

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA
DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS, DAPIRONA E
CITRATO DE SILDENAFIL EM MATRIZES DIVERSAS**

PATRÍCIA LOS WEINERT

Tese de Doutorado
2008

Patrícia Los Weinert

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA
DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS, DAPIRONA E
CITRATO DE SILDENAFIL EM MATRIZES DIVERSAS**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Redigolo Pezza
Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza

ARARAQUARA
2008

DADOS CURRICULARES

1. Formação Acadêmica

1.1. Graduação

Química – Licenciatura, Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG

Período: 1999 a 2002

1.2. Pós-Graduação

1.2.1. *Mestrado em Química*, Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Período: 02/2003 a 07/2004.

1.2.2. *Doutorado em Química*, Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Período: 08/2004 a 01/2008.

2. Artigos Aceitos ou Publicados

2.1. Weinert, P. L.; Oliveira, J. E.; Pezza, H. R.; Pezza, L. A simplified spectrophotometric method for routine analysis of saccharin in commercial non caloric sweeteners. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, n. 26, p. 7788-7792, 2004.

2.2. Ciappina, E. G.; Weinert, P. L.; Santini, A. O.; Gotardo, M. A.; Pezza, H. R.; Pezza, L. Spectrophotometric determination of diclofenac in pharmaceutical preparations assisted by microwave oven. *Eclética Química.*, v. 30, n. 1, p. 29-36, 2005.

2.3. Weinert, P. L.; Pezza, H. R.; Pezza, L. Determination of dipyrone in pharmaceutical formulations by combined *spot test* / diffuse reflectance spectroscopy. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 18, n. 4, p. 846-854, 2007. (Anexo 1).

2.4. Weinert, P. L.; Fernandes, J. R.; Pezza, L.; Pezza, H. R. Flow-Injection Spectrophotometric Determination of Novalgin in Pharmaceuticals using Micellar Medium. *Anal. Sci.*, v. 23, p. 1 - 7, 2007. (Anexo 2).

2.5. Weinert, P. L.; Pezza, H. R.; Pezza, L. Determinação espectrofotométrica de Viagra[®] em formulações farmacêuticas. Aceito para publicação: *Quím. Nova*, 2007. (Anexo 3).

3. Trabalhos apresentados em Congresso

3.1. Weinert, P. L.; Pezza, L.; Pezza, H. R. Determinação de sulfonamidas em medicamentos por análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica em meio micelar. In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa. Painel EP-081.

3.2. Weinert, P. L.; Pezza, L.; Pezza, H. R. Determinação de Bumetanida em medicamentos e urina via análise por injeção em fluxo em meio micelar. In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa. Painel EP-015.

3.3. Spazzapam, L. L.; Weinert, P. L.; Pezza, L.; Pezza, H. R. Determinação de cloridrato de ranitidina em formulações farmacêuticas por espectroscopia de reflectância difusa. In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa. Painel EP-007.

3.4. Weinert, P. L.; Pezza, L.; Pezza, H. R. Determinação de Bumetanida em formulações farmacêuticas por análise por injeção com detecção espectrofotométrica. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia. Livro de Resumos p. QA-110.

3.5. WEINERT, P. L., CESPEDES, R. M., PEZZA, H. R., PEZZA, L. Determinação de Ferro (II) em medicamentos por espectroscopia de reflectância difusa. In: 29ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. Livro de Resumos p. QA-195.

3.6. WEINERT, P. L., RUFINO, J. L., PEZZA, H. R., PEZZA, L. Determinação espectrofotométrica de antibióticos da classe das tetraciclina em formulações farmacêuticas com cloramina-T. In: 29ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. Livro de Resumos p. QA-065.

3.7. WEINERT, P. L., PEZZA, L., PEZZA, H. R. Determinação espectrofotométrica de Viagra® em formulações farmacêuticas. In: 29ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. Livro de Resumos QA-268.

3.8. WEINERT, P. L., POLLO, F., PEZZA, H. R., PEZZA, L. Determinação de bumetanida em medicamentos utilizando espectroscopia de reflectância difusa In: 29ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia.

3.9. WEINERT, P. L., PEZZA, L., PEZZA, H. R. Desenvolvimento de spot test quantitativo utilizando quimiometria para determinação de dipirona por espectroscopia de reflectância difusa In: Encontro Nacional de Química Analítica e 1º Congresso Ibero-Americano de Química Analítica, 2005, Niterói. QA- 444.

3.10. WEINERT, P. L., LIMA, L. S.; SANTOS, E. C. S.; PEZZA, L., PEZZA, H. R. Determinação espectrofotométrica de ranitidina em formulações farmacêuticas. In: Encontro Nacional de Química Analítica e 1º Congresso Ibero-Americano de Química Analítica, 2005, Niterói, Apresentado sob a forma de Painel (QA – 446) e oralmente.

3.11. WEINERT, P. L., PEZZA, L., RIBEIRO, P. R. S., PEZZA, H. R. Determinação espectrofotométrica de metildopa na forma pura e em formulações farmacêuticas In: XXVI Congresso Latino-americano de Química 27^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador. Livro de Resumos: p. QA-249.

3.12. WEINERT, P. L., PEZZA, L., PEZZA, H. R. Determinação Espectrofotométrica de Sacarina em Adoçantes Artificiais In: XXVI Congresso Latino-americano de Química 27^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador. Livro de Resumos: p. QA- 205.

3.13. WEINERT, P. L., LAZZAROTTO, M. Avaliação das Propriedades Extratoras de Metais Alcalinos e Alcalino-terrosos de Imidodiacetatos de Calixarenos. In: II Encontro de Pesquisa da UEPG. Ponta Grossa, 2002.

3.14. WEINERT, P. L., LAZZAROTTO, M., NACHTIGALL, F. F. Calixareno Amido e Iminoésteres: extração seletiva de cátions de metais alcalinos In: 25^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002, Poços de Caldas. Livro de resumos p.QO-011.

3.15. WEINERT, P. L., LAZZAROTTO, M. Avaliação das Propriedades Extratoras de Metais Alcalinos de Novos Derivados de Calixarenos In: X Encontro Anual de Iniciação Científica, 2001, Ponta Grossa. In: Anais do X Encontro Anual de Iniciação Científica. Ponta Grossa, 2001. v.1. p.199 – 200.

3.16. WEINERT, P. L., NACHTIGALL, F. F., GALAN, V., LAZZAROTTO, M. Síntese do p-Nitrocalix[6]areno-reação com aminas In: IX Encontro de Química da Região Sul, 2001, Maringá. Anais do IX Encontro de Química da Região Sul, QO-062, v.1.

3.17. WEINERT, P. L., NACHTIGALL, F. F., GALAN, V., LAZZAROTTO, M. Imidociacetatos de calixarenos: extração de metais alcalinos e alcalino-terrosos In: IX Encontro de Química da Região Sul, 2001, Maringá. Anais do IX Encontro de Química da Região Sul, p. QO-047, v.1.

3.18. WEINERT, P. L., LAZZAROTTO, M., NACHTIGALL, F. F., NOME, F. Calixarenos-Aminoácidos: Extração de Cátions Alcalinos In: 23 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2000, Poços de Caldas. Anais da 23^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, v. 2. p. QO-01.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz César e Gerda,

Aos meus irmãos, Luiz César e Sheila,

Por todo carinho, compreensão,

pelo incentivo e amor dados

incondicionalmente em todos

os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar-me em toda minha vida, sempre fiel.

Aos meus pais e aos meus irmãos, que sempre me incentivaram e deram forças, carinho e amor.

A Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza, obrigada pela confiança, paciência, orientação e dedicação ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leonardo Pezza, obrigada pela co-orientação, pelas sugestões e apoio.

A Sandra, mais que uma amiga, uma mãe. Obrigada por tudo.

Aos colegas de laboratório: Mara, Paulo, Rafael, Leonardo (Bob), Fabrícia, Laura, Fritz, Zé Rufino, Thiago, Rodrigo, Marcos (Marcão) e Joel, obrigada pela paciência e amizade.

As queridas amigas: Liliane, Sahra e Fernanda, por toda ajuda, compreensão, paciência, carinho e amizade.

As queridas amigas: Elaine e Luciana, obrigada pela amizade, mesmo longe, sempre presentes.

Aos colegas do Grupo LATIG: Cláudio, Adriano, Patrícia, Beatriz, Emanuel, Gilbert, Elías pelo carinho e amizade.

Aos técnicos do laboratório didático: Poli, Valter e Maria.

Ao Departamento de Química Analítica deste Instituto, pela oportunidade de ministrar aulas junto à graduação.

A todos os funcionários do IQ, principalmente as bibliotecárias e secretárias da seção de pós-graduação, que sempre foram muito solícitas.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

A todos, muito obrigada.

*Se alguém lhe bloquear a porta,
não gaste energia com o confronto,
Procure as janelas.*

*Lembre-se da sabedoria da água:
“... a água nunca discute com os seus obstáculos,
mas os contorna.”*

*Quando alguém o ofender ou o frustrar,
você é a água
e a pessoa que o feriu é o obstáculo!
Contorne-o sem discutir.*

*“Quem te faz chorar, não te merece”.
“Aprenda a amar,
sem esperar muito dos outros.”*

Autor desconhecido

RESUMO

Este trabalho propõe métodos analíticos simples, rápidos e de baixo custo para determinação de dipirona, citrato de sildenafil (Viagra®) e sulfonamidas em formulações farmacêuticas e também o *screening* de sulfonamidas em amostras complexas, tais como urina, água superficial e leite bovino. A determinação de Viagra® foi efetuada utilizando a técnica de espectrofotometria com medidas na região visível do espectro. O método envolveu a reação entre citrato de sildenafil e tetraclorobenzoquinona (*p*-cloranil), acelerada pela adição de H₂O₂ produzindo um complexo colorido estável ($\lambda = 535$ nm). Para a determinação de dipirona foram empregados um método reflectométrico e o procedimento de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica. Ambos baseiam-se na reação entre dipirona e *p*-dimetilaminocinamaldeído em meio ácido, com formação de produto colorido ($\lambda = 510$ nm), sobre a superfície de um papel de filtro no método reflectométrico e em solução no procedimento em fluxo. Neste último método, o uso de meio micelar conferiu significativo aumento na sensibilidade analítica, possibilitando o desenvolvimento de um método bastante sensível para a determinação de dipirona. O *screening* de sulfonamidas em urina, água superficial e leite bovino empregando procedimento de análise por injeção em fluxo em meio micelar com detecção espectrofotométrica ($\lambda = 555$ nm) está baseado na reação entre sulfonamidas e *p*-dimetilaminocinamaldeído em meio ácido. Para as duas primeiras amostras foi possível o emprego da extração em fase sólida acoplada diretamente ao sistema em fluxo. O uso de meio micelar conferiu ao método grande sensibilidade analítica possibilitando sua aplicação no *screening* dos analitos de acordo com o valor de limite máximo de resíduo permitido (100 ppb). O meio micelar também permitiu a eluição dos analitos retidos em minicoluna de C-18 sem a necessidade de empregar solventes orgânicos. As condições experimentais para o desenvolvimento de todos os métodos propostos foram otimizadas com auxílio de planejamento de experimentos. Para validação dos métodos desenvolvidos foram avaliados alguns parâmetros considerados importantes, tais como: exatidão, precisão, limite de detecção ($LD = 3 SD^{\text{Branco}} / \text{inclinação da curva analítica}$), limite de quantificação ($LQ = 10 SD^{\text{Branco}} / \text{inclinação da curva analítica}$), recuperação e interferência dos excipientes comumente encontrados nas formulações farmacêuticas. Os métodos desenvolvidos foram aplicados na análise dos fármacos

em amostras reais com resultados satisfatórios em termos de precisão e exatidão. Os métodos desenvolvidos são alternativas vantajosas em relação a outros métodos disponíveis, pois são simples, rápidos, portáteis (métodos reflectométrico e espectrofotométrico), ambientalmente amigáveis (envolvem o baixo consumo de reagentes e amostras) e não requerem procedimentos específicos ou complicados para o preparo das amostras.

Palavras-chave: espectroscopia de reflectância difusa; *spot test*; espectrofotometria; análise por injeção em fluxo, micelas, dipirona, citrato de sildenafil, sulfonamidas.

ABSTRACT

This work proposes simple, fast and of low cost analytic methods for dipyrone, sildenafil citrate (Viagra[®]) and sulfonamides in pharmaceutical formulations and also the sulfonamides screening in complex samples, such as urine, water and bovine milk. The determination of Viagra[®] was carried out using the spectrophotometry technique with detection on the visible spectrum. The method involved the reaction between sildenafil citrate and tetrachlorobenzoquinone (*p*-chloranil), accelerated by the addition of H₂O₂ producing a stable colored complex ($\lambda = 535$ nm). For the dipyrone determination a reflectometric method and the flow injection analysis with spectrophotometric detection procedure were used. The both methods are based on the reaction between dipyrone and *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (*p*-DAC) in acid medium, with formation of a colored product ($\lambda = 510$ nm), on the surface of a filter paper to the reflectometric method and in solution for the procedure in flow. In this last method, the use of micelar medium granted a significant increase of the analytic sensibility, allowed the development of a quite sensitive method for dipyrone determination. The sulfonamide screening in urine, water and bovine milk using the flow injection analysis procedure in micelar medium with spectrophotometric detection ($\lambda = 555$ nm) is based on the reaction between sulfonamides and *p*-DAC in acid medium. For the two first samples the solid phase extraction coupled directly at flow system was possible. The use of micelar medium granted to the method a great analytical sensibility allowed its application for the screening of the analytes in agreement with the residue maximum limit value acceptable (100 ppb). The micelar medium also allowed the elution of the analytes retained on the C-18 minicolumns without the need of the use the organic solvents. The experimental design methodologies were used to optimize the proposed methods. For validation of the developed methods some important parameters were available, such as: accuracy, precision, detection limit ($LD = 3 SD^{Blank}$ / inclination of the analytical curve), quantification limit ($LQ = 10 SD^{Blank}$ / inclination of the analytical curve), recovery and interference of common excipients present in pharmaceutical formulations. The developed methods were applied in the analysis of drugs in real samples with satisfactory results in relation to precision and accuracy. The developed methods are an advantageous alternative to other available methods, because they are simple, rapid, portable (reflectometric and spectrophotometric methods), environmentally

friendly (requires extremely low consumption of reagents/solvents) and does not involve specific or complicated sample treatments.

Keywords: diffuse reflectance spectroscopy; spot test; spectrophotometry; flow injection analysis, micelles, dipyrone, sildenafil citrate, sulfonamides.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Estrutura química da dipirona sódica. | 39 |
| Figura 2. Estrutura química do citrato de sildenafil (Viagra®). | 41 |
| Figura 3. Estrutura da sulfanilamida (precursor das sulfas). | 42 |
| Figura 4. Distribuição dos trabalhos publicados para determinação de dipirona de acordo com a técnica analítica empregada. | 46 |
| Figura 5. Distribuição das publicações sobre métodos analíticos para determinação de Citrato de sildenafil. | 56 |
| Figura 6. Distribuição das publicações sobre métodos para análise de sulfonamidas encontradas na literatura até o mês de outubro de 2007. | 67 |
| Figura 7. Distribuição das publicações sobre métodos para análise de sulfonamidas encontradas na literatura até o mês de outubro de 2007 em função da matriz analisada. | 68 |
| Figura 8. Distribuição das publicações sobre métodos para análise de sulfonamidas encontradas na literatura até o mês de outubro de 2007 em função da técnica analítica utilizada. | 69 |
| Figura 9. Classificação de um conjunto através de métodos de <i>screening</i> . As amostras em vermelho contêm um analito em nível de concentração acima do valor de corte. | 88 |
| Figura 10. Distribuição das publicações encontradas envolvendo o uso da espectroscopia de reflectância difusa com medidas na região visível do espectro, de acordo com a década. | 96 |
| Figura 11. Espectro de absorção do produto da reação na presença e na ausência de peróxido. Concentrações finais: citrato de sildenafil $1,70 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, <i>p</i> -cloranil $3,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2O_2 $0,33 \text{ mol L}^{-1}$, em meio de metanol/dioxano (4,36/0,64). Caminho óptico = 1 cm. Medidas efetuadas após 10 minutos da adição dos reagentes. | 107 |
| Figura 12. Provável mecanismo para reação com <i>p</i> -cloranil. a) reação de substituição; b) reação de transferência de carga. | 108 |
| Figura 13. (a) Superfície de resposta otimizada com sua respectiva (b) curva de nível para a leitura de absorbância ($\lambda = 535 \text{ nm}$) em função das variáveis independentes: Volume de <i>p</i> -cloranil ($1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e volume de H_2O_2 $5,00 \text{ mol L}^{-1}$. A concentração final de citrato de sildenafil foi mantida constante ($1,13 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em todos os experimentos. | 113 |
| Figura 14. Curva analítica obtida para determinação de Citrato de sildenafil em triplicata. | 115 |
| Figura 15. Estudo da estabilidade óptica do produto da reação formado. Condições experimentais: 1,50 mL de citrato de sildenafil ($5,68 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$); 640 μL de <i>p</i> -cloranil ($1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e 330 μL de H_2O_2 ($5,00 \text{ mol L}^{-1}$), em meio de metanol/dioxano (4,36/0,64) em balão volumétrico de 5 mL a temperatura ambiente (25°C). | 116 |
| Figura 16. Suporte utilizado na realização dos <i>spot tests</i> (Baseado em: TUBINO et al). | 125 |
| Figura 17. Espectro de reflectância da reação de spot test no papel de filtro entre dipirona, <i>p</i> -DAC, em meio de ácido acético. Valores de A_R foram obtidos após o papel secar ao ar por 15 minutos. O valor máximo de A_R foi em 510 nm. Dipirona sódica = $8,56 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. | 128 |

| | |
|---|-----|
| Figura 18. Mecanismo da hidrólise ácida da dipirona sódica. | 129 |
| Figura 19. Mecanismo provável para a reação entre dipirona sódica e <i>p</i> -DAC, em meio ácido. | 130 |
| Figura 20. Gráfico dos efeitos principais e de interação estimados para as variáveis estudadas. | 133 |
| Figura 21. Superfície de resposta otimizada com sua respectiva curva de nível para a leitura de reflectância em 510 nm em função das variáveis: concentração de <i>p</i> -DAC % (m/v) e volume de ácido acético glacial (μL). Foram adicionados 10 μL de dipirona $2,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em todos os experimentos. | 136 |
| Figura 22. Curva analítica. Concentrações das soluções padrão de Dipirona: $1,42 \times 10^{-4}$ a $2,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Cada ponto foi analisado em triplicata. | 138 |
| Figura 23. Estudo da estabilidade óptica do produto da reação de spot test entre dipirona sódica e <i>p</i> -DAC, em meio ácido. Condições: 20 μL de <i>p</i> -DAC 0,8 % (m/v); 20 μL de ácido acético glacial e 10 μL de solução de dipirona sódica $2,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ nesta ordem de adição. | 140 |
| Figura 24. Foto do sistema de análise modular ASIA, Ismatec (Zurique, Suíça). Módulo 1: Bomba peristáltica de rotação variável; Módulo 2: Bomba peristáltica de rotação fixa; Módulo 3: Válvula de 6 caminhos, Rheodyne 5011; Módulo 4: Válvula de injeção Rheodyne 5041. | 147 |
| Figura 25. Diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo para determinação de dipirona. T solução transportadora (SDS $2,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) com vazão de $3,3 \text{ mL min}^{-1}$; R solução reagente de <i>p</i> -DAC 0,054 % (m/v) preparada em HCl $2,22 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ com vazão de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$; A soluções padrão ou amostra (alça de amostragem 880 μL); VI : válvula de injeção; x ponto de confluência; B bobina reacional (250 cm); E espectrofotômetro (510 nm); D descarte. | 150 |
| Figura 26. Diagrama esquemático para uma válvula de injeção em suas posições de amostragem e injeção. | 151 |
| Figura 27. Espectro de absorção do produto colorido formado. a : com adição de SDS; b : sem adição de SDS. | 154 |
| Figura 28. Gráfico dos efeitos principais e de interação estimados para as variáveis estudadas. | 158 |
| Figura 29. (a) Superfície de resposta otimizada com sua respectiva (b) curva de nível para a leitura de absorbância ($\lambda = 510 \text{ nm}$) em função das variáveis independentes: Volume de amostra e comprimento da bobina. A concentração final de dipirona sódica foi mantida constante ($2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em todos os experimentos. | 160 |
| Figura 30. Gráfico dos efeitos principais e de interação estimados para as variáveis estudadas. | 163 |
| Figura 31. (a) Superfície de resposta otimizada com sua respectiva (b) curva de nível para a leitura de absorbância ($\lambda = 510 \text{ nm}$) em função das variáveis independentes: [HCl] e [<i>p</i> -DAC]. A concentração final de dipirona sódica foi mantida constante ($2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em todos os experimentos. | 165 |
| Figura 32. Diagrama da curva analítica. Sinais transientes obtidos na injeção de soluções padrão de dipirona sódica da esquerda para direita ($1,45 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ - $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Cada ponto foi analisado com repetições ($n = 4$). | 167 |

| | |
|---|-----|
| Figura 33. Curva analítica. Concentrações das soluções padrão de Dipirona: $1,45 \times 10^{-6}$ a $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Cada ponto foi analisado com repetições ($n = 4$). | 168 |
| Figura 34. Diagrama para estudo da repetibilidade. Sinais transientes obtidos na injeção de soluções de amostra de dipirona sódica nas concentrações (A): $2,90 \times 10^{-6}$, (B): $5,80 \times 10^{-6}$ e (C): $1,45 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 10$). | 172 |
| Figura 35. Estrutura química das sulfonamidas estudadas neste trabalho. | 179 |
| Figura 36. Diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo para determinação de sulfonamidas. T solução transportadora (SDS $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) com vazão de $2,48 \text{ mL min}^{-1}$; R solução de reagente de <i>p</i> -DAC 0,013 % (m/v) preparada em HCl $3,70 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ com vazão de $1,28 \text{ mL min}^{-1}$; A soluções padrão ou amostra (alça de amostragem $505 \mu\text{L}$); VI : válvula de injeção; x ponto de confluência; B bobina reacional (40,0 cm); E espectrofotômetro (555 nm); D descarte. | 183 |
| Figura 37. Representação esquemática da configuração do sistema FIA acoplado a EFS para o <i>screening</i> de sulfonamidas. a) posição de retenção e limpeza; b) posição de eluição; VI : válvula de injeção com alça de amostragem de $505 \mu\text{L}$; Bobina reacional de 40 cm; E : espectrofotômetro ($\lambda = 555 \text{ nm}$); coluna: minicoluna confeccionada. | 184 |
| Figura 38. Foto do sistema de FIA acoplado a EFS. a) Foto do sistema mostrando a seleção da amostra pela alça de amostragem que na seqüência passa pela minicoluna e após limpeza e eluição conflui com a solução reagente e atinge o detector; b) Destaque para a posição de inserção da minicoluna no sistema FIA; c) Minicolunas construídas. | 187 |
| Figura 39. Provável mecanismo para a reação entre sulfamezarina e <i>p</i> -DAC em meio ácido. | 197 |
| Figura 40. Gráfico dos efeitos principais para as variáveis estudadas no planejamento inicial para otimização do sistema de <i>screening</i> . | 200 |
| Figura 41. Espectro de absorção do produto colorido formado. Linha cheia: com adição de SDS; Linha tracejada: sem adição de SDS. | 202 |
| Figura 42. Sinais transientes obtidos no estudo para definição da configuração do sistema FIA. a): picos com desdobramento; b): picos uniformes. | 205 |
| Figura 43. Gráfico dos efeitos principais estimados para as variáveis estudadas. | 208 |
| Figura 44. Gráfico dos efeitos principais e de interação estimados para as variáveis estudadas. | 210 |
| Figura 45. Superfície de resposta e a correspondente curva de nível otimizada para a leitura de absorbância ($\lambda = 555 \text{ nm}$) em função das variáveis independentes: Concentração de <i>p</i> -DAC e concentração de HCl. A concentração final de sulfamezarina foi mantida constante ($5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) em todos os experimentos. | 212 |
| Figura 46. Gráfico dos efeitos principais para as variáveis estudadas na otimização da EFS <i>on-line</i> . | 216 |
| Figura 47. Representação gráfica dos resultados obtidos na otimização do tempo de injeção da amostra para o procedimento FIA com EFS <i>on-line</i> no modo univariado. | 218 |
| Figura 48. Curvas analíticas para as sulfonamidas estudadas. As concentrações das soluções padrão de sulfonamidas compreendem a faixa de concentração de 0,050 a 5,00 ppm. Cada ponto foi analisado em replicatas ($n = 3$). | 219 |

| | |
|--|-----|
| Figura 49. Fiagrama obtido no registro dos sinais transientes obtidos no monitoramento da absorbância em 555 nm em função do tempo durante a construção da curva analítica para sulfametazina . | 220 |
| Figura 50. Curva analítica com medidas de triplicata obtidas para sulfacetamida sódica pelo procedimento em fluxo acoplado a EFS. | 222 |
| Figura 51. Fiagrama obtido no registro dos sinais transientes obtidos no monitoramento da absorbância em 555 nm em função do tempo durante a construção da curva analítica para sulfacetamida sódica. As medidas foram feitas em triplicata e as últimas referem-se à medida do branco. | 222 |
| Figura 52. Cromatograma obtido para a separação das sulfonamidas estudadas neste trabalho utilizando as condições descritas no procedimento experimental. Concentração individual para as sulfas é de 20 ng mL ⁻¹ 1: sulfanilamida; 2: sulfacetamida sódica; 3: sulfatiazol; 4: Sulfamezarina; 5: sulfametazina; 6: sulfametoxipiridazina e 7: sulfametoxazol. | 225 |
| Figura 53. Curvas analíticas obtidas pelo método CLAE-UV para soluções padrão de sulfonamidas na faixa de concentrações de 10 a 170 ng mL ⁻¹ . | 226 |
| Figura 54. Porcentagem de falsos positivos e falsos negativos obtidos no screening de sulfonamidas em amostras aquosas sintéticas. | 228 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Características principais dos métodos espectrofotométricos propostos para análise de citrato de sildenafil por Amin e El-Beshbershy. | 65 |
| Tabela 2. Principais características dos métodos espectrofotométricos baseados na reação de diazotação propostos para determinação de sulfonamidas. | 72 |
| Tabela 3. Características dos principais métodos de CLAE descritos para análise de sulfonamidas. | 76 |
| Tabela 4. Exemplos de aplicações dos métodos de <i>screening</i> . | 89 |
| Tabela 5. Amostras analisadas pelo método espectrofotométrico desenvolvido. | 102 |
| Tabela 6. Seleção dos solventes para o desenvolvimento do método espectrofotométrico para determinação de Citrato de sildenafil. | 106 |
| Tabela 7. Resultados obtidos para o planejamento composto central executado na otimização do método espectrofotométrico para determinação de Citrato de sildenafil. | 111 |
| Tabela 8. Valores de absorbância obtidos em 535nm para a construção da curva analítica para determinação de citrato de sildenafil através de sua reação com <i>p</i> -cloranil em presença de peróxido. | 115 |
| Tabela 9. Valores de absorbância medidos em 535 nm no estudo da estabilidade ótica do produto colorido formado na reação entre Citrato de sildenafil e <i>p</i> -cloranil na presença e ausência de peróxido de hidrogênio. | 117 |
| Tabela 10. Determinação de Citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas. | 118 |
| Tabela 11. Resultados de recuperação de Citrato de sildenafil adicionado às formulações farmacêuticas pré-analisadas. | 120 |
| Tabela 12. Principais figuras de mérito para o método espectrofotométrico proposto para a determinação de citrato de sildenafil. | 121 |
| Tabela 13. Amostras comerciais de medicamentos analisados contendo dipirona sódica. | 124 |
| Tabela 14. Matriz do planejamento fatorial 2 ³ para triagem das variáveis importantes na realização do <i>spot test</i> juntamente com os resultados de reflectância obtidos. | 132 |
| Tabela 15. Matriz experimental do planejamento composto central, juntamente com os resultados experimentais obtidos para o método reflectométrico desenvolvido para determinação de dipirona. Em todos os ensaios foram adicionados 10µl de dipirona sódica $2,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. | 135 |
| Tabela 16. Valores de reflectância obtidos na construção da curva analítica para determinação de dipirona através da reação com 20 µL de <i>p</i> -DAC 0,8 % (m/v) e 20 µL de ácido acético glacial em suporte sólido (papel de filtro). | 138 |
| Tabela 17. Resultados de $A_{R\ 510\ \text{nm}}$ obtidos no estudo da estabilidade ótica do produto colorido obtido sobre a superfície do papel de filtro. | 140 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 18. Resultados obtidos no estudo de interferentes para o método de <i>spot-test</i> combinado a espectroscopia de reflectância difusa proposto para a determinação de dipirona sódica. | 141 |
| Tabela 19. Determinação de dipirona em formulações farmacêuticas pelo método de <i>spot-test</i> combinado a espectroscopia de reflectância difusa. | 142 |
| Tabela 20. Resultados de recuperação de dipirona adicionada nas formulações farmacêuticas pré-analisadas pelo método de <i>spot-test</i> combinado a espectroscopia de reflectância difusa. | 144 |
| Tabela 21. Principais figuras de mérito para o método de <i>spot-test</i> combinado a espectroscopia de reflectância difusa proposto para a determinação de dipirona sódica. | 145 |
| Tabela 22. Verificação do efeito da presença de SDS sobre a reação colorimétrica proposta para o desenvolvimento do procedimento de FIA para determinação de dipirona. | 154 |
| Tabela 23. Matriz experimental do planejamento fatorial 2^3 para triagem das variáveis físicas do sistema de FIA desenvolvido para determinação de dipirona. | 157 |
| Tabela 24. Matriz experimental do planejamento composto central para otimização das variáveis físicas do sistema de FIA desenvolvido para a determinação de dipirona, juntamente com os resultados experimentais obtidos. | 159 |
| Tabela 25. Matriz experimental para o planejamento fatorial 2^3 para triagem das variáveis químicas do sistema de FIA desenvolvido para determinação de dipirona. | 162 |
| Tabela 26. Matriz experimental do planejamento composto central para otimização das variáveis químicas do sistema de FIA desenvolvido para a determinação de dipirona, juntamente com os resultados experimentais obtidos. | 164 |
| Tabela 27. Valores de absorbância obtidos para a construção da curva analítica para o procedimento em fluxo para determinação de dipirona. | 167 |
| Tabela 28. Determinação de dipirona em formulações farmacêuticas empregando o procedimento FIA desenvolvido. | 169 |
| Tabela 29. Resultados obtidos no estudo de interferentes na aplicação do procedimento FIA proposto para determinação de dipirona sódica. | 170 |
| Tabela 30. Resultados de recuperação de dipirona obtidos pelo método da adição de padrão no procedimento de FIA desenvolvido. | 173 |
| Tabela 31. Principais figuras de mérito para o método em fluxo desenvolvido para determinação de dipirona sódica. | 174 |
| Tabela 32. Amostras de medicamentos contendo sulfonamidas analisados pelo procedimento de FIA desenvolvido. | 181 |
| Tabela 33. Amostras de leite analisados pelo procedimento de <i>screening</i> desenvolvido. | 183 |
| Tabela 34. Matriz experimental para o planejamento fatorial completo 2^3 inicial executado para o desenvolvimento do procedimento de <i>screening</i> . | 199 |
| Tabela 35. Verificação do efeito da adição de SDS ao meio reacional para o desenvolvimento da reação colorimétrica proposta para o procedimento de <i>screening</i> . | 201 |
| Tabela 36. Variáveis examinadas e seus níveis estudados no planejamento fracionário 2^{6-2} realizado para a otimização do procedimento de <i>screening</i> . | 206 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 37. Matriz experimental (codificada) para o planejamento fracionário 2^{6-2} realizado para a otimização do procedimento de <i>screening</i> com os resultados obtidos. | 207 |
| Tabela 38. Matriz experimental para o planejamento completo 2^3 realizado na otimização do procedimento de <i>screening</i> . | 209 |
| Tabela 39. Matriz experimental para o planejamento composto central realizado para a otimização do procedimento de <i>screening</i> . | 211 |
| Tabela 40. Fatores e seus respectivos níveis examinados para a otimização do procedimento de EFS no modo <i>on-line</i> . | 215 |
| Tabela 41. Matriz experimental (codificada) para o planejamento fracionário 2^{6-3} realizado para a otimização do procedimento de EFS no modo <i>on-line</i> com os resultados obtidos. | 216 |
| Tabela 42. Resultados obtidos na otimização do tempo de injeção da amostra para o procedimento FIA com EFS <i>on-line</i> no modo univariado. | 217 |
| Tabela 43. Relação linear observada para cada uma das sulfonamidas estudadas pelo procedimento FIA desenvolvido para o <i>screening</i> com tratamento das amostras não automatizado. | 220 |
| Tabela 44. Relação linear observada para cada uma das sulfonamidas estudadas pelo procedimento de CLAE utilizado para as medidas de quantificação. | 226 |
| Tabela 45. Resultados obtidos na análise confirmatória – CLAE das amostras falsas (positivas e/ou negativas). | 227 |
| Tabela 46. Resultados de recuperação de sulfonamidas obtidos na aplicação do sistema de <i>screening</i> em amostra de urina. | 230 |
| Tabela 47. Resultados de recuperação de sulfonamidas obtidos na aplicação do sistema de <i>screening</i> em amostras de águas superficiais. | 231 |
| Tabela 48. Resultados de recuperação de sulfonamidas obtidos na aplicação do sistema de <i>screening</i> em amostras de leite. | 234 |
| Tabela 49. Resultados obtidos na análise de medicamentos a base de sulfas pelo procedimento FIA desenvolvido. | 235 |
| Tabela 50. Resultados de recuperação de sulfonamidas adicionadas às formulações farmacêuticas pré-analisadas. | 237 |
| Tabela 51. Resultados obtidos no estudo de interferentes em formulações farmacêuticas contendo SFAs. | 238 |
| Tabela 52. Resultados obtidos no estudo de interferentes no procedimento de <i>screening</i> . | 239 |
| Tabela 53. Figuras de mérito do método de FIA proposto para análise de sulfonamidas. | 242 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA análise de variância

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BsDA *Bacillus stearothermophilus* disk assay

CCD cromatografia em camada delgada

CCDAE cromatografia em camada delgada de alta eficiência

CG cromatografia gasosa

CLAE cromatografia líquida de alta eficiência

cmc concentração micelar crítica

C₁₈ grupo octadecilsilano ligado a sílica

C₈ grupo octil ligado a sílica

DAD detector de arranjo de diodos

DCQ 2,6-dicloroquinona-4-cloroimida

DDQ 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona

DEF dicionário de especialidades farmacêuticas

DMFS dispersão da matriz em fase sólida

DNA ácido desoxirribonucléico

EC eletroforese capilar

ECC eletroforese cinética capilar

ECCM eletroforese cinética capilar micelar

EDTA ácido etilediaminotetracético

EFS extração em fase sólida

ELISA *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

ELL extração líquido-líquido

EM espectroscopia de massas

ETE estação de tratamento de esgoto

FAO Food and Agriculture Organization

FDA Food and Drug Administration

FIA análise por injeção em fluxo

IUPAC *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LD limite de detecção

LDR *light dependent resistor* (resistor dependente de luz)

LED *light emitting diode* (diodo emissor de luz)

LMR (s) limite máximo de resíduo (s)

LQ limite de quantificação

MBTH 3-metil-2-benzoatiazona hidrazona

MSR metodologia da superfície de resposta

ND não descrito

OMS Organização Mundial de Saúde

PABA ácido *p*-aminobenzóico

PAMVet Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários

PCR regressão de componentes principais

p-DAB *p*- dimetilaminobenzaldeído

p-DAC *p*-dimetilaminocinamaldeído

PLS mínimos quadrados parciais

PM. Peso molecular

ppb partes por bilhão

ppm partes por milhão

PTFE politetrafluoretileno

PVC cloreto de polivinila

RDC resolução da diretoria colegiada

RENAME Relação nacional de medicamentos essenciais

RMN ressonância magnética nuclear

rpm rotações por minuto

R.S.D. desvio padrão relativo

S.D. desvio padrão

SDS dodecil sulfato de sódio

SFA (s) sulfonamida (s)

TCNE tetracianoetileno

TCNQ 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano

UF ultrafiltração

UV Ultravioleta

Vis visível

WHO World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

A absorbância

A_R densidade óptica para medida de reflectância

b caminho óptico

C concentração

I intensidade da radiação refletida

I_0 intensidade da radiação incidente

r coeficiente de correlação linear

R reflectância ou poder de reflexão

s coeficiente de dispersão

ε absortividade molar

k coeficiente de absorção molar

$\lambda_{\text{máx.}}$ comprimento de onda de máxima absorção

ξ_i variáveis examinadas pelo planejamento de experimentos composto central

x_i níveis definidos para as variáveis no planejamento de experimentos composto central

d_i diferença entre os níveis examinados no planejamento de experimentos composto central

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO | 29 |
| I.1. MEDICAMENTOS - CONSIDERAÇÕES GERAIS | 33 |
| I.1.1. Falsificação de medicamentos | 33 |
| I.1.2. Medicamentos veterinários: resíduos e impactos na segurança da saúde e do meio ambiente | 34 |
| II.1. DAPIRONA SÓDICA | 38 |
| II.2. CITRATO DE SILDENAFIL (VIAGRA®) | 39 |
| II.3. ANTIMICROBIANOS | 41 |
| II.3.1. Sulfonamidas..... | 42 |
| III.1. DAPIRONA | 46 |
| III.1.1. Espectrofotometria UV-Vis..... | 47 |
| III.1.2. Métodos eletroquímicos..... | 49 |
| III.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência..... | 50 |
| III.1.4. Métodos empregando a análise por injeção em fluxo | 52 |
| III.2. CITRATO DE SILDENAFIL | 55 |
| III.2.1. Métodos de separação..... | 57 |
| III.2.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência | 57 |
| III.2.1.2. Eletrocromatografia cinética capilar | 59 |
| III.2.1.3. Cromatografia gasosa | 61 |
| III.2.2. Métodos eletroquímicos..... | 61 |
| III.2.2.1. Voltametria | 62 |
| III.2.2.2. Potenciometria | 63 |
| III.2.3. Métodos espectrofotométricos | 64 |
| III.2.4. Outros métodos para determinação de citrato de sildenafil..... | 66 |
| III.3. SULFONAMIDAS | 67 |
| III.3.1. Considerações gerais..... | 67 |
| III.3.1.1. Métodos de preparo das amostras | 70 |
| III.3.2. Métodos de análise – técnicas analíticas | 71 |
| III.3.2.1. Espectrofotometria UV-Vis | 71 |
| III.3.2.2. Métodos de separação..... | 74 |

| | |
|---|------------|
| III.3.2.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência | 75 |
| III.3.2.2.2. Cromatografia gasosa..... | 79 |
| III.3.2.2.3. Eletroforese capilar de alta eficiência | 81 |
| III.3.2.3. Métodos microbiológicos | 82 |
| III.3.2.4. Métodos imunológicos..... | 83 |
| III.3.2.6. Outros métodos..... | 84 |
| | |
| IV.1. MÉTODOS DE SCREENING: CONSIDERAÇÕES GERAIS | 86 |
| | |
| IV.2. ESPECTROFOTOMETRIA: ESTRATÉGIAS PARA AUMENTO DA SENSIBILIDADE..... | 89 |
| | |
| IV.3. ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA): CONSIDERAÇÕES GERAIS.... | 91 |
| | |
| IV.4. ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA: CONSIDERAÇÕES GERAIS | 92 |
| | |
| V.1. IMPORTÂNCIA E RELEVÂNCIA DO TEMA..... | 98 |
| | |
| V.2. OBJETIVOS | 99 |
| | |
| VI.1. PARTE EXPERIMENTAL..... | 101 |
| VI.1.1 Materiais e Equipamentos..... | 101 |
| VI.1.2. Reagentes e Soluções..... | 101 |
| VI.1.3. Amostras..... | 102 |
| | |
| VI.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... | 102 |
| VI.2.1. Construção da curva analítica | 102 |
| VI.2.2. Estudo da estabilidade óptica do produto..... | 103 |
| VI.2.3. Preparo das amostras | 103 |
| VI.2.4. Estudo de interferentes..... | 103 |
| VI.2.5. Estudo de Adição e Recuperação..... | 104 |
| | |
| VI.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 104 |
| VI.3.1. Seleção da reação | 104 |
| VI.3.1.1. Testes preliminares | 105 |
| VI.3.1.2. Investigação sobre o mecanismo da reação | 107 |
| VI.3.2. Otimização da metodologia proposta..... | 110 |
| VI.3.3. Verificação da linearidade e construção da curva analítica | 114 |
| VI.3.4. Estudo da estabilidade óptico do composto colorido e o efeito exercido pela adição de H ₂ O ₂ ao meio reacional | 116 |

| | |
|---|------------|
| VI.3.5. Estudo de interferentes | 118 |
| VI.3.6. Aplicação analítica do método desenvolvido..... | 118 |
| VI.3.7. Validação do método..... | 118 |
| VI.3.7.1. Estudos de adição e recuperação | 119 |
| VI.4. CONCLUSÕES..... | 120 |
| VII.1. PARTE EXPERIMENTAL..... | 123 |
| VII.1.1. Materiais e equipamentos | 123 |
| VII.1.2. Reagentes e soluções | 123 |
| VII.1.3. Amostras..... | 124 |
| VII.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... | 125 |
| VII.2.1. Procedimento para o spot test quantitativo empregando espectroscopia de reflectância difusa.. | 125 |
| VII.2.1.1. Construção da curva analítica..... | 125 |
| VII.2.2. Estudo da estabilidade óptica | 126 |
| VII.2.3. Preparo das amostras..... | 126 |
| VII.2.3.1. Comprimidos..... | 126 |
| VII.2.3.2. Solução oral..... | 126 |
| VII.2.4. Estudo de interferentes | 126 |
| VII.2.5. Análise das amostras pelo método oficial | 127 |
| VII.2.6. Estudos de adição e recuperação..... | 127 |
| VII.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 128 |
| VII.3.1. Testes preliminares..... | 128 |
| VII.3.1.1. Proposição de um provável mecanismo para a reação de spot test | 129 |
| VII.3.2. Otimização dos fatores envolvidos na reação de spot test..... | 131 |
| VII.3.2.1. Triagem das variáveis..... | 131 |
| VII.3.2.2. Metodologia de superfície de resposta | 134 |
| VII. 3.3. Construção da curva analítica | 137 |
| VII. 3.4. Estudo da estabilidade óptica | 139 |
| VII. 3.5. Estudo de interferentes | 141 |
| VII. 3.6. Aplicação analítica do método de spot test desenvolvido | 142 |
| VII.3.7. Validação do método de spot test desenvolvido | 142 |
| VII.3.7.1. Estudos de adição e recuperação | 143 |
| VII.4. CONCLUSÕES..... | 144 |

| | |
|--|------------|
| VIII.1. PARTE EXPERIMENTAL..... | 147 |
| VIII.1.1. Materiais e equipamentos..... | 147 |
| VIII.1.2 Reagentes e soluções | 148 |
| VIII.1.3 Amostras | 149 |
| VIII.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... | 149 |
| VIII.2.1 Construção da curva analítica | 149 |
| VIII.2.2. Procedimento para o preparo das amostras | 151 |
| VIII.2.2.1. Comprimidos | 151 |
| VIII.2.2.2. Solução oral | 151 |
| VIII.2.3 Estudo de interferentes | 152 |
| VIII.2.4. Estudos de adição e recuperação | 152 |
| VIII.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 153 |
| VIII.3.1. Testes preliminares | 153 |
| VIII.3.2 Verificação do efeito da presença de SDS sobre a reação proposta..... | 153 |
| VIII.3.2.1 Espectro de absorção e sensibilidade | 153 |
| VIII.3.3. Otimização das condições experimentais | 155 |
| VIII.3.3.1. Definição da configuração para o sistema em fluxo | 155 |
| VIII.3.3.2. Otimização das variáveis do sistema de FIA | 156 |
| VIII.3.3.1 Otimização das condições químicas | 161 |
| VIII.3.4 Verificação da linearidade..... | 166 |
| VIII.3.5 Aplicações analíticas | 168 |
| VIII.3.6 Estudo de interferentes | 169 |
| VIII.3.7. Validação do método em fluxo desenvolvido | 171 |
| VIII.3.7.1. Estudos de adição e recuperação..... | 172 |
| VIII.4. CONCLUSÕES..... | 174 |
| IX.1. PARTE EXPERIMENTAL..... | 176 |
| IX.1.1 Materiais | 176 |
| IX.1.2. Equipamentos..... | 176 |
| IX.1.2.1. Equipamento de uso geral..... | 176 |
| IX.1.2.2. Sistema de análise por injeção em fluxo..... | 176 |
| IX.1.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência..... | 177 |
| IX.1.3. Reagentes e soluções..... | 178 |
| IX.1.4. Amostras | 181 |
| IX.1.4.1 Formulações farmacêuticas | 181 |

| | |
|--|------------|
| IX.1.4.2. Urina..... | 182 |
| IX.1.4.3. Água superficial..... | 182 |
| IX.1.4.4. Leite bovino..... | 182 |
| IX.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... | 183 |
| IX.2.1. Construção das curvas analíticas..... | 183 |
| IX.2.2. Procedimento de EFS..... | 185 |
| IX.2.2.1. EFS no modo convencional (off-line) | 185 |
| IX.2.2.2. EFS acoplada ao sistema FIA (modo on-line) | 186 |
| IX.2.3. Procedimento para o preparo das amostras | 188 |
| IX.2.3.1. Formulações farmacêuticas | 188 |
| IX.2.3.1.1. Suspensão oftálmica | 188 |
| IX.2.3.1.2. Pomadas para queimadura e oftálmica..... | 188 |
| IX.2.3.1.3. Suspensão oral | 188 |
| IX.2.3.2. Amostras de urina, água superficial e leite bovino | 189 |
| IX.2.3.2.1. Preparo das amostras para a etapa de EFS off-line. | 189 |
| IX.2.3.2.1.1. Urina | 189 |
| IX.2.3.2.1.2. Água superficial | 190 |
| IX.2.3.2.1.3. Leite bovino | 190 |
| IX.2.3.2.2. Preparo das amostras para etapa de EFS on-line | 191 |
| IX.2.3.2.2.1. Urina | 191 |
| IX.2.3.2.2.2. Água superficial | 191 |
| IX.2.4. Estudo de interferentes | 191 |
| IX.2.4.1. Interferentes para formulações farmacêuticas | 191 |
| IX.2.4.2. Interferentes para o sistema de screening..... | 192 |
| IX.2.5. Análise das amostras de medicamentos pelo método oficial..... | 192 |
| IX.2.6. Estudos de adição e recuperação para formulações farmacêuticas..... | 193 |
| IX.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 194 |
| IX.3.1. Seleção da estratégia analítica..... | 194 |
| IX.3.1.2. Mecanismo para a reação utilizada no desenvolvimento do procedimento de screening | 197 |
| IX.3.2. Otimização das condições experimentais | 198 |
| IX.3.1.1. Etapa 1 - Definição das variáveis químicas para a reação | 198 |
| IX.2.1.2. Etapa 2 - Seleção da configuração do sistema FIA..... | 203 |
| IX.2.1.3. Etapa 3 - Otimização das condições experimentais para o procedimento de FIA | 206 |
| IX.2.1.4. Etapa 4 – Otimização dos parâmetros envolvidos na extração em fase sólida acoplada ao sistema FIA..... | 213 |
| IX. 3.4. Construção das curvas analíticas..... | 218 |
| IX.3.4.1. Procedimento em fluxo com preparo das amostras não automatizado | 218 |
| IX.3.4.2. Procedimento em fluxo acoplado a extração em fase sólida para o preparo das amostras automatizado..... | 221 |
| IX.3.5. Screening de sulfonamidas em água fortificada com os analitos | 223 |
| IX.3.5.1. Confiabilidade do sistema de screening desenvolvido | 224 |
| IX.3.5.1.1. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência..... | 224 |
| IX.3.5.2.1.1. Construção das curvas analíticas pelo método cromatográfico..... | 225 |
| IX.3.5.3. Definição da porcentagem de falsos resultados fornecidos pelo método de screening..... | 227 |

| | |
|--|------------|
| IX.3.6. Aplicação do procedimento em fluxo para sulfonamidas em amostras reais | 229 |
| IX.3.6.1. Screening em amostras de urina | 229 |
| IX.3.6.2. Screening em amostras de águas superficiais | 231 |
| IX.3.6.3. Screening em amostras de leite..... | 232 |
| IX.3.6.4. Aplicação do procedimento em fluxo para determinação de sulfas em formulações farmacêuticas..... | 235 |
| IX.3.6.4.1. Validação do método em fluxo para análise de formulações farmacêuticas..... | 236 |
| IX.3.6.4.1.1. Estudos de adição e recuperação | 236 |
| IX.3.7. Estudo de interferentes | 238 |
| IX.3.7.1. Interferentes em formulações farmacêuticas | 238 |
| IX.3.7.2. Interferentes em geral – screening | 239 |
| IX.4. CONCLUSÕES..... | 240 |
| X.1. CONCLUSÕES GERAIS | 244 |
| XI.1. PERSPECTIVAS FUTURAS | 247 |
| XII. REFERÊNCIAS | 249 |

Introdução

A história da humanidade está ligada à luta para dominar a natureza e fazê-la operar a seu favor. Essa luta se dá através do trabalho humano e se expressa na construção da cultura que se ergue entre homem e natureza. A história dos meios que o homem vem usando para aliviar a dor e o sofrimento também faz parte desta cultura. Há registro do uso de medicamentos nos papiros egípcios. Os povos primitivos utilizavam elementos do reino vegetal, animal ou mineral para preparar pílulas, pós, supositórios, pomadas e unguentos¹.

O século XIX é marcado por grandes avanços nas ciências químicas e na fisiologia, que, no entanto, não foram seguidos de imediato pela ciência terapêutica. Somente no início do século XX é que surgem os primeiros barbitúricos, os arsenicais e a insulina. Após a década de 1930 e nos anos seguintes à Segunda Guerra Mundial é que foram maciçamente desenvolvidos novos fármacos, como as sulfonamidas, a fenitoína e parte importante dos antibióticos conhecidos hoje.

Atualmente é grande a quantidade de antibióticos e medicamentos de eficácia comprovada. Porém, a pesquisa nesta área continua com intuito de desenvolver medicamentos mais eficazes, em função do surgimento de novas doenças, a fim de garantir a saúde da população mundial.

Os avanços da medicina e do setor farmacêutico são indiscutivelmente importantes para a promoção e garantia da saúde da população. Entretanto, o uso indiscriminado e/ou inapropriado de medicamentos tem merecido uma atenção particular nos últimos anos, principalmente devido a crescente incidência da detecção de resíduos destas substâncias nos sistemas aquáticos^{2,3} e em alimentos de origem animal, tais como leite⁴⁻⁸ carne^{9,10}, ovos^{11,12} e mel¹³⁻¹⁶. Outro grande problema referente ao uso inadequado dos medicamentos e que afeta o mundo todo, é o da falsificação e/ou adulteração¹⁷. Apesar de não haver dados exatos sobre o problema, a Organização Mundial de Saúde¹⁸ (OMS) estima que aproximadamente 25% dos medicamentos utilizados nos países em desenvolvimento são falsificados ou de má qualidade. A mesma entidade afirma ainda, que o problema também afeta os países desenvolvidos.

Diante do exposto, é inquestionável a necessidade de disponibilizar meios eficazes e adequados para garantir a qualidade dos mais variados produtos. Neste sentido, vários profissionais podem colaborar, dentre os quais, os químicos. Estes podem contribuir desenvolvendo métodos analíticos simples, rápidos e eficientes ao propósito a que se destinam. Pode ser necessário, por exemplo, quantificar um ou mais fármacos presentes em formulações farmacêuticas, ou então efetuar o *screening* (rastreamento) em amostras de alimentos de origem animal e em amostras de interesse ambiental, como a água superficial para determinar se um ou mais analitos (resíduos) estão ou não presentes.

Neste trabalho, foram desenvolvidos métodos analíticos para a determinação de fármacos de grande importância, visando atender as necessidades expostas acima. Dipirona, Viagra® e antimicrobianos pertencentes a classe das Sulfonamidas foram os analitos selecionados para o desenvolvimento desta tese de doutorado.

Procurou-se desenvolver métodos analíticos ambientalmente amigáveis (baixo consumo de reagentes, baixa geração de resíduos e de menor risco ao operador e ao meio ambiente), simples, rápidos e eficientes podendo ser adotados como uma alternativa vantajosa em termos de tempo e custo das análises.

O presente estudo foi dividido em capítulos de forma a apresentar seu desenvolvimento de forma mais didática ao leitor.

O Capítulo I traz uma breve discussão sobre a importância dos medicamentos de modo geral, seus usos e implicações.

O Capítulo II aborda algumas das principais características e aplicação dos fármacos selecionados para este estudo.

O Capítulo III apresenta uma revisão da literatura sobre os métodos analíticos comumente utilizados para a análise dos fármacos selecionados.

O Capítulo IV apresenta um breve comentário a respeito das estratégias e técnicas analíticas empregadas no desenvolvimento desta tese de doutorado.

O Capítulo V traz um comentário sobre a importância deste trabalhos e os seus objetivos.

O Capítulo VI descreve o desenvolvimento e validação do método espectrofotométrico desenvolvido para a determinação de Viagra[®] (Citrato de sildenafil) em formulações farmacêuticas.

O Capítulo VII descreve o desenvolvimento e validação do método de *spot test* combinado à espectroscopia de reflectância difusa para a determinação de Dipirona sódica em formulações farmacêuticas.

O Capítulo VIII descreve o desenvolvimento e validação de um procedimento de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica como alternativa na determinação de Dipirona sódica em formulações farmacêuticas. O uso de estratégias para aumento da sensibilidade analítica foi explorado neste estudo, ficando demonstrado o benefício do uso de meios micelares na condução da reação colorimétrica proposta.

O Capítulo IX descreve o desenvolvimento e validação de um procedimento de *screening* para sulfonamidas em diferentes amostras (leite bovino, águas superficiais e urina humana) empregando procedimento automatizado de extração em fase sólida acoplado a um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica em meio micelar. O procedimento também foi adaptado aplicado e validado como método quantitativo para determinação de sulfonamidas em formulações farmacêuticas e urina.

As conclusões gerais de todo o trabalho desenvolvido são apresentadas no Capítulo X.

Capítulo I - Medicamentos

I.1. Medicamentos - considerações gerais

I.1.1. Falsificação de medicamentos

Em uma sociedade onde são vendidos indiscriminadamente produtos copiados clandestinamente, talvez nem surpreenda o fato de que a indústria da pirataria seja a mais rentável do mundo. Estimativas da Polícia Criminal Internacional (Interpol) indicam o setor movimenta em torno de 522 bilhões de dólares por ano¹⁹.

O uso de medicamentos falsificados ou de má qualidade pode resultar em ineficiência de tratamentos médicos, no caso de os pacientes não receberem a quantidade necessária do princípio ativo, ou em sérios danos à saúde, quando os produtos são adulterados ou produzidos deliberadamente com substâncias inadequadas.

No Brasil, a crise ocorrida nos anos de 1997 a 1998 quando foram recebidas 172 denúncias de medicamentos falsificados²⁰, teve grande repercussão e gerou medidas importantes, como a instituição da Comissão Parlamentar de Inquérito dos Medicamentos, a modificação da lei que tornou a falsificação um crime hediondo e a aprovação da Política Nacional de Medicamentos. A criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 1999 e a sua estruturação e ações no âmbito do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária também foi fundamental para enfrentar o problema da falsificação e adulteração dos medicamentos vendidos no país²⁰.

Entretanto, ainda existem relatos de adulteração e/ou falsificação de medicamentos no Brasil^{19,21,22}, como por exemplo analgésicos, antineoplásicos e até de xaropes infantis. Neste último, os falsificadores substituem o medicamento por água dissolvida em tinta vermelha e vendem para o tratamento de crianças doentes¹⁹.

Ressalta-se que o foco das falsificações são medicamentos com grande volume de venda ou alto custo, entre os quais estão a Dipirona e o Viagra[®], respectivamente.

Em novembro²¹ de 2004, a ANVISA determinou a interdição cautelar em todo o território nacional, de um lote de medicamento contendo como princípio ativo a dipirona sódica. O problema verificado foi o parâmetro insatisfatório quanto ao teor de dipirona que estava abaixo da especificação do rótulo. Em julho²² do mesmo ano,

já havia sido determinada a apreensão de um lote de medicamento contendo também a dipirona sódica, por não atender as exigências regulamentares.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS)¹⁸ o Viagra[®] é um dos medicamentos falsificados mais vendidos em todo mundo e que pode ser comprado facilmente pela Internet. No Brasil também existem relatos de venda de Viagra[®] falsificado. Este medicamento é produzido no Paraguai e é vendido ilegalmente no Brasil sob o nome de Pramil. O remédio tem o mesmo princípio ativo do Viagra, no entanto não tem registro na ANVISA.

1.1.2. Medicamentos veterinários: resíduos e impactos na segurança da saúde e do meio ambiente

A medicina veterinária utiliza os medicamentos para fins terapêuticos, profiláticos ou para a promoção do crescimento animal. Entretanto, quando estes medicamentos são utilizados de forma incorreta podem restar resíduos dos mesmos nos alimentos obtidos a partir dos animais que foram tratados com estes medicamentos⁴⁻¹⁶. A presença destes resíduos pode ser prejudicial à saúde da população e este fato sugere desta forma a existência de uma segurança higiênico-sanitária dos alimentos de origem animal.

No que diz respeito à presença de resíduos de medicamentos nos sistemas aquáticos, estudos demonstram que esta é uma realidade em várias partes do mundo inclusive no Brasil³. Contudo, até pouco tempo pouca atenção era dada a esta questão, apesar de se supor que estes poderiam estar sendo lançados nos rios, lagos e mares junto com o esgoto urbano. Desta forma, o monitoramento de fármacos no meio ambiente tem mostrado expressivo crescimento devido ao fato de que muitas destas substâncias foram encontradas em águas naturais e em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE)³. E esta constatação demonstra que os sistemas de tratamento do esgoto normalmente empregados não são capazes de degradar resíduos dos medicamentos.

Diante deste contexto, ressalta-se a importância do monitoramento dos fármacos no meio ambiente, uma vez que estes são desenvolvidos para serem persistentes mantendo suas propriedades químicas por tempo suficiente para servir a um propósito terapêutico. Dados revelam que de 50% a 90% de uma dosagem

farmacêutica pode ser excretada inalterada e persistir no meio ambiente. Estas características tornam os fármacos muito semelhantes aos principais xenobióticos nocivos, ou seja, as substâncias farmacêuticas apresentam propriedades necessárias para a bioacumulação o que pode provocar efeitos nocivos no ecossistema aquático e terrestre².

Dentre os fármacos residuais, merecem uma atenção especial os antimicrobianos^{2,3}. Estes têm sido alvo de muita discussão na literatura, devido ao seu potencial em desenvolver bactérias resistentes no meio ambiente e por serem usados em grandes quantidades, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária (crescimento do gado, na aqüicultura e produção avícola e suína)².

Vários problemas podem surgir em razão da utilização indiscriminada destes compostos, destacando-se: riscos toxicológicos, alérgicos e microbiológicos. É preciso considerar também que a presença desses fármacos residuais na água pode causar efeitos adversos tanto na saúde humana como na saúde de outros organismos presentes nas águas, como os peixes². Os possíveis riscos à saúde humana decorrente do emprego de antimicrobianos tanto na prática veterinária (especialmente em animais produtores de alimentos) como na medicina humana estão associados aos resíduos destes compostos em níveis acima daqueles limites máximos recomendados (LMRs)²³.

No caso de resíduos de antimicrobianos em sistemas aquáticos não se tem estabelecido um valor limite máximo de resíduo tolerado. A água deve estar isenta de tais compostos para uma garantia da sua inocuidade para quem a utiliza. Investigações sobre a contaminação de diferentes ambientes aquáticos por fármacos revelam que esses contaminantes estão presentes em faixas de concentrações de ng mL^{-1} (ppb) a $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ppm)^{2,3}.

Entretanto, um ponto central sobre este tema, é ter o real conhecimento do potencial efeito nocivo que tais substâncias representam para os seres vivos, bem como saber quais seriam as doses prejudiciais e em que tempo de exposição. Diante destas questões pesquisas vem sendo desenvolvidas com intuito de se conhecer melhor as características ecotoxicológicas dos fármacos e assim, desenvolver tecnologias capazes de eliminar este tipo de poluição do meio ambiente².

Para alimentos de origem animal, a quantidade de resíduo considerada segura, depende de estudos toxicológicos. Na prática são adotados os valores de LMRs²³ preconizados internacionalmente, ou, são criados pelo próprio país por meio de estudos do tempo de depleção do fármaco e a presença de metabólitos no produto de origem animal. A competência para estabelecer LMRs em alimentos, é do Ministério da Saúde através da ANVISA. Entretanto, no Brasil estes valores ainda não foram definidos. Entretanto, a ANVISA criou o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em alimentos de origem animal (PAMVet)²⁴, através da resolução RDC nº. 253 de 16 de setembro de 2003 e desde então se vem utilizando valores de LMR internacionais.

Dentre os alimentos sujeitos a esta avaliação, o leite bovino foi classificado como prioritário, devido à sua importância na dieta da população brasileira. O controle de resíduos de agentes antimicrobianos no leite é particularmente importante, pois os efeitos tóxicos destes compostos sobre a saúde humana, e, a possibilidade de favorecer o desenvolvimento de formas de resistência bacteriana^{4,25,26}, prejudicam os tratamentos farmacológicos, uma vez que surgem cepas cada vez mais resistentes tornando o uso dos medicamentos ineficiente.

O monitoramento da presença de resíduos de antimicrobianos no leite é também fundamental para a indústria de produtos lácteos, devido aos prejuízos causados pela interferência que estes compostos apresentam no desenvolvimento das culturas lácteas largamente empregadas em fábricas de laticínios^{27,28}. Desta forma, a produção intensiva de leite de alta qualidade, e sem resíduos de antimicrobianos, reveste-se de extrema importância para os produtores, ao se considerar os prejuízos e as penalidades decorrentes da rejeição do leite contaminado com resíduos acima dos níveis tolerados.

O valor de LMR para antimicrobianos, tolerado em leite foi estabelecido por diversos órgãos governamentais, como por exemplo, pela Food and Agriculture Organization das Nações Unidas (FAO), World Health Organization (WHO) e a agência americana Food and Drug Administration (FDA), visando garantir a saúde dos consumidores. De acordo com a regulamentação Européia foi estabelecido para as sulfonamidas o LMR de 100 µg de sulfonamidas total kg⁻¹ em tecidos animais, incluindo o leite²³. Este mesmo valor é adotado no Brasil.

Capítulo II. Aspectos gerais dos fármacos selecionados para este estudo

II.1. Dipirona sódica

A dipirona é um medicamento com propriedades analgésicas e antipiréticas indicado no tratamento sintomático da dor e febre. Age simultaneamente no sistema nervoso central e periférico e sua absorção é rápida, uniforme e quase completa²⁹. Em torno de 58% da dose liga-se às proteínas plasmáticas, proporcionando um efeito do fármaco em aproximadamente 15 minutos após a sua administração. A biotransformação ocorre no fígado, com duração de 4 a 7 horas. É totalmente metabolizada e cerca de 70% de uma dose é excretada pela urina após 24 horas da ingestão como metabólitos. Entre os principais metabólitos estão: 4-N-metilaminofenazona, 4-aminofenazona, 4-N-acetilaminofenazona e 4-N-formilaminofenazona. Uma coloração avermelhada da urina pode revelar a existência de outro metabólito da dipirona, o ácido rubazônico. Esta coloração avermelhada não tem significado clínico ou toxicológico³⁰.

Devido ao seu forte efeito analgésico, disponibilidade de formulação parenteral e baixo custo, a dipirona é extremamente usada na Europa e América do Sul, bem como no Brasil. Sua ação antiespasmódica junto com seu efeito analgésico faz da dipirona uma droga de grande valor no tratamento de dores espásticas. Recentemente, efeitos benéficos adicionais como relaxante muscular e anticonvulsivante têm sido descritos e o interesse por esta droga tem aumentado³¹.

Apesar de ser utilizada em muitos países, o seu uso é proibido em alguns países como Estados Unidos e Suécia, devido a um potencial efeito de agranulocitose. No entanto, esta proibição tem sido criticada por alguns autores³¹. No Brasil, em julho de 2001 foi realizado um evento para avaliação da segurança do uso de dipirona, contando com a participação de renomados cientistas nacionais e estrangeiros. Neste evento foi concluído que os riscos atribuídos a dipirona não são significativos, não sendo necessário proibir o uso deste medicamento³².

A dipirona (sal do 1-fenil-2,3-dimetil-4-metilaminometanosulfonato-5-pirazolona)³³ é o principal analgésico da terapêutica brasileira. Quimicamente, a dipirona é um derivado 5-pirazolônico com a presença de um grupo metanossulfônico na sua estrutura (Figura 1).

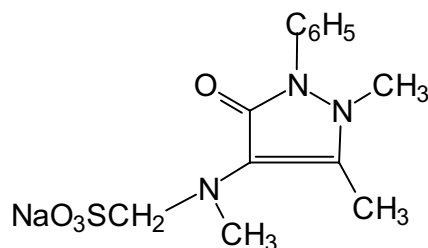


Figura 1. Estrutura química da dipirona sódica.

Dentre os medicamentos mais vendidos no país, quatro são analgésicos feitos à base de dipirona, dentre os quais a Novalgina[®] aparece no 3^o lugar da lista. Em 1999, o consumo brasileiro de dipirona foi de 190,54 toneladas³². É importante ressaltar ainda, que a dipirona faz parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) desde sua criação em 1971³².

Até o início de 2001, constava no Dicionário de Especialidades Farmacêuticas (DEF) o registro de 60 medicamentos cujo princípio ativo é a dipirona e outros 80 medicamentos contendo a dipirona associada a outras drogas³⁴. A dipirona é comercializada principalmente sob a forma de sal de sódio e em diferentes formas farmacêuticas (solução oral, injetável, comprimidos e supositórios).

II.2. Citrato de sildenafil (Viagra[®])

A disfunção erétil também conhecida como impotência sexual masculina, é definida como a incapacidade persistente (por no mínimo seis meses) de obter e manter uma ereção firme o suficiente para permitir um desempenho sexual satisfatório³⁵⁻³⁷. Diversos fatores físicos e psicológicos estão envolvidos na função erétil normal, incluindo fatores hormonais, neurológicos, vasculares e cavernosos^{36,37}. Depois da ejaculação precoce este é o comprometimento mais comum da função sexual masculina, afetando cerca de 30 milhões de indivíduos apenas nos Estados Unidos³⁸. Um estudo realizado com homens maiores de 18 anos no Brasil no ano de 2000 demonstrou a ocorrência de algum sintoma de disfunção erétil em 42% dos indivíduos. A idade avançada é o principal fator de risco para o desenvolvimento de problemas com a ereção e presume-se que aproximadamente 55% dos homens são completamente impotentes aos 75 anos de idade. No Brasil estima-se que aproximadamente 11% dos homens com mais de 70 anos apresentam o problema³⁸.

De acordo com especialistas em problemas de disfunção erétil, o tratamento ideal para este mal deve ter as seguintes características: simples, indolor, não invasivo, com altas taxas de sucesso e efeitos colaterais mínimos³⁶. No mercado, são encontradas formas farmacêuticas de aplicação local e de administração oral. A Administração oral é fácil, não-invasiva, facilmente reversível e bem tolerada tanto pelo paciente quanto por sua parceira. Assim, os fármacos de administração oral tornaram-se a terapia de primeira escolha para os mais diversos casos de disfunção erétil, destacando-se entre eles o sildenafil (Viagra[®])³⁸.

O medicamento sildenafil era utilizado até meados de 1990 em tratamentos cardiovasculares. Entretanto, descobriu-se casualmente que este composto apresentava como efeito colateral uma estimulação da ereção peniana. Após diversos estudos clínicos comprovou-se esta propriedade e o sildenafil foi aprovado para o tratamento de problemas com a ereção pela “Food and Drug Administration” (FDA), em 27 de março de 1998. Foi introduzido no comércio pela Pfizer sob o nome comercial de Viagra[®], sendo a primeira terapia oral disponível para o tratamento³⁶. O lançamento deste medicamento teve grande repercussão mundial como pode ser visto pela grande atenção dada ao mesmo pela mídia.

Com base na eficácia e na tolerabilidade observadas nos grandes estudos clínicos conduzidos, o Viagra[®] parece cumprir os critérios do tratamento ideal, pois é bem tolerado, associa-se a reações adversas mínimas, pode ser utilizado com discrição e funciona quando necessário. O sildenafil age restaurando a função erétil resultando em uma resposta natural à estimulação sexual e rapidamente se tornou um dos mais populares medicamentos utilizados no tratamento da disfunção erétil.

Quimicamente³⁹ o Viagra[®] é designado como citrato de 1-[[3-(6,7-diidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-pirazol-[4,3-d]pirimidin-5-il)-4-etóxfenilsulfonil]-4-metilpiperazina, cuja fórmula empírica é $C_{22}H_{30}N_6O_4S.C_6H_8O_7$ (PM= 666,7 g mol⁻¹) (Figura 2).

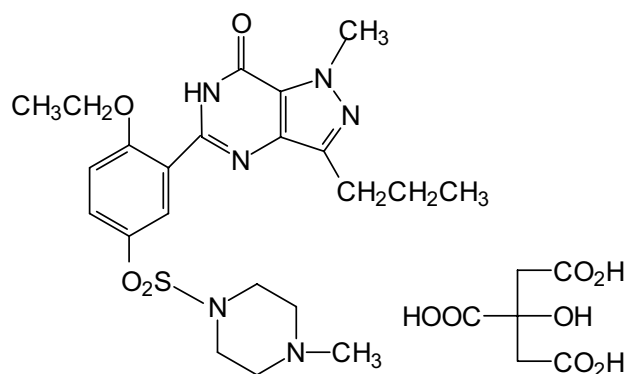


Figura 2. Estrutura química do citrato de sildenafil (Viagra[®]).

Citrato de sildenafil é um pó cristalino branco com solubilidade de 3,5 mg/mL em água. Viagra[®] (citrato de sildenafil) é formulado como comprimido com formato de diamante de coloração azul contendo 25mg, 50mg e 100mg equivalente ao composto sildenafil.

II.3. Antimicrobianos

Antimicrobianos, são substâncias naturais ou sintéticas que agem sobre as bactérias inibindo o seu crescimento (bacteriostáticos) ou causando a sua destruição (bactericida)⁴⁰. Devido a estas características são utilizados com fins terapêuticos ou profiláticos. Inúmeros compostos são classificados em antimicrobianos destacando-se os quimioterápicos e os antibióticos. Ambos possuem a mesma função, porém conceitualmente quimioterápicos são definidos como as substâncias produzidas em laboratório e os antibióticos são aquelas produzidas parcial ou totalmente, por seres vivos⁴⁰, em sua maioria fungos do gênero *Streptomyces* e alguns do gênero *Penicillium* e *Cephalosporium*. Porém, na prática, esta distinção nem sempre é observada, sendo o termo antibiótico utilizado de forma geral.

A indicação de um antimicrobiano está condicionada ao diagnóstico de uma infecção cuja etiologia seja sensível. Infecções virais, por exemplo, não respondem ao tratamento com antimicrobianos.

A medicina dispõe de um amplo espectro de antimicrobianos, para o tratamento de diversas enfermidades. Dentre os quais, grande destaque é dado à classe das sulfonamidas (SFAs) ou comumente denominadas apenas de sulfas, as

quais são amplamente empregadas na medicina humana e veterinária devido ao seu amplo espectro de atividade e baixo custo^{13,27,41}.

II.3.1. Sulfonamidas

As sulfonamidas (sulfas) são agentes antimicrobianos bacteriostáticos, que em altas concentrações possuem efeito bactericida, mas nessas condições, podem causar graves reações adversas ao hospedeiro⁴⁰.

As sulfonamidas derivam da sulfanilamida (Figura 3). Estes fármacos contêm um anel benzênico substituído por dois grupos orientados nas posições 1 e 4, respectivamente. O grupo amino na posição 4 confere para a molécula atividade bacteriana enquanto que modificações no radical unido ao carbono 1 do anel benzênico modificam as características farmacológicas do composto.

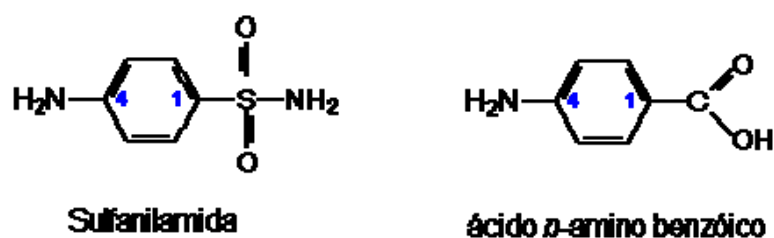


Figura 3. Estrutura da sulfanilamida (precursor das sulfas).

Foram os primeiros agentes quimioterápicos eficazes a serem utilizados por via sistêmica na prevenção e cura das infecções bacterianas em seres humanos. Na prática veterinária, as sulfas são muito utilizadas com fins terapêuticos e ou profiláticos para o tratamento de infecções bacterianas, ou ainda, como estimulante de crescimento^{8,13,14}. O mecanismo de ação das sulfas se dá pela inibição do crescimento bacteriano. São análogos estruturais (Figura 3) e antagonistas competitivos do ácido *p*-amino benzóico (PABA), impedindo a sua utilização pelas bactérias na síntese de ácido fólico. Os microrganismos sensíveis são aqueles que precisam sintetizar seu próprio ácido fólico. O efeito bacteriostático induzido pelas sulfas é anulado competitivamente pelo PABA. Já as células de mamíferos não são afetadas, uma vez que necessitam de ácido fólico pré-formado por serem incapazes de sintetizá-lo⁴⁰.

De uma maneira geral, apresentam grande espectro de ação, atingindo bactérias Gram positivas e Gram negativas. Existem microrganismos que não requerem ácido fólico para o crescimento ou podem usar o ácido fólico pré-formado, portanto, esses são resistentes a sulfonamidas⁴⁰.

São absorvidas pelo trato gastrointestinal, sendo que o principal centro de absorção é o intestino delgado, estabelecendo um intervalo terapêutico de 30 – 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no plasma e 500 – 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na urina⁴². Podem ser absorvidas por outras vias (pelo trato respiratório, vagina), em níveis variáveis, podendo causar reações tóxicas e sensibilização. As sulfas ligam-se às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina e o grau de ligação depende da hidrofobicidade e do pka da sulfa.

As sulfas distribuem-se por todos os tecidos. Penetram nos líquidos: pleural, peritoneal, sinovial e ocular, sendo que a forma predominante é a ativa não ligada, devido ao baixo teor protéico destes líquidos. No líquido cefalorraquidiano, a taxa e o grau de difusão dependem do grau de ligação à albumina plasmática, do grau de acetilação ou da presença de inflamação das meninges. Quanto mais os componentes acetilados ligam-se à albumina, a relação entre a droga livre e a forma acetilada torna-se maior no licor (fluido corpóreo) do que no sangue. Atravessam rapidamente a barreira placentária podendo em 3 horas, ocorrer o equilíbrio entre sangue materno e o fetal. As concentrações nos tecidos do feto podem ser suficientes para produzirem ações antibacterianas e efeitos tóxicos⁴⁰.

O metabolismo ocorre principalmente no fígado formando uma sulfa acetilada como produto principal. A acetilação é prejudicial, pois o produto tem baixa atividade bacteriana, porém mantém as propriedades tóxicas da substância original. Além disso, formas acetiladas de algumas sulfas são pouco solúveis podendo causar complicações renais e cristalúria.

A excreção das sulfas é feita pelos rins, sendo que parte é eliminada na forma inalterada e parte como produto metabólico. Ela também pode ser eliminada nas fezes, bile e no leite. Baseando-se na taxa de absorção e excreção, as sulfas são classificadas em quatro grupos⁴⁰:

a) agentes absorvidos e excretados rapidamente, como o sulfisoxazol e a sulfadiazina;

b) agentes de pouca absorção quando administrados por via oral e, por conseguinte, ativos ao atingir o intestino, como a sulfasalazina;

c) sulfonamidas utilizadas principalmente para aplicação tópica, como a sulfacetamida, a mafenida e a sulfadiazina de prata;

d) sulfonamidas de ação prolongada, como a sulfadoxina, que sofre rápida absorção, mas que é excretada lentamente.

A incidência global de reações adversas é de cerca de 5%. Entre os efeitos⁴⁰ relatados estão: distúrbios das vias urinárias como cristalúria; distúrbios do sistema hematopoético; anemia hemolítica aguda; agranulocitose; anemia aplástica; reações de hipersensibilidade com febre, mal-estar e prurido. Em menos de 0,1% dos pacientes ocorre necrose local ou difusa do fígado. Em 1 a 2% dos indivíduos ocorre anorexia, náuseas e vômitos. Nos recém-nascidos pode ocorrer encefalopatia do tipo Kernicterus. As sulfonamidas não devem ser administradas em mulheres grávidas perto da época do parto, visto que estes fármacos atravessam a placenta e são secretados no leite.

A presença de resíduos de sulfonamidas nos sistemas aquáticos e em alimentos de origem animal já foi constatada o que representa um potencial problema de saúde. Evidências recentes indicam que a sulfametazina pode causar câncer na glândula tireóide e outras sulfas são conhecidas por causarem reações alérgicas em humanos^{5,27,28}. Além disto, as sulfas normalmente aumentam o risco de desenvolvimento de resistência bacteriana.

Capítulo III. Revisão da literatura - métodos analíticos
para determinação dos fármacos em estudo

III.1. Dipirona

Em levantamento bibliográfico realizado na base de dados do *Chemical Abstracts* (versão on-line) *SciFinder*⁴³, foram encontradas várias publicações sobre métodos analíticos para determinação de dipirona até outubro de 2007. De modo geral, a determinação de dipirona é feita em formulações farmacêuticas, e, menos frequentemente aplica-se na análise de fluídos biológicos.

A espectrofotometria UV-Vis e a volumetria são as técnicas analíticas mais utilizadas para a detecção e quantificação de dipirona em formulações farmacêuticas. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) está entre as técnicas mais empregadas para análise de fluídos biológicos. A Figura 4 mostra a distribuição dos trabalhos publicados para a determinação de dipirona segundo a técnica analítica empregada.

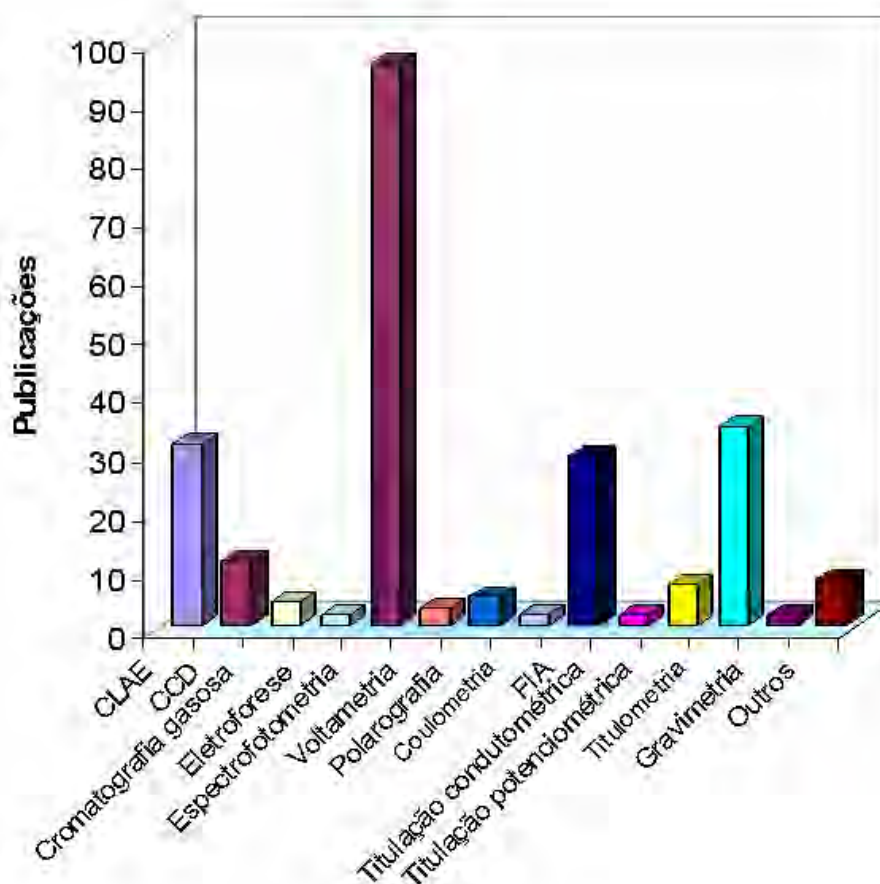


Figura 4. Distribuição dos trabalhos publicados para determinação de dipirona de acordo com a técnica analítica empregada.

III.1.1. Espectrofotometria UV-Vis

Os métodos espectrofotométricos de absorção molecular são os métodos mais amplamente usados dentre todas as técnicas de análise quantitativa em laboratórios químicos e clínicos em todo o mundo⁴⁴. Análises espectrofotométricas baseadas em medidas de absorção ultravioleta (UV) e visível (Vis) encontram vasta aplicação para identificação e determinação de uma grande variedade de espécies inorgânicas e orgânicas. Na literatura são descritos trabalhos que empregaram a espectrofotometria para determinação da dipirona empregando medidas de absorção no UV⁴⁵⁻⁵⁴ como também medidas na região Vis⁵⁵⁻⁶⁴ do espectro.

Os métodos baseados em medidas no ultravioleta são relativamente sensíveis, entretanto, existe a dificuldade de se trabalhar nessa região do espectro, pois entre os excipientes comumente encontrados nos medicamentos é possível a existência de compostos orgânicos insaturados. Estes compostos podem interferir nas medidas, uma vez que também absorvem radiação nesta região do espectro. Visando eliminar este tipo de interferência, os métodos espectrofotométricos baseados em medidas no ultravioleta utilizam do recurso matemático de derivação dos espectros⁴⁵⁻⁵⁴, todavia, o inconveniente reside no uso de formas sofisticadas de tratamento matemático das medidas para a quantificação do sinal obtido.

MORELLI⁵⁴ propôs a determinação de uma mistura ternária dos fármacos dipirona, cloridrato de pitofenona e brometo de fempiverínio utilizando a espectrofotometria com medidas de absorção na região UV do espectro. Entretanto, devido à sobreposição espectral destes fármacos, o recurso matemático da espectrofotometria derivativa foi necessário para uma análise correta. Utilizando a derivada primeira, a lei de Beer é obedecida no intervalo de concentração de zero a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos os fármacos, com limites de detecção e quantificação de $0,40$ e $1,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a dipirona. O método foi aplicado na análise de injeções com bons resultados (recuperação média de 99,1%) e sem interferência significativa de matriz. O método envolve o uso de uma técnica simples e acessível à maioria dos laboratórios, porém requer do operador um bom conhecimento matemático para o tratamento correto dos espectros obtidos.

Diante das limitações apresentadas pelos métodos baseados na absorção de radiação ultravioleta é que aqueles que empregam absorção na região visível do espectro ganham destaque. Para tanto, é necessária a formação de um cromóforo

que absorva na região do visível. Para a determinação de dipirona, reações com diferentes reagentes cromogênicos, tais como: cloreto de neotetrazólio⁵⁵, ácido cromotrópico^{56,57}, Fe(III)-1,10-fenantrolina⁵⁸, iodato de potássio⁵⁹ entre outros⁶⁰⁻⁶⁴ tem sido propostas na literatura.

VASSILEVA-ALEXANDROVA e SHISHMANOV⁵⁵ propuseram a determinação espectrofotométrica de dipirona baseando-se na reação de complexação do fármaco com o reagente cloreto de neotetrazólio, solúvel em meio de etanol-HCl. O complexo amarelo formado apresentou absorção máxima em 400 nm. O método apresentou boa sensibilidade, possibilitando a determinação de dipirona em medicamentos no intervalo de 4,0 a 20 µg do fármaco.

PEZZA et al.⁵⁶ desenvolveram um método baseado na oxidação seletiva da dipirona em meio de ácido sulfúrico com a liberação de formaldeído, o qual reage então com o ácido cromotrópico produzindo um composto violeta monitorado espectrofotometricamente em 575 nm. Inicialmente, a reação foi utilizada como *spot test* para a determinação qualitativa de dipirona, mostrando-se bastante seletivo. Posteriormente, SAKIARA et al.⁵⁷ utilizaram a mesma reação para o desenvolvimento de um procedimento para determinação quantitativa de dipirona em medicamentos. A lei de Beer foi obedecida no intervalo de concentração de 0,57 a 5,7 mg L⁻¹ ($1,6 \times 10^{-6}$ a $1,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) de dipirona. O procedimento apresentou precisão e seletividade na determinação de dipirona em medicamentos. Porém, para que haja a formação do composto colorido são necessárias condições muito drásticas, como uso de ácido sulfúrico 11,2 mol L⁻¹ e aquecimento a 100 °C durante 25 minutos.

QURESHI et al.⁵⁸ propuseram a determinação espectrofotométrica indireta de dipirona baseados na redução de ferro (III) a ferro (II) por ação da dipirona. A quantificação do íon Fe²⁺ produzido é efetuada através da reação de complexação com 1,10-fenantrolina. A concentração de dipirona é diretamente proporcional àquela de íons Fe²⁺ formados. A lei de Beer é obedecida no intervalo de concentração de dipirona de 1,0 a 7,0 µg mL⁻¹. Apesar de sensível, o método apresenta uma série de inconvenientes. São necessários 30 minutos de espera para que a reação se processe completamente, o complexo Fe²⁺—1,10-fenantrolina é sensível à luz, sendo recomendado adicionar ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para mascarar o excesso de íons férricos presentes no meio reacional após

o desenvolvimento da cor e prevenir a foto redução do complexo formado. A presença de agentes oxidantes interfere na reação e desta forma, formulações farmacêuticas devem estar isentas de tais substâncias como, por exemplo, paracetamol normalmente presente nas formulações farmacêuticas contendo dipirona.

SASTRY e RAO⁶⁴ propuseram a determinação de dipirona em formulações farmacêuticas baseados na formação de um produto colorido na reação com cloridrato de 3-metil-2-benzotiazona hidrazona (MBTH) sob oxidação com íons Fe^{3+} em meio de metanol. As medidas de absorvância são efetuadas em 620 nm após 7 min. de espera. A lei de Beer é obedecida para concentrações de dipirona de 0,5 – 6,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com absortividade molar (ϵ) de $5,27 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O método foi aplicado na análise de medicamentos onde as recuperações de dipirona variaram de 97,9 – 100,5%. Fármacos como amidopirina, paracetamol e ácido mefenâmico apresentam a mesma reação e interferem na determinação de dipirona.

III.1.2. Métodos eletroquímicos

O número de métodos eletroquímicos na forma clássica para a determinação de dipirona descrito na literatura é pequeno^{65,66}. TEIXEIRA et al.⁶⁵ descreveram a preparação e caracterização de um eletrodo de pasta de carbono modificado com o complexo N,N-etilenobis(saldenoaminato) de oxovanádio (IV) ([VO(Salen)]). Empregando a voltametria cíclica o comportamento eletrocatalítico do eletrodo na oxidação da dipirona foi investigado. A melhor resposta voltamétrica foi observada para uma composição do eletrodo de 25% (m/m) [VO(Salen)] em solução eletrolítica de KCl para pH entre 5,5 a 8,0 com varredura a uma velocidade de 10 mV s^{-1} . Uma resposta voltamétrica linear para dipirona foi obtida no intervalo de concentração de $9,9 \times 10^{-6}$ a $2,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com LD de $7,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Vários compostos foram avaliados em estudo de interferentes e somente o ácido ascórbico mostrou interferir nas medidas. Como este composto é encontrado em muitas formulações o método fica limitado para a análise de amostras em que o mesmo não está presente, ou então, uma etapa de pré-tratamento das amostras para eliminar esta interferência se faz necessária. O método foi aplicado na análise de medicamentos em que o ácido ascórbico estava ausente com resultados satisfatórios. As porcentagens de recuperação de dipirona variaram de 97,2 – 104,0%.

BELAL⁶⁶ propôs o uso da técnica polarográfica para a determinação simultânea de dipirona e ácido ascórbico em formulações farmacêuticas. O método baseia-se na produção de ondas polarográficas durante a oxidação dos fármacos na região anódica e em meio de tampão acetato (pH 3,6). A separação das ondas ($> 0,65$ V) foi eficiente para a quantificação dos dois analitos sem interferências nas medidas. O método foi aplicado com sucesso na análise de medicamentos.

III.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é empregada em muitas circunstâncias como técnica analítica para análise de dipirona em diferentes matrizes⁶⁷⁻⁷⁴. Métodos de CLAE estão entre aqueles mais indicados para análise de amostras complexas como fluídos biológicos. As análises são realizadas com intuito de separar e detectar os principais metabólitos da dipirona após a sua ingestão.

A determinação de dipirona em sua forma inalterada quase nunca é conseguida, pois a mesma é rapidamente metabolizada. Entretanto, alguns pesquisadores propuseram a determinação de dipirona em amostras de urina rapidamente após a adição do fármaco, para evitar a sua decomposição. A aplicação da CLAE na análise de medicamentos justifica-se devido a inerente capacidade da técnica de separar os constituintes da amostra. Deste modo, procedimentos de CLAE são empregados na análise de amostras contendo vários fármacos concomitantemente, sendo possível separá-los e quantificá-los em uma única análise.

ALTUN⁶⁷ propôs o desenvolvimento de um método de CLAE para a determinação simultânea de dipirona, paracetamol e cafeína. A separação foi realizada com eluição isocrática em coluna C-8 detecção UV em 215 nm. A fase móvel utilizada consiste da mistura quaternária de KH_2PO_4 ($1,00 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}) – metanol – acetonitrila – álcool isopropílico na proporção de 420:20:30:30 (v/v/v/v), com vazão de 1 mL min^{-1} . A análise requer menos que 10 minutos com picos bem resolvidos. A faixa de trabalho para a determinação de paracetamol, cafeína e dipirona foram de 0,409 – 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,151 – 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,233 – 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Estudos de recuperação foram realizados para validação do método. As recuperações para dipirona variaram de 96,4 – 103,5%.

SENYUVA et al.⁶⁸ desenvolveram e validaram um método de CLAE para a rápida determinação de dipirona em formulações farmacêuticas. O sistema cromatográfico é constituído por uma coluna C-18 operando em modo isocrático e detecção UV em 254 nm. A fase móvel utilizada foi uma mistura metanol – água na razão de 80/20 (v/v) com vazão de 1 mL min⁻¹. A relação entre a área dos picos e a concentração de dipirona foi linear para o intervalo de 0,5 – 100 µg mL⁻¹. As taxas de recuperação para três níveis de concentração (10, 15 e 25 µg mL⁻¹) variaram de 93,0 – 100,0% e foram comparados favoravelmente com os resultados obtidos pela execução de análises de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

BARANOWSKA et al.⁶⁹ desenvolveram um método cromatográfico em fase reversa para a determinação quantitativa de onze fármacos em amostras de urina humana, dentre os quais a dipirona. A separação foi realizada em coluna C-18 com eluição em modo gradiente. Dois sistemas de detecção foram empregados, um arranjo de fotodiodos (DAD) (200 – 450 nm) e outro de fluorescência. Dipirona foi detectada utilizando a detecção por DAD. O tempo de uma análise é de aproximadamente 20 minutos. Utilizaram misturas de metanol – acetonitrila – ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) em várias proporções para a composição da fase móvel. A faixa de concentração para dipirona com resposta linear foi de 4,5 – 38 µg mL⁻¹. O método foi aplicado na análise de amostras de urina de pacientes hospitalizados que receberam um ou mais dos fármacos em estudo, incluindo a dipirona. A dipirona não foi detectada nestas amostras. Entretanto, estudos de adição de padrão foram realizados para validação do método proposto. As recuperações de dipirona variaram de 97,8 – 102,3%.

GOLUBTSKII et al.⁷⁰ propuseram dois procedimentos cromatográficos para análise de comprimidos do medicamento Pentalgin N, uma formulação farmacêutica multicomponente muito empregada na Rússia. Empregando a CLAE a separação dos fármacos (dipirona, cafeína, naproxeno, fenobarbital, codeína e metabólitos da dipirona), foi efetuada em coluna C-18, utilizando os modos de eluição isocrático e em gradiente. A detecção em ambos os procedimentos foi realizada em 212 nm. Para o modo gradiente a fase móvel consiste na mistura de solução aquosa de KH₂PO₄ 6,25 x 10⁻³ mol L⁻¹ com acetonitrila variando de 10 a 60% (v/v) durante um tempo de 10 minutos. A eluição isocrática foi realizada utilizando a fase móvel

composta por KH_2PO_4 $1,10 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ com 5% de acetonitrila (v/v). Uma boa separação é obtida em ambos os procedimentos. Entretanto, o uso do modo de eluição isocrático é preferido devido a sua maior simplicidade instrumental, conseqüentemente, menor custo com equipamentos. Para a aplicação analítica do método proposto uma amostra sintética contendo os fármacos em teores iguais aqueles esperados para o medicamento comercial foi analisada e por comparação com a análise da amostra real a concentração dos fármacos foi estimada.

III.1.4. Métodos empregando a análise por injeção em fluxo

Procedimentos de análise por injeção em fluxo (FIA) são de grande interesse para análise de medicamentos, devido à rapidez com que os resultados podem ser obtidos, simplicidade operacional e a possibilidade de empregar diferentes configurações para o sistema e variados modos de detecção.

Para a determinação de dipirona em formulações farmacêuticas são descritos vários procedimentos de FIA na literatura⁷⁵⁻⁸⁸, com sistemas de detecção variados, tais como: espectrofotométrico⁷⁵⁻⁷⁸, eletroquímico⁷⁹⁻⁸⁴, por turbidimetria⁸⁵, quimioluminescente⁸⁶⁻⁸⁸ entre outros. Normalmente, estes métodos são indiretos e apresentam sensibilidade adequada. Uma tabela comparando vários destes procedimentos pode ser consultada no artigo publicado por nosso grupo de pesquisa para a determinação de dipirona sódica (Anexo 3).

BAUTISTA et al.⁷⁸ propuseram a determinação de dipirona via análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica. O método é indireto e baseia-se na reação da dipirona com PbO_2 imobilizado em resina de poliéster em meio de ácido perclórico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Empregando a reação em fase sólida ocorre simultaneamente a oxidação da dipirona e a liberação controlada de íons Pb^{2+} , os quais atuam como catalisadores para a reação da dipirona oxidada com vermelho de pirogalol. O decréscimo da cor é monitorado em 520 nm. A faixa de concentração de dipirona onde se obteve uma relação linear em função da altura do pico foi de 2 – 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A frequência analítica foi de 72 amostras hora⁻¹. O método foi aplicado na análise de medicamentos com recuperações variando de 99,2 – 100,4%. Paracetamol, dexametasona e o ácido ascórbico interferem no procedimento.

HUANG et al.⁸⁷ descreveram a preparação de um sensor em fase sólida para a determinação de dipirona utilizando procedimento FIA. O método baseia-se na auto-oxidação de Rodamina 6G imobilizada em coluna de troca catiônica e monitoramento quimioluminescente em 550 nm. O sensor responde linearmente na faixa de concentração de 0,4 – 10 mg L⁻¹ de dipirona com LD de 0,15 mg L⁻¹ e apresenta estabilidade para até 200 determinações. O método foi aplicado na determinação de dipirona em formulações farmacêuticas com bons resultados. As porcentagens de recuperação variaram de 95,6 a 99,6%. Considerando que a frequência analítica foi de 60 amostras hora⁻¹ constata-se que a aplicabilidade do método em laboratórios que analisam dipirona frequentemente pode ser limitada à disponibilidade dos sensores.

PAIXÃO et al.⁸⁰ descreveram o uso de uma célula eletroquímica para a titulação por difusão em fase sob condições de fluxo, para a determinação de dipirona em formulações farmacêuticas. O método é indireto e baseia-se na geração eletroquímica de iodeto que então reage com a dipirona. Utilizando um volume de amostra de 100 µL o intervalo de concentração para a dipirona de trabalho foi de 2,00 x 10⁻³ a 15 x 10⁻³ mol L⁻¹ com LD de 1,10 x 10⁻³ mol L⁻¹ e frequência analítica de 90 amostras hora⁻¹. A determinação de dipirona em medicamentos foi efetuada sem interferência dos excipientes comumente encontrados nestas formulações. As porcentagens de recuperação variaram de 99,6 a 104,9%.

LIMA et al.⁷⁶ propuseram a determinação de dipirona empregando procedimento FIA com detecção espectrofotométrica adotando o uso de um sistema constituído por minibombas solenóides utilizadas para gerar fluxos de amostra e reagente, posicionadas próximas a um ponto de confluência. O reagente cromogênico adotado foi o *p*-dimetilaminobenzaldeído (*p*-DAB) em meio de HCl 2,5% (v/v). Após a confluência, a reação entre dipirona e *p*-DAB se processa em uma bobina reacional de 50 cm e o próprio *p*-DAB atuando como carregador transporta o produto colorido até o detector onde é monitorado em 430 nm. A curva de calibração foi construída para soluções de dipirona com concentrações de 10 a 400 mg L⁻¹, com LD de 1 mg L⁻¹ e frequência analítica de 50 amostras hora⁻¹. O método foi aplicado na análise de formulações farmacêuticas contendo dipirona com resultados satisfatórios. As recuperações variaram de 96,6 a 101,7%.

MARCOLINO-JR et al.⁸⁵ propuseram a determinação de dipirona em formulações farmacêuticas empregando procedimento FIA com detecção turbidimétrica empregando também uma reação em fase sólida. O procedimento baseia-se na inserção de um reator em fase sólida contendo AgCl imobilizado e por ação da dipirona íons Ag^+ são reduzidos a prata metálica a qual é detectada turbidimetricamente em 425 nm. A faixa de concentração de trabalho para dipirona foi de $5,0 \times 10^{-4} - 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com LD de $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e frequência analítica de 45 amostras hora⁻¹. As recuperações de dipirona obtidas na análise de formulações farmacêuticas variaram de 96 a 102%. A presença de altas concentrações de bissulfito de sódio interfere nas análises. Entretanto, este interferente encontra-se nos medicamentos em teores bem menores do que os de dipirona não sendo a análise prejudicada nestes casos.

MEDEIROS et al.⁷⁹ propuseram a determinação indireta de dipirona em formulações farmacêuticas empregando procedimento em FIA com detecção amperométrica. Dois sistemas indicadores redox foram estudados, Fe (III) / Fe (II) e I_2 / I^- . Ambos os sistemas demonstraram uma boa relação linear para determinação de dipirona na faixa de concentração de 10 – 50 mg L⁻¹. Porém, o sistema Fe (III) / Fe (II) apresenta inclinação significativamente maior da curva e foi selecionado para a aplicação analítica na determinação de dipirona em medicamentos. As recuperações de dipirona alcançadas nestas análises foram de 99,3 a 104,1%. O método é simples e permite a execução de 71 determinações por hora, com baixo consumo de amostras (50 μL) e não sofre interferência de excipientes comumente encontrados nas formulações farmacêuticas.

ALBUQUERQUE et al.⁸¹ descreveram a construção de um eletrodo tubular constituído por uma membrana polimérica contendo tetraoctilamônio como material eletroativo utilizado como sistema de detecção potenciométrica na análise de dipirona por procedimento FIA. Solução de tampão fosfato (pH 5,2) com vazão de 6 mL min⁻¹ foi empregada como solução carregadora para transportar 500 μL de solução de amostra até o eletrodo. A curva de calibração foi construída para injeção de soluções de dipirona na faixa de concentração de $8,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ com um LD estimado em $9,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. O método é menos sensível quando comparado a outros procedimentos em fluxo, entretanto, apresenta uma ótima frequência analítica (108 amostras hora⁻¹). O procedimento foi aplicado na

determinação de dipirona em medicamentos com resultados satisfatórios. As porcentagens de recuperação variaram de 95,6 a 98,4%. Estudo de interferentes revelou a interferência de íons nitrato nas medidas.

III.2. Citrato de Sildenafil

O citrato de sildenafil, comercializado sob o nome de Viagra[®], é um medicamento relativamente novo. Foi introduzido em 1998 na terapêutica e desde então o interesse por este medicamento tem crescido anualmente. Em um cuidadoso levantamento bibliográfico efetuado na base de dados “*ScinFinder*”⁴³, foram encontradas publicações de métodos analíticos para a análise e determinação de citrato de sildenafil em diversas matrizes (fluidos biológicos e medicamentos).

A Figura 5 ilustra a distribuição dos métodos reportados para a análise de citrato de sildenafil de acordo com a técnica analítica empregada. Pode-se verificar que a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)⁸⁹⁻¹⁰⁰ é a técnica mais adotada. Métodos de eletrocromatografia cinética capilar (ECC)¹⁰¹⁻¹⁰⁴, cromatografia gasosa (CG)^{105,106}, voltametria¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, potenciometria¹¹⁰, análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção UV¹¹¹ e detecção potenciométrica¹¹², espectrofotometria¹¹³⁻¹¹⁶, ressonância magnética nuclear (RMN)¹¹⁷, cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE)¹¹⁸ e dispersão de ressonância Rayleigh¹¹⁹ também foram descritos na literatura para a análise de citrato de sildenafil em diversas matrizes, tais como: sangue, urina e formulações farmacêuticas. Recentemente a técnica de difração de raios-X¹²⁰ foi proposta para a detecção de adulterações de formulações farmacêuticas.

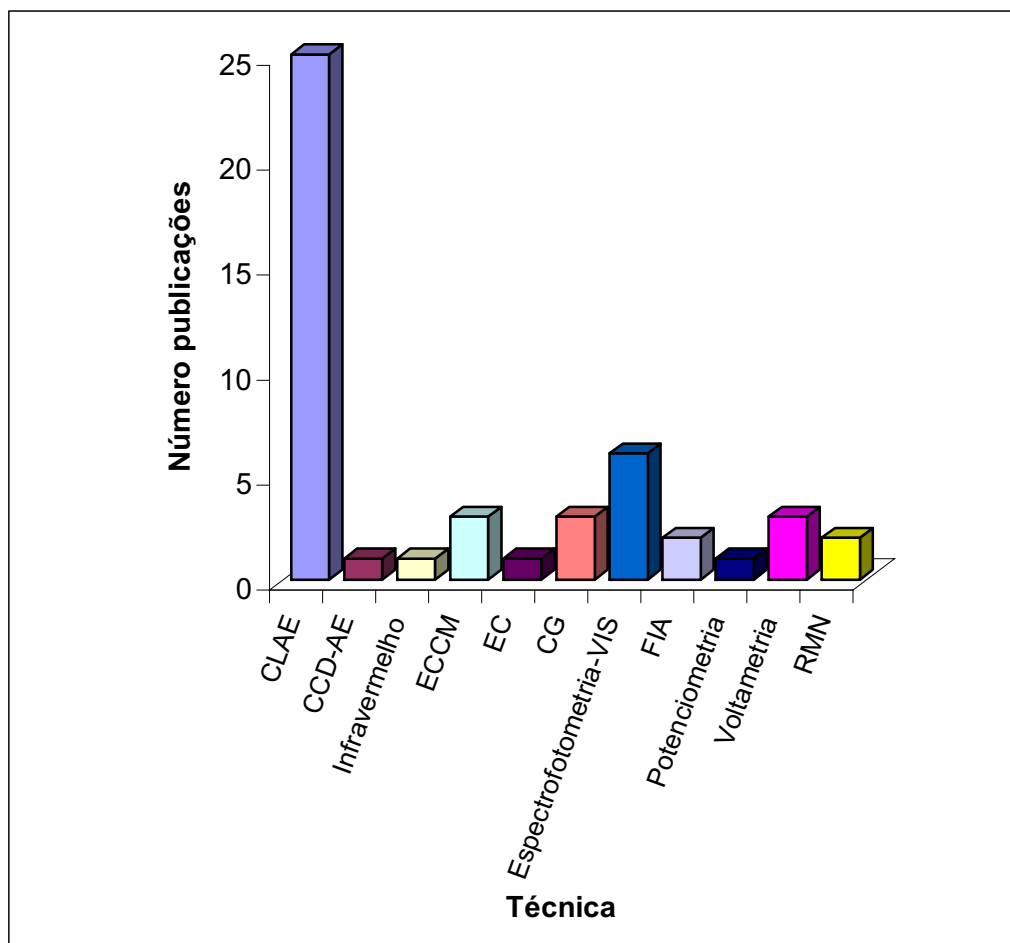


Figura 5. Distribuição das publicações sobre métodos analíticos descritos para a determinação de Citrato de sildenafil segundo a técnica analítica adotada.

III.2.1. Métodos de separação

III.2.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é entre todas as técnicas analíticas de separação a mais empregada na determinação de citrato de sildenafil. Os procedimentos descritos na literatura são na grande maioria baseados em sistemas operando em modo reverso com eluição isocrática. A fase móvel normalmente é constituída por misturas binárias de metanol ou acetonitrila com água pura ou soluções aquosas tamponadas. Algumas vezes uma mistura ternária destas soluções é empregada.

DARAGHMEH et al.⁸⁹ desenvolveram um método de CLAE para determinação de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas e para análise da presença de impurezas oriundas do processo de síntese ou da degradação do fármaco. A separação é realizada de modo isocrático em coluna C-18 utilizando como fase móvel uma solução de acetato de amônio (pH 7,0; 0,20 mol L⁻¹) – acetonitrila na proporção 1:1 (v/v) com vazão de 1,0 mL min⁻¹. A detecção foi efetuada em 240 nm. Uma boa separação cromatográfica foi observada entre citrato de sildenafil e possíveis subprodutos obtidos no processo de síntese ou na degradação do fármaco em aproximadamente 15 min. A faixa de concentração linear de trabalho para o citrato de sildenafil foi de 3,00 x 10⁻⁶ – 1,80 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, com LD de 6,76 x 10⁻⁷ mol L⁻¹. O método foi aplicado em formulações farmacêuticas fornecendo bons resultados, com recuperações variando de 98,7 a 102,7%.

DINESH et al.⁹⁴ desenvolveram um método de CLAE em fase reversa para a quantificação de citrato de sildenafil em sua forma pura e em formulações farmacêuticas. O procedimento opera em modo isocrático e utiliza como fase móvel uma solução de água – acetonitrila (48:52 v/v) com vazão de 1,0 mL min⁻¹, coluna C-18 e detecção UV em 245 nm. Piroxicam foi utilizado como padrão interno. A separação e detecção requerem aproximadamente 7 min. O intervalo linear de trabalho situa-se na faixa de concentrações de citrato de sildenafil de 7,50 x 10⁻⁸ a 1,12 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. O LD estimado foi de 2,25 x 10⁻⁸ mol L⁻¹. O método foi aplicado na análise de formulações farmacêuticas, com recuperações de 98,5 a 101,1%.

ABD-ELBARY et al.⁹⁵ desenvolveram um método de CLAE rápido e específico para a determinação de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas. A

separação cromatográfica isocrática em fase reversa foi conseguida em 5 minutos. Cinarizina foi utilizada como padrão interno. A fase móvel foi a mistura: metanol – água – acetonitrila (60:20:20 – v/v/v) ajustada para pH de 6,1 com adição de 0,1% de ácido acético glacial, passando por uma coluna C-18, a uma vazão de 0,5 mL min⁻¹ e detecção em 290 nm. Uma relação linear entre a área do pico e a concentração de citrato de sildenafil foi observada para o intervalo de $1,50 \times 10^{-8}$ – $3,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. A aplicação na determinação de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas apresentou bons resultados. As porcentagens de recuperação variaram de 97,0 a 104,0%.

NAGARAJU et al.⁹⁶ propuseram o desenvolvimento de um sistema cromatográfico em fase reversa com separação isocrática de citrato de sildenafil para o controle de qualidade do padrão puro de citrato de sildenafil e para o monitoramento das reações químicas durante o processo de síntese do fármaco. A separação foi conseguida em 11 minutos em coluna C-18 empregando como fase móvel a mistura acetonitrila – 0,05 mol L⁻¹ de KH₂PO₄ na proporção 70:30 (v/v) com vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção em 230 nm.

ZHU et al.⁹¹ desenvolveram um método de CLAE acoplado aos sistemas de detecção UV-EM para a determinação simultânea de sildenafil, vardenafil e tadalafil, em suplementos dietéticos, comumente utilizados no tratamento da impotência sexual na China. A separação foi efetuada em modo reverso (coluna C-18), utilizando acetonitrila e uma solução aquosa de acetato de amônio $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ com 0,2% de ácido fórmico como solventes para eluição em programa de gradiente, com vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção UV em 292 nm. A identificação foi realizada pela espectrometria de massas. A faixa de concentração linear para o sildenafil foi de $1,20 \times 10^{-6}$ – $1,20 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O método foi aplicado na análise de três amostras de suplementos dietéticos fortificadas com o analito de interesse. As porcentagens de recuperação variaram de 95,0 a 104,0% para o sildenafil.

ERGUN et al.⁹⁰ descreveram o desenvolvimento e validação de um método de CLAE para a determinação de citrato de sildenafil em amostras de medicamentos e sangue. A separação foi efetuada em coluna C-18, usando uma mistura de acetonitrila – água (45:55 v/v) como fase móvel com vazão de 1,0 mL min⁻¹. Fenobarbital sódico foi empregado como padrão interno e a detecção foi realizada pelo monitoramento da absorção em 220 nm. Os tempos de retenção para o padrão

interno e citrato de sildenafil foram de 3,2 e 7,2 minutos, respectivamente. A faixa de trabalho foi de $5,00 \times 10^{-8}$ – $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de citrato de sildenafil, com limite de detecção de $2,20 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. O método foi aplicado na determinação de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas com recuperação média de 98,3%. A aplicação em amostras de sangue foi efetuada após etapa centrifugação (15 min.), adição de acetonitrila ao sobrenadante para precipitação das proteínas, nova centrifugação (15 min.) e filtração em membrana filtrante de 0,45 µm. A recuperação variou de 98,5 – 101,5%.

ABOUL-ENEIN e HEFNAWY⁹² desenvolveram e validaram um método de CLAE para a rápida determinação de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas usando uma coluna monolítica de sílica (100 x 4,6 mm i.d.) com eluição isocrática em menos de 1 min. A fase móvel consiste da mistura acetonitrila – água (60:40 v/v), com vazão de 2,0 mL min⁻¹ e a detecção efetuada em 292 nm. Uma relação linear foi observada para o intervalo de concentração de $7,50 \times 10^{-8}$ – $4,50 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $3,75 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. O método foi aplicado na análise de medicamentos com recuperações variando de 101,1 – 103,0%.

III.2.1.2. Eletrocromatografia cinética capilar

A eletrocromatografia cinética capilar (ECC) é um híbrido da eletroforese com CLAE e apresenta algumas vantagens em relação às duas técnicas, pois permite a separação tanto de espécies iônicas como neutras, utilizando micro volumes de amostra sem a necessidade de bombeamento com alta pressão e com uma maior eficiência na separação⁴⁴. Considerando a alta capacidade de separação exibida pela eletroforese capilar e a facilidade com que fases micelares e ou tamponadas podem ser modificadas, fica evidente que esta é uma alternativa atrativa para determinações em amostras complexas.

QIN e LI¹⁰¹ construíram um capilar de sílica covalentemente ligada a um líquido iônico (dialquil imidazol) e observaram que o fluxo eletro osmótico no capilar pode ser eficientemente anulado em pH de 3,5 a 7,0. Esta modificação no capilar permitiu a melhor separação de citrato de sildenafil e seu metabólito UK-103,320 em relação ao modo de eletrocromatografia capilar. Baseados nesta observação, os

autores desenvolveram um procedimento de eletroforese capilar acoplado a um espectrômetro de massas para determinar citrato de sildenafil e seu metabólito em amostras de sangue previamente submetidas a uma etapa de extração em cartucho de C-18, em amostras de sangue utilizando a eletroforese capilar acoplada a um espectrômetro de massas. O tempo de uma análise foi de aproximadamente 15 minutos em um intervalo de concentração de trabalho de $7,50 \times 10^{-8}$ – $9,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para o sildenafil, com LD de $2,10 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. A aplicação em amostras de sangue fortificada forneceu recuperações de 97,6 – 100,5%. A camada de líquido iônico pode ser utilizada por até 80 horas de trabalho em condições de fluxo eletro osmótico estável.

FLORES et al.¹⁰² propuseram um método de eletrocromatografia cinética capilar micelar (ECCM) que permite a determinação simultânea de sildenafil, vardenafil e tadalafil, embora as formulações farmacêuticas sejam formuladas com apenas um dos três fármacos e nunca os três concomitantemente. A condição eletroforética utiliza uma solução aquosa de tampão fosfato (pH 12,0) $1,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e dodecil sulfato de sódio (SDS) $2,50 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ aplicando uma diferença de potencial de 25kv para a separação. A detecção foi efetuada em 222 nm. A faixa de concentração de trabalho foi de $1,50 \times 10^{-6}$ – $3,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com LD de $2,85 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para o citrato de sildenafil. A análise de uma formulação farmacêutica contendo este analito exibiu recuperação média de 107%.

NEVADO et al.¹⁰³ desenvolveram um método de ECCM para a determinação de citrato de sildenafil e seu metabólito (UK-103,320) em amostras de sangue. As amostras necessitam de uma etapa de pré-tratamento e eluição com metanol em cartucho de C-18. O extrato alcoólico é evaporado, reconstituído em uma solução de tampão fosfato $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (pH 12,3) contendo 20% de metanol (v/v), e analisado em coluna capilar de sílica fundida. A separação foi efetuada com uma solução tampão de fosfato $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (pH 12,3) contendo $3,00 \times 10$ mol L⁻¹ de SDS operando a temperatura ambiente e 25kv. A faixa de concentração com resposta linear foi de $7,50 \times 10^{-7}$ a $5,25 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com LD de $3,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. A análise de amostras de sangue fortificada com sildenafil apresentou recuperações de 98 a 101%.

III.2.1.3. Cromatografia gasosa

Métodos de cromatografia gasosa (CG)^{104,105} com detector de ionização de chama foram descritos para a análise de citrato de sildenafil em fluídos biológicos e formulações farmacêuticas. O acoplamento da CG com a espectrometria de massas foi empregado para a identificação do citrato de sildenafil. Estes métodos mostraram-se bastante sensíveis. Entretanto, apresentam algumas desvantagens que inviabilizam seu emprego em análises de rotina, pois em geral requerem etapas prévias de extração e purificação da amostra com necessidade de derivatizar o analito antes da análise e o alto custo operacional da técnica.

NEVADO et al.¹⁰⁴ desenvolveram um método de cromatografia gasosa capilar com detecção de ionização de chama para a determinação simultânea de citrato de sildenafil e seu metabólito UK-103,320. O método não requer a etapa prévia de derivatização dos analitos, normalmente necessária em métodos de cromatografia gasosa. Entretanto, para aplicação analítica em amostras de urina e sangue foi necessário efetuar uma extração e pré-concentração em cartucho de C-18 antes da separação cromatográfica. O intervalo de concentração de trabalho para o citrato de sildenafil foi de $1,05 \times 10^{-7} - 1,57 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,50 \times 10^{-7} - 1,57 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para amostras de sangue e urina, respectivamente. Os resultados obtidos na análise de sangue fortificado foram satisfatórios. As recuperações foram de 93 a 98% para o citrato de sildenafil e de 91 a 92% para o seu metabólito. Já, quando a urina foi analisada os resultados mostraram que somente o citrato de sildenafil pode ser determinado com resultados aceitáveis. As recuperações foram de 94 a 107%. Para o metabólito UK-103,320 os resultados não foram adequados, pois as recuperações obtidas foram muito baixas, variando de 13 a 62%.

III.2.2. Métodos eletroquímicos

Entre os métodos eletroquímicos descritos para a determinação de citrato de sildenafil são encontrados alguns métodos que empregam a voltametria¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ e um método potenciométrico¹⁰⁹ com o uso de eletrodos íons-seletivos. Um procedimento de análise em fluxo foi proposto para a determinação de citrato de sildenafil empregando a detecção potenciométrica¹¹⁰.

III.2.2.1. Voltametria

BERZAS et al.¹⁰⁶ estudando o comportamento do citrato de sildenafil pela técnica de voltametria de onda quadrada observaram que o fármaco era fortemente adsorvido no eletrodo de mercúrio. Baseados neste fenômeno propuseram o desenvolvimento de um método bastante sensível para a determinação de sildenafil no intervalo de $1,00 \times 10^{-9}$ – $1,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O método foi aplicado na determinação de formulações farmacêuticas com bons resultados. As taxas de recuperação variaram de 98% para a técnica de voltametria de onda quadrada e de 94 - 99% utilizando a voltametria de onda quadrada adsortiva.

Os mesmos autores¹⁰⁷ verificaram que o principal metabólito do citrato de sildenafil, UK-103,320, apresenta comportamento idêntico ao do sildenafil propondo deste modo, a determinação da concentração total destes analitos em amostras de urina e sangue. A aplicação em urina foi direta, entretanto, a análise de amostras de sangue só foi possível após etapa prévia de pré-concentração em cartucho de C-18. Foi constatada uma baixa reprodutibilidade dos resultados durante a construção da curva de calibração, em função do operador e da quantidade de amostra empregada, provavelmente devido a alterações na composição da matriz. Por este motivo, o método da adição de padrão foi empregado para quantificação da concentração total (sildenafil e o metabólito UK-103,320). Melhores resultados foram encontrados na análise de amostras de sangue, com recuperações de 99 – 102%. Na análise de amostras de urina baixas taxas de recuperação foram observadas, além de uma grande variação nos resultados (65 – 96%).

ÖZKAN et al.¹⁰⁸ desenvolveram um método eletroanalítico baseado na oxidação voltamétrica do anel piperazínico do sildenafil na sua forma não protonada em solução aquosa contendo 30% (v/v) de acetonitrila, sobre a superfície de um eletrodo de carbono na faixa de pH de 2 a 8. As melhores condições experimentais para a aplicação analítica do método se deu tanto em meio tamponado com tampão fosfato (pH 2,0) como em tampão acetato (pH 3,5). A quantificação de sildenafil em formulações farmacêuticas foi efetuada utilizando as curvas de corrente vs potencial usando as técnicas de voltametria cíclica, de onda quadrada e de pulso diferencial. Ambas as técnicas forneceram bons resultados com recuperações próximas a 100% em relação ao valor declarado pelo fabricante das amostras.

III.2.2.2. Potenciometria

OTHAMAN et al.¹⁰⁹ descreveram, a construção e caracterização analítica de dois eletrodos de membrana íons-seletivos para a determinação de citrato de sildenafil em medicamentos. Os sensores propostos baseiam-se nos complexos de associação iônica formados entre sildenafil e tetrafenilborato de sódio e com ácido fosfomolibídico imobilizados em membranas de PVC. Os dois eletrodos mostraram comportamento nerstiano, boa reprodutibilidade, resposta rápida (30 – 40 s) e boa estabilidade durante o período de cinco semanas. A faixa de concentração de trabalho foi de 10^{-2} – 10^{-5} mol L⁻¹, com LD da ordem de 10^{-6} mol L⁻¹. A aplicação em formulações farmacêuticas forneceu bons resultados, com recuperações variando de 98,6 – 99,8%. Porém, os eletrodos sofrem interferência de altas concentrações dos íons Ca²⁺ e Mg²⁺. Para solucionar este problema recomenda-se a adição de algumas gotas de ácido pentaacético dietiltritriamina 5%.

HASSAN et al.¹¹⁰ propuseram a determinação de sildenafil em formulações farmacêuticas empregando procedimento de análise por injeção em fluxo com detecção potenciométrica. Dois eletrodos íons-seletivos foram desenvolvidos, caracterizados e comparados. Os sensores construídos estão baseados na formação de complexos de associação iônica entre sildenafil - fosfato de tungstato (S-FT) e sildenafil – reineckate (S-R), imobilizados em membranas de PVC. Uma resposta nerstiana foi observada para ambos os eletrodos no intervalo de concentração de $1,00 \times 10^{-2}$ - $7,90 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $1,00 \times 10^{-2}$ – $1,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para os eletrodos S-FT e S-R, respectivamente. No estudo da seletividade para os sensores desenvolvidos foi constatado que o eletrodo S-R sofre interferência de um maior número de substâncias e íons (glicina, alanina, uréia, tiouréia, maltose, frutose, oxalato, Mg²⁺, Ba²⁺ e NH₄⁺) que podem estar presentes nas amostras, enquanto que o eletrodo S-FT é menos afetado por estas substâncias. O eletrodo S-FT foi utilizado para construção de um detector tubular aplicado na determinação de sildenafil em amostras de medicamentos e sangue fortificado no sistema de análise por injeção em fluxo. As recuperações variaram de 101,2 a 103,0%. Em torno de 25 a 30 amostras podem ser analisadas em uma hora.

III.2.3. Métodos espectrofotométricos

Há poucos métodos espectrofotométricos^{111,112} descritos para a determinação de citrato de sildenafil e dentre estes se observa que a maior parte baseia-se na formação de complexos de associação iônica em meio tamponados. Estes complexos são extraídos em clorofórmio e as medidas de absorvância então efetuadas na região visível do espectro. Também é reportado um trabalho que propõem diversos métodos espectrofotométricos para determinação de citrato de sildenafil, todos baseados na formação de complexos de transferência de carga¹¹².

DINESH et al.¹¹¹ desenvolveram dois métodos espectrofotométricos baseados na formação de complexos de associação iônica entre sildenafil e verde de bromocresol (método A) e ciano cromoxano R (método B). As reações ocorrem em meio tamponado (pH 2 e 1,4 para os métodos A e B, respectivamente) e em ambos os métodos, o complexo formado é extraído em clorofórmio e monitorado espectrofotometricamente em 415 nm e em 460 nm para os métodos A e B, respectivamente. A lei de Beer foi obedecida para intervalos de concentração de 1,25 – 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($1,88 \times 10^{-6}$ – $3,75 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) para o método A e de 1,50 – 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($2,25 \times 10^{-6}$ – $9,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) para o método B. Os métodos foram aplicados para a determinação de sildenafil em formulações farmacêuticas com bons resultados. As porcentagens de recuperação ficaram em torno de 98,7 – 102,%. Apesar da boa sensibilidade e ausência de interferência de matriz, ambos os procedimentos são demorados e laboriosos. Além destas desvantagens, o uso de clorofórmio é desfavorável, pois oferece riscos tanto ao operador como ao meio ambiente.

AMIN e EL-BESHERSHY¹¹² desenvolveram vários métodos espectrofotométricos para determinação de citrato de sildenafil, baseados na formação de complexos de transferência de carga²⁸ empregando como reagentes cromogênicos os seguintes receptores de elétrons: 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano (TCNQ); 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ); tetracianoetileno (TCNE); 2,4,7-trinitro-9-fluoreno (TNF); ácido cloranílico (CLA); *p*-cloranil (CL); bromanil (BL). A Tabela 1 apresenta as principais características dos métodos propostos por estes autores.

Tabela 1. Características principais dos métodos espectrofotométricos propostos por Amin e El-Beshbershy¹¹² para análise de citrato de sildenafil.

| Reagente | Solvente | T (°C) | Tempo (min) | $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) | Faixa de concentração (mol L ⁻¹) |
|----------|------------------|--------|-------------|-----------------------------|---|
| Iodo | 1,2-dicloroetano | 25 ± 2 | Instantâneo | 366 | 2,25 x 10 ⁻⁵ – 2,40 x 10 ⁻⁴ |
| TCNQ | acetonitrila | 50 ± 2 | 10 | 841 | 2,25 x 10 ⁻⁵ – 3,30 x 10 ⁻⁴ |
| DDQ | metanol | 50 ± 2 | 5 | 460 | 3,00 x 10 ⁻⁵ – 3,90 x 10 ⁻⁴ |
| TCNE | acetonitrila | 50 ± 2 | 5 | 415 | 1,50 x 10 ⁻⁵ – 3,15 x 10 ⁻⁴ |
| TNF | 1,2-dicloroetano | 60 ± 2 | 15 | 412 | 2,25 x 10 ⁻⁵ – 3,60 x 10 ⁻⁴ |
| CLA | acetonitrila | 60 ± 2 | 10 | 529 | 3,00 x 10 ⁻⁵ – 2,70 x 10 ⁻⁴ |
| CL | acetonitrila | 60 ± 2 | 10 | 550 | 4,20 x 10 ⁻⁵ – 2,25 x 10 ⁻⁴ |
| BL | metanol | 60 ± 2 | 15 | 455 | 2,25 x 10 ⁻⁵ – 2,55 x 10 ⁻⁴ |

Como pode ser visto na Tabela 1, com exceção da reação com iodo, as demais não ocorrem instantaneamente a temperatura ambiente. Para que haja o desenvolvimento da reação são necessários períodos de aquecimento de 5 a 15 min a temperaturas de 50 – 60°C. A reação com iodo ocorre instantaneamente a temperatura ambiente, entretanto, o monitoramento é efetuado em 366 nm situado na região do ultravioleta na qual a maioria dos compostos orgânicos apresentam uma ou mais bandas de absorção, podendo interferir nas medidas para determinação correta do citrato de sildenafil.

ALTIOKKA et al.¹¹³ desenvolveram um método para determinação de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas utilizando um procedimento de análise por injeção em fluxo com detecção UV. O sistema em fluxo utilizado é bastante simples no qual uma alíquota de 20 µL de uma solução padrão ou amostra é injetada no fluxo carregador de uma solução aquosa de tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH 8,0) contendo 10 % de metanol (v/v) a uma vazão de 1,00 mL min⁻¹ até o detector onde o sinal é monitorado continuamente em 292 nm. Uma relação linear foi observada para concentrações de sildenafil de 1,00 x 10⁻⁶ – 5,00 x 10⁻⁶ mol L⁻¹. O método foi aplicado na determinação de sildenafil em uma única amostra com recuperação de 95,4%. O trabalho não faz referência de quantas amostras podem ser analisadas por hora, nem fornece os dados necessários para estimá-la.

III.2.4. Outros métodos para determinação de citrato de sildenafil

WAWER et al.¹¹⁴ desenvolveram um método para a identificação e caracterização estrutural de citrato de sildenafil. O procedimento baseia-se na coleta dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de H¹, C¹³ e N¹⁵. Os autores propuseram o uso da técnica de RMN de C¹³, no estado sólido, para a análise de formulações farmacêuticas. Entretanto, a validação do procedimento para fins quantitativos requer o uso de ferramentas estatísticas adequadas para o estabelecimento de importantes parâmetros analíticos, tais como: limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e reprodutibilidade. As medidas de RMN devem ser feitas em um número relativamente grande de amostras, com a mesma composição de excipientes, diferindo apenas no conteúdo do princípio ativo. Desta forma, o custo das análises se eleva, visto que demanda um maior tempo de análise e consumo de amostras, não sendo uma alternativa atraente do ponto de visto custo-benefício.

LIU et al.¹¹⁵ propuseram um método bastante sensível para a determinação de citrato de sildenafil coletando os espectros de ressonância de dispersão Rayleigh do produto obtido na reação entre sildenafil e azul de Evans. O espectro apresentou máxima intensidade em 365nm e neste comprimento de onda uma relação linear foi obtida para concentrações de sildenafil de 0 – 11,5 µg mL⁻¹, com LD igual a 30,3 ng mL⁻¹. O método foi aplicado na análise de medicamentos, nos quais o sildenafil foi determinado sem interferência dos excipientes comumente encontrados nestas formulações com recuperações variando de 97,0 – 104,4%.

A técnica de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) foi empregada por ABOURASHED et al.¹¹⁶ para a determinação de sildenafil em formulações farmacêuticas.

Recentemente, MAURIN et al.¹¹⁷ propuseram o uso da técnica de difração de raios X para o screening de sildenafil em formulações farmacêuticas. O método proposto mostrou-se útil para a análise qualitativa para a identificação de eventuais imitações do medicamento original e permite afirmar com confiança se o composto sildenafil está ou não presente nas formulações farmacêuticas investigadas.

III.3. Sulfonamidas

III.3.1. Considerações gerais

Em levantamento bibliográfico⁴³ no período de 1937 a 10/2007, foram encontradas aproximadamente 1720 citações de métodos analíticos propostos para a determinação de sulfonamidas. A Figura 6 ilustra a distribuição destes trabalhos de acordo com a década de publicação.

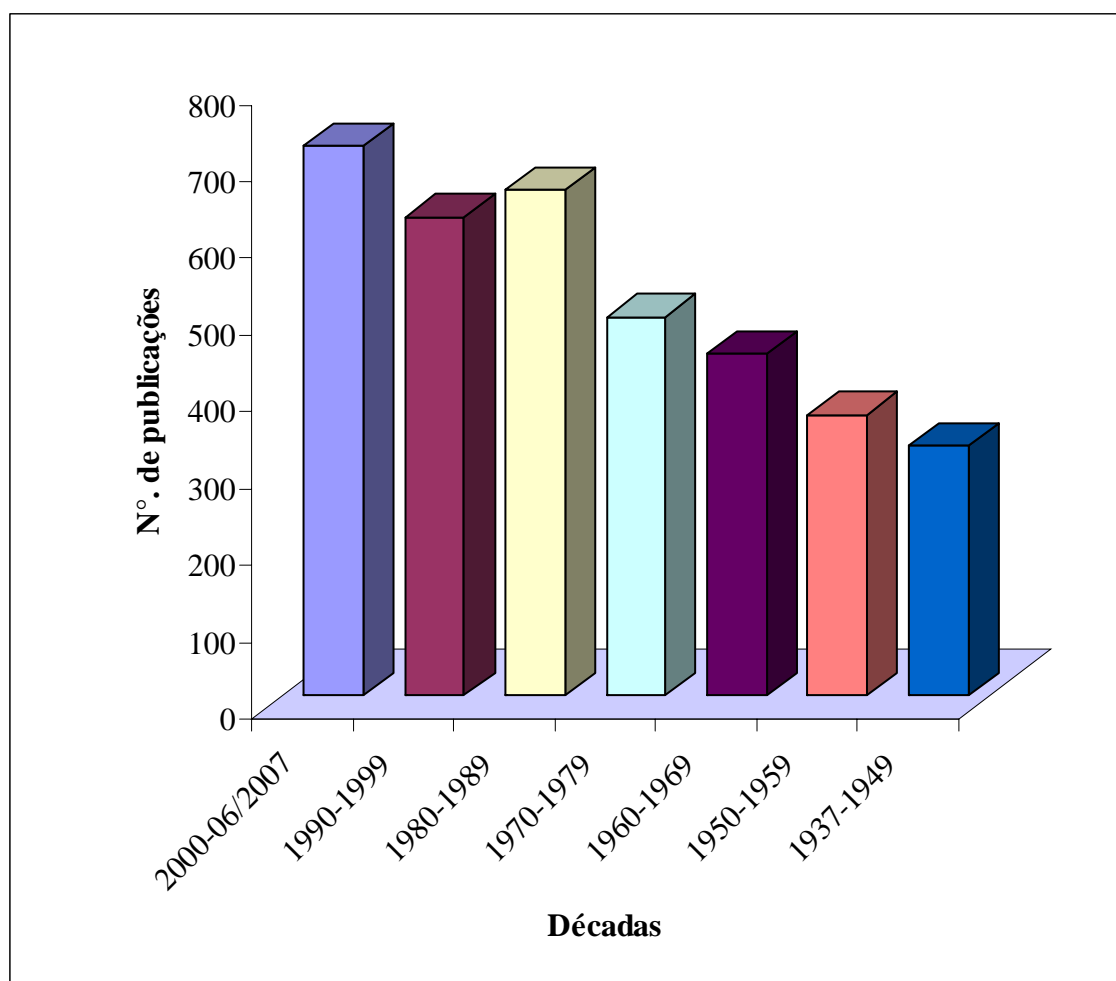


Figura 6. Distribuição das publicações sobre métodos para a determinação de sulfonamidas encontradas na literatura até o mês de outubro de 2007.

Verifica-se que desde os primeiros trabalhos publicados para análise de sulfonamidas em 1937 o interesse por estes antimicrobianos tem aumentado com o passar dos anos. A década iniciada no ano 2000 ainda não completou seu ciclo e o número de artigos publicados já supera àqueles de períodos anteriores.

De um modo geral, os métodos destinam-se para a detecção e/ou quantificação das sulfonamidas em diversas matrizes, tais como: formulações farmacêuticas, fluídos biológicos (urina, sangue e plasma), alimentos de origem animal (leite, ovos, carnes e mel) e em amostras de águas. A Figura 7 ilustra a distribuição destes artigos em função do tipo de amostra na qual foram aplicados e na Figura 8 a análise é feita em função da técnica analítica empregada.

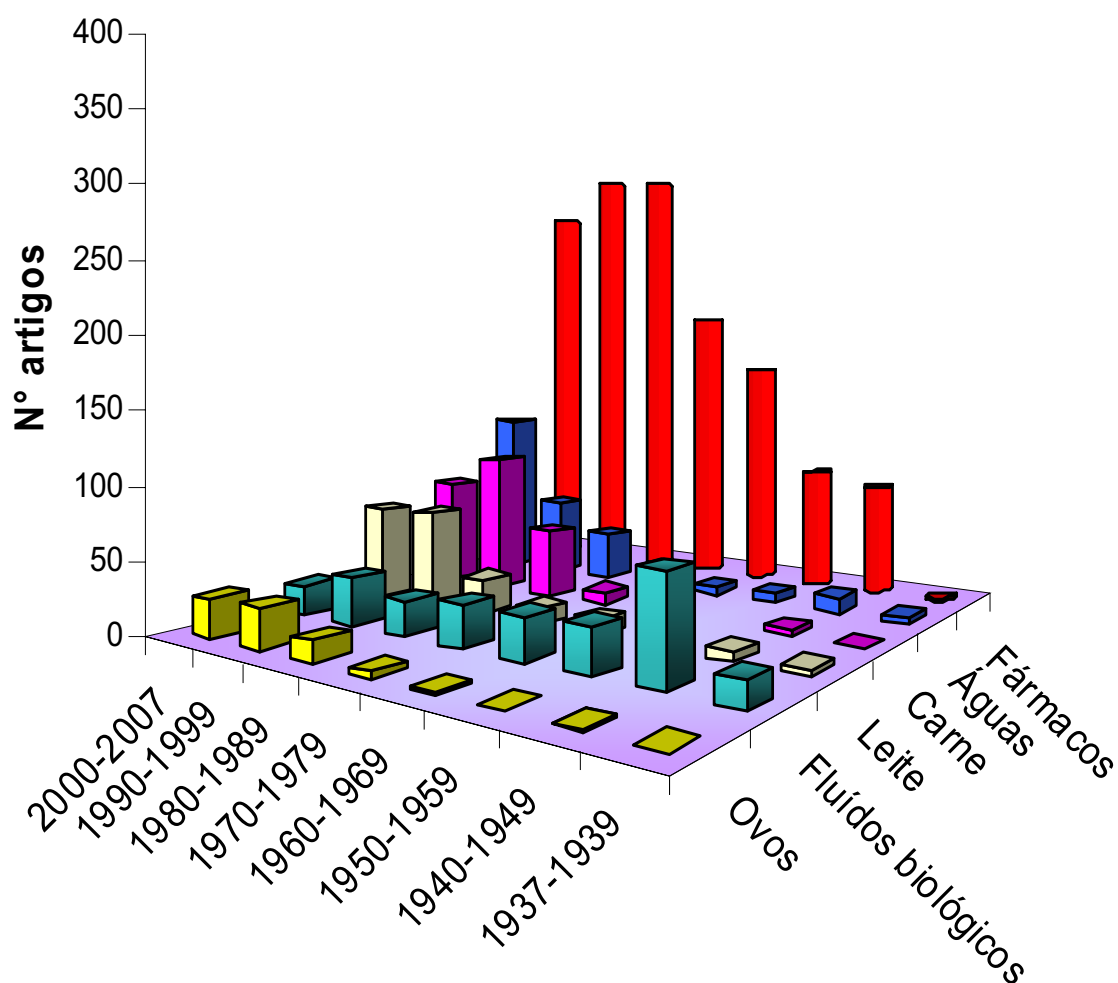


Figura 7. Distribuição das publicações sobre métodos para a determinação de sulfonamidas encontradas na literatura até o mês de outubro de 2007 em função da matriz analisada.

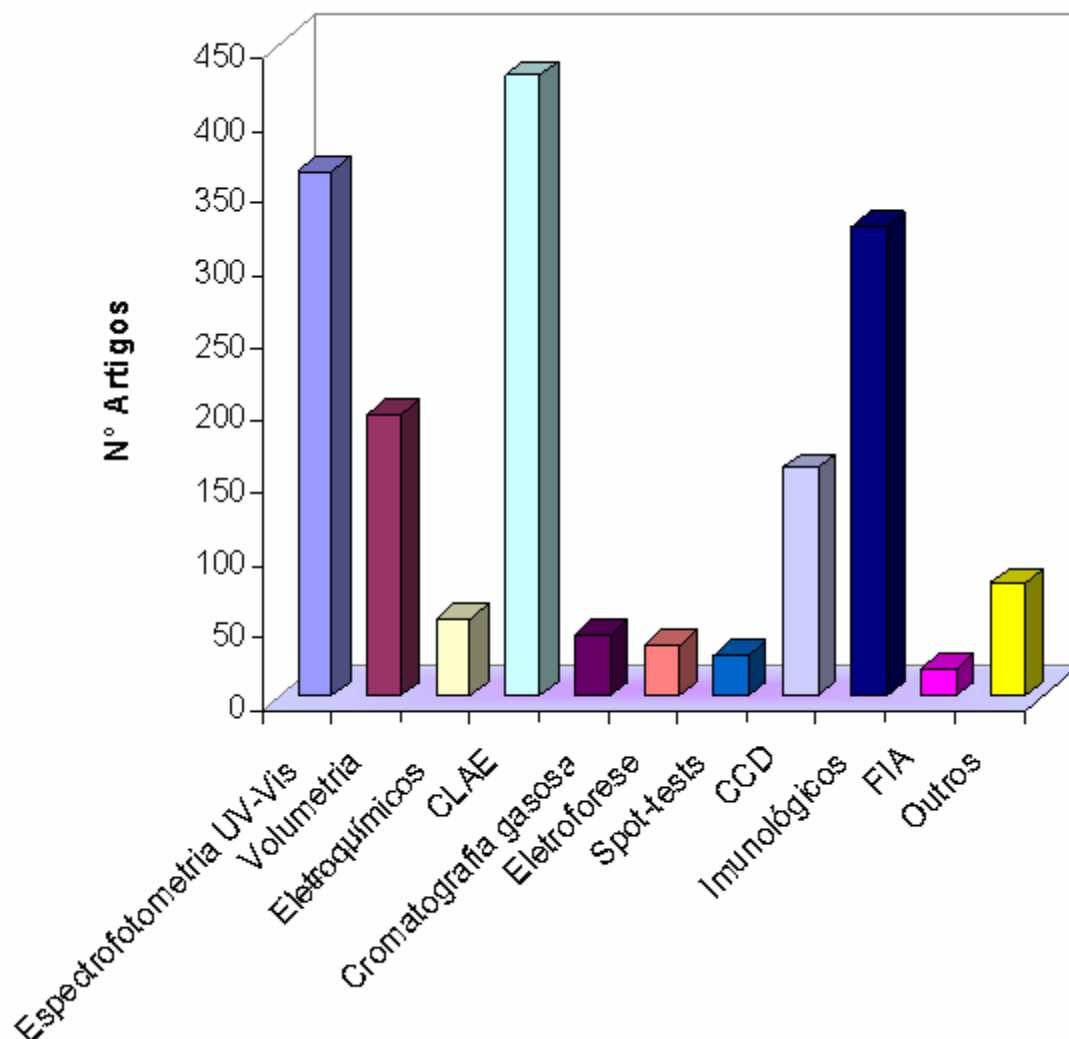


Figura 8. Distribuição das publicações sobre métodos para a determinação de sulfonamidas encontradas na literatura até o mês de outubro de 2007 em função da técnica analítica utilizada.

Explorando o conteúdo deste levantamento é possível distinguir dois grandes grupos de métodos propostos, de acordo com a finalidade para qual foram aplicados. O primeiro inclui os métodos de *screening* aplicados em diferentes matrizes (alimentos, fluídos biológicos, águas) com objetivo de classificar estas amostras quanto à presença (positivas) ou ausência (negativas) dos referidos antimicrobianos. Estes sistemas de *screening* normalmente empregam procedimentos microbiológicos ou imunológicos, baseados no princípio da inibição microbiana ou enzimática^{118,119}.

No segundo grupo estão incluídos os métodos utilizados normalmente para a confirmação dos resultados obtidos no *screening*, os quais têm por objetivo além de identificar um determinado analito, quantificá-lo com exatidão e precisão. Para a análise de amostras complexas, grande destaque é dado às técnicas de separação, acopladas a sistemas de detecção variados. Para a determinação de sulfonamidas em amostras de menor complexidade, como por exemplo, formulações farmacêuticas, técnicas menos sofisticadas como a espectrofotometria e os métodos eletroanalíticos são mais interessantes, mas nem sempre preferidas. Da mesma forma, métodos envolvendo o uso de procedimentos menos sofisticados também são algumas vezes utilizados na análise de matrizes complexas.

III.3.1.1. Métodos de preparo das amostras

Como a aplicação dos métodos para determinação de sulfonamidas é bastante diversificada, algum conhecimento com respeito aos procedimentos de preparo das amostras é indiscutivelmente importante. Desta forma, a discussão dos métodos analíticos propostos para análise de sulfonamidas é frequentemente associada às etapas de preparo das amostras, as quais muitas vezes determinam o sucesso dos métodos^{120,121}.

A análise de resíduos de sulfonamidas geralmente envolve a extração com um solvente apropriado seguida de uma ou mais etapas de pré-tratamento da amostra antes da determinação quantitativa. Tradicionalmente, as sulfonamidas são extraídas de amostras de carne, leite e ovos com o uso de solventes orgânicos, tais como: acetonitrila, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio ou acetona. Alguns solventes também promovem a desnaturação das proteínas possibilitando a obtenção de extratos mais limpos. Após o procedimento de extração líquido-líquido, normalmente uma etapa de limpeza é necessária antes da análise final. Entre os procedimentos de *clean-up* citam-se o emprego de cromatografia líquida (CL), cromatografia em camada delgada (CCD), extração em fase sólida (EFS)^{120,121}.

Recentemente, procedimentos de ultrafiltração (UF) e dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) têm sido empregados no pré-tratamento das amostras. Dispositivos de UF eliminam muitas etapas e problemas associados aos métodos convencionais de preparo de amostras como, por exemplo, a formação de emulsões

que contribui para a obtenção de baixas taxas de recuperação. Conseqüentemente há um aumento na eficiência no pré-tratamento da amostra além da redução de custos. Procedimentos baseados no uso da DMFS também oferecem vantagens sobre os procedimentos convencionais de tratamento de amostras. O procedimento é simples e rápido, a possibilidade de formação de emulsões é eliminada e o consumo de solventes é substancialmente reduzido^{120,121}.

III.3.2. Métodos de análise – técnicas analíticas

III.3.2.1. Espectrofotometria UV-Vis

Os métodos espectrofotométricos estão entre os mais utilizados em laboratórios de análise em todo mundo devido à simplicidade instrumental e operacional⁴⁴. Entre os procedimentos baseados em medidas espectrofotométricas descritos para análise de sulfonamidas pode ser observado que grande parte destes baseia-se na reação de diazotação¹²²⁻¹²⁸ das sulfas. Nesta reação, o grupo amino aromático das sulfonamidas é convertido no respectivo sal de diazônio utilizando ácido nitroso gerado *in situ* pela adição de nitrito de sódio em meio ácido, cujo excesso é neutralizado pela adição de ácido sulfâmico. Nesta primeira etapa, devido à labilidade do sal de diazônio em temperaturas superiores a 15°C, normalmente se faz necessário manter a reação sob condições de baixa temperatura (<10°C) durante aproximadamente 5 minutos. Na seqüência o sal de diazônio formado, sofre uma reação de acoplamento com fenóis ou aminas aromáticas, produzindo então o produto colorido que é espectrofotometricamente monitorado.

Baseados na reação supracitada, vários autores propuseram o desenvolvimento de métodos espectrofotométricos para a determinação de sulfonamidas em diferentes matrizes. Todos estes métodos apresentam em comum a primeira etapa da reação com variações no reagente de acoplamento empregado, produzindo compostos com sensibilidades analíticas e estabilidade ótica variadas, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Principais características dos métodos espectrofotométricos baseados na reação de diazotação propostos para determinação de sulfonamidas.

| Reagente de acoplamento | λ_{\max} (nm) | Intervalo linear (mg L ⁻¹) | Amostras | Comentários | Ref. |
|-------------------------|-----------------------|--|-----------------------------|---|------|
| Iminodibenzil | 570 - 580 | 0,05 – 6,0 | Medicamento | Requer 20 minutos p/ o desenvolvimento de cor e utiliza H ₂ SO ₄ 10 M. Produto é estável por 1 dia. | 122 |
| 3-aminofenol | 460 | 0,05 – 8,0 | Medicamento | Produto é estável por até 6 dias. | 124 |
| 8-hidroxiquinolina | 500 | 0,2 – 6,0 | Medicamento | Produto é estável por até 48 horas | 125 |
| N-naftiletilenodiamina | 540 - 555 | 10,0 – 100,0 | Medicamento | Reação em meio micelar de SDS e tampão acetato (pH 4). | 126 |
| N-naftiletilenodiamina | 400 - 700 | 0,41 – 7,34 | Urina, Mel e medicamento | Requer o uso da espectrofotometria derivativa para uma análise correta devido interferências de matriz. | 127 |
| Fosfato de primaquina | 468 - 474 | 0,1 – 12,0 | Urina, sangue e medicamento | Requer 15 minutos para o desenvolvimento de cor. Produto colorido é estável por várias semanas. | 128 |

Entretanto, apesar dos métodos descritos na Tabela 2 basearem-se na reação de diazotação, amplamente estudada e difundida no mundo todo, algumas desvantagens são observadas. Como exemplo, alguns procedimentos não demonstram alta sensibilidade, sendo adequados somente para amostras que contenham os analitos em concentrações relativamente altas, como é o caso dos medicamentos. Também se observa que os procedimentos envolvem muitas etapas de manipulação das amostras e requerem longos tempos de reação para obtenção do produto colorido a ser monitorado espectrofotometricamente.

Avanços neste sentido foram conseguidos nos métodos baseados em procedimentos de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica^{129,130}. Nestes procedimentos, a reação colorimétrica supracitada é muitas vezes utilizada para a determinação de sulfonamidas em formulações

farmacêuticas e/ou fluídos biológicos, com maior rapidez nas análises e economia de reagentes e amostras.

TENA et al.¹³⁰ propuseram o uso de um sensor para sistema em fluxo baseados na integração da reação e retenção do produto colorido em fase sólida para a pré-concentração *in situ*. A reação de diazotação das SFAs seguida pela reação de acoplamento com N-naftiletilenodiamina (NEED) foi empregada. Após a formação do produto colorido, este é retido em C-18 imobilizada em tubo de vidro inserido na célula de detecção. Adotando esta estratégia um grande aumento na sensibilidade do método foi conseguido, sendo esta a sua principal vantagem. É possível determinar SFAs em intervalos de concentração de 10 – 1200 ppb. Entretanto, a aplicação na análise de amostras complexas não mostrou melhorias, visto que as etapas de ELL com diclorometano e posteriormente em meio aquoso ácido não podem ser dispensadas. As recuperações para amostras de água e leite fortificados mostraram grande variação e em alguns casos valores muito abaixo dos esperados. As taxas de recuperação foram de 26,8 – 86,1% e de 62,7 – 104,2% para amostras de água e leite respectivamente. Os autores também não fazem referência à frequência analítica alcançada pelo método nem sobre a estabilidade do sensor e não fornecem dados que nos permitam determiná-los.

Além dos métodos baseados na reação de diazotação/acoplamento, várias outras reações são propostas para a determinação espectrofotométrica de SFAs.

NEVADO et al.¹³¹ propuseram a determinação simultânea de sulfametazina e sulfatiazol usando o reagente 3-metil-2-benzotiazona hidrazona (MBTH) na presença de íons Fe^{3+} . O recurso matemático de derivação dos espectros é necessário para a correta quantificação dos analitos. Utilizando a derivada 1ª, uma relação linear foi obtida para concentrações de até 40 ppm para ambas as sulfonamidas. O método foi aplicado na determinação de produtos veterinários com recuperações variando de 95,8 a 105,6%.

AMIN et al.¹³² propuseram a determinação espectrofotométrica de sulfonamidas utilizando a reação de transferência de carga destas substâncias com azul de alizarina, vermelho de alizarina e quinalizarina. Os produtos coloridos são

formados após cinco minutos de reação. Relações lineares foram observadas para os três reagentes no intervalo de concentração de 5 a 130 ppm. Os métodos foram aplicados na determinação de sulfonamidas em medicamentos com bons resultados e ausência de interferências. As porcentagens médias de recuperação foram de 99,3 a 100,8%.

AMIN e ZAREH¹³³ propuseram o uso da mistura formaldeído – acetilcetona como reagente cromogênico para a determinação de SFAs. O produto de coloração amarela é formado após aquecimento a 40°C durante 25 minutos e monitorado em 400nm. O produto apresentou estabilidade em soluções com pH ajustado para 4,3 a 4,5. A lei de Beer foi obedecida para concentrações entre 4 e 80 ppm. A recuperação das SFAs na análise de amostras de medicamentos foi de 98,3 a 101,0%.

AL-ABACHI et al.¹³⁴ propuseram o emprego da reação de acoplamento oxidativo utilizando cloridrato de prometazina para a determinação de SFAs em formulações farmacêuticas. A reação ocorre em meio de ácido acético diluído e íons hipoclorito. O produto colorido é formado após 25 minutos de reação a temperatura ambiente e monitorado espectrofotometricamente em 610 nm. A lei de Beer é obedecida para concentrações de 0,4 a 9 ppm. Compostos contendo grupos amino aromáticos primários tais como 1-aminonaftol, ácido amino-salicílico e 4-aminoantipirina interferem seriamente nas medidas.

III.3.2.2. Métodos de separação

Os métodos que empregam as técnicas de separação possuem maior sensibilidade para detectar resíduos de sulfonamidas nas mais variadas amostras (fluídos biológicos, alimentos e águas superficiais). Estes métodos requerem sempre algum tipo de extração e, ou, desproteínização prévia, dependendo da matriz a ser pesquisada, além de instrumentação complexa e operador treinado. No entanto, a capacidade desses métodos em identificar seletivamente e quantificar níveis de resíduos na ordem de ng/mL ou ng/ g tem garantido seu uso, principalmente para a confirmação de amostras positivas em métodos de *screening*. Portanto, encontram maior aplicação na análise de matrizes complexas tais como, leite, ovos, mel, carne, águas superficiais e fluídos biológicos.

III.3.2.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

A CLAE é uma das técnicas analíticas mais empregadas na análise de SFAs o número de publicações é muito grande^{120,121}. Para fornecer ao leitor uma visão geral sobre estes procedimentos, alguns destes métodos foram selecionados e encontram-se apresentados na Tabela 3, relatando algumas das suas principais características. Outros métodos foram detalhadamente descritos devido a sua maior relevância.

A separação é comumente realizada em modo reverso, empregando colunas de sílica modificadas com grupos C-18, C-8 ou C-4, e raramente colunas de íon-par também são empregadas.

A fase móvel consiste principalmente da mistura de acetonitrila – água; metanol – água ou misturas ternárias de acetonitrila – metanol – água. O uso de etanol – água também foi proposto. Adicionalmente, acetato ou SDS também são adicionados à fase móvel para melhorar a separação cromatográfica.

A retenção das SFAs não depende somente da polaridade da fase móvel, mas também da ionização destes compostos. Deste modo, o ajuste do pH da fase móvel tem papel fundamental na eficiência de separação. O pH ótimo encontra-se em torno de 4,4, valor este no qual todas as sulfonamidas com exceção da sulfanilamida tem excelente retenção.

Tabela 3. Características dos principais métodos de CLAE descritos para análise de sulfonamidas.

| Matriz | Preparação das amostras | Deteção | LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | Ref. |
|---------------|--|---|------------------------------|------|
| Frutos do mar | Extração líquido-sólido e EFS de exclusão por tamanho | UV | 10 | 135 |
| Rim e fígado | Dispersão da matriz em fase sólida e extração com fluido supercrítico | EM com ionização eletrospray | 5 - 14 | 136 |
| Leite e ovos | Dispersão da matriz em fase sólida | EM com ionização eletrospray | 1 - 6 | 137 |
| Leite | ELL e ultrafiltração | EM quadrupolo com ionização eletrospray | 5 -20 | 138 |
| Carne | Extração com CH_2Cl_2 | UV-EM/EM | 50 | 139 |
| Mel | Dissolução com EFS de troca catiônica e EFS em Oasis-HLB | CLAE com deteção por fluorescência | 2 - 5 | 16 |
| Leite | SFAs são isoladas através de diálise | UV em 260 nm | --- | 140 |
| Leite | ELL com acetonitrila seguida por EFS | CLAE/APCI-EM | 8,2 | 141 |
| Leite | <i>Clean-up</i> usando UF | DAD | 5 - 20 | 142 |
| Leite e ovos | Extração com ácido tricloroacético-metanol (4:1, v/v), etapa de EF e CL em C-8 | UV em 268 nm | 100 (leite) 10 (ovos) | 143 |

Dentre os métodos de CLAE vários tipos de deteção são empregadas, como: absorção na região do UV^{5,8,11,12,14,28,144-153}, fluorescência^{16,41,154-156}, EM^{7,10,13,15,157-160} e apenas um método utilizando detector eletroquímico é descrito, o qual se baseia na medida coulométrica¹⁶¹.

HUANG et al.⁵ propuseram um método simplificado de CLAE para a identificação e determinação de resíduos de sulfonamidas em amostras de leite bovino. As sulfas são extraídas com a mistura etanol – ácido acético (97:3, v/v) seguida por centrifugação. O sobrenadante é então separado em coluna C-8 modificada com grupos éter, confeccionada pelos próprios autores. O sistema opera em modo isocrático utilizando como fase móvel a mistura acetonitrila – água (5:95) com deteção em 270 nm. Uma relação linear foi observada para o intervalo de concentração de 50 a 1000 ppb para sulfanilamida e de 100 a 1000 ppb para sulfadiazina, sulfamezarina e sulfametazina. A separação das quatro sulfas é conseguida em aproximadamente 16 minutos. As porcentagens de recuperação variaram de 83,7 a 103,0%.

ZAYAS-BLANCO et al.²⁸ desenvolveram um procedimento simples e rápido para a determinação de sulfametazina em leite bovino sem a interferência de outras sulfonamidas. O método envolve um pré-tratamento inicial de 20 mL da amostra pela adição de HCl 1 mol L⁻¹ (20 mL) para precipitação das proteínas e purificação para obtenção de um extrato em diclorometano limpo através da EFS em cartucho C-18. Quando amostras de leite integral são analisadas uma etapa adicional de ELL com hexano é necessária para remoção das gorduras. O extrato é evaporado até securo e o resíduo reconstituído em 0,5 mL de HCl 1 mol L⁻¹. Neste pré-tratamento a amostra é concentrada 40 vezes. A separação e quantificação da sulfametazina são realizadas por CLAE operando em modo reverso e eluição isocrática. A fase móvel consiste na mistura de uma solução aquosa de metanol – acetato de amônio 4,0 x 10⁻³ mol L⁻¹, com vazão de 1 mL min⁻¹. A detecção é efetuada em 264 nm. Uma relação linear foi observada em cinco níveis de concentração (25, 50, 100 150 e 200 ppb) para amostras de leite fortificadas com o padrão analítico. A porcentagem média de recuperação foi 82,8 % com LD de 3 ppb.

SMEDLEY¹⁵² descreve um estudo em colaboração com oito laboratórios para a determinação de oito sulfonamidas em amostras de leite bovino usando a CLAE com detecção ultravioleta em 265 nm. Antes das análises as sulfas precisam ser extraídas da matriz com a mistura de solventes: clorofórmio – acetona (2+1, v/v). O extrato orgânico é evaporado até securo e o resíduo é reconstituído em solução aquosa de mono-hidrogeno fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹. Uma etapa de ELL adicional é feita com hexano para remoção das gorduras. A separação das sulfas foi efetuada em modo isocrático em coluna C-18. A separação e a quantificação foram conseguidas após duas análises empregando condições cromatográficas diferentes. Em uma primeira análise, utilizou-se como fase móvel a mistura metanol - KH₂PO₄ (12 + 88, v/v), possibilitando a separação inicial de cinco sulfas. A segunda análise é feita empregando como fase móvel a mesma mistura supracitada, porém na proporção de 30:70 (v/v). Em ambas as condições a coluna foi mantida a 35°C com a fase móvel fluindo a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. A necessidade de duas condições cromatográficas diferentes para a separação das oito sulfas implica na análise de uma mesma amostra duas vezes. Este fato torna a análise dispendiosa e demorada. Se dois sistemas cromatográficos forem disponíveis o tempo total de análise diminui, mas o custo aumenta. Se não há disponibilidade de dois

equipamentos, o tempo de análise aumenta consideravelmente, pois primeiro uma análise é feita empregando a primeira fase móvel, então a coluna precisa ser condicionada com a segunda fase móvel por pelo menos uma hora para que só então a segunda análise seja efetuada. Isto também eleva os custos da análise, pois o gasto com solventes é maior.

WU et al.¹⁵³ determinaram oito sulfonamidas (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfamonometoxina, sulfametoxazol, sulfametoxina e sulfaquinoxalina) em leite bovino utilizando a CLAE operando em modo gradiente com detecção em 270 nm. As amostras inicialmente são filtradas em papel de filtro quantitativo e na seqüência 10 mL são tratados com sulfato de sódio anidro (15 g) e acetato de etila (15 mL) com agitação por um minuto. A mistura é centrifugada e a fase orgânica coletada e o procedimento repetido mais uma vez. Os extratos orgânicos são combinados, evaporados até *secura* e o resíduo dissolvido em 1 mL de acetato de etila. Esta solução é então submetida a uma etapa de purificação em cartucho de extração aniônico contendo sílica modificada com grupos amino. As sulfas são eluídas com 1,5 mL da mistura de metanol – acetonitrila – solução aquosa de ácido acético 1% (1:1:8, v/v/v) e separadas em coluna C-18. Um número de 75 amostras foram fortificadas e analisadas. As porcentagens de recuperação variaram de 70,5 a 89,0%. Em duas das amostras analisadas foi constatada a contaminação por sulfadiazina em concentrações de 9,7 e 12,3 ppb.

TSAI e KONDO¹⁵⁶ desenvolveram um método de CLAE com detecção fluorimétrica para a determinação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametazina, sulfamonometoxina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina em sangue e leite bovinos. Foi empregado o ácido p-aminobenzóico como padrão primário. As sulfas foram extraídas com acetonitrila, seguida por evaporação e derivatizadas pela adição de fluorescamina gerando derivados fluorescentes. A separação em coluna C-18 empregou como fase móvel a mistura acetonitrila – fosfato $10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ nas proporções 30:70 (v/v) e a detecção fluorimétrica com excitação em 390 nm e emissão em 475 nm. A separação é efetuada em aproximadamente 20 minutos. A faixa de concentração de trabalho foi de 0,1 – 100 ppb. As taxas de recuperação na análise de amostras enriquecidas com mistura de sulfas em concentrações de 1,0 e 10 ppb foram de 95,4 – 107,2% e 81,4 – 89,6% para sangue e de 80,7 – 91,1% e 62,6 – 84,1% para leite, respectivamente.

VOLMER¹⁶⁰ propôs a determinação de resíduos de 21 sulfonamidas em amostras leite bovino empregando a técnica CLAE, acoplada a espectrometria de massas (EM-EM). A separação é conseguida em menos de seis minutos operando em modo reverso com a fase móvel constituída pela mistura de acetonitrila e água (10:90, v/v) com adição de 0,1% de ácido fórmico com eluição em modo gradiente. As amostras requerem uma etapa prévia de purificação para precipitação das proteínas do leite e remoção das gorduras empregando HCl e hexano, respectivamente. O extrato resultante é pré-concentrado 10 vezes pela evaporação do solvente. As porcentagens de recuperação foram avaliadas para níveis de concentração de 10 e 100 ppb, com resultados variando de 72 – 96%.

III.3.2.2.2. Cromatografia gasosa

Esta técnica é sensível e seletiva para a determinação de sulfonamidas. Entretanto, é essencial derivatizar as sulfonamidas para obter derivados voláteis antes da análise cromatográfica. Esta etapa de derivatização normalmente envolve tanto a metilação das SFAs como a metilação seguida por uma acilação.

Devido a laboriosidade do procedimento de preparo das amostras, a técnica de CG é pouco empregada para a análise de SFAs¹⁶²⁻¹⁶⁷.

TAKATSUKI e KIKUCHI¹⁶⁴ desenvolveram um método de cromatografia gasosa, acoplado a espectrometria de massas para a determinação simultânea de seis sulfonamidas em amostras de ovos e salmão. A aplicação do método na análise destas amostras complexas requer um tratamento laborioso e tedioso. Amostras passam por etapas de extração líquido-líquido (ELL) e extração em fase sólida (EFS). Após a extração, as sulfas são convertidas em derivados metilados para só então poderem ser separadas pela técnica de cromatografia gasosa. A faixa de concentração de trabalho foi de 0,10 – 1,00 ppm, com LDs variando de 30 a 50 ppb. As porcentagens de recuperação para níveis de concentração de 1 e 0,2 ppm foram de 92,2 – 107% e de 59,1 – 101,9%, respectivamente. Estes resultados indicam que as taxas de recuperação mostram grande variação quando concentrações menores são examinadas, indicando a baixa exatidão e precisão das medidas.

GOODSPEED et al.¹⁶⁵ propuseram um procedimento de *screening* de cinco sulfonamidas em amostras de fígado, rim e músculo bovinos. As sulfonamidas são extraídas com acetona, o extrato é evaporado e reconstituído em éter etílico e novamente extraído com solução de HCl 1 mol L⁻¹. Este extrato aquoso é submetido ao *screening* empregando procedimento colorimétrico baseado na reação clássica de diazotação. As amostras que apresentaram resultados positivos foram então submetidas ao procedimento de CG para confirmação dos resultados. Para tanto, o pH das amostras foi ajustado para 6,5 e as sulfas extraídas com diclorometano. O extrato é submetido a duas etapas de derivatização. A primeira consiste na metilação das sulfonamidas seguida pela acilação com anidrido pentafluoropropiônico. Os derivados são então analisados pela CG usando detector de captura de elétrons. A separação é efetuada em apenas três minutos. Entretanto, a desvantagem do método reside no preparo das amostras, que é demasiadamente demorado e laborioso, além de empregar solventes de elevada toxicidade, como o diclorometano. O método foi aplicado na análise das amostras fornecendo resultados com variações muito grandes. Por exemplo, na análise de amostras contendo 100 ppb de sulfas as taxas de recuperação variaram de 40,3 – 89,3%; 54 – 123% e de 50,7 – 99,8% para fígado, rim e músculo, respectivamente.

CARIGNAM e CARRIER¹⁶⁶ descreveram um procedimento de cromatografia líquida para a purificação prévia de amostras de fígado e músculo suínos e posterior separação e detecção empregando CG-EM, para a quantificação de sulfametazina. O método apresentou boa sensibilidade, permitindo a análise de concentrações menores que 100 ppb. Entretanto, várias etapas estão envolvidas no preparo das amostras o que pode resultar em baixos índices de recuperação. Como os autores não fornecem as recuperações obtidas e nem fornecem dados que nos permitam determiná-las, a análise da eficiência e aplicabilidade do método proposto fica prejudicada.

REEVES¹⁶⁷ propôs a confirmação da presença de nove sulfas em concentrações de 10 ppb em amostras de leite bovino empregando a CG-EM. As sulfas são extraídas do leite com acetato de etila e purificadas em cartucho de EFS contendo como material sorvente sílica modificada com grupos ciclohexil. O extrato é derivatizado e então analisado. A separação é efetuada em aproximadamente 30 minutos. O método mostrou ser bastante preciso e exato, sendo indicado para

análises confirmatórias. Entretanto, seu uso no *screening* não é recomendado devido ao alto custo dos equipamentos e devido ao laborioso preparo das amostras.

III.3.2.2.3. Eletroforese capilar de alta eficiência

Nos últimos anos, a eletroforese capilar de alta eficiência (ECAE) tem-se tornado uma técnica promissora para a separação de uma ampla variedade de amostras, devido a sua alta resolução, alta eficiência, rapidez e pequeno consumo de amostras e solventes, quando comparada a CLAE^{120,121}.

A separação das SFAs empregando a ECAE é efetuada normalmente em dois modos: eletroforese capilar (EC) ou eletrocromatografia cinética capilar micelar (ECCM). A preparação das amostras é semelhante às descritas para os métodos de CLAE. Tampões fosfato ou borato são os mais comumente utilizados como modificadores eletrolíticos para a separação dos analitos no modo ECCM. No modo de EC a separação é controlada pelo ajuste adequado do pH do tampão empregado.

A ordem de migração das SFAs depende da razão carga massa e é determinada primariamente pelos valores de pKa. Deste modo, a precisa otimização do pH do tampão é indispensável para uma separação adequada. Para a EECM além do pH a concentração do surfactante é crucial. Além da importância dos valores de pKa, a separação é governada pelas constantes de ligação do soluto-micela.

NG et al.¹⁶⁸ desenvolveram um método de eletroforese capilar usando β -ciclodextrina como modificador para a separação de uma mistura de sete SFAs. O pH 7,0 apresentou os melhores resultados para a separação e monitoramento em 210 nm. Uma relação linear foi observada para concentrações de 100 a 1000 ppm. A recuperação média de SFAs na análise de amostras de medicamentos foram relativamente baixas, em torno de 86,0%.

FUH e CHU¹⁶⁹ propuseram o uso da ECAE combinado a etapa de *clean-up* por EFS para a determinação de oito SFAs em amostras de carne. A completa separação é conseguida usando solução tampão de $\text{Na}_3\text{PO}_4 - \text{H}_3\text{PO}_4$ (pH 6,5) aplicando uma voltagem de 25 kV. Relações lineares foram observadas para

concentrações de SFA de 0,5 – 5,0 ppm, com LDs variando de 5 a 10 ppb. As porcentagens de recuperação foram de 80 a 97%.

III.3.2.3. Métodos microbiológicos

O uso de kits comercialmente disponíveis, baseados nestes métodos microbiológicos como testes rápidos para a detecção de resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem animal têm se difundido.

Os métodos microbiológicos permitem detectar um amplo espectro de antimicrobianos, mas com a limitação de que os limites de detecção (LD) são relativamente altos, variando normalmente de 2 µg / Kg a 10 mg / Kg. Desta forma, classes de antimicrobianos como a das sulfonamidas não pode ser determinada com sensibilidade adequada para análise de resíduos dos mesmos¹⁷⁰.

Os conjuntos mais antigos apresentam como princípio, a inibição do crescimento de espécies de bactérias sensíveis, o que possibilita a sua aplicação em diferentes tipos de amostras, como urina, soro e vários tecidos. A análise é executada em placas, utilizando-se um disco ou *swab* (é um cotonete de cabo comprido que já vem esterilizado num invólucro de papel) estéril posto em contato com o fluido ou tecido suspeito de conter resíduos. O *swab* é, então, posicionado na placa de ágar contendo a bactéria sensível ao antibiótico e incubado por 8 a 12 horas, dependendo do conjunto utilizado. A zona de inibição de crescimento bacteriano circundante ao *swab* indica a presença de antibiótico na amostra⁴.

A inibição do crescimento microbiano pode ser avaliada, também, através de indicadores colorimétricos. Os sistemas que empregam esta técnica são conhecidos pela sigla BsDA (*Bacillus stearothermophilus* Disk Assay), considerados oficiais para a detecção de resíduos de antibióticos *b*-lactâmicos no leite¹⁷¹. Diferentemente dos testes de placa, a inibição microbiana é constatada usando-se um indicador de pH, cuja cor é alterada na presença de compostos ácidos produzidos pelo *B. stearothermophilus*. Deste modo, se na amostra houver resíduos, o crescimento bacteriano é inibido e a mudança de cor não ocorre.

Os métodos que empregam princípios microbiológicos, contudo, apresentam certas pontos críticos que exigem maiores cuidados e conhecimento técnico

especializado para sua execução; além disso, os resultados não são imediatos. Estes kits também apresentam baixa especificidade e podem gerar resultados falso-positivos, exigindo, portanto, testes confiáveis adicionais para a confirmação dos resultados¹⁷². Estas análises confirmatórias normalmente são feitas por técnicas mais especializadas de separação cromatográfica acopladas a espectrômetros de massa e utilizadas para a detecção e quantificação de resíduos de antimicrobianos em diversas matrizes.

III.3.2.4. Métodos imunológicos

Os conjuntos que empregam princípios imunológicos baseiam-se na competição por sítios de ligação em receptores de células bacterianas que são específicos para várias classes de antibióticos. Os receptores bacterianos são adicionados à amostra, juntamente com antibióticos conjugados com isótopos radioativos (radioimunoensaio) ou enzimas (ELISA). A concentração de resíduos na amostra pode ser avaliada através de radiometria ou colorimetria, sendo diretamente proporcional ao número de sítios receptores ocupados pelo antibiótico não marcado. Entre as vantagens destas técnicas, destacam-se rapidez e simplicidade de execução, menor conhecimento técnico exigido para suas operações, maior especificidade para determinados antibióticos e possibilidade de detecção de outros agentes antimicrobianos, além de antibióticos¹⁷³.

É importante ressaltar que os conjuntos de reativos necessitam de condições adequadas de armazenagem e operação, pois, por se tratar de um material biológico, são sensíveis às variações do ambiente. Assim, deve-se procurar mantê-los em temperatura conveniente para conservação, bem como realizar o teste em sala apropriada para esta finalidade, evitando a ocorrência de resultados falso-positivos. Além disso, as orientações fornecidas pelo fabricante devem ser seguidas rigorosamente, principalmente no que se refere à alíquota de leite tomada para o ensaio, ao uso adequado dos reagentes e cumprimento dos períodos de incubação, quando necessários¹⁷³.

Recentemente, novos métodos analíticos, baseados em reações imunológicas e/ou enzimáticas foram aprimorados, oferecendo uma alternativa prática, aos procedimentos microbiológicos¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

O'KEEFFE, M. et al.¹⁷⁵ utilizando-se do princípio dos métodos de imunoensaio propuseram o desenvolvimento de uma nova metodologia, denominada de imunocromatografia, a qual como o próprio nome indica, alia os princípios cromatográficos com aqueles dos procedimentos baseados em imunoensaios. Entretanto, neste início, a aplicação da metodologia ficou restrita a análise somente de uma sulfonamida isolada, a sulfametazina. Recentemente¹³³, procedimento semelhante foi desenvolvido, porém ampliando o espectro de analitos, permitindo a análise de várias sulfonamidas simultaneamente.

III.3.2.6. Outros métodos

Métodos eletroanalíticos são poucas vezes empregados para a análise de SFAs¹⁷⁷⁻¹⁹¹. As poucas citações de uso desta técnica são feitas até a década de 90 e daí em diante nenhuma referência de métodos eletroquímicos é feita na literatura.

Dentre estes métodos, YAO et al.¹⁸¹ descreveram a construção de eletrodos íons-seletivos para a determinação potenciométrica de sulfatiazol, sulfadoxina e sulfadimetoxina em formulações farmacêuticas. Os eletrodos são construídos pela imobilização dos complexos íon-par formados entre cetiltriocetilamônio com as formas aniônicas das sulfas examinadas em tubos de PVC. Os eletrodos apresentaram resposta rápida (15 – 25 segundos) e comportamento nerstiano para faixas de concentrações entre $3,00 \times 10^{-5}$ – $1,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. O método foi aplicado na análise de medicamentos com recuperação média de 99,3% e ausência de interferências.

Outros métodos propostos na literatura empregam medidas de absorção atômica¹⁸²⁻¹⁸⁴ para a determinação indireta de SFAs em diversas matrizes. Métodos volumétricos com determinação do ponto de equivalência através de medidas espectrofotométricas¹⁸⁵ ou potenciométricas¹⁸⁶ também foram propostos para a análise de medicamentos. Entre outras técnicas citam-se a CCD¹⁸⁷, procedimentos em fluxo¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ e recentemente, a fluorimetria^{191,192} também foi empregada.

Capítulo IV. Estratégias e técnicas analíticas
empregadas neste trabalho: comentários gerais

IV.1. Métodos de *Screening*: considerações gerais

A necessidade por respostas analíticas rápidas e exatas é inquestionável. Métodos laboratoriais convencionais que fornecem informações qualitativas e quantitativas detalhadas sobre as amostras estão sendo cada vez mais (mas não completamente) substituídos por ferramentas analíticas de resposta rápida, fornecendo uma resposta binária SIM/NÃO, a qual indicará se os analitos de interesse estão presentes acima ou abaixo de uma concentração pré-estabelecida como limite.

Deste modo algumas importantes vantagens podem ser conseguidas incluindo redução de custos, rapidez, simplicidade e minimização de erros operacionais pela demora entre a amostragem e a análise. Esses métodos são denominados de métodos de “*screening*”¹⁹³, também conhecidos como métodos de triagem.

Os métodos de *screening* (rastreamento, reconhecimento, varredura) são considerados métodos para averiguação preliminar que têm como função confirmar ou não a presença de um ou mais analitos em uma dada amostra, ou seja, permitem classificar as amostras de acordo com algum critério pré-estabelecido¹⁹⁴. O procedimento básico deve usar equipamentos e operações simples e produzir uma resposta binária SIM/NÃO que ocasionalmente requer confirmação¹⁹³⁻¹⁹⁶.

Os principais objetivos dos sistemas de *screening* são:

➤ Fornecer uma resposta rápida e confiável em relação a uma propriedade específica de uma amostra, objeto ou sistema, de modo a evitar o processamento completo de um grande número de amostras e, assim, obter medidas globais de substâncias tóxicas e/ou tomar decisões rápidas;

➤ Minimizar as operações preliminares de um processo analítico convencional. Estas operações preliminares, normalmente são trabalhosas e são as maiores fontes de erro sistemáticos ou aleatórios, sendo o ponto fraco do processo analítico¹⁹⁷. Além disso, em alguns casos, oferecem perigo para o operador e para o ambiente.

➤ Minimizar a necessidade do uso permanente de instrumentos com altos custos de aquisição e manutenção. Ao invés de serem usados para avaliar todas as amostras, estes poderiam ser reservados para processar somente aquelas amostras para as quais o sistema de *screening* previamente fornecesse uma resposta positiva confiável.

As principais diferenças entre um sistema de *screening* e os métodos analíticos tradicionais^{193,198} referem-se as características sumarizadas abaixo, para os métodos de *screening*: tendem a ter uma ênfase mais qualitativa do que quantitativa; normalmente envolvem pouco ou nenhum tratamento de amostra; os métodos utilizados são rápidos; a resposta binária obtida algumas vezes requer confirmação pelo uso de um método convencional; a resposta é usada para se tomar uma decisão imediata.

A Figura 9 ilustra a propriedade seletiva de um método de *screening* usado para a classificação de um conjunto de amostras.

Em muitos casos apenas uma pequena parcela de amostras fornece uma resposta positiva e deve, então, ser submetida ao processo analítico convencional de análise. Esses procedimentos de confirmação servem tanto para confirmar a resposta do sistema de *screening* quanto para adicionar informações analíticas quantitativas. Usualmente envolvem o uso de procedimentos analíticos complexos e técnicas caras como as de separação acopladas muitas vezes a espectrometria de massa. Sem dúvida estes são mais exatos e precisos, mas também são mais laboriosos, tediosos e dispendiosos principalmente quando um grande número de amostras precisa ser analisado.

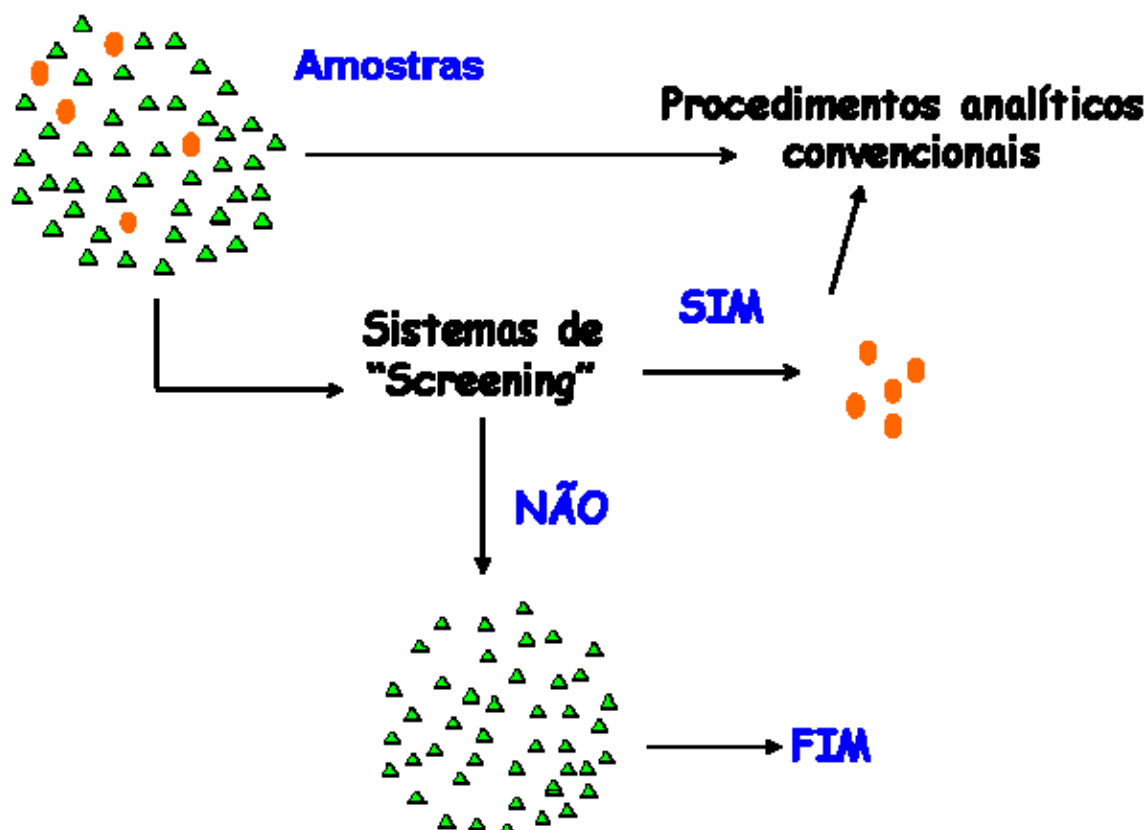


Figura 9. Classificação de um conjunto de amostras através de métodos de *screening*. As amostras em vermelho contêm um analito em nível de concentração acima do valor de corte (Baseado em: VALCÁRCEL et al.¹⁹³).

Em alguns casos, além de indicar em quais amostras o analito está presente, o sistema de *screening* também pode indicar a concentração aproximada de forma a facilitar a escolha do método de confirmação a ser utilizado. Portanto, a resposta binária (SIM/NÃO) qualitativa fornecida pelo sistema de *screening* possui conotações quantitativas. Isto ocorre quando são utilizados instrumentos nos métodos de *screening* e os sinais obtidos são adequadamente convertidos em uma resposta binária. Entretanto, nestes casos algumas informações quantitativas devem ser levadas em conta: o limite de detecção do procedimento utilizado; o limite imposto pelo cliente ou pela legislação em vigor; o nível de concentração de corte adotado pelo analista; as incertezas nas quantificações prévias.

Como podemos perceber é na fase de *screening* que se define a continuidade do processo, direcionando novas tomadas de amostras com posterior investigação detalhada. Neste sentido, os métodos de *screening* requerem rapidez nas respostas

e custo mais baixo na execução das análises em comparação à análise convencional ou completa.

Tabela 4. Exemplos de aplicações dos métodos de *screening*.

| Análito | Amostra | Comentários e técnica analítica empregada | Ref. |
|---------------------------------------|---------------------|--|-------------|
| Resíduos de penicilinas | Leite | Imunoensaio empregando biossensores | 199 |
| Hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) | Óleo vegetal | Extração por fluido supercrítico acoplado a cromatografia líquida com detecção fluorimétrica | 200 |
| Benzodiazepinas | Urina | FIA com detecção espectrofotométrica acoplada a EFS “on-line”. | 201 |
| Penicilinas | Águas | Emprega a ECCM com detecção UV em 210 nm. | 202 |
| Pesticidas organoclorados | Solos | Emprega a extração assistida por microondas seguida pela determinação por CG. | 203 |
| Antibióticos | Leite | Emprega a CLAE com ionização por eletrospray e detecção por EM do tipo triplo quadrupolo (EM/EM). | 204 |
| Dexametasona | Água e ração animal | Emprega a cromatografia de imunoafinidade acoplada a CLAE com detecção por DAD. | 205 |
| Diuréticos | Urina | Emprega a ELL dos analitos da matrix, seguida por derivatização e posterior análise por CG com acoplada a detecção por EM. | 206 |
| Antibióticos | Leite | Os analitos são extraídos por EFS após precipitação das proteínas e analisados por EC com detecção UV. | 207 |
| Sulfonamidas | Ovos | Analitos são extraídos das amostras com acetonitrila. Uma etapa de EFS é executada e a análise é efetuada por CG/EM e LC/EM. | 208 |
| Antibióticos | Águas de ETE | Amostras passam por etapas de ELL e EFS seguida pela identificação e quantificação por CL acoplada a EM. | 209 |

IV.2. Espectrofotometria: estratégias para aumento da sensibilidade

A espectrofotometria UV-Vis é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas⁴⁴.

Apesar da grande utilização, ainda são poucas as inovações relacionadas às medidas espectrofotométricas²¹⁰. Em termos instrumentais, a evolução é notável,

desde os procedimentos baseados em medidas visuais e fotômetros de filtro até os equipamentos mais recentes, como os de arranjo de diodos, que permite o registro do espectro inteiro em uma dada faixa de comprimentos de onda, de uma só vez em fração de segundos.

Muitas inovações referentes à espectrofotometria consistem em estratégias para aumento de sensibilidade, visando ampliação da faixa de aplicação da técnica e permitindo em alguns casos, que medidas em concentrações da ordem de nmol L^{-1} sejam efetuadas²¹⁰.

Entre as ferramentas comumente utilizadas para o aumento da sensibilidade em espectrofotometria incluem-se²¹⁰: espectrofotometria derivativa, aumento do caminho óptico, separação e concentração do analito, medidas em fase sólida e o uso de surfactantes. Dentre estes, destaca-se o emprego de surfactantes principalmente devido à sua capacidade em modificar algumas propriedades reacionais, com conseqüente melhoria em sensibilidade e/ou seletividade analítica²¹¹.

As principais características do uso de surfactantes estão relacionadas à formação de ambientes organizados também conhecidos como ambientes micelares²¹¹. Na presença de surfactantes, o equilíbrio e cinética das reações, bem como propriedades espectrais podem ser modificadas. As alterações podem ser observadas para um amplo intervalo de concentração dos surfactantes, acima ou abaixo da sua concentração micelar crítica (cmc)²¹².

Ambientes micelares podem induzir deslocamentos favoráveis das constantes de equilíbrio e propriedades espectrais, tais como deslocamentos batocrômicos. Inibir reações indesejáveis, como hidrólise e fotólise, estabilizar intermediários de reações, aumentarem a velocidade de reações através da catálise micelar e solubilizar amostras polares e não-polares. Esta última propriedade é de grande importância para a substituição de metodologias tradicionais de extração e/ou separação, baseadas em uso de solventes orgânicos, laboriosas e que muitas vezes oferecem altos riscos ao operador devido a toxicidade e periculosidade dos solventes normalmente empregados.

Desta forma, pode-se destacar o emprego de surfactantes principalmente sob dois aspectos, ambos devido à formação de ambientes quimicamente organizados²¹¹. O primeiro se refere à melhoria da sensibilidade e/ou seletividade e o segundo, se relaciona a etapas de concentração e/ou separação onde é possível

substituir solventes orgânicos na busca de procedimentos “limpos” do ponto de vista da Química Verde²¹³.

IV.3. Análise por injeção em fluxo (FIA): considerações gerais

A crescente necessidade de automação de procedimentos analíticos se deve ao aumento significativo do número de amostras laboratoriais a serem analisadas, como por exemplo, nas áreas clínicas e ambientais. A demanda por técnicas rápidas e confiáveis operando 24 horas por dia é grande, principalmente para controle de processos industriais.

A partir da metade da década de setenta iniciou-se o uso de sistemas em fluxo, com dimensões e vazões adequadas, simplificando o sistema analítico e aumentando o número de amostras analisadas por unidade de tempo (frequência de amostragem). Esta abordagem passou a ser conhecida como Análise por Injeção em Fluxo (FIA)²¹⁴.

Empregando esses sistemas é possível a implementação de praticamente todas as etapas envolvidas no processo da análise química (amostragem, separações, diluições, pré-concentrações e adição de reagentes). Operações em fluxo são mais fáceis de controlar no tempo e no espaço, já que o uso de tubos fechados evita a evaporação de líquidos, permite a mistura de reagentes, bem como a formação altamente reprodutível de produtos de reação.

Em geral o processo de análise química por injeção em fluxo pode ser dividido em quatro partes: propulsão dos fluidos, injeção da amostra, reação e detecção.

A propulsão dos fluidos pode ser a vazão ou pressão constante. Quando o sistema trabalha a vazão constante o meio mais empregado para movimentar o fluido carregador e as soluções dos reagentes através do percurso analítico (espaço por onde o fluido carregador transporta a amostra para o detector) é a bomba peristáltica. Em sistemas com pressão constante são empregados dispositivos de ação gravitacional como propulsores de fluidos²¹⁴.

O injetor é o dispositivo fundamental do sistema, além de introduzir a amostra no percurso analítico pode ser empregado para selecionar as vazões do carregador

e dos reagentes, aumentando a flexibilidade do processo. Dentre os vários tipos de injetores têm-se as válvulas rotatórias e os injetores comutadores²¹⁴.

A reação ocorre dentro do percurso analítico. Para escolher o dimensionamento do mesmo deve se levar em conta o tempo de residência da amostra. O tempo de residência está ligado ao fenômeno da dispersão, este processo é dependente das características físico-químicas das soluções (por exemplo, viscosidade), bem como das dimensões dos componentes do sistema (volume da alça da amostragem, material, diâmetro e comprimento dos tubos que constituem o percurso analítico). Usualmente as medidas são efetuadas com esses parâmetros mantidos constantes, permitindo a obtenção de resultados caracterizados por alta repetibilidade. As vazões, volumes do percurso analítico e da amostra devem ser definidas considerando-se a dispersão e o tempo de residência necessário para a ocorrência das reações químicas.

O detector para um sistema da análise em fluxo, assim como todos os detectores, deve ser estável, utilizar um baixo volume morto, ter uma resposta rápida e os canais de fluxo não devem criar turbulência no sistema.

Os detectores empregados são praticamente todos usuais em química analítica: espectrofotômetros de UV-Vis, espectrômetros de absorção atômica e de emissão em plasma, potenciômetros e condutivímetros.

As principais características dos procedimentos em fluxos que podem ser consideradas como vantagens são: o consumo reduzido de amostras e/ou reagentes; boa precisão, redução dos riscos de contaminação, diminuição de erros operacionais, aumento da frequência analítica e grande versatilidade que permite o acoplamento a várias técnicas de pré-tratamento, separação e pré-concentração de amostras, bem como a diferentes técnicas analíticas de detecção e quantificação.

Todas essas características dos sistemas em fluxo permitem seu uso no desenvolvimento de sistemas de *screening*, pois preenchem boa parte dos requisitos destes sistemas.

IV.4. Espectroscopia de reflectância difusa: considerações gerais

Ao contrário da espectroscopia de absorção que há muito tempo vêm apresentando amplo uso como técnica para análise quantitativa, a espectroscopia

de reflectância foi uma técnica muito pouco explorada para fins quantitativos até meados da década de 90.

Durante muitos anos, o uso da espectroscopia de reflectância foi limitado às áreas têxteis de pintura e pigmentos e de papel como técnica analítica de controle de qualidade para avaliar cor, brancura e brilho²¹⁵. A técnica era considerada inviável para análises quantitativas, uma vez que não era possível alcançar boa precisão das medidas obtidas a partir de spot tests convencionais²¹⁶.

Entretanto com o desenvolvimento de instrumentos analíticos como fibras ópticas e esferas de reflectância melhor projetadas, os *spot tests* quantitativos envolvendo procedimentos simples puderam ser realizados apresentando bons resultados em termos de precisão e seletividade²¹⁷⁻²²².

Conforme descrito por Gotardo²²⁰:

Segundo as teorias discutidas por WENDLANT e HECHT²¹⁵ a reflexão da radiação sobre uma superfície pode ser de dois tipos: especular ou tipo espelho e difusa. Para que se possa utilizar a reflectância como técnica analítica é preciso ter algum conhecimento sobre os tipos de reflexão.

A reflexão especular ou tipo espelho ocorre em superfícies lisas ou polidas e pode ser definida pela lei de reflexão de Fresnel. Neste tipo de processo os ângulos de incidência e de reflexão são idênticos e não há transmissão da radiação através da superfície²¹⁵.

Ao contrário da reflexão especular, a reflexão difusa acontece em superfícies foscas ou opacas e ocorre por reflexões múltiplas a partir das superfícies das partículas que constituem o meio. A reflexão difusa compreende um processo complexo que ocorre quando a radiação penetra em um substrato sólido. Parte desta radiação retorna à superfície do substrato, ocorrendo também dispersão múltipla e absorção parcial da radiação pelas partículas ou fibras que constituem o substrato sólido²¹⁵.

A reflectância ou poder de reflexão (R) é dada por:

$$R = \frac{I}{I_0}, \quad (\text{Equação 1}), \text{ onde:}$$

R é a razão que representa a radiação refletida e que pode ser registrado por detectores, tais como uma fotomultiplicadora ou arranjo de fotodiodos.

I_0 = intensidade da radiação incidente

I = intensidade da radiação refletida

Os valores de R variam entre 0 e 1 e são normalmente expressos em termos de reflectância percentual $R(\%)$, isto é:

$$R = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Considera-se R igual a 1 quando o sinal de reflectância é igual ao da radiação incidente, condição que pode ser conseguida utilizando um padrão de reflectância máxima, geralmente pastilhas de BaSO_4 e MgO ²¹⁵.

Diversos modelos foram desenvolvidos para descrever em termos quantitativos a intensidade da radiação refletida difusamente²²¹. A teoria de Kubelka-Munk é o modelo mais aceito que relaciona concentração da amostra e reflectância. Esta teoria descreve a relação entre coeficiente de absorção molar, coeficiente de dispersão e poder de reflectância em um meio semi-infinito (infinitamente fino) de acordo com a seguinte equação:

$$f(T_R) = \frac{(1 - T_R)^2}{2T_R} = \frac{k}{s} \quad (\text{Equação 3}), \text{ onde:}$$

k = coeficiente de absorção molar

s = coeficiente de dispersão

Para amostras diluídas, k está relacionado à absorptividade molar (ε) e à concentração (C) pela relação:

$$k = 2,303\varepsilon.C \quad (\text{Equação 4})$$

Para a aplicação adequada da equação de Kubelka-Munk é necessária a determinação da reflectância absoluta do material usado como referência²²¹. Entretanto, a relação linear entre $f(R)$ e concentração somente é observada na prática para substâncias que absorvem fracamente e quando o tamanho das partículas que constituem o meio é relativamente pequeno ($1 \mu\text{m}$ de diâmetro interno)²²². Atualmente, diversos gráficos têm sido descritos para análises quantitativas envolvendo transformações matemáticas da variável dependente (sinal) e/ou independente (concentração), tais como: $\log R$ versus $C^2 - R$; R versus $[C/(1-C)^2]$; $\log R$ versus $1/C$; e R versus $\log C$ ²¹⁹.

Vale mencionar que em análises por espectroscopia de reflectância difusa, o sinal de reflectância pode ser convertido em densidade óptica para medida de reflectância (A_R), que é dada por:

$$A_R = \log(1/R) \quad (\text{Equação 5})$$

Atualmente o avanço tecnológico tem dado a espectrometria de reflectância difusa grande importância. O resultado pode ser constatado pelo aumento no número de trabalhos publicados na literatura utilizando a técnica para fins quantitativos com medidas na região visível do espectro, a partir da década de 90, como mostra a Figura 10.

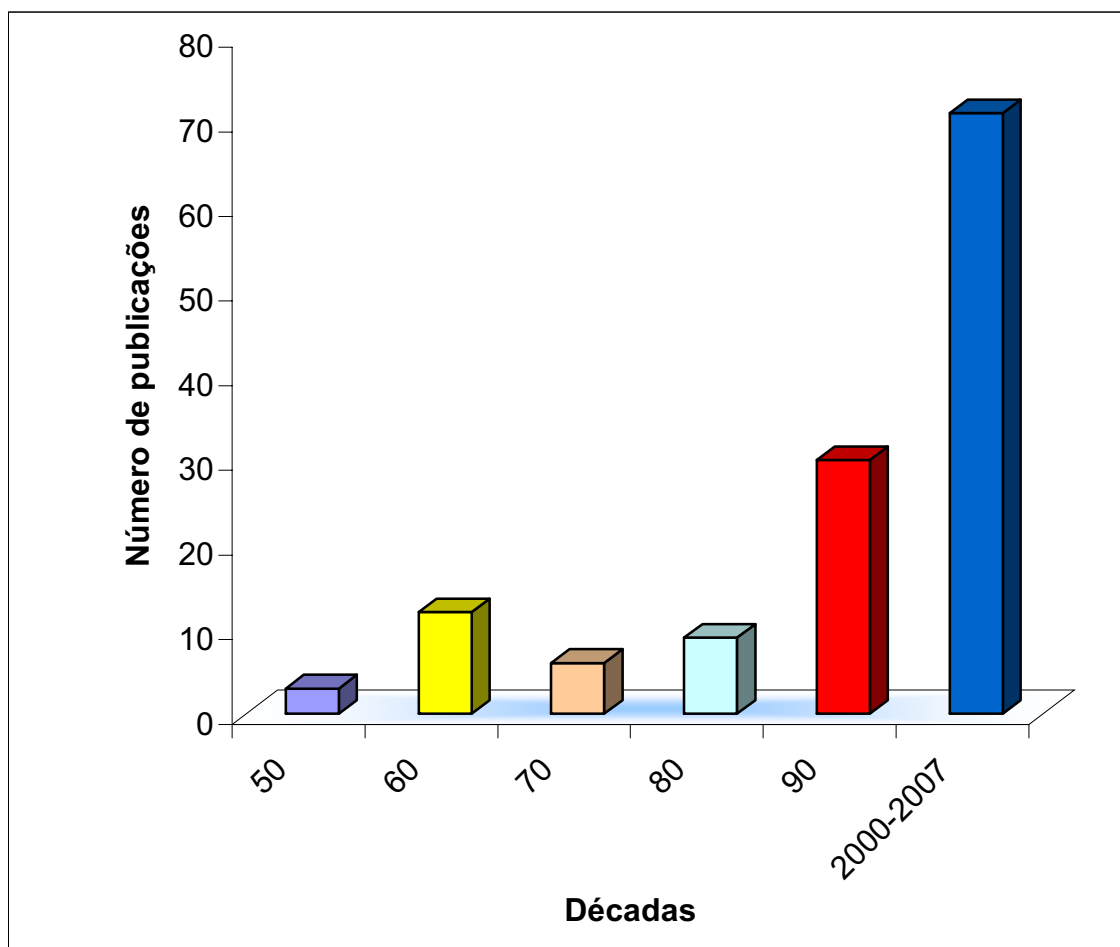


Figura 10. Distribuição das publicações encontradas envolvendo o uso da espectroscopia de reflectância difusa com medidas na região visível do espectro, de acordo com a década.

Estudos revelam que o uso apropriado desta técnica pode fornecer resultados quantitativos confiáveis, demonstrando o potencial da técnica no desenvolvimento de “*spot-tests*” quantitativos²¹⁷⁻²²⁰. Outra grande vantagem da espectrometria de reflectância difusa é dada do ponto de vista da “Química Verde”⁵², uma vez que podemos considerar que a técnica requer um procedimento limpo, devido ao baixo consumo de reagentes, solventes e amostras, minimizando a geração de resíduos.

Capítulo V. Justificativa e Objetivos

V.1. Importância e Relevância do tema

O uso de medicamentos tem sido alvo de muitas discussões. O número de produtos farmacêuticos falsificados e/ou adulterados é grande e tem sido frequentemente detectado pelos órgãos ligados ao Ministério da Saúde. Estes medicamentos são de má qualidade e podem ser prejudiciais à saúde ou até mesmo letais. Além dos problemas de falsificação de medicamentos, constata-se que existe uma crescente preocupação mundial com a presença de fármacos residuais no meio ambiente e em alimentos de origem animal. Destacam-se aqui, os resíduos de antimicrobianos, devidos aos vários efeitos adversos que os mesmos podem ocasionar.

No Brasil a presença de resíduos destes medicamentos, tanto em alimentos de origem animal, como no esgoto doméstico e em águas naturais (águas superficiais e águas subterrâneas) já foi constatada. As evidências demonstram que estamos diante de uma realidade preocupante. A presença destes resíduos, seja em amostras de águas ou de alimentos, os tornam impróprios para o consumo, representando riscos para a saúde pública e riscos tecnológicos, especialmente para indústria de laticínios.

A cada dia que passa o mercado nacional e mundial fica mais exigente quanto à qualidade dos produtos comercializados. A segurança e eficácia de medicamentos e a isenção de resíduos de antimicrobianos nos produtos alimentícios de origem animal são pontos fundamentais dentro deste contexto.

Considerando a grande competitividade do mercado de medicamentos, é indiscutível a urgente necessidade do desenvolvimento de metodologias analíticas de baixo impacto ambiental, rápidas, simples e de menor custo, para que possam ser utilizadas para análises de controle de qualidade.

A mesma preocupação ocorre no setor alimentício. A produção de produtos livres destes resíduos torna-se indispensável. Portanto, para obter credibilidade e desta forma, garantir espaço no mercado nacional e internacional, é preciso que os preceitos de qualidade e rastreabilidade definidos por órgãos oficiais, tais como FAO/WHO, FDA, ANVISA entre outros, sejam estritamente seguidos. Deste modo, torna-se de fundamental importância o desenvolvimento de procedimentos de

screening confiáveis e sensíveis que permitam a realização do monitoramento de eventuais resíduos de sulfonamidas em amostras de interesse ambiental (águas) e/ou nutricionais (leite) com rapidez e confiabilidade.

V.2. Objetivos

1- Desenvolvimento de um procedimento de “*screening*” para antibióticos da classe das sulfonamidas, com aplicação na análise de produtos farmacêuticos, fluídos biológicos (urina) águas superficiais e/ou em produtos alimentícios de origem animal (leite), utilizando procedimento de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica. Realização de análises quantitativas para verificação da confiabilidade do método desenvolvido.

2- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica simples, rápida, sensível e de baixo custo para a análise de dipirona sódica presente em medicamentos vendidos no mercado nacional, utilizando a técnica de espectroscopia de reflectância difusa.

3- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica simples, rápida, sensível e de baixo custo para a análise de dipirona sódica presente em medicamentos vendidos no mercado nacional, utilizando procedimento de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica .

4- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica simples, rápida, sensível e de baixo custo para a análise de citrato de sildenafil (Viagra[®]) presente em medicamentos vendidos no mercado nacional, utilizando a técnica de espectrofotometria-Visível.

Capítulo VI. Desenvolvimento de método
espectrofotométrico para determinação de Citrato de
Sildenafil (Viagra[®]) em formulações farmacêuticas

VI.1. Parte experimental

VI.1.1 Materiais e Equipamentos

As medidas de volume foram efetuadas com buretas classe A e micropipeta “Seapetell” (100-1000 μ L). A vidraria utilizada no preparo das soluções foi de grau A e as pesagens foram realizadas em balança analítica AG204, Mettler Toledo. Para solubilização dos reagentes foi utilizado um banho de ultra-som, marca Thornton e agitadores magnéticos.

As medidas de absorbância foram efetuadas em espectrofotômetro Varian modelo Cary 100 munido de cubetas de vidro ou quartzo com caminho ótico de 1 cm. As medidas de pH foram efetuadas em pHmetro Micronal, modelo B375, com eletrodo de vidro. Todos os equipamentos encontram-se instalados em salas devidamente equipadas com energia estabilizada, ar condicionado e desumidificador.

VI.1.2. Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados foram todos de grau p.a.:

- Metanol, acetona, acetonitrila, dioxano e clorofórmio (Mallinckrodt, Xalostoc, México, todos de grau cromatográfico);
- *p*-cloranil (Sigma, St. Louis, MO, 99,9%);
- Citrato de sildenafil (Pfizer, São Paulo, 94,7%);
- H₂O₂ – Pehridrol 30% (Merck, Darmstadt, Germany);
- Verde de bromocresol (Merck, Darmstadt, Germany, 99,9 %);
- HCl 37,0 % (Mallinckrodt, Xalostoc, México);
- KCl p.a (Synth, Brasil).

As soluções utilizadas no desenvolvimento do método proposto foram:

a) Solução de trabalho de Citrato de Sildenafil $5,68 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Esta solução foi preparada pela dissolução de 100,0 mg de citrato de sildenafil em balão volumétrico de 25 mL com metanol. Esta solução é estável por 15 dias quando conservada em refrigerador¹⁰⁷.

b) Solução de *p*-cloranil para testes iniciais. Foram preparadas três soluções de *p*-cloranil (A, B e C) na concentração de $2,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ pela dissolução de 0,1230 g do sólido em balão volumétrico de 25 mL empregando dioxano (A), acetona (B) ou acetonitrila (C) para dissolução do composto.

c) Solução de trabalho de *p*-cloranil. Foi preparada uma solução $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ pela dissolução de 0,0615 g do sólido em balão volumétrico de 25 mL com dioxano.

d) Solução de peróxido de hidrogênio $5,00 \text{ mol L}^{-1}$. Esta solução foi preparada pela adequada diluição com metanol da solução de pehidrol 30% (m/m), previamente padronizada de acordo com o procedimento permanganimétrico⁷².

VI.1.3. Amostras

As amostras comerciais de medicamentos contendo citrato de sildenafil analisadas estão listadas na Tabela 5. As mesmas foram adquiridas em farmácias locais e analisadas pelo método proposto, dentro dos seus prazos de validade.

Tabela 5. Amostras analisadas pelo método espectrofotométrico desenvolvido.

| Amostra | Lote | Valor nominal ^a |
|---------|-----------|----------------------------|
| A | 50483003A | 50 mg |
| B | 40493006B | 100 mg |

^a Quantidade declarada pelo fabricante.

VI.2. Procedimento experimental

VI.2.1. Construção da curva analítica

Para a construção da curva analítica foram adicionados a balões volumétricos de 5 mL: 640 μL de *p*-cloranil ($1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$); 330 μL de H_2O_2 ($5,00 \text{ mol L}^{-1}$) e alíquotas de 75 μL a 1,50 mL de citrato de sildenafil ($5,68 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) de modo que a sua concentração final variou de $8,52 \times 10^{-5}$ a $1,70 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Completou-se o volume dos balões com metanol até a marca e em seguida efetuaram-se as leituras de absorvância em 535 nm contra um branco preparado similarmente,

porém sem adição de citrato de sildenafil. Construiu-se a curva de calibração traçando-se o gráfico dos valores de absorvância em função da concentração de citrato de sildenafil.

VI.2.2. Estudo da estabilidade óptica do produto

Para avaliar o efeito acelerador do H_2O_2 sobre a reação bem como a estabilidade óptica do produto colorido obtido, foi efetuado o acompanhamento do valor de absorvância em 535 nm durante 2 horas, com leituras em intervalos de 2 minutos, para o produto formado após a adição de: 1,50 mL de citrato de sildenafil $5,68 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (em metanol), 640 μL de *p*-cloranil $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (em dioxano); 330 μL de H_2O_2 $5,00 \text{ mol L}^{-1}$ (em metanol) em balão volumétrico de 5 mL, cujo volume foi completado até a marca com metanol.

O efeito do H_2O_2 sobre o desenvolvimento da reação foi avaliado através de um experimento similar ao descrito acima, omitindo-se, entretanto, a adição do peróxido ao meio reacional. Preparou-se o branco similarmente.

VI.2.3. Preparo das amostras

Dezesseis comprimidos, de um mesmo lote, foram pesados em balança analítica e determinou-se o valor da massa média. Subseqüentemente, os mesmos foram pulverizados em gral de ágata até obtenção de um pó fino. Uma porção de amostra pulverizada equivalente a 20 mg de citrato de sildenafil foi exatamente pesada e submetida à agitação com 5 mL de metanol em agitador mecânico com barra magnética por 15 minutos. Esta solução foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com metanol até o menisco. Na seqüência a solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo Whatman 41 e uma alíquota de 750 μL foi tomada e analisada de acordo com o procedimento recomendado para a construção da curva analítica.

VI.2.4. Estudo de interferentes

Os excipientes presentes nas formulações farmacêuticas de Viagra[®] foram cuidadosamente estudados visando avaliar possíveis interferências que os mesmos

poderiam causar sobre o valor de absorvância em 535 nm. Em adição ao ingrediente ativo, citrato de sildenafil, cada comprimido contém os seguintes ingredientes inativos: celulose microcristalina, fosfato de cálcio dibásico anidro, estearato de magnésio, metilcelulose hidroxipropil, dióxido de titânio, lactose e croscarmelose sódica.

VI.2.5. Estudo de Adição e Recuperação

Estudo de adição e recuperação do princípio ativo puro foi realizado com o objetivo de avaliar efeitos de matriz (formulação farmacêutica) nas análises. Para tanto, quantidades conhecidas (100; 200; 300; 400 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ equivalente a $1,50 \times 10^{-4}$; $3,00 \times 10^{-4}$; $4,50 \times 10^{-4}$; $6,00 \times 10^{-4}$ e $7,50 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , respectivamente) de citrato de sildenafil foram adicionadas nas amostras previamente analisadas contendo o equivalente a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($3,00 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) de citrato de sildenafil. As quantidades do fármaco padrão adicionadas corresponderam a 50, 100, 150, 200 e 250% da quantidade presente na amostra. A análise foi realizada como descrito no procedimento para construção da curva analítica.

VI.3. Resultados e Discussão

VI.3.1. Seleção da reação

A interação molecular entre doador-receptor de elétrons esta normalmente associada com a formação de complexos de transferência de carga, intensamente coloridos²²³⁻²²⁶. Os métodos espectrofotométricos baseados neste tipo de interação são normalmente simples e convenientes devido à relativa rapidez com que há formação dos complexos, dependendo do meio reacional. Entre os receptores de elétrons comumente utilizados está o *p*-cloranil.

Ao propormos um novo método espectrofotométrico para a determinação de citrato de sildenafil (Viagra[®]) nossa atenção foi atraída para as reações de transferência de carga supracitadas, visto que o citrato de sildenafil apresenta centros doadores de elétrons em sua estrutura (Figura 2), podendo desta forma, reagir com receptores de elétrons tais como o *p*-cloranil.

Dados da literatura revelam que as reações com *p*-cloranil são normalmente lentas a temperatura ambiente sendo necessário para fins analíticos, aquecimento a 60 – 65 °C durante 10 – 45 minutos para a absorvência máxima ser alcançada.

Reações empregando *p*-cloranil têm sido estudadas por nosso grupo de pesquisa e utilizadas no desenvolvimento de diversos métodos para a determinação de alguns princípios ativos de interesse nutricional e/ou farmacêutico²²⁷⁻²²⁹. Em um destes estudos foi descoberto que a adição de peróxido de hidrogênio acelera o desenvolvimento destas reações²²⁷.

Após a realização do levantamento bibliográfico sobre métodos para determinação de citrato de sildenafil foi encontrado um trabalho propondo o uso de *p*-cloranil. Entretanto, este método apresenta a desvantagem de necessitar de aquecimento a 60°C por no mínimo 10 minutos para que haja desenvolvimento da cor, o que torna o método lento e tedioso. Diante do exposto, propomos neste trabalho o desenvolvimento de um novo método espectrofotométrico para determinação de citrato de sildenafil baseando-se na reação com *p*-cloranil, adotando o uso de H₂O₂ no meio reacional, para acelerar a reação e eliminar a etapa de aquecimento, tornando o método mais rápido e vantajoso.

VI.3.1.1. Testes preliminares

Testes qualitativos preliminares demonstraram que a reação entre citrato de sildenafil e *p*-cloranil e com adição de H₂O₂ ao meio reacional, ocorreu instantaneamente à temperatura ambiente.

Sabe-se que as reações de transferência de carga são fortemente influenciadas pelo solvente²²⁴⁻²²⁹ utilizado, sendo este um parâmetro muito importante a ser avaliado durante o desenvolvimento do método espectrofotométrico²²⁴. Desta forma, um estudo inicial foi feito para selecionar o meio reacional mais adequado para o desenvolvimento da reação.

Foi avaliado o uso de acetona, acetonitrila e dioxano como solvente para a dissolução do *p*-cloranil e metanol, acetona, acetonitrila e dioxano para ajuste do volume dos balões. Metanol não foi utilizado no preparo da solução de *p*-cloranil devido à baixa solubilidade do composto neste solvente. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6. Levou-se em consideração na seleção da melhor

condição experimental uma maior sensibilidade aliada à estabilidade óptica do composto formado.

Tabela 6. Seleção dos solventes para o desenvolvimento do método espectrofotométrico para determinação de Citrato de sildenafil.

| Solvente do <i>p</i> -cloranil | Solvente para completar o volume dos balões | A _{535nm} |
|--------------------------------|---|--------------------|
| Dioxano | Dioxano | 0,2928 |
| Dioxano | Metanol | 0,4652 |
| Acetona | Acetona | 0,3060 |
| Acetona | Metanol | 0,3872 |
| Acetonitrila | Acetonitrila | 0,2736 |
| Acetonitrila | Metanol | 0,4592 |

A partir dos resultados apresentados na Tabela 6 verifica-se que quando o solvente utilizado na solubilização do *p*-cloranil é o mesmo utilizado para completar o volume dos balões, a acetona mostra o melhor resultado, seguido de dioxano e acetonitrila, respectivamente. Quando o metanol foi o solvente utilizado para completar o volume dos balões os resultados indicaram que o dioxano seria o melhor solvente para *p*-cloranil, seguido pela acetonitrila e em último a acetona.

Também foi observado que o produto formado não apresenta estabilidade óptica adequada quando a acetona está presente no meio reacional, o que nos permitiu eliminar este solvente. Entre o uso de dioxano e acetonitrila preferimos usar o primeiro principalmente devido a maior estabilidade óptica do composto colorido formado.

Em relação à sensibilidade aparentemente, ambos os solventes (acetonitrila ou dioxano) poderiam ser utilizados. Desta forma, o meio reacional selecionado para prosseguimento dos estudos e que forneceu os resultados mais promissores foi metanol/dioxano.

O espectro de absorção do produto colorido formado após a reação colorimétrica entre citrato de sildenafil e *p*-cloranil, na presença e ausência de H₂O₂ é apresentado na Figura 11.

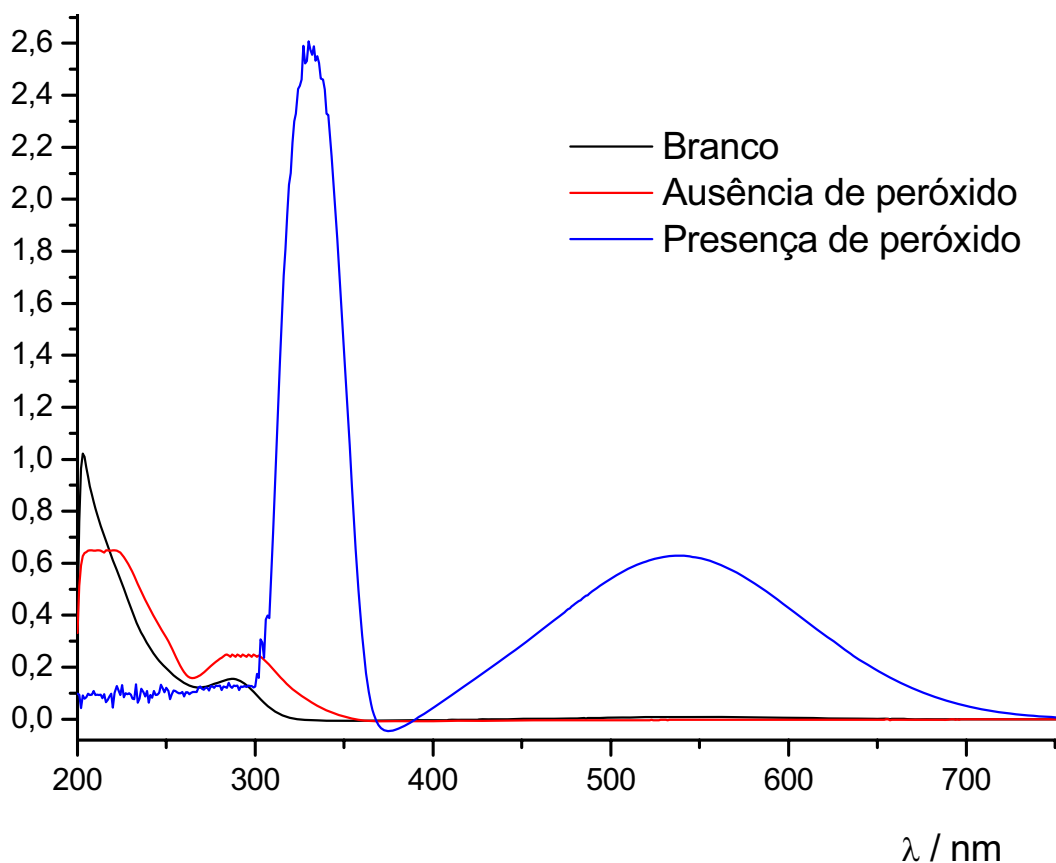


Figura 11. Espectro de absorção do produto da reação na presença e na ausência de peróxido. Concentrações finais: citrato de sildenafil $1,70 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, *p*-cloranil $3,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e peróxido de hidrogênio $0,33 \text{ mol L}^{-1}$, em meio de metanol/dioxano (4,36/0,64). Caminho óptico = 1 cm. Medidas efetuadas após 10 minutos da adição dos reagentes.

VI.3.1.2. Investigação sobre o mecanismo da reação

A literatura descreve que o *p*-cloranil pode interagir com moléculas contendo centros doadores de elétrons segundo dois tipos de reações, sendo uma delas baseada na formação de uma amino-quinona mono-substituída (Figura 12, a) e a outra através da formação de um complexo de transferência de carga com subsequente dissociação do mesmo em solvente polar formando par iônico radicalar²²⁵ (Figura 12, b).

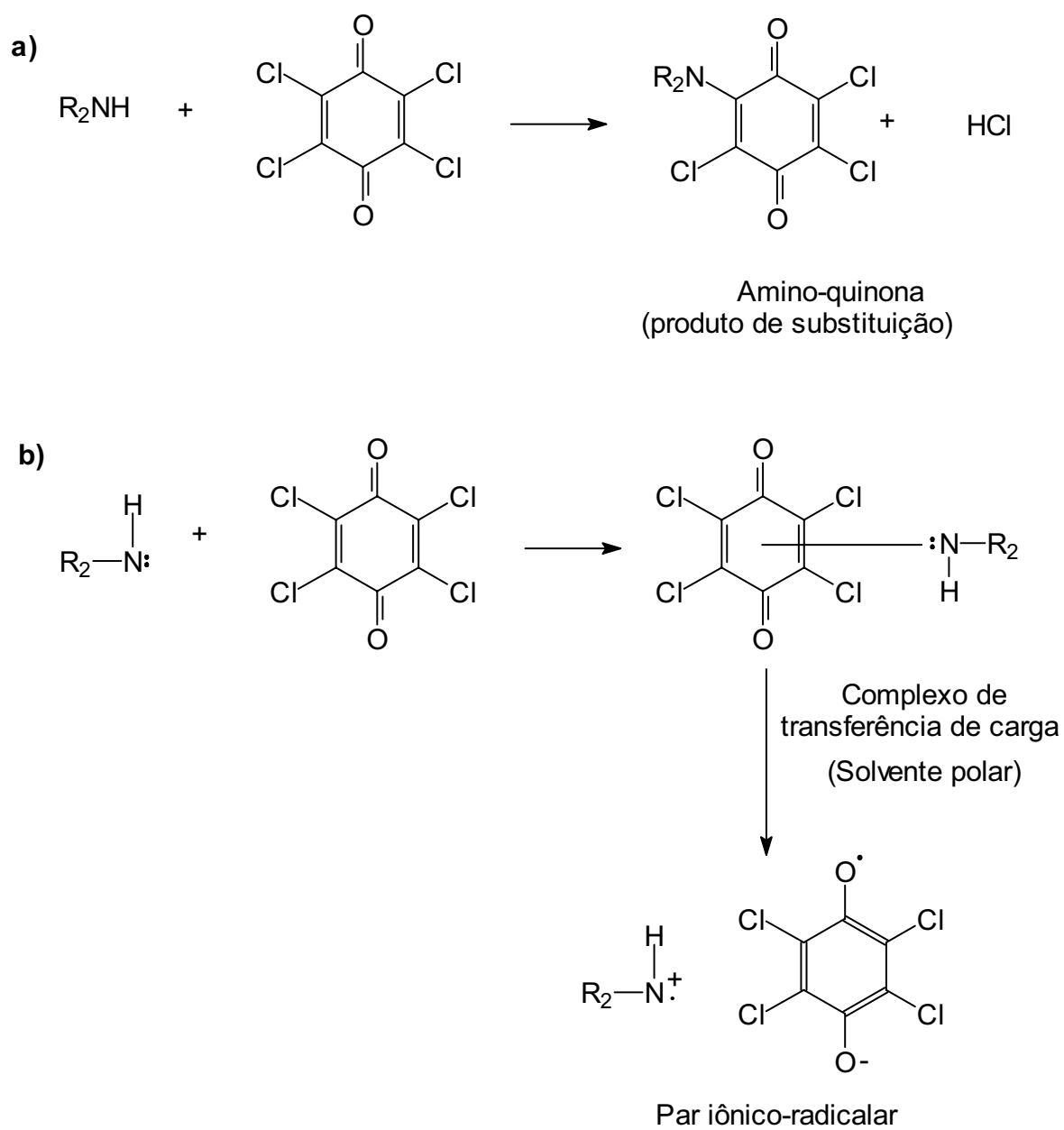


Figura 12. Provável mecanismo para reação com *p*-cloranil. **a)** reação de substituição; **b)** reação de transferência de carga.

No entanto, esses mecanismos não são bem elucidados existindo muita discussão na literatura a respeito dos produtos formados, considerando-se inclusive que estão envolvidos equilíbrios químicos complexos e com muitos produtos existindo concomitantemente.

Com base nos relatos para os possíveis mecanismos de reação envolvendo o *p*-cloranil²²⁴⁻²²⁶ e em testes qualitativos realizados em nosso laboratório supomos que a reação predominante entre citrato de sildenafil e *p*-cloranil na presença de peróxido de hidrogênio consiste na formação de uma amino-quinona substituída. Nesse caso, o peróxido provavelmente estaria atuando na oxidação do citrato de sildenafil que então reage com o *p*-cloranil formando o produto de substituição.

Esta consideração foi fundamentada na obtenção de teste positivo para cloreto (em meio de ácido nítrico) realizado com o produto da reação, cuja formação só ocorre em reações de substituição. Os resultados obtidos durante a seleção do solvente para a realização da reação também vão ao encontro com o mecanismo sugerido, pois como mostram os resultados da Tabela 6, quanto maior a constante dielétrica do solvente, mais estável foi o produto da reação.

Além disso, o espectro UV-Vis do produto colorido obtido, com máximos de absorção em 535 e 330 nm é muito similar ao espectro de amino-quinonas mono-substituídas²²⁴⁻²²⁶. Já o íon radical formado pela dissociação do complexo de transferência de carga com o *p*-cloranil apresenta máximos de absorção em torno de 440 – 450 nm²²⁴⁻²²⁶.

Para as medidas espectrofotométricas selecionou-se o comprimento de onda situado na região visível do espectro, embora menos sensível do que o situado na região UV, visto que na região ultravioleta as medidas estão sujeitas a interferência já que a maioria dos compostos orgânicos apresenta absorção nesta região.

Uma vez que o dioxano demonstrou ser o melhor solvente para a dissolução do *p*-cloranil e sabendo-se que este pode conter traços de peróxido, foi necessário determinar o teor de H₂O₂ presente no dioxano utilizado no desenvolvimento do método proposto. Para tal, foi empregado o método espectrofotométrico modificado descrito por BENATSKY e TOMIK²³⁰ para determinação de peróxidos em solventes orgânicos.

Os resultados obtidos revelaram que o dioxano utilizado no desenvolvimento deste método continha $4,71 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio, valor este menor que aquele descrito nas especificações do rótulo que é de $1,47 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

VI.3.2. Otimização da metodologia proposta

O procedimento tradicional para a otimização de forma univariada, onde cada fator é avaliado separadamente, envolve um grande número de experimentos e não é capaz de estabelecer como cada fator se comporta frente aos demais.

A forma mais eficiente de se extrair uma maior quantidade de informações sobre um determinado sistema com um número mínimo de ensaios, é a utilização de ferramentas estatísticas de planejamento de experimentos. Na prática isso significa diminuição de horas trabalhadas, de gastos com reagentes e mais agilidade no desenvolvimento de novos produtos, processos ou métodos, além do melhor entendimento do sistema, melhor controle e conseqüentemente obtenção de resultados mais confiáveis, dentre outras vantagens²³¹⁻²³³.

O planejamento de experimentos não propõe uma rota única a ser seguida, mas direciona a condução dos experimentos de forma a atingir a meta estabelecida. Para tanto é necessário: selecionar as variáveis independentes a serem avaliadas; selecionar os níveis em que cada variável será avaliada e projetar o planejamento do experimento de forma que se possa ser obtida exatamente o tipo de informação desejada²³¹⁻²³³.

A metodologia de superfície de resposta foi empregada na otimização do procedimento utilizando um planejamento composto central. O objetivo foi obter a melhor condição experimental na qual se obtém um valor ótimo para a variável resposta (leitura de absorvância em 535 nm), ou seja, é possível obter melhor sensibilidade analítica.

Neste planejamento a variação na absorvância foi investigada em função das variáveis (ξ_i): volume de p-cloranil e volume de peróxido de hidrogênio, uma vez que o solvente já havia sido selecionado. As variáveis (ξ_i) consideradas com seus níveis examinados (reais e codificados) e a matrix experimental com os resultados obtidos estão mostradas na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados obtidos para o planejamento composto central executado na otimização do método espectrofotométrico para determinação de Citrato de sildenafil.

| Ensaio | Variáveis não codificadas | | Variáveis codificadas | | A _{535nm} |
|----------------|---|---|-----------------------|---------|--------------------|
| | V _{p-cloranil} (μL) ^a | V _{peróxido} (μL) ^b | Fator A | Fator B | |
| 1 | 210 | 195 | -1 | -1 | 0,3084 |
| 2 | 780 | 195 | 1 | -1 | 0,5120 |
| 3 | 210 | 650 | -1 | 1 | 0,3715 |
| 4 | 780 | 650 | 1 | 1 | 0,4432 |
| 5 ^c | 495 | 420 | 0 | 0 | 0,5219 |
| 6 ^c | 495 | 420 | 0 | 0 | 0,5186 |
| 7 ^c | 495 | 420 | 0 | 0 | 0,5148 |
| 8 ^c | 495 | 420 | 0 | 0 | 0,5121 |
| 9 | 100 | 420 | -1,41 | 0 | 0,2003 |
| 10 | 890 | 420 | 1,41 | 0 | 0,4379 |
| 11 | 495 | 100 | 0 | -1,41 | 0,4588 |
| 12 | 495 | 740 | 0 | 1,41 | 0,4182 |

^a p-cloranil 1,00 x 10⁻² mol L⁻¹ (preparado em dioxano);

^b H₂O₂ 5,00 mol L⁻¹;

^c Ponto central executado em replicatas (n = 4).

Os experimentos no ponto central foram realizados com repetições (n = 4) para estimativa do erro experimental e os resultados foram analisados utilizando o programa Statistica, versão 6.0. Para cada variável (ξ_i) o valor real de x_i (nível codificado por -1,41; -1, 0, +1 e +1,41) é determinado de acordo com a Eq. (6)²³⁴.

$$x_i = 2(\xi_i - \xi_i^*) / d_i \quad \text{Eq. (6)}$$

Onde, ξ_i é o valor real da variável, ξ_i^* é a média aritmética dos níveis alto (+1) e baixo (-1) da variável ξ_i e d_i é a diferença entre os níveis alto e baixo de ξ_i .

Os resultados obtidos a partir deste planejamento (Tabela 7) foram ajustados a um modelo matemático quadrático descrito pela Equação (7), utilizando o programa Statistica, versão 6.0. A superfície de resposta e a curva de nível correspondente ao modelo ajustado estão representadas na Figura 13.

$$\mathbf{Z} = -9,7 \times 10^{-2} + 1,6 \times 10^{-2}\mathbf{x} - 1,0 \times 10^{-6}\mathbf{x}^2 + 0,7 \times 10^{-2}\mathbf{y} - 1,0 \times 10^{-6}\mathbf{y}^2 - 1,0 \times 10^{-6} \mathbf{xy} \quad \mathbf{Eq.(7)}$$

A equação (7) inclui os termos lineares (\mathbf{x} e \mathbf{y}) e quadráticos (\mathbf{x}^2 e \mathbf{y}^2) bem como, o produto dos pares dos efeitos lineares (\mathbf{xy}). Nesta equação, \mathbf{Z} representa a absorvância em 535 nm, e as variáveis \mathbf{x} e \mathbf{y} são: volumes de *p*-cloranil e de H_2O_2 , respectivamente.

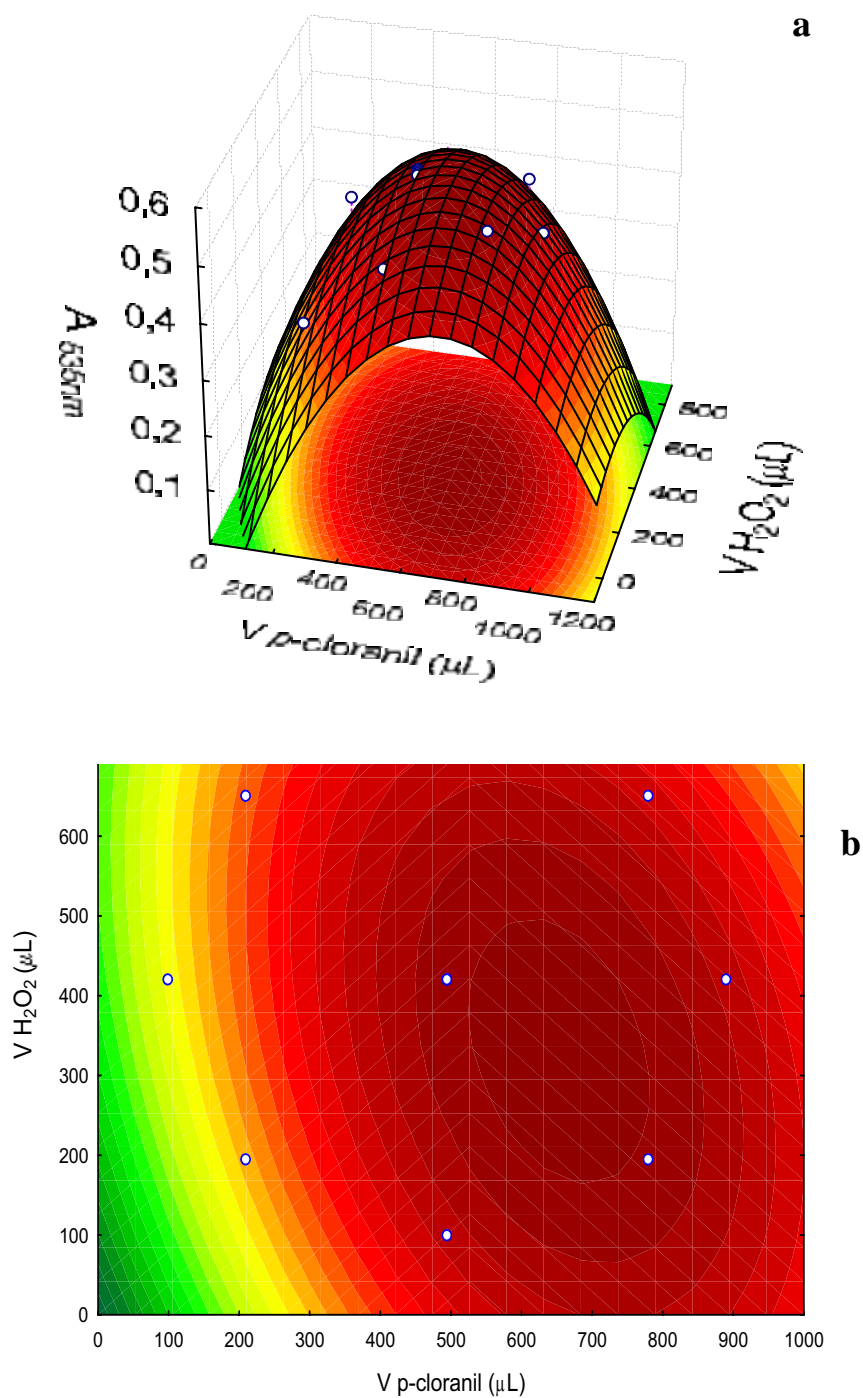


Figura 13. (a) Superfície de resposta otimizada com a sua respectiva (b) curva de nível para a medida de absorvância ($\lambda = 535 \text{ nm}$) em função das variáveis independentes: Volume de p -cloranil ($1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e volume de H_2O_2 $5,00 \text{ mol L}^{-1}$. A concentração final de citrato de sildenafil foi mantida constante ($1,13 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em todos os experimentos.

A análise da Figura 13 indica que dentro do intervalo em que as variáveis independentes foram avaliadas, o valor da variável dependente passa por uma região de máximo, situada na área mais escura do gráfico, a qual representa a condição experimental ótima para a realização da reação proposta. De acordo com estes resultados os maiores valores de absorvância foram obtidos quando os volumes adicionados de *p*-cloranil ($1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e de H_2O_2 ($5,00 \text{ mol L}^{-1}$) foram 640 μL e 330 μL , respectivamente.

Foram realizados experimentos com repetições ($n = 4$) nas condições experimentais determinadas pelo modelo matemático, para verificação da concordância entre o resultado obtido experimentalmente com àquele predito pela equação gerada pelo programa Statistica. Observou-se que o resultado predito (0,5363) para a medida de absorvância nas condições ótimas, concorda com o valor médio obtido experimentalmente [$0,5260 \pm 4,36 \times 10^{-3}$ (R.S.D = 0,8%)], a um nível de confiança de 95%.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados do planejamento foi realizada para verificação da significância do modelo matemático obtido. Esta análise expressa a relação entre a resposta (medida de absorvância em 535 nm) com os efeitos dos fatores que a influenciam. Neste estudo verificou-se que o modelo ajustado aos dados experimentais obtidos para o planejamento composto central é capaz de prever com uma confiabilidade de 94,4% o comportamento da variável dependente ($A_{535\text{nm}}$) frente as variáveis independentes estudadas (Volumes de *p*-cloranil e de H_2O_2).

VI.3.3. Verificação da linearidade e construção da curva analítica

Após a otimização das condições experimentais verificou-se a faixa de trabalho onde uma relação linear era obtida entre o valor de absorvância medido e a concentração de citrato de sildenafil. Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados na Tabela 8. Construiu-se a curva analítica representando os valores de $A_{535\text{nm}}$ em função da concentração de citrato de sildenafil (Dados Tabela 8). Uma relação linear foi observada na faixa de concentração de $8,52 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,70 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Para medidas de $A_{535\text{nm}}$ efetuadas para de soluções de citrato de sildenafil com concentrações superiores a $1,70 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram observados desvios da linearidade e baixa reprodutibilidade.

Tabela 8. Valores de absorvância obtidos em 535nm para a construção da curva analítica para determinação de citrato de sildenafil através de sua reação com *p*-cloranil em presença de peróxido.

| [Citrato de sildenafil] mol L ⁻¹ | A _{535nm} ± SD ^a |
|---|--------------------------------------|
| 8,52 x 10 ⁻⁵ | 0,0207 ± 4,0 x 10 ⁻⁴ |
| 2,26 x 10 ⁻⁴ | 0,0695 ± 9,0 x 10 ⁻⁴ |
| 2,83 x 10 ⁻⁴ | 0,1091 ± 5,0 x 10 ⁻⁴ |
| 5,64 x 10 ⁻⁴ | 0,2362 ± 1,2 x 10 ⁻³ |
| 8,49 x 10 ⁻³ | 0,3806 ± 3,0 x 10 ⁻⁴ |
| 1,13 x 10 ⁻³ | 0,5325 ± 3,0 x 10 ⁻⁴ |
| 1,42 x 10 ⁻³ | 0,6548 ± 1,5 x 10 ⁻³ |
| 1,70 x 10 ⁻³ | 0,7968 ± 5,0 x 10 ⁻⁴ |

^a Média ± desvio padrão para 3 medidas.

A Figura 14 apresenta a curva analítica obtida para os dados da Tabela 8. A equação matemática que descreve a relação linear existente entre A_{535nm} e concentração de citrato de sildenafil é: $A_{535nm} = -0,0263 (\pm 0,0032) + 488,5 (\pm 0,3) \times C$, onde C = concentração de citrato de sildenafil em mol L⁻¹, com um coeficiente de correlação de 0,9995.

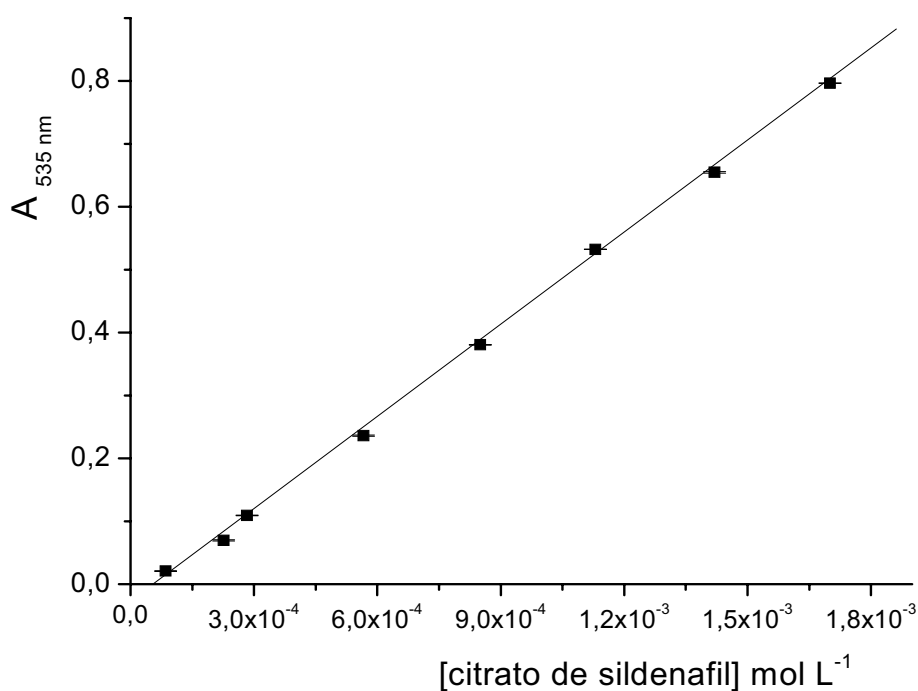


Figura 14. Curva analítica obtida para determinação de Citrato de sildenafil em triplicata.

VI.3.4. Estudo da estabilidade óptica do composto colorido e o efeito exercido pela adição de H_2O_2 ao meio reacional

Neste estudo o valor da absorbância em 535 nm foi monitorado em intervalos de 2 minutos durante duas horas. A Figura 15 representa os resultados obtidos neste estudo e apresentados na Tabela 9. Observa-se que após 10 minutos iniciais o valor máximo da absorbância permanece estável por pelo menos uma hora, mostrando uma boa estabilidade ótica do produto colorido formado na reação entre citrato de sildenafil e p-cloranil, na presença de H_2O_2 . Entretanto, quando não foi utilizado H_2O_2 não há formação significativa do produto colorido durante o período estudado (baixo valor de absorbância), indicando que o H_2O_2 é capaz de acelerar o desenvolvimento da reação proposta significativamente.

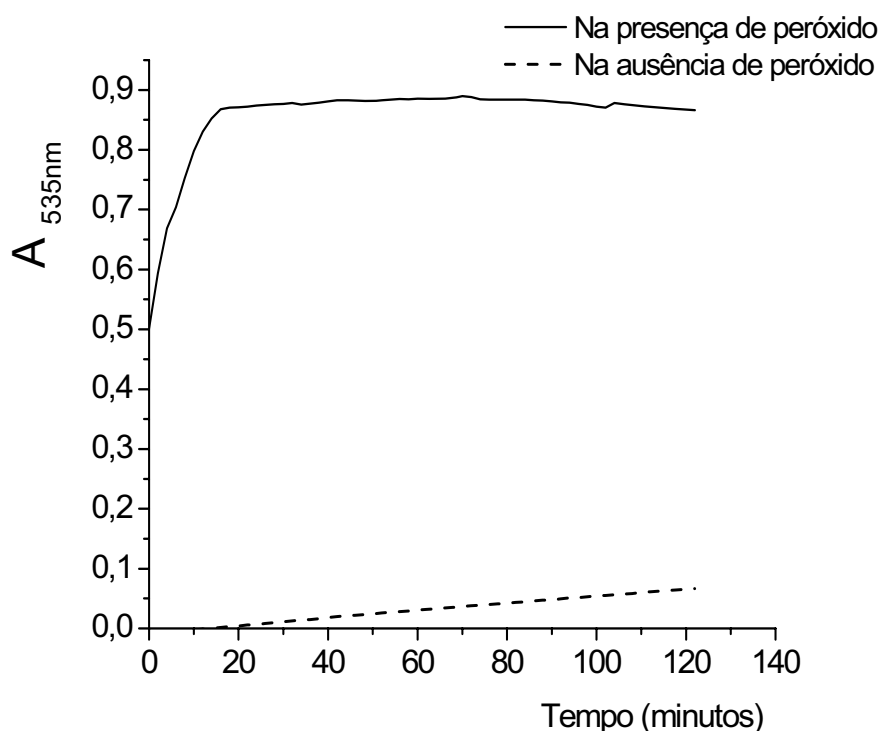


Figura 15. Estudo da estabilidade óptica do produto da reação formado. Condições experimentais: 1,50 mL de citrato de sildenafil ($5,68 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$); 640 μL de p-cloranil ($1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e 330 μL de H_2O_2 ($5,00 \text{ mol L}^{-1}$), em meio de metanol/dioxano (4,36/0,64) em balão volumétrico de 5 mL a temperatura ambiente (25°C).

Tabela 9. Valores de absorvância monitorados em 535 nm no estudo da estabilidade ótica do produto colorido formado na reação entre Citrato de sildenafil e *p*-cloranil na presença e ausência de H₂O₂.

| Tempo (minutos) | A _{535nm} presença de H ₂ O ₂ | A _{535nm} ausência de H ₂ O ₂ | Tempo (minutos) | A _{535nm} presença de H ₂ O ₂ | A _{535nm} ausência de H ₂ O ₂ |
|-----------------|--|--|-----------------|--|--|
| 0 | 0,50142 | 0,00014 | 64 | 0,88516 | 0,03306 |
| 2 | 0,59401 | 0,00026 | 66 | 0,88563 | 0,03428 |
| 4 | 0,66873 | 0,00055 | 68 | 0,88708 | 0,03542 |
| 6 | 0,70435 | 0,00049 | 70 | 0,88973 | 0,03663 |
| 8 | 0,75259 | 0,00066 | 72 | 0,88808 | 0,03784 |
| 10 | 0,79798 | 0,00072 | 74 | 0,88427 | 0,03898 |
| 12 | 0,83026 | 0,00094 | 76 | 0,88359 | 0,04021 |
| 14 | 0,85245 | 0,00010 | 78 | 0,88406 | 0,04138 |
| 16 | 0,86781 | 0,00185 | 80 | 0,88369 | 0,04253 |
| 18 | 0,87081 | 0,00325 | 82 | 0,88368 | 0,04368 |
| 20 | 0,87113 | 0,00458 | 84 | 0,88360 | 0,04483 |
| 22 | 0,87229 | 0,00589 | 86 | 0,88290 | 0,04611 |
| 24 | 0,87397 | 0,00725 | 88 | 0,88193 | 0,04723 |
| 26 | 0,87525 | 0,00854 | 90 | 0,88119 | 0,04839 |
| 28 | 0,87624 | 0,00980 | 92 | 0,87918 | 0,04951 |
| 30 | 0,87682 | 0,01115 | 94 | 0,87861 | 0,0507 |
| 32 | 0,87827 | 0,01248 | 96 | 0,87642 | 0,05185 |
| 34 | 0,87530 | 0,01376 | 98 | 0,87528 | 0,05298 |
| 36 | 0,87701 | 0,01505 | 100 | 0,87236 | 0,05417 |
| 38 | 0,87882 | 0,01648 | 102 | 0,87049 | 0,05538 |
| 40 | 0,88083 | 0,01830 | 104 | 0,87824 | 0,05647 |
| 42 | 0,88265 | 0,01976 | 106 | 0,87649 | 0,05768 |
| 44 | 0,88276 | 0,02088 | 108 | 0,87501 | 0,05868 |
| 46 | 0,88214 | 0,02205 | 110 | 0,87282 | 0,05987 |
| 48 | 0,88177 | 0,02319 | 112 | 0,87180 | 0,06103 |
| 50 | 0,88186 | 0,02439 | 114 | 0,87078 | 0,06209 |
| 52 | 0,88294 | 0,02568 | 116 | 0,86923 | 0,06330 |
| 54 | 0,88379 | 0,02705 | 118 | 0,86841 | 0,06457 |
| 56 | 0,88474 | 0,02816 | 120 | 0,86732 | 0,06565 |
| 58 | 0,88457 | 0,02940 | 122 | 0,86631 | 0,06677 |
| 60 | 0,88525 | 0,03067 | 124 | 0,86516 | 0,06306 |
| 62 | 0,88572 | 0,03189 | 126 | 0,86563 | 0,06428 |

VI.3.5. Estudo de interferentes

O efeito de cada excipiente (celulose microcristalina, fosfato de cálcio dibásico anidro, estearato de magnésio, metilcelulose hidroxipropil, dióxido de titânio, lactose e croscarmelose sódica) foi considerado como interferência quando o sinal de absorvância apresentou erro maior ou igual a 5% na determinação do fármaco. A porcentagem de citrato de sildenafil encontrada nas soluções adicionadas foi de 98,6 a 101,5 % com coeficientes de variação menores que 3% para três repetições. Assim, nenhuma interferência foi constatada a partir destes excipientes, sob as condições estudadas.

VI.3.6. Aplicação analítica do método desenvolvido

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas adquiridas em farmácias locais (Tabela 5). Os resultados obtidos pela aplicação do método proposto estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Determinação de Citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas.

| Amostras | Método proposto | | t ^c (2,78) | F ^c (19,00) | Método de referência ¹¹¹ | |
|-----------------|----------------------|--------|--------------------------|---------------------------|-------------------------------------|--------|
| | Média ^{a,b} | R.S.D. | | | Média ^{a,b} | R.S.D. |
| A 50 mg | 49,9 ± 0,3 | 0,6 % | 0,11 | 1,78 | 50,0 ± 0,4 | 0,8 % |
| B 100 mg | 99,5 ± 0,9 | 0,9 % | 1,72 | 1,65 | 100,6 ± 0,7 | 0,6 % |

^a mg por comprimido;

^b n = 3

^c Valor tabelado com P = 0,05 – 95% de significância com (n – 2) graus de liberdade.

VI.3.7. Validação do método

Para validação^{223,235-237} do método desenvolvido foram avaliados alguns parâmetros considerados importantes, tais como: exatidão, precisão, limite de detecção²³⁶ (LD = 3 SD^{Branco} / inclinação da reta), limite de quantificação²³⁶ (LQ = 10 SD^{Branco} / inclinação da reta), sensibilidade analítica²³⁷, recuperação e repetibilidade.

A precisão e exatidão do método proposto foram avaliadas através da aplicação dos testes F e t, respectivamente. Para tanto os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com aqueles obtidos pela aplicação do método espectrofotométrico de referência descrito na literatura. Para as duas amostras analisadas os valores obtidos pelo método proposto mostraram-se em boa concordância com os obtidos pelo método de referência. Os valores de F e t calculados não excederam os valores tabelados, indicando desta forma a precisão e exatidão do método desenvolvido, com um nível de confiança de 95%. As porcentagens médias de recuperação em relação ao valor descrito no rótulo pelo fabricante foram de 99,5 e 99,9% para amostra de Viagra[®] de 50mg e 100 mg, respectivamente, com desvio padrão relativo menor que 2,0%.

Para avaliação da precisão intradia foram realizadas análises repetidas (n = 10) para soluções de uma mesma amostra contendo o equivalente a $8,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de citrato de sildenafil e para estudo da precisão interdia foram executadas análises da amostra durante um período de 5 dias consecutivos. Os resultados obtidos, em termos de coeficiente de variação, foram de 0,9% e 1,1%, evidenciando a boa reprodutibilidade do método desenvolvido.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC como sendo $1,96 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $6,52 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente, indicando uma boa sensibilidade analítica do método desenvolvido. A sensibilidade analítica do método proposto foi estimada²³⁸ como sendo de $1,53 \times 10^5$ L mol⁻¹. O inverso da sensibilidade analítica fornece a diferença de concentração mínima que é discernível pelo método analítico, na ausência de erro experimental. Para o método proposto o valor estimado foi $6,53 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

VI.3.7.1. Estudos de adição e recuperação

Estudos de recuperação foram realizados através do método da adição de padrão²³⁹. Neste estudo, quantidades conhecidas de citrato de sildenafil (padrão analítico) foram adicionadas às duas amostras pré-analisadas. De acordo com os resultados obtidos apresentados na Tabela 11, observa-se que as médias percentuais de recuperação de citrato de sildenafil encontram-se entre 99,0 –

101,7%, evidenciando novamente a boa exatidão do método proposto, além de mostrar que não há interferência de matriz significativa.

Tabela 11. Resultados de recuperação de Citrato de sildenafil adicionado às formulações farmacêuticas pré-analisadas.

| Amostra ^a | [Citrato de sildenafil] adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | [Citrato de sildenafil] encontrada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | R.S.D. | Rec.(%) ^b |
|----------------------|---|---|--------|----------------------|
| A 50 mg | 100,0 | 100,0 \pm 2,4 | 2,4 | 100,0 \pm 2,4 |
| | 200,0 | 201,0 \pm 4,3 | 2,3 | 100,5 \pm 2,1 |
| | 300,0 | 298,9 \pm 0,8 | 0,3 | 99,6 \pm 0,3 |
| | 400,0 | 397,5 \pm 0,8 | 0,2 | 99,4 \pm 0,3 |
| | 500,0 | 505,2 \pm 4,5 | 0,9 | 101,1 \pm 0,9 |
| B 100 mg | 100,0 | 99,0 \pm 2,6 | 2,6 | 99,0 \pm 2,6 |
| | 200,0 | 201,5 \pm 4,9 | 2,4 | 100,7 \pm 2,4 |
| | 300,0 | 304,3 \pm 2,5 | 0,8 | 101,4 \pm 0,8 |
| | 400,0 | 401,5 \pm 5,5 | 1,4 | 100,4 \pm 1,4 |
| | 500,0 | 508,4 \pm 7,1 | 1,4 | 101,7 \pm 1,4 |

^a Comprimidos;

^b Média de 3 determinações.

VI.4. Conclusões

O método desenvolvido é simples, rápido, fácil de ser executado, apresenta ótima sensibilidade analítica ($\text{LD} = 1,96 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), não requer etapas de pré-tratamento da amostra, apresenta baixo consumo de reagentes (1,57 mg de *p*-cloranil e 330 μL de solução de H_2O_2 5,00 mol L^{-1} por amostra analisada) e requer o uso de equipamento de menor custo quando comparado a cromatografia líquida de alta eficiência. O método foi aplicado com sucesso na determinação de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas, com excelentes resultados em termos de precisão e exatidão, sendo uma boa alternativa para a determinação de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas com resultados de elevada confiabilidade.

Na Tabela 12 estão sumarizadas as principais figuras de mérito para o método proposto.

Tabela 12. Principais figuras de mérito para o método espectrofotométrico proposto para a determinação de citrato de sildenafil.

| PARÂMETRO | |
|---|---|
| Volume de <i>p</i> -cloranil $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ | 640 μL |
| Volume de H_2O_2 $5,00 \text{ mol L}^{-1}$ | 330 μL |
| Linearidade | $1,14 \times 10^{-4}$ a $1,70 \times 10^{-3} \text{ M}$ |
| Equação da reta | $y = 3,17 \times 10^{-2} + 4,87 \times 10^2 x$ |
| Coef. de correlação (r) | 0,9997 |
| λ nm | 535 |
| Estabilidade óptica | 60 minutos |
| LD | $1,96 \times 10^{-5} \text{ M}$ |
| LQ | $6,52 \times 10^{-5} \text{ M}$ |
| Precisão interdia ($8,50 \times 10^{-4} \text{ M}$) | 1,1% (5 dias) |
| Precisão intradia ($8,50 \times 10^{-4} \text{ M}$) | 0,9% (10 repetições) |

Capítulo VII. Desenvolvimento de método
reflectométrico para determinação de dipirona em
formulações farmacêuticas

VII.1. Parte Experimental

VII.1.1. Materiais e equipamentos

As medidas de volume foram efetuadas com buretas classe A e micropipetas “Brand” (100-1000 μ L) e “Eppendorf” (10-100 μ L). A vidraria utilizada no preparo das soluções foi de grau A e as pesagens foram realizadas em balança analítica AG204, Mettler Toledo. Para solubilização dos reagentes foi utilizado um banho de ultrasson, marca Thornton e agitadores magnéticos.

As medidas de reflectância foram efetuadas utilizando uma esfera integradora portátil (ISP-REF, Ocean Optics, Dunedin, USA) conectada a um espectrofotômetro de fibra ótica (USB2000, Ocean Optics).

VII.1.2. Reagentes e soluções

Para os experimentos foi utilizado papel de filtro qualitativo Whatman 1 como suporte sólido. Água deionizada (18,2 M Ω .cm) obtida pelo sistema Milli-Q plus (Millipore Corp., Bedford, MA, Estados Unidos) foi utilizada no preparo das soluções de dipirona sódica. Os reagentes utilizados foram todos de grau p.a.:

- Metanol (grau cromatográfico) (Mallinckrodt, Xalostoc, México);
- *p*-Dimetilaminocinamaldeído 94,0% (p.a., Riedel-de haën, Alemanha);
- Ácido acético glacial 99 % (Merck, Alemanha);
- Dipirona sódica 99,99%, (Daichi Seiyaku Co. Ltd, Tóquio, Japão).

As soluções utilizadas neste trabalho foram:

a) Solução estoque de dipirona sódica: Foi preparada diariamente uma solução estoque $5,70 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pela dissolução de 100 mg de dipirona sódica em 10 mL de água deionizada e transferida quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL e o volume completado até a marca com água deionizada. Esta solução foi padronizada como descrito na literatura²³⁹.

Soluções padrão foram preparadas a partir de diluições adequadas da solução estoque de dipirona sódica com água deionizada e utilizadas na construção da curva analítica ($1,42 \times 10^{-4}$ a $2,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ equivalente a 50 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

b) Solução de *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC) 0,8 % (m/v): foi preparada pela dissolução de 80,0 mg do sólido em 5 mL de metanol com agitação em banho de ultrassom durante 5 minutos. Esta solução foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com metanol. A solução foi mantida refrigerada por, no máximo, uma semana²²⁰.

VII.1.3. Amostras

As amostras comerciais de medicamentos contendo dipirona sódica foram adquiridas em farmácias locais e analisadas pelo método proposto, dentro dos seus prazos de validade.

Na Tabela 13 estão relacionadas as formulações farmacêuticas (comprimidos e solução oral) analisadas neste trabalho.

Tabela 13. Amostras comerciais de medicamentos analisados contendo dipirona sódica.

| Amostras comerciais | Conteúdo nominal de dipirona sódica^c |
|---|--|
| Novalgina ^{® a} | 500 mg |
| Anador ^{® a} | 500 mg |
| Lisador ^{® a} | 500 mg |
| Conmel ^{® a} | 320 mg |
| Dipirona Sódica – Genérico ^a | 500 mg |
| Buscopan [®] Composto | 250 mg |
| Anador ^{® b} | 500 mg |
| Lisador ^{® b} | 333 mg |

^a mg/comprimido;

^b mg / mL de solução;

^c quantidade declarada pelo fabricante.

VII.2.Procedimento experimental

VII.2.1. Procedimento para o spot test quantitativo empregando espectroscopia de reflectância difusa

Para a reação de spot test, as soluções foram adicionadas no centro do papel de filtro (com 2,25 cm² de área) utilizando uma micropipeta que é encaixada em um suporte representado na Figura 16, de acordo com o procedimento descrito por TUBINO e colaboradores²¹⁹.

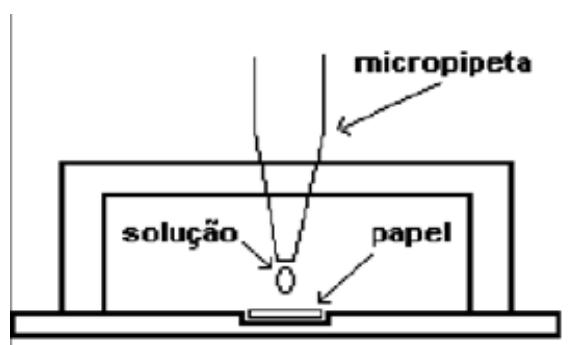


Figura 16. Suporte utilizado na realização dos *spot tests* (Baseado em: TUBINO et al.²¹⁹).

Inicialmente, 20 µl da solução do reagente cromogênico *p*-DAC foi adicionada. Subseqüentemente, fez-se a adição de 20 µl de ácido acético glacial e por fim 10 µl da solução do analito (dipirona sódica). Em seguida, o papel de filtro foi secado ao ar durante 15 minutos e as medidas de reflectância efetuadas em 510 nm. Uma solução de referência contendo 20 µl da solução do reagente cromogênico (*p*-DAC), 20 µl do ácido e 10 µl de água deionizada foi analisada utilizando o mesmo procedimento.

VII.2.1.1. Construção da curva analítica

A curva analítica foi construída seguindo o procedimento descrito no item acima de *spot test* utilizando soluções padrão de dipirona sódica na faixa de concentração de $1,42 \times 10^{-4}$ a $2,85 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para os experimentos. Um branco contendo 20 µl da solução do reagente cromogênico *p*-DAC, 20 µl do ácido e 10 µl de água deionizada foi preparado utilizando o mesmo procedimento.

VII.2.2. Estudo da estabilidade óptica

Com o objetivo de avaliar a estabilidade óptica do composto colorido obtido, sobre a superfície do papel de filtro, após reação de spot test proposta neste trabalho, foi efetuado o acompanhamento do valor da reflectância em 510 nm durante 60 minutos, com medidas em intervalos de 5 minutos. Transcorrido este período, efetuou-se a medida de reflectância após 20 horas.

VII.2.3. Preparo das amostras

VII.2.3.1. Comprimidos

Vinte comprimidos de um mesmo lote de cada amostra comercial analisada foram pesados em balança analítica. Determinou-se o valor da massa média dos comprimidos com variação menor que 5%²³⁹. Os comprimidos foram subsequentemente pulverizados em gral de ágata até obtenção de um pó fino.

Uma porção de amostra pulverizada equivalente a 7,4 mg de dipirona foi exatamente pesada e submetida à agitação com 7 mL de água deionizada com agitador magnético por 5 minutos. Esta solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo Whatman 41 e o filtrado transferido para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água deionizada até o menisco.

VII.2.3.2. Solução oral

Alíquotas de 500 µL ou 750 µL das amostras líquidas foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL com auxílio de uma micropipeta e diluídas com água deionizada. Diluições posteriores foram efetuadas de modo a obter soluções com uma concentração final aproximada de $7,11 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

VII.2.4. Estudo de interferentes

Os excipientes comumente encontrados nas formulações farmacêuticas de dipirona sódica foram cuidadosamente estudados visando avaliar possíveis interferências que os mesmos poderiam causar sobre o valor de reflectância medido.

Os excipientes analisados foram: lactose, sacarose, ácido cítrico, amido, sacarina sódica, sulfito de sódio, benzoato de sódio, talco, estearato de magnésio, polivinilpirrolidona, sorbitol, metilcelulose, cafeína, aspirina, acetaminofem, ácido ascórbico, fenacetina, oxifenbutazona, cloridrato de prometazina, cloridrato de adifenina, brometo de butilescolpolamina, salicilamida e fenobarbital.

Neste estudo, soluções individuais contendo dipirona sódica ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$ correspondente a $7,11 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) juntamente com cada excipiente presente em concentração igual e dez vezes maior à concentração de dipirona sódica (em massa) foram submetidas à agitação magnética por 5 minutos em aproximadamente 15 mL de água deionizada, quantitativamente transferidas para balões volumétricos de 25 mL e diluídas até a marca com água deionizada. Estas soluções foram então filtradas em papel de filtro quantitativo Whatman n^o. 41 se necessária e posteriormente, analisadas sob as mesmas condições descritas para a construção da curva analítica.

VII.2.5. Análise das amostras pelo método oficial

A Farmacopéia Brasileira preconiza a titulação iodométrica²³⁹ para a determinação quantitativa da dipirona sódica. O método consiste em solubilizar a amostra com água deionizada, acidificá-la com HCl $0,5 \text{ mol. L}^{-1}$ e titular com uma solução de iodo $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ utilizando como indicador uma solução de amido 1% (m/v).

VII.2.6. Estudos de adição e recuperação

Estudo de adição e recuperação do princípio ativo puro foi realizado com o objetivo de avaliar efeitos de matriz (formulação farmacêutica) nas análises. Para tanto, quantidades conhecidas ($3,98 \times 10^{-4}$; $7,97 \times 10^{-4}$ e $1,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) de dipirona sódica foram adicionadas em quatro amostras previamente analisadas contendo o equivalente a $7,97 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de dipirona sódica. As quantidades do fármaco padrão adicionadas corresponderam a 50, 100 e 150% da quantidade presente na amostra. A análise foi realizada como descrito no procedimento para construção da curva analítica.

VII.3. Resultados e discussão

VII.3.1. Testes preliminares

Experimentos preliminares realizados em nosso laboratório demonstraram a formação de um produto colorido (rosa-laranja) após a reação da dipirona sódica com *p*-DAC, em meio ácido sobre a superfície do papel de filtro utilizado como suporte sólido para a reação.

A Figura 17 mostra o espectro de reflectância do produto colorido formado com valor máximo de A_R (intensidade da medida de reflectância) em 510 nm.

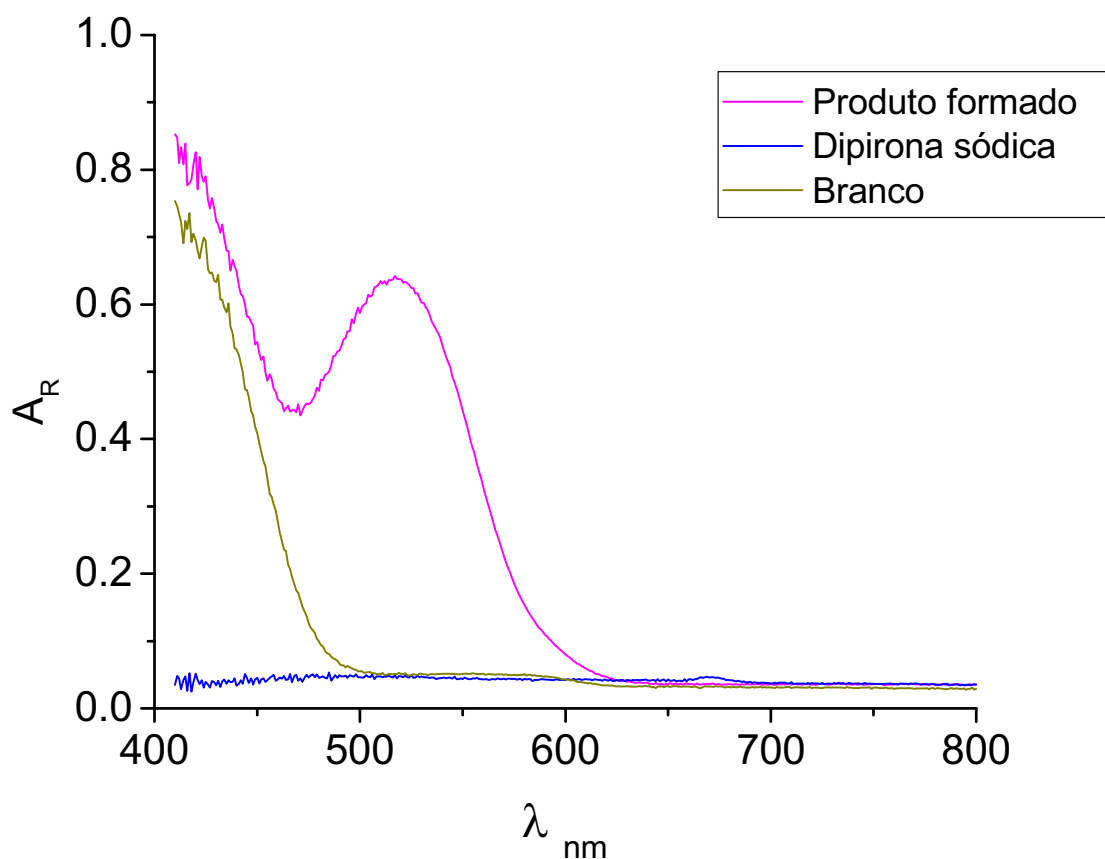


Figura 17. Espectro de reflectância da reação de spot test no papel de filtro entre dipirona, *p*-DAC, em meio de ácido acético. Valores de A_R foram obtidos após o papel secar ao ar por 15 minutos. O valor máximo de A_R foi em 510 nm. Concentração de dipirona sódica = $8,56 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

VII.3.1.1. Proposição de um provável mecanismo para a reação de spot test

A dipirona sódica em soluções aquosas sofre hidrólise rapidamente⁶². Na Figura 18 é mostrado o mecanismo desta hidrólise, no qual a dipirona sódica (I) está em equilíbrio com a 4-metilaminoantipirina (II), uma amina secundária.

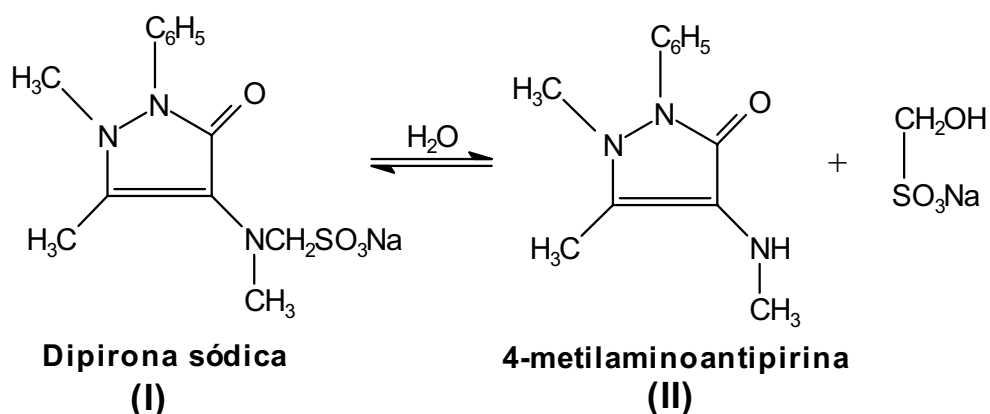


Figura 18. Mecanismo da hidrólise ácida da dipirona sódica.

O *p*-DAC é um reagente analítico utilizado para a detecção e determinação espectrofométrica de aminas aromáticas ou alifáticas, primárias ou secundárias²⁴⁰. A reação entre aminas secundárias aromáticas e *p*-DAC envolve a condensação do grupo amino secundário protonado, com o grupo carbonila do reagente (*p*-DAC) produzindo um sal imínio²⁴¹.

A dipirona sódica é uma amina terciária, logo não poderia reagir com *p*-DAC. Entretanto, com base na literatura acreditamos que neste trabalho a reação ocorre entre o produto da reação de hidrólise da dipirona sódica com o *p*-DAC conforme sugerido na Figura 19.

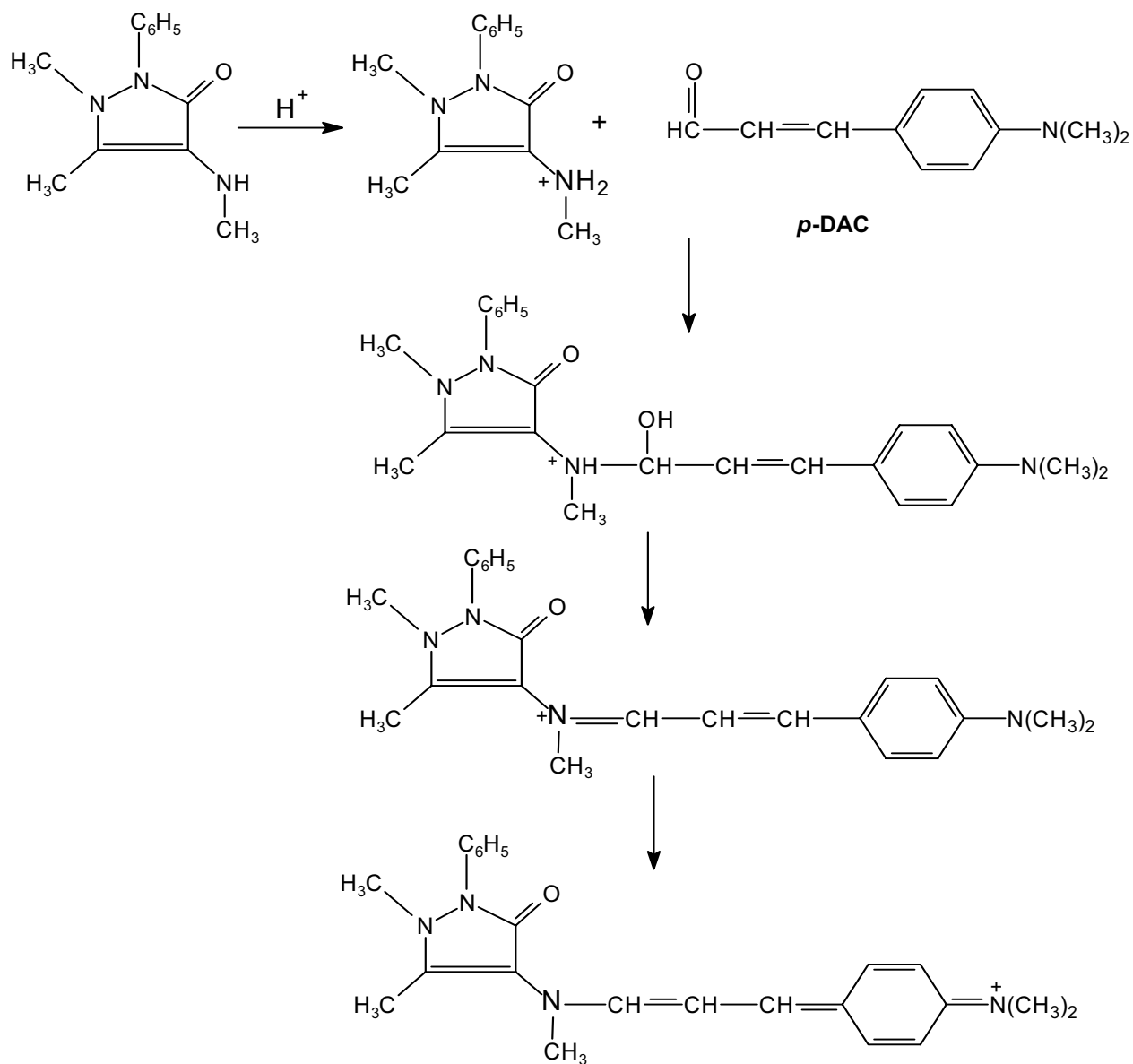


Figura 19. Mecanismo provável para a reação entre dipirona sódica e *p*-DAC, em meio ácido.

VII.3.2. Otimização dos fatores envolvidos na reação de spot test

A utilização de planejamentos de experimentos baseados em princípios estatísticos é, em geral, a maneira mais eficiente para se estimar os efeitos de várias variáveis simultaneamente²³¹⁻²³³. Com esta ferramenta é possível extrair do sistema em estudo o máximo de informações úteis com um número mínimo de ensaios. Na prática isso significa diminuição de horas trabalhadas, de gastos com reagentes e mais agilidade no desenvolvimento de novos produtos, processos ou métodos, além do melhor entendimento do sistema, melhor controle e conseqüentemente obtenção de resultados mais confiáveis, dentre outras vantagens.

O planejamento de experimentos não propõe uma rota única a ser seguida, mas direciona a condução dos experimentos de forma a atingir a meta estabelecida, para tanto se deve: selecionar as variáveis independentes a serem avaliadas; selecionar os níveis em que cada variável será avaliada e projetar o planejamento do experimento de forma que se possa ser obtida exatamente o tipo de informação desejada^{232,233}.

Neste trabalho o planejamento de experimentos foi aplicado no desenvolvimento de um novo método analítico para determinação de dipirona sódica em formulações farmacêuticas, utilizando a técnica de espectroscopia de reflectância difusa. O objetivo foi obter a melhor condição experimental que levará à obtenção de um valor ótimo para a variável resposta (medida de reflectância).

Inicialmente realizou-se uma triagem das variáveis através de um planejamento fatorial completo. Subseqüentemente, a metodologia de superfície de resposta (MSR) foi adotada para avaliar a relação existente entre as principais variáveis do sistema com a medida de reflectância do produto colorido formado sobre a superfície do papel de filtro.

VII.3.2.1. Triagem das variáveis

É possível utilizar as medidas de reflectância para fins quantitativos se certas condições experimentais forem selecionadas. Desta forma é útil conhecer algo sobre os parâmetros que influenciam as medidas de reflectância. De acordo com WENDLANT e HECHT²¹⁵, a cor do spot test deve ser uniforme sobre toda a superfície a fim de assegurar medidas de reflectância reprodutíveis. Neste sentido,

foram considerados detalhes importantes previamente descritos²¹⁵ para a reação de *spot test*, como ordem e velocidade de adição do reagente, qualidade do papel de filtro e volume da solução adicionada. Com o objetivo de se obter um *spot test* com sensibilidade analítica adequada, reprodutível e uniforme, as principais características que afetam o desenvolvimento da reação foram estudadas através do planejamento dos experimentos.

Inicialmente foi realizada uma triagem das variáveis que afetam a reação de *spot test* proposta neste trabalho. As variáveis do sistema foram selecionadas com base em conhecimentos prévios adquiridos em testes preliminares executados no laboratório, nos quais foi demonstrado que a reação com *p*-DAC ocorre em meio de ácido acético imediatamente após a adição das soluções sobre a superfície do papel de filtro.

Desta forma, realizou-se um primeiro planejamento fatorial completo (2^3) no qual foram selecionadas três variáveis consideradas importantes e avaliadas em dois níveis [baixo (-) e alto (+)]. As variáveis experimentais selecionadas estão mostradas na Tabela 14. O papel de filtro utilizado foi sempre de mesma área e qualidade. O volume de cada uma das soluções também foi mantido fixo, sendo 20 μL para o *p*-DAC e para o ácido, e 10 μL para uma solução de dipirona sódica na concentração $2,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 14. Matriz do planejamento fatorial 2^3 para triagem das variáveis importantes na realização do *spot test* juntamente com os resultados de reflectância obtidos.

| Nº. | Variáveis não codificadas | | | Variáveis codificadas | | | $A_{R\ 510\ \text{nm}}$ |
|-----|-------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------------|------|----|--------------------------------|
| | [<i>p</i> -DAC] ^a | [Ácido Acético] ^b | OA ^c | [<i>p</i> -DAC] | [H+] | OA | |
| 1 | 0,4 | 1:1 | X | - | - | - | $0,9736 \pm 4,2 \cdot 10^{-3}$ |
| 2 | 0,8 | 1:1 | X | + | - | - | $1,0242 \pm 2,8 \cdot 10^{-2}$ |
| 3 | 0,4 | Concentrado | X | - | + | - | $0,9026 \pm 1,1 \cdot 10^{-2}$ |
| 4 | 0,8 | Concentrado | X | + | + | - | $1,0199 \pm 1,9 \cdot 10^{-2}$ |
| 5 | 0,4 | 1:1 | Y | - | - | + | $0,4841 \pm 6,1 \cdot 10^{-3}$ |
| 6 | 0,8 | 1:1 | Y | + | - | + | $0,3692 \pm 3,3 \cdot 10^{-3}$ |
| 7 | 0,4 | Concentrado | Y | - | + | + | $0,6159 \pm 3,1 \cdot 10^{-3}$ |
| 8 | 0,8 | Concentrado | Y | + | + | + | $0,5306 \pm 2,6 \cdot 10^{-3}$ |

^a 20 μL de *p*-DAC em concentração dada em % m/v.

^b 20 μL de ácido acético glacial concentrado ou diluído com água deionizada.

^c OA = ordem de adição, onde: X = *p*-DAC + Ácido + dipirona e Y = dipirona + Ácido + *p*-DAC.

A Figura 20 apresenta os efeitos estimados dos fatores investigados e suas interações. Pode-se perceber que a ordem de adição dos reagentes é a variável mais importante, com um efeito de sinal negativo, o que indica que uma melhor resposta é obtida quando esta variável estiver ajustada no nível baixo (-). Já as concentrações de ácido acético e de *p*-DAC exercem uma menor influência sobre a resposta. Entretanto, são variáveis significativas quando analisadas simultaneamente com a variável ordem de adição, pois apresentam significativos efeitos de interação. Pela análise da mesma figura fica claro que quando as concentrações de ácido acético e de *p*-DAC estão ajustadas no nível alto (+) há uma maior resposta analítica.

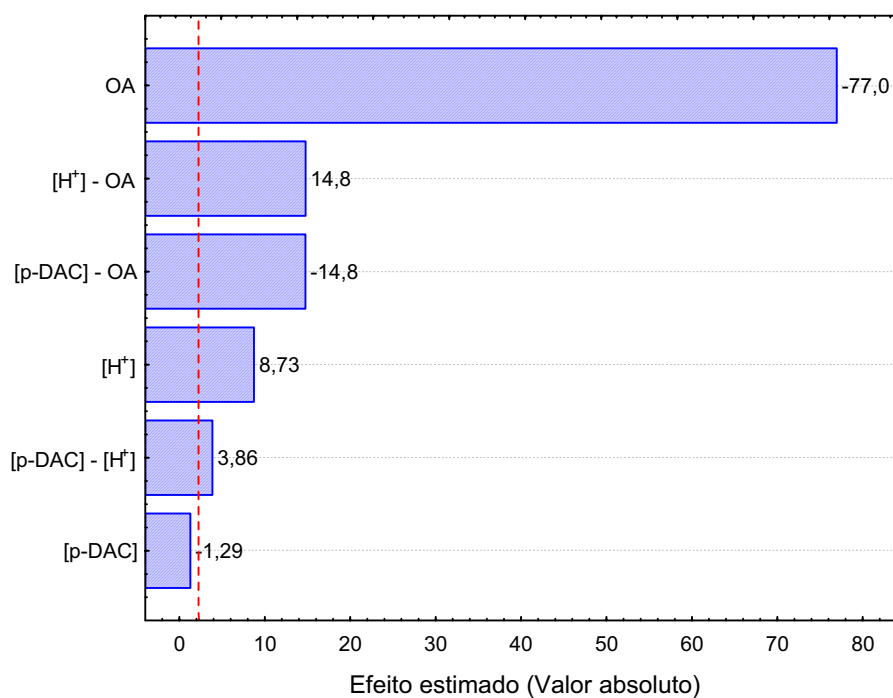


Figura 20. Gráfico dos efeitos principais e de interação estimados para as variáveis estudadas.

Com estes resultados pode-se fixar a ordem de adição dos reagentes no nível baixo (-) restando as variáveis: concentração de ácido acético e *p*-DAC. Para continuar a otimização, a variável concentração de ácido acético passou a ser analisada variando-se o volume adicionado de ácido acético concentrado.

VII.3.2.2. Metodologia de superfície de resposta

De acordo com os resultados obtidos durante o estudo para triagem das variáveis constatou-se que as concentrações de *p*-DAC e ácido acético adicionados são as variáveis de maior importância na realização do *spot test*.

Para dar continuidade ao procedimento de otimização a metodologia da superfície de resposta foi adotada. Através da superfície de resposta é possível analisar a forma com que a resposta de interesse (leitura da reflectância do produto colorido) é simultaneamente influenciada pelas variáveis examinadas (concentração de *p*-DAC e volume de ácido acético adicionado).

Deste modo, em um planejamento composto central as variáveis: concentração de *p*-DAC e o volume de ácido acético (selecionadas após a triagem das variáveis) foram analisadas em cinco níveis. As variáveis estudadas em seus respectivos níveis (codificados e não-codificados), a matriz experimental e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 15. Os experimentos no ponto central foram realizados com repetições ($n = 4$) para estimativa do erro experimental. Os resultados foram analisados utilizando o programa Statistica, versão 6.0.

Tabela 15. Matriz experimental do planejamento composto central e resultados experimentais obtidos para o método reflectométrico desenvolvido para determinação de dipirona. Em todos os ensaios foram adicionados 10 μ l de dipirona sódica $2,85 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$.

| Ensaio | Variáveis não codificadas em seus níveis | | Variáveis codificadas em seus níveis | | A _{R510nm} |
|----------------|---|---------------------------------------|---|---------|---------------------|
| | [p-DAC] (% m/v) ^a | Ácido acético (μ l) ^b | Fator A | Fator B | |
| 1 | 0,6 | 15 | -1 | -1 | 0,97092 |
| 2 | 1,0 | 15 | 1 | -1 | 1,03841 |
| 3 | 0,6 | 25 | -1 | 1 | 1,03923 |
| 4 | 1,0 | 25 | 1 | 1 | 1,03928 |
| 5 ^c | 0,8 | 20 | 0 | 0 | 1,07671 |
| 6 ^c | 0,8 | 20 | 0 | 0 | 1,07871 |
| 7 ^c | 0,8 | 20 | 0 | 0 | 1,07151 |
| 8 ^c | 0,8 | 20 | 0 | 0 | 1,07411 |
| 9 | 0,52 | 20 | -1,41 | 0 | 1,03408 |
| 10 | 1,08 | 20 | 1,41 | 0 | 1,03356 |
| 11 | 0,8 | 13 | 0 | -1,41 | 1,03133 |
| 12 | 0,8 | 27 | 0 | 1,41 | 1,03307 |

^a O volume adicionado foi de 20 μ l;

^b Ácido acético concentrado (99%);

^c Ponto central executado em replicatas (=4).

A análise variância (ANOVA) foi realizada no planejamento para verificação da significância do modelo matemático que expressa a relação da resposta (leitura de reflectância em 510 nm) com os efeitos dos fatores que a influenciam.

Neste estudo verificou-se que o modelo ajustado aos dados experimentais obtidos para o planejamento composto central é capaz de prever com uma confiabilidade de 87,0% o comportamento da variável dependente (A_{R510nm}) frente as variáveis independentes estudadas (concentração de p-DAC e volume de ácido acético).

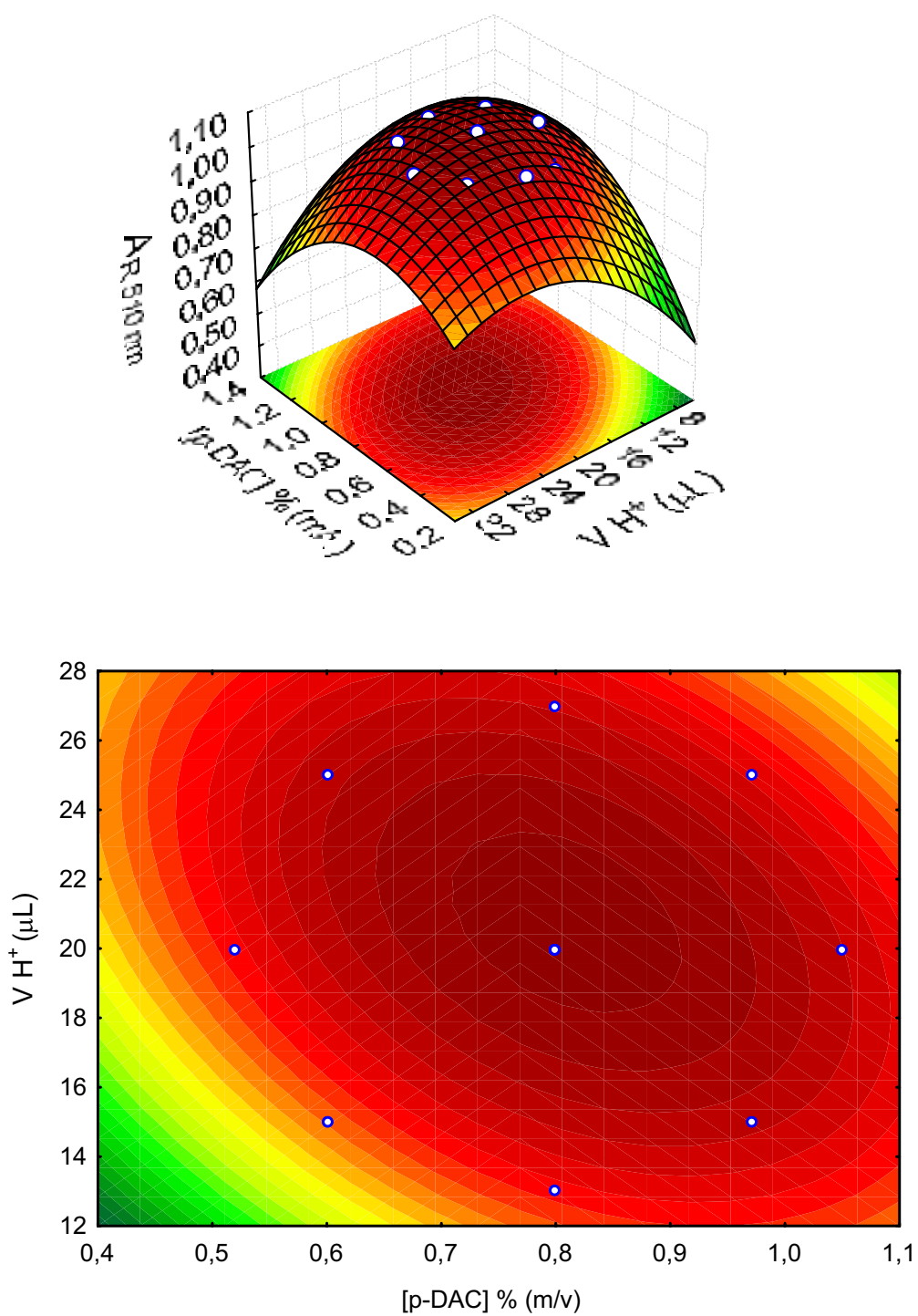


Figura 21. Superfície de resposta otimizada com sua respectiva curva de nível para a leitura de reflectância em 510 nm em função das variáveis: concentração de *p*-DAC % (m/v) e volume de ácido acético glacial (μL). Foram adicionados 10 μL de dipirona = $2,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ nos experimentos.

Observando-se a superfície de resposta juntamente com sua curva de nível (Figura 21), percebe-se que uma região de máximo valor de reflectância situada na área mais escura do gráfico que representa as condições experimentais ótimas para a realização da reação de spot test. Observa-se ainda, que nesta região está o ponto central do planejamento.

Depois de realizada toda a análise estatística dos dados e definida a superfície de resposta determinou-se que as melhores condições experimentais seriam: volume de ácido acético glacial de 20,8 μL e a concentração de *p*-DAC de 0,808 % (m/v).

Foram realizados experimentos em replicata ($n = 4$) nas condições experimentais determinadas pelo modelo matemático, para verificação da concordância entre o resultado obtido experimentalmente com àquele calculado pelo programa. Entretanto, por questões de maior praticidade operacional, as condições experimentais empregadas no desenvolvimento do método proposto para determinação de dipirona foram àquelas correspondentes ao ponto central do planejamento, ou seja, volume de ácido acético glacial de 20,0 μL e a concentração de *p*-DAC de 0,80 % (m/v). Observou-se que o resultado predito pelo modelo matemático (1,076) para a medida de reflectância nas condições ótimas, concorda com àqueles obtidos experimentalmente [$1,053 \pm 3,13 \times 10^{-3}$ (R.S.D = 0,3 %)], a um nível de confiança de 95%.

VII. 3.3. Construção da curva analítica

Após a otimização das condições experimentais verificou-se a faixa de trabalho onde era obtida uma relação linear entre o valor de reflectância monitorado e a concentração de dipirona sódica. Os valores de reflectância obtidos estão apresentados na Tabela 16. Construiu-se a curva analítica (Figura 22) colocando em gráfico os valores de A_R monitorados (Tabela 16) versus o logaritmo da concentração de dipirona sódica. Uma relação linear foi observada na faixa de concentração de $1,42 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Para medidas de A_R para soluções de dipirona com concentração inferior a $1,42 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou superior a $2,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram observados desvios da linearidade.

Tabela 16. Valores de reflectância obtidos na construção da curva analítica para determinação de dipirona através da reação com 20 μL de *p*-DAC 0,8 % (m/v) e 20 μL de ácido acético glacial em suporte sólido (papel de filtro).

| [dipirona] mol L ⁻¹ | log 10 ³ [dipirona] | A _{R 510 nm} |
|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 1,42 x 10 ⁻⁴ | 0,15 | 0,15269 ± 0,0146 |
| 1,85 x 10 ⁻⁴ | 0,27 | 0,25462 ± 0,0024 |
| 2,13 x 10 ⁻⁴ | 0,33 | 0,28019 ± 0,0127 |
| 2,85 x 10 ⁻⁴ | 0,46 | 0,33339 ± 0,0078 |
| 5,70 x 10 ⁻⁴ | 0,76 | 0,53274 ± 0,0033 |
| 8,55 x 10 ⁻⁴ | 0,93 | 0,66221 ± 0,0091 |
| 1,04 x 10 ⁻³ | 1,02 | 0,73402 ± 0,0196 |
| 1,43 x 10 ⁻³ | 1,16 | 0,79985 ± 0,0020 |
| 1,71 x 10 ⁻³ | 1,23 | 0,83669 ± 0,0028 |
| 2,00 x 10 ⁻³ | 1,30 | 0,87494 ± 0,0073 |
| 2,28 x 10 ⁻³ | 1,36 | 0,93766 ± 0,0053 |
| 2,57 x 10 ⁻³ | 1,41 | 0,98562 ± 0,0162 |
| 2,85 x 10 ⁻³ | 1,46 | 1,01072 ± 0,0192 |

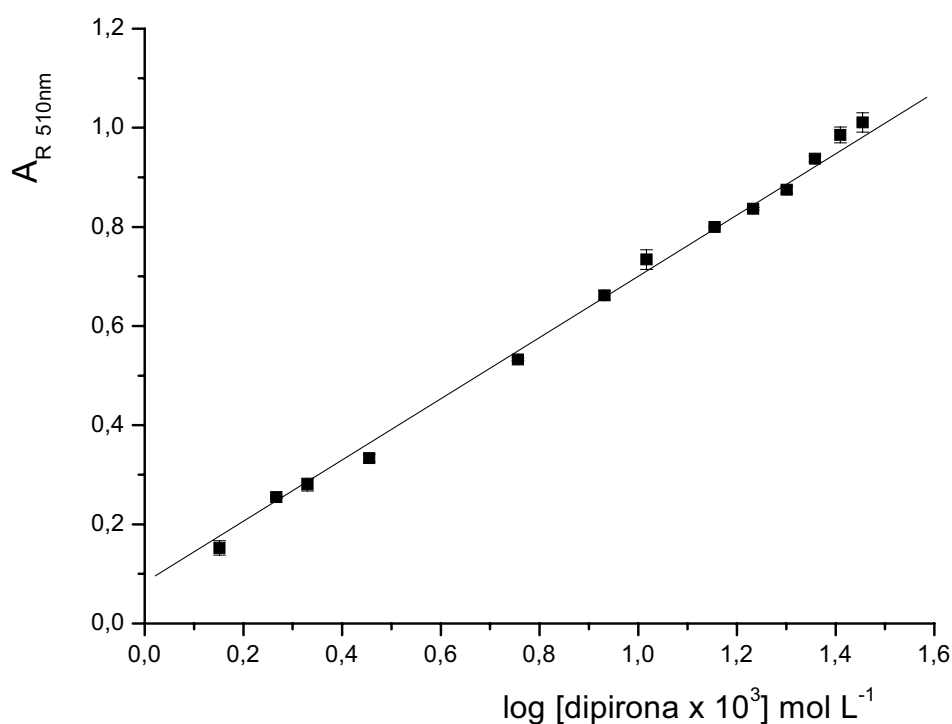


Figura 22. Curva analítica. Concentrações das soluções padrão de Dipirona: 1,42 x 10⁻⁴ a 2,85 x 10⁻³ mol L⁻¹. Cada ponto foi analisado em triplicata.

Os valores de reflectância (A_R) em 510 nm monitorados para a faixa de concentração de dipirona foram ajustados pela equação da reta: $A_R = 0,08231 + 0,61757 \times C$, onde $C = \log (10^3 [\text{Dipirona}] / \text{mol L}^{-1})$ com um coeficiente de correlação de 0,9991. O fator 10^3 foi usado para ajustar a curva analítica para valores de log maiores que zero.

VII. 3.4. Estudo da estabilidade óptica

Neste estudo o valor da medida de reflectância em 510 nm foi monitorado em intervalos de 5 minutos durante uma hora. A Figura 23 representa graficamente os resultados obtidos neste estudo e apresentados na Tabela 17. Observa-se que não houve diferença significativa entre os valores de A_R medidos durante o período de tempo estudado indicando a estabilidade óptica do composto colorido formado na reação de *spot test* entre dipirona sódica e *p*-DAC.

Entretanto, observa-se que o valor da reflectância decresce durante os 5 minutos iniciais, provavelmente devido ao fato do papel ainda estava úmido e a reação estava se processando. Após este tempo observa-se que o papel está seco e as leituras de reflectância podem ser efetuadas. Medidas realizadas após 20 horas revelaram que o produto colorido formado manteve-se estável, uma vez que o valor de reflectância monitorado mostrou uma variação menor que 2%.

Tabela 17. Resultados de $A_{R\ 510\ \text{nm}}$ obtidos no estudo da estabilidade ótica do produto colorido obtido sobre a superfície do papel de filtro.

| Tempo (minutos) | $A_{R510\text{nm}}$ | Tempo (minutos) | $A_{R510\text{nm}}$ |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| 5 | 1,1345 | 35 | 1,0722 |
| 10 | 1,0712 | 40 | 1,0794 |
| 15 | 1,0766 | 45 | 1,0737 |
| 20 | 1,0785 | 50 | 1,0726 |
| 25 | 1,0765 | 55 | 1,1345 |
| 30 | 1,0716 | 60 | 1,0712 |

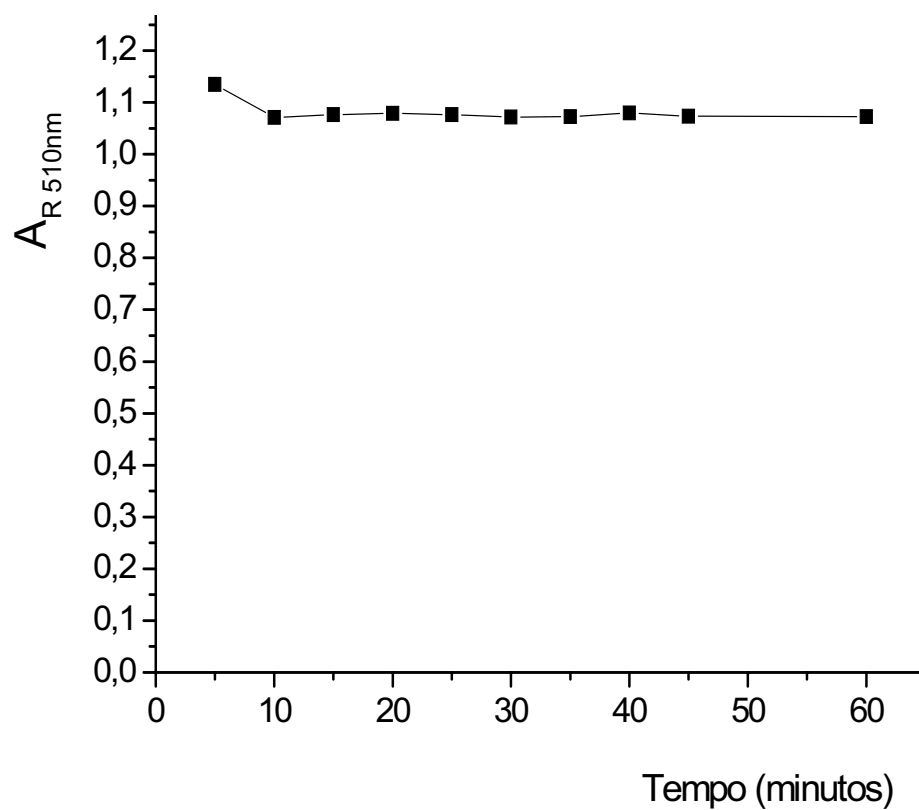


Figura 23. Estudo da estabilidade ótica do produto da reação de spot test entre dipirona sódica e *p*-DAC, em meio ácido. Condições: 20 μL de *p*-DAC 0,8 % (m/v); 20 μL de ácido acético glacial e 10 μL de solução de dipirona sódica $2,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ nesta ordem de adição.

VII. 3.5. Estudo de interferentes

O efeito de cada excipiente foi considerado como interferência quando a variação foi maior ou igual a 3% na determinação do fármaco²³⁹. Os resultados obtidos neste estudo, apresentados na Tabela 18 indicam a ausência de interferentes. A porcentagem de dipirona encontrada nas soluções adicionadas foi de 97 a 102% com coeficientes de variação menores que 3% para três repetições.

Tabela 18. Resultados obtidos no estudo de interferentes para o método de *spot test* combinado a espectroscopia de reflectância difusa proposto para a determinação de dipirona sódica.

| Excipientes | Dipirona: excipiente ^a | | Dipirona: excipiente ^b | |
|------------------------------|-----------------------------------|--------|-----------------------------------|--------|
| | Rec. (%) ^c | R.S.D. | Rec. (%) ^c | R.S.D. |
| Estearato de magnésio | 98,0 ± 0,9 | 0,9 | 98,5 ± 0,1 | 0,1 |
| Amido | 98,5 ± 0,1 | 0,1 | 97,8 ± 1,2 | 1,2 |
| Talco | 98,5 ± 1,5 | 1,5 | 100,5 ± 0,9 | 0,9 |
| Sacarina sódica | 97,7 ± 2,0 | 2,0 | 101,1 ± 2,0 | 2,0 |
| Bissulfito de sódio | 97,0 ± 1,0 | 1,0 | 97,8 ± 1,9 | 2,0 |
| Sacarose | 101,1 ± 1,9 | 1,9 | 98,4 ± 2,3 | 2,3 |
| Lactose | 97,8 ± 1,9 | 1,9 | 98,2 ± 2,6 | 2,6 |
| Sorbitol | 98,6 ± 2,3 | 2,3 | 98,4 ± 2,8 | 2,8 |
| Cafeína | 102,0 ± 1,7 | 1,7 | 97,9 ± 1,8 | 1,8 |
| Aspirina | 100,2 ± 0,8 | 0,8 | 100,7 ± 0,6 | 0,6 |
| Ácido ascórbico | 99,0 ± 0,8 | 0,8 | 101,0 ± 1,8 | 1,8 |
| Acetaminofem | 101,2 ± 0,8 | 0,8 | 100,9 ± 0,5 | 0,5 |
| Fenacetina | 101,8 ± 0,7 | 0,7 | 99,2 ± 0,8 | 0,8 |
| Acetanilida | 101,1 ± 0,6 | 0,6 | 99,9 ± 0,9 | 0,9 |
| Oxifenbutazona | 100,2 ± 1,0 | 1,0 | 101,2 ± 1,2 | 1,2 |
| Cloridrato de prometazina | 98,5 ± 0,5 | 0,5 | 100,4 ± 1,4 | 1,4 |
| Cloridrato de adifenina | 100,2 ± 1,3 | 1,3 | 101,4 ± 0,8 | 0,8 |
| Brometo de butilescopolamina | 99,2 ± 1,5 | 1,5 | 100,7 ± 0,8 | 0,8 |
| Salicimida | 101,9 ± 0,5 | 0,5 | 101,2 ± 0,9 | 0,9 |
| Fenobarbital | 99,0 ± 0,6 | 0,6 | 100,2 ± 0,3 | 0,3 |
| Polivinilpirrolidona | 98,8 ± 2,1 | 2,1 | 100,9 ± 1,6 | 1,6 |
| Ácido cítrico | 100,0 ± 0,6 | 0,7 | 98,5 ± 2,2 | 2,2 |
| Benzoato de sódio | 102,1 ± 1,9 | 1,8 | 99,3 ± 1,4 | 1,4 |
| Metilcelulose | 99,0 ± 0,8 | 0,8 | 98,3 ± 0,1 | 0,1 |

^a Relação de massas para dipirona:excipiente 1:1

^b Relação de massas para dipirona:excipiente 1:10

^c Média de três determinações ± S.D.

VII. 3.6. Aplicação analítica do método de spot test desenvolvido

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de dipirona em formulações farmacêuticas (comprimidos e solução oral) adquiridas em farmácias locais (Tabela 13). Os resultados obtidos pela aplicação do método proposto estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Determinação de dipirona em formulações farmacêuticas pelo método de *spot-test* combinado a espectroscopia de reflectância difusa.

| Amostras | Método proposto | | % | t ^d (2,78) | F ^d (19,00) | Método oficial ²³⁹ | | |
|----------------|--------------------|--------|-------|--------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------|--------|
| | Média ^c | R.S.D. | | | | Rec. | Média ^c | R.S.D. |
| A ^a | 500,2 | 0,8 | 100,0 | 0,06 | 2,56 | 500,4 | 0,5 | 100,1 |
| B ^a | 320,6 | 1,4 | 100,2 | 0,22 | 3,06 | 320,0 | 0,8 | 100,0 |
| C ^a | 496,3 | 0,8 | 99,3 | 0,74 | 2,56 | 494,3 | 0,5 | 98,9 |
| D ^a | 506,4 | 0,4 | 101,3 | 1,07 | 2,25 | 504,3 | 0,6 | 100,9 |
| E ^a | 520,7 | 0,3 | 104,1 | 1,43 | 4,00 | 517,7 | 0,6 | 103,5 |
| F ^a | 245,2 | 1,3 | 98,1 | 0,93 | 1,69 | 244,5 | 1,0 | 97,8 |
| G ^b | 498,7 | 0,6 | 99,7 | 0,26 | 1,00 | 499,3 | 0,6 | 99,9 |
| H ^b | 504,9 | 0,4 | 101,0 | 0,52 | 2,25 | 506,0 | 0,6 | 101,2 |

^a mg por comprimido;

^b mg por mL

^c Média de 3 determinações

^d Valor tabelado com P = 0,05 – 95% de significância com (n – 2) graus de liberdade.

VII.3.7. Validação do método de spot test desenvolvido

Para validação²³⁵⁻²³⁷ do método desenvolvido foram avaliados alguns parâmetros considerados importantes, tais como: exatidão, precisão, limite de detecção ($LD = 3 SD^{\text{Branco}} / \text{inclinação da reta}$), limite de quantificação ($LQ = 10 SD^{\text{Branco}} / \text{inclinação da reta}$), recuperação e repetibilidade.

A precisão e exatidão do método proposto foram avaliadas através da aplicação dos testes F e t, respectivamente. Para tanto os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com aqueles obtidos pela aplicação do método

recomendado pela Farmacopéia Brasileira²³⁹ (titulação iodométrica). Em todos os casos, os valores obtidos pelo método proposto mostraram-se em boa concordância com os obtidos pelo método oficial. Os valores de F e t calculados não excederam os valores tabelados, indicando desta forma a precisão e exatidão do método desenvolvido, com um nível de confiança de 95%.

Para avaliação da precisão intradia foram realizadas análises com repetições (n = 10) para soluções de uma mesma amostra contendo o equivalente a $7,90 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de dipirona e para estudo da precisão interdia foram executadas análises da amostra durante um período de 5 dias consecutivos. Os resultados obtidos, em termos de coeficiente de variação, foram de 0,9% e 1,1%, evidenciando a boa reprodutibilidade do método desenvolvido.

Os limites²³⁶ de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC como sendo $1,20 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $4,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente, indicando uma boa sensibilidade analítica do método desenvolvido.

VII.3.7.1. Estudos de adição e recuperação

Estudos de recuperação foram realizados através do método da adição de padrão²³⁸. Neste estudo, quantidades conhecidas de dipirona sódica pura (padrão analítico) foram adicionadas a quatro amostras pré-analisadas (comprimidos e solução oral). De acordo com os resultados obtidos apresentados na Tabela 20, observa-se que as médias percentuais de recuperação de dipirona encontram-se entre 98,6 – 103,3%, evidenciando novamente a boa exatidão do método proposto, além de mostrar que não há interferência de matriz.

Tabela 20. Resultados de recuperação de dipirona adicionada nas formulações farmacêuticas pré-analisadas pelo método de *spot test* combinado a espectroscopia de reflectância difusa.

| Amostras | Adicionado (mol L ⁻¹) | Encontrado (mol L ⁻¹) | Rec. % |
|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| <i>Líquidas</i> | | | |
| G | ---- | 8,00 x 10 ⁻⁴ | ---- |
| | 3,98 x 10 ⁻⁴ | 1,20 x 10 ⁻³ | 100,5 |
| | 7,97 x 10 ⁻⁴ | 1,60 x 10 ⁻³ | 100,4 |
| | 1,20 x 10 ⁻³ | 2,01 x 10 ⁻³ | 100,8 |
| | | | μ ^a = 100,6 ± 0,2 |
| H | ---- | 7,94 x 10 ⁻⁴ | ---- |
| | 3,98 x 10 ⁻⁴ | 1,19 x 10 ⁻³ | 99,5 |
| | 7,97 x 10 ⁻⁴ | 1,60 x 10 ⁻³ | 101,1 |
| | 1,20 x 10 ⁻³ | 2,00 x 10 ⁻³ | 100,8 |
| | | | μ ^a = 100,5 ± 0,9 |
| <i>Comprimidos</i> | | | |
| A | ---- | 8,01 x 10 ⁻⁴ | ---- |
| | 3,98 x 10 ⁻⁴ | 1,20 x 10 ⁻³ | 100,3 |
| | 7,97 x 10 ⁻⁴ | 1,60 x 10 ⁻³ | 101,5 |
| | 1,20 x 10 ⁻³ | 2,01 x 10 ⁻³ | 101,7 |
| | | | μ ^a = 101,2 ± 0,8 |
| B | ---- | 7,98 x 10 ⁻⁴ | ---- |
| | 3,98 x 10 ⁻⁴ | 1,21 x 10 ⁻³ | 103,5 |
| | 7,97 x 10 ⁻⁴ | 1,60 x 10 ⁻³ | 100,6 |
| | 1,20 x 10 ⁻³ | 2,04 x 10 ⁻³ | 103,3 |
| | | | μ ^a = 102,5 ± 1,6 |

^a Média de 3 determinações ± desvio padrão.

VII.4. Conclusões

O método analítico desenvolvido neste trabalho demonstrou o potencial da espectroscopia de reflectância difusa juntamente com o emprego de *spot tests* quantitativos para o controle de qualidade de dipirona em formulações farmacêuticas. O método envolve um procedimento de *spot test* muito simples, no qual 20 μl da solução do reagente cromogênico *p*-DAC, 20 μl de ácido acético glacial

e 10 µl da solução de dipirona sódica foram adicionados em papel de filtro. O produto colorido formado na superfície do papel mostrou um valor de reflectância máximo em 510 nm e grande estabilidade óptica.

O planejamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta foram utilizados para otimização do experimento. Assim, determinou-se que para a obtenção do máximo de reflectância as condições experimentais deveriam ser: 20 µl da solução do reagente cromogênico *p*-DAC 0,8 % (m/v), 20 µl de ácido acético glacial e 10 µl da solução de dipirona sódica, nesta ordem de adição.

Uma excelente linearidade foi observada e a ausência de interferência dos excipientes comumente presentes nas formulações farmacêuticas. Foi possível aplicar com sucesso o método desenvolvido na determinação de dipirona em formulações farmacêuticas com excelentes resultados em termos de precisão e exatidão quando comparados ao método da Farmacopéia Brasileira. O método também apresentou sensibilidade analítica adequada para o propósito a que foi aplicado com grande reprodutibilidade. Pelos testes estatísticos verifica-se que o método apresenta boa precisão e exatidão. Desta forma, este trabalho apresenta uma proposta viável de método para a análise de dipirona em medicamentos, oferecendo vantagens relacionadas à simplicidade, rapidez e baixo consumo de reagentes e de solventes. Na Tabela 21 estão sumarizadas as principais figuras de mérito para o método proposto.

Tabela 21. Principais figuras de mérito para o método de *spot-test* combinado a espectroscopia de reflectância difusa proposto para a determinação de dipirona sódica.

| PARÂMETRO | |
|---|---|
| p-DAC | 20 µL (0,8%) m/V |
| Ácido acético | 20 µL glacial |
| Ordem de Adição | p-DAC - H ⁺ - dipirona |
| Linearidade | 1,42 x 10 ⁻⁴ a 2,85 x 10 ⁻³ M |
| Equação da reta | y = 2,17 x 10 ⁻² + 6,78 x 10 ⁻¹ x |
| Coef. de correlação (r) | 0,999 |
| λ nm | 510 |
| Estabilidade óptica | 20 horas |
| LOD | 1,20 x 10 ⁻⁵ M |
| LOQ | 4,00 x 10 ⁻⁵ M |
| Precisão interdia (7,90 x 10 ⁻⁴ M) | 1,1% (5 dias) |
| Precisão intradia (7,90 x 10 ⁻⁴ M) | 0,9% (10 repetições) |

Capítulo VIII. Desenvolvimento de procedimento de
análise por injeção em fluxo para determinação de
Dipirona em formulações farmacêuticas

VIII.1. Parte experimental

VIII.1.1. Materiais e equipamentos

As medidas de volume foram efetuadas com buretas classe A e micropipetas “Brand” (100 - 1000 μ L) e “Eppendorf” (10 - 100 μ L). A vidraria utilizada no preparo das soluções foi de grau A e as pesagens foram realizadas em balança analítica AG204, Mettler Toledo. Para solubilização dos reagentes foi utilizado um banho de ultra-som, marca Thornton e agitadores magnéticos.

Para o desenvolvimento do procedimento de análise por injeção em fluxo foi utilizado o sistema de análise modular ASIA da Ismatec (Zurique, Suíça). Este sistema é constituído por quatro módulos como representado na Figura 24.



Figura 24. Foto do sistema de análise modular ASIA, Ismatec (Zurique, Suíça). Módulo 1: Bomba peristáltica de rotação variável; Módulo 2: Bomba peristáltica de rotação fixa; Módulo 3: Válvula de 6 caminhos, Rheodyne 5011; Módulo 4: Válvula de injeção Rheodyne 5041.

Para a realização deste trabalho foram utilizados os módulos: bomba peristáltica de quatro canais, Ismatec modelo IS 7610 com rotação variável (1-50 rpm) para a propulsão das soluções e a válvula de injeção (IS 7630, Rheodyne 5041, EUA) para a injeção das soluções de dipirona e amostras.

A detecção foi realizada pelo acoplamento, através de uma interface RS 232, de um espectrofotômetro de arranjo de diodos UV-Vis HP 8453A (Hewlett Packard, EUA) equipado com cubeta de fluxo com caminho ótico de 1,00 cm e volume interno de 80µl, Hewlett Packard (Hewlett Packard, EUA).

Para a propulsão das soluções foram utilizados tubos de Tygon[®] de diferentes diâmetros internos. Para a confecção das alças de amostragem, bobinas reacionais e linhas de condução das soluções tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno foram utilizados e uma conexão em acrílico foi empregada para confluência das soluções.

VIII.1.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram de grau analítico p.a. Para a preparação das soluções foi utilizada água deionizada (18,2 MΩ.cm) obtida pelo sistema Milli-Q plus (Millipore Corp., Bedford, MA, Estados Unidos).

- *p*-Dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC) 98 % (p.a., Aldrich, Milwaukee, EUA);
- Dipirona sódica 99,99% (Daichi Seiyaku Co. Ltd, Tóquio, Japão);
- HCl 37% (Mallinckrodt, Xalostoc, México);
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) 99,9% (Sigma, St. Louis, EUA).

As soluções utilizadas neste trabalho foram:

a) Solução de dipirona sódica de trabalho: Foi preparada diariamente uma solução estoque $2,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, pela dissolução de 10,0 mg de dipirona sódica (pureza 99,99 % determinada pela padronização do sal de acordo com o procedimento recomendado na farmacopéia brasileira)²³⁹ em balão volumétrico de 100 mL com água deionizada. Soluções padrão foram preparadas a partir de

diluições adequadas da solução estoque de dipirona sódica com água deionizada e utilizadas na construção da curva analítica ($1,45 \times 10^{-6}$ to $2,90 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ ou 0,50 a 10,0 µg mL⁻¹).

b) Solução estoque de HCl $4,79 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹: foi preparada através da conveniente diluição do HCl concentrado (37,0% m/v Mallinckrodt, Xalostoc, México) com água deionizada e adequadamente padronizada²⁴². Soluções de trabalho foram preparadas por diluição com água deionizada.

c) Solução de *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC) 0,054 % (m/v): foi preparada pela dissolução de 54,0 mg do sólido em HCl $2,22 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ em balão volumétrico de 100 mL.

d) Solução estoque de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,10 mol L⁻¹: foi preparada semanalmente através da dissolução de 7,1210 g de SDS em aproximadamente 100 mL de água deionizada. Esta solução foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 250 mL e o volume completo até o menisco com água deionizada. Soluções de trabalho foram convenientemente preparadas através de diluição com água deionizada.

VIII.1.3 Amostras

As amostras comerciais de medicamentos contendo dipirona sódica foram as mesmas utilizadas no desenvolvimento do método reflectométrico para determinação de dipirona apresentadas na Tabela 13.

VIII.2. Procedimento experimental

VIII.2.1 Construção da curva analítica

O diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo otimizado está representado na Figura 25. Para o funcionamento do sistema, alíquotas de 880 µL das soluções de referência de dipirona ($1,45 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ - $2,90 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) são introduzidas no fluxo transportador (SDS $2,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹)

a uma vazão de $3,3 \text{ mL min}^{-1}$ através da alça de amostragem inserida na válvula de injeção. A solução de dipirona é transportada pelo fluxo carregador até o ponto de confluência X encontrando a solução reagente (*p*-DAC 0,054% (m/v) preparada em HCl $2,22 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ propulsionada a uma vazão de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$). Após a confluência ocorre há formação do composto colorido vermelho-alaranjado no reator B, o qual foi monitorado espectrofotometricamente em 510 nm no espectrofotômetro. Os sinais transientes foram registrados no computador e transferidos como arquivos ASCII para tratamento no programa Origin 7.0.

A curva analítica foi construída representando-se graficamente os valores de $A_{510\text{nm}}$ em função da concentração de dipirona sódica.

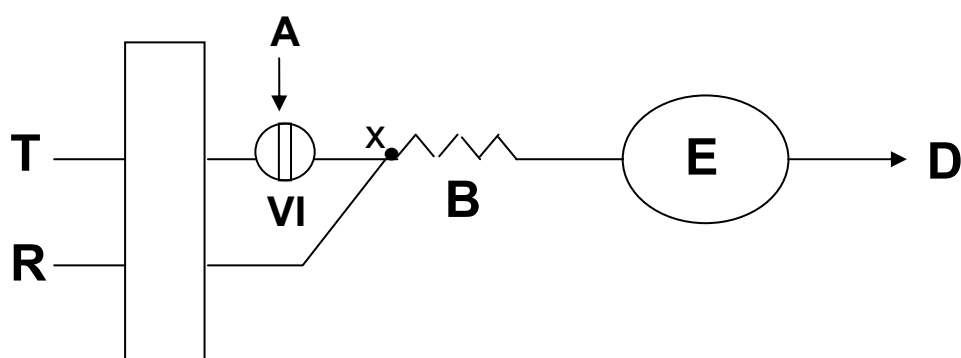


Figura 25. Diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo para determinação espectrofotométrica de dipirona. **T** solução transportadora (SDS $2,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) com vazão de $3,3 \text{ mL min}^{-1}$; **R** solução reagente de *p*-DAC 0,054 % (m/v) preparada em HCl $2,22 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ com vazão de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$; **A** soluções padrão ou amostra (alça de amostragem $880 \mu\text{L}$); **VI**: válvula de injeção; **x** ponto de confluência; **B** bobina reacional (150 cm); **E** espectrofotômetro (510 nm); **D** descarte.

Na Figura 26 é apresentado o esquema representando as posições de amostragem e injeção da amostra para uma válvula de injeção. Na posição de amostragem a alça de amostragem está inserida nas posições 1 e 4, onde a entrada da amostra se faz pela posição 2 e o excesso é descartado pela posição 3. Quando a válvula é acionada para o modo de injeção a solução do carregador (que entra pela posição 6) passa pela alça de amostragem carregando amostra em direção ao detector (posição 5). No percurso até o detector essa amostra pode encontrar um ou mais reagentes através de pontos de confluência, sofrer reações em uma bobina reacional para então atingir o detector.

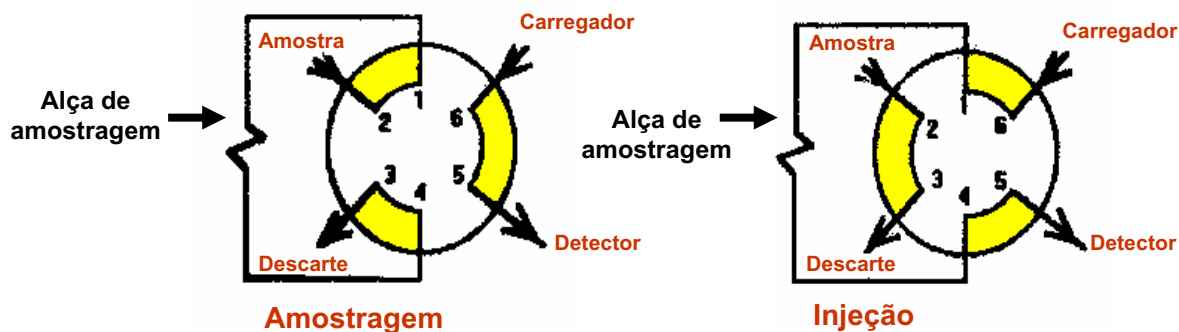


Figura 26. Diagrama esquemático para uma válvula de injeção em suas posições de amostragem e injeção.

VIII.2.2. Procedimento para o preparo das amostras

VIII.2.2.1. Comprimidos

Vinte comprimidos do mesmo lote para cada amostra comercial analisada foram pesados em balança analítica. Determinou-se o valor da massa média dos comprimidos com variação menor que 5%²³⁹. Os comprimidos foram subsequentemente pulverizados em gral de ágata até obtenção de um pó fino.

Uma porção de amostra pulverizada equivalente a 2,5 mg de dipirona foi exatamente pesada e submetida à agitação com 10 mL de água deionizada em agitador magnético por 5 minutos. Esta solução foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado até o menisco com água deionizada. Uma alíquota de 1,25 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25 mL. Na seqüência foram adicionados ao balão 5,00 mL de SDS 0,10 mol L⁻¹ e o volume completado com água deionizada até o menisco. Esta solução foi então analisada de acordo com o procedimento recomendado.

VIII.2.2.2. Solução oral

Alíquotas das amostras líquidas contendo o equivalente a 125,0 mg de dipirona sódica foram transferidas para balões volumétricos de 250 mL com auxílio de uma micropipeta e diluídas com água deionizada. Na seqüência 250,0 µL desta solução foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL, adicionaram-se 5,00

mL de SDS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e o volume completado com água deionizada até o menisco e analisada de acordo com o procedimento recomendado.

VIII.2.3 Estudo de interferentes

Os excipientes comumente encontrados nas formulações farmacêuticas foram cuidadosamente estudados visando avaliar possíveis interferências que os mesmos poderiam causar sobre o valor de reflectância medido.

Os excipientes analisados foram os mesmos descritos item VII. Neste estudo, soluções individuais contendo dipirona sódica com concentração final de $1,45 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ juntamente com o excipiente presente em concentração igual e dez vezes maior à concentração de dipirona sódica (em massa) foram submetidas à agitação magnética por 10 minutos em aproximadamente 5 mL de água deionizada. As soluções foram filtradas em papel de filtro quantitativo Whatman n^o 41, quantitativamente transferidas para balões volumétricos de 25 mL e diluídas com água deionizada e analisadas de acordo com o procedimento descrito para a construção da curva analítica.

VIII.2.4. Estudos de adição e recuperação

Estudo de adição e recuperação de fármaco padrão foi realizado com o objetivo de avaliar efeitos de matriz (formulação farmacêutica) nas análises. Para tanto, quantidades conhecidas (1,00; 2,00; 3,00 e 4,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ equivalente a $2,93 \times 10^{-6}$; $5,85 \times 10^{-6}$, $8,79 \times 10^{-6}$ e $1,17 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) de dipirona sódica foram adicionadas em quatro amostras previamente analisadas contendo o equivalente a $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($5,85 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) de dipirona sódica. As quantidades do fármaco padrão adicionadas corresponderam a 50, 100, 150 e 200% da quantidade presente na amostra. A análise foi realizada como descrito no procedimento para construção da curva analítica.

VIII.3 Resultados e Discussão

VIII.3.1. Testes preliminares

Experimentos preliminares realizados em nosso laboratório demonstraram a formação de um produto colorido (vermelho-laranja) após a reação da dipirona sódica com *p*-DAC, em meio de ácido diluído.

As aminas, devido o par de elétrons isolados do nitrogênio, são excelentes doadores de elétrons e podem, dessa maneira, interagir fortemente com espécies receptoras de elétrons. O produto da hidrólise da dipirona, possuindo um grupo amino aromático, reage instantaneamente com o *p*-DAC, o qual é utilizado com frequência para determinação de aminas aromáticas ou alifáticas²⁴⁰. A reação entre aminas e *p*-DAC envolve a condensação do grupo amino protonado, com o grupo carbonila do reagente (*p*-DAC) produzindo um sal imínio^{240,241} como ilustrado no Figura 19.

É conhecido que meios micelares são capazes de mudar o equilíbrio, a cinética e as propriedades espectrais, e estes meios organizados têm sido usados para melhorar as características dos procedimentos analíticos²⁴³. O efeito catalítico de surfactantes em reações de condensação de aldeídos, tais como *p*-DAC, com aminas tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores^{240,241,243}.

No presente estudo o efeito de dodecil sulfato de sódio (SDS - surfactante catiônico) no desenvolvimento da reação entre dipirona sódica e *p*-DAC em meio de ácido clorídrico diluído foi investigado.

VIII.3.2 Verificação do efeito da presença de SDS sobre a reação proposta

VIII.3.2.1 Espectro de absorção e sensibilidade

Inicialmente, foram realizados alguns testes para verificar se a reação entre dipirona e *p*-DAC, em meio ácido é influenciada pela adição de SDS ao meio reacional. Para tanto, as soluções de reagentes foram adicionadas em balões volumétricos de 5 mL de acordo com a Tabela 22. O volume dos balões volumétricos foi completado com água deionizada até o menisco

Tabela 22. Verificação do efeito da presença de SDS sobre a reação colorimétrica proposta para o desenvolvimento do procedimento de FIA para determinação de dipirona.

| Balão | Dipirona ^a (mL) | p-DAC/HCl ^b (mL) | SDS ^c (mL) | A _{510nm} |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------|
| 1a | 0,250 | 1,50 | 0,850 | 0,42884 |
| 1b ^d | ----- | 1,50 | 0,850 | ----- |
| 2 ^a | 0,250 | 1,50 | ---- | 0,08166 |
| 2b ^d | ----- | 1,50 | ---- | ----- |

^a Dipirona $2,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$;

^b p-DAC 0,18 % (m/v) preparado em HCl 0,4 % (v/v);

^c SDS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$;

^d Brancos analíticos

Após a realização dos testes pode-se verificar que a reação em presença de SDS ocorreu instantaneamente após a adição dos reagentes, resultando na formação de um produto de coloração intensa, vermelho-laranja. Entretanto, para o mesmo nível de concentração de dipirona testada ($1,45 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ após diluição), a coloração da solução foi visivelmente menos intensa quando não foi adicionado SDS ao meio reacional.

Na Figura 27 estão representados os espectros de absorção para os produtos formados na presença e ausência de SDS.

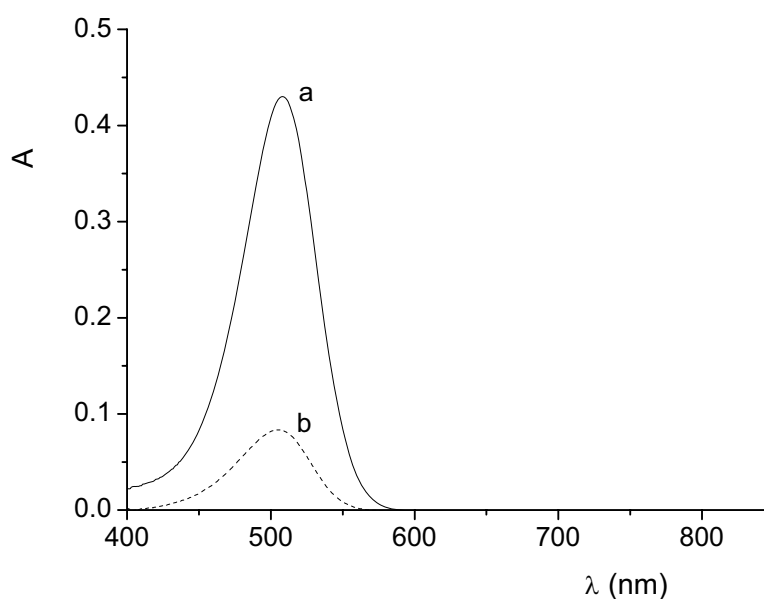


Figura 27. Espectro de absorção do produto colorido formado. **a:** com adição de SDS; **b:** sem adição de SDS.

A partir da análise da Figura 27 é evidente o aumento significativo na sensibilidade da reação quando foi utilizado meio micelar (SDS). Nesta condição uma absorvância de 0,42884 foi obtida em 510 nm, enquanto que uma absorvância de 0,08166 foi obtida no meio reacional em que não foi adicionado SDS. Estes valores indicam um aumento de 5,25 vezes na sensibilidade analítica, utilizando-se meio micelar (SDS) para o desenvolvimento da reação.

VIII.3.3. Otimização das condições experimentais

VIII.3.3.1. Definição da configuração para o sistema em fluxo

Experimentos preliminares foram realizados para testar a configuração do sistema de FIA e aproximar os intervalos a serem estudados para as variáveis selecionadas neste estudo. A resposta analisada foi a magnitude de absorvância em 510 nm. Também foram monitoradas a estabilidade da linha base, a forma do pico resultante e a frequência analítica.

Os melhores resultados foram obtidos quando a amostra (dipirona sódica $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) é selecionada pela alça de amostragem e injetada através da válvula de injeção no fluxo transportador de SDS ($1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) confluindo com o fluxo do reagente (*p*-DAC 0,040% (m/v) preparado em HCl $1,20 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) no ponto de confluência. As concentrações dos reagentes foram aquelas utilizadas antes da otimização das mesmas. Adotando esta configuração houve uma melhora no desempenho analítico do sistema com a redução do consumo de reagente. Esta configuração deixa evidente que a cinética da reação proposta é rápida. A Figura 24 apresenta a configuração do sistema em fluxo adotado nos estudos de otimização.

Neste estudo, o volume de amostra foi variado adotando alças de amostragem de comprimentos diferentes. Em estudos preliminares foi observado que os melhores resultados eram obtidos quando o fluxo da solução transportadora era maior que o fluxo do canal que transportava a solução reagente. Desta forma, para simplificar o estudo do efeito da vazão transportadora sobre a magnitude da absorvância optou-se pela variação na rotação da bomba.

Para propulsão das soluções transportadora e reagente utilizou-se tubos de Tygon com diâmetro interno de 2,06 mm e 1,42, respectivamente. Desta forma, pela variação na velocidade da bomba foi possível variar a vazão total do sistema, mantendo-se a razão constante entre as vazões das soluções transportadora e reagente.

Após definida a configuração para o sistema em fluxo a otimização dos parâmetros em fluxo e das variáveis químicas foram investigados separadamente para facilitar a execução dos experimentos.

O procedimento de otimização foi realizado utilizando-se dois tipos de planejamento de experimentos: um planejamento fatorial para definição das variáveis mais significativas, e o planejamento composto central para a obtenção da superfície de resposta onde uma condição experimental ótima para a realização dos experimentos pode ser determinada.

VIII.3.3.2. Otimização das variáveis do sistema de FIA

Para a otimização do procedimento proposto, as variáveis do sistema em fluxo (velocidade da bomba, volume de amostra e comprimento da bobina) foram inicialmente avaliadas através de um planejamento fatorial completo 2^3 . Neste estudo as concentrações dos reagentes envolvidos e de dipirona foram mantidas constantes, como segue: *p*-DAC 0,04 % m/v, HCl $1,20 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, SDS 0,01 mol L⁻¹ e dipirona $2,90 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Estas concentrações foram selecionadas com base em testes iniciais realizados em nosso laboratório.

Este planejamento envolveu a execução de oito experimentos os quais foram realizados de forma aleatória e em triplicata. Na Tabela 23 são listadas as variáveis examinadas em seus respectivos níveis (reais e codificados), juntamente com os resultados obtidos.

Tabela 23. Matriz experimental do planejamento fatorial 2^3 para triagem das variáveis físicas do sistema de FIA desenvolvido para determinação de dipirona.

| Ensaio | Vazão total (mL min ⁻¹) | Volume de Amostra (µL) | Bobina (cm) | Fator A | Fator B | Fator C | A _{510nm} ^a |
|--------|--|---------------------------|----------------|------------|------------|------------|-----------------------------------|
| 1 | 5,00 | 125,0 | 50 | -1 | -1 | -1 | 0,13855 ± 2,00 x 10 ⁻³ |
| 2 | 6,25 | 125,0 | 50 | +1 | -1 | -1 | 0,12479 ± 1,21 x 10 ⁻³ |
| 3 | 5,00 | 375,0 | 50 | -1 | +1 | -1 | 0,24567 ± 4,89 x 10 ⁻³ |
| 4 | 6,25 | 375,0 | 50 | +1 | +1 | -1 | 0,20789 ± 1,87 x 10 ⁻³ |
| 5 | 5,00 | 125,0 | 100 | -1 | -1 | +1 | 0,17453 ± 1,17 x 10 ⁻³ |
| 6 | 6,25 | 125,0 | 100 | +1 | -1 | +1 | 0,16364 ± 2,86 x 10 ⁻³ |
| 7 | 5,00 | 375,0 | 100 | -1 | +1 | +1 | 0,29099 ± 1,79 x 10 ⁻³ |
| 8 | 6,25 | 375,0 | 100 | +1 | +1 | +1 | 0,26247 ± 0,74 x 10 ⁻³ |

^a Média ± Desvio padrão de três medidas.

A Figura 28 representa os efeitos estimados das variáveis investigadas a partir dos resultados apresentados na Tabela 23. Os resultados mostrados no gráfico de Pareto evidenciam que o volume de amostra apresenta um efeito positivo com maior importância sobre a magnitude de absorvância. Os efeitos individuais, velocidade da bomba e comprimento da bobina também são significantes, porém menos importantes. Os efeitos de interação: vazão total do sistema-volume de amostra e vazão total do sistema-comprimento da bobina e volume de amostra-comprimento da bobina são significantes, porém, com menor importância estatística.

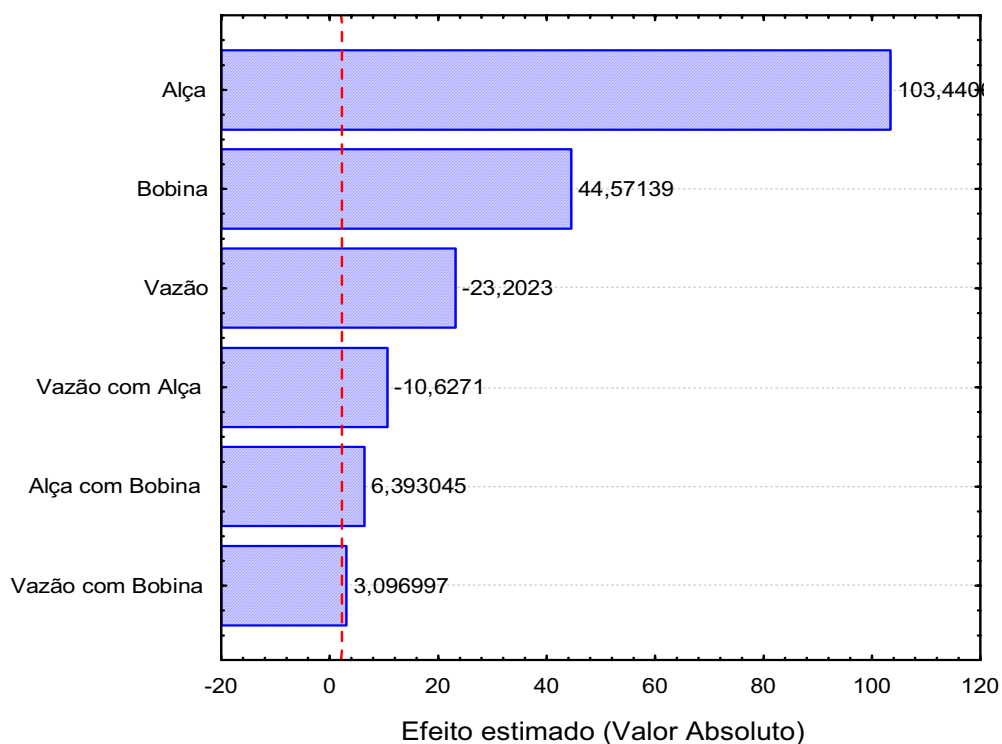


Figura 28. Gráfico dos efeitos principais e de interação estimados para as variáveis estudadas.

Como a vazão total do sistema não tem um efeito de grande importância sobre a sensibilidade analítica (magnitude de absorvância), a mesma foi fixada em $5,00 \text{ mL min}^{-1}$, produzindo um sinal transiente bem definido, um consumo de reagente adequado, uma ótima frequência analítica e excelente sensibilidade.

Para continuação do processo de otimização, um planejamento composto central foi realizado para investigar os efeitos das variáveis: volume de amostra e comprimento da bobina, sobre a magnitude de absorvância medida em 510 nm. A matriz experimental com os níveis das variáveis estudadas (reais e codificados) e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 24. Para cada variável (ξ_i) o valor codificado x_i foi determinado de acordo com a Eq. (6)²³⁴ e os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Statistica.

Tabela 24. Matriz experimental do planejamento composto central para otimização das variáveis físicas do sistema de FIA desenvolvido para a determinação de dipirona, juntamente com os resultados experimentais obtidos.

| Ensaio | Variáveis em seus níveis reais | | Variáveis em seus níveis codificadas | | A _{510nm} |
|----------------|-------------------------------------|-------------|--------------------------------------|---------|--------------------|
| | Volume de Amostra (μL) ^a | Bobina (cm) | Fator A | Fator B | |
| 1 | 792,0 | 214,5 | -1 | -1 | 0,48309 |
| 2 | 968,0 | 214,5 | +1 | -1 | 0,48735 |
| 3 | 792,0 | 285,5 | -1 | +1 | 0,48951 |
| 4 | 968,0 | 285,5 | +1 | +1 | 0,48233 |
| 5 ^a | 880,0 | 250,0 | 0 | 0 | 0,50975 |
| 6 ^a | 880,0 | 250,0 | 0 | 0 | 0,50367 |
| 7 ^a | 880,0 | 250,0 | 0 | 0 | 0,50767 |
| 8 ^a | 880,0 | 250,0 | 0 | 0 | 0,50674 |
| 9 | 704,0 | 250,0 | -1,41 | 0 | 0,44946 |
| 10 | 1006,0 | 250,0 | +1,41 | 0 | 0,47419 |
| 11 | 880,0 | 200,0 | 0 | -1,41 | 0,49052 |
| 12 | 880,0 | 300,0 | 0 | +1,41 | 0,49519 |

^a Volume calculado pela fórmula: $V = \pi r^2 L$ (onde $r = 0,04$ cm e L comprimento das alças confeccionadas com tubos de PTFE em cm)

Os resultados obtidos a partir deste planejamento (Tabela 24) foram ajustados a um modelo matemático quadrático descrito pela Eq. 8, utilizando o programa Statistica, versão 6.0.

$$Z = -1,52 + 3,60 \times 10^{-3} x - 1,92 \times 10^{-6} x^2 + 3,57 \times 10^{-3} y - 5,48 \times 10^{-6} y^2 - 9,16 \times 10^{-7} xy \quad (\text{Eq. 8})$$

A Eq. 8 inclui os termos lineares (x e y) e quadráticos (x^2 e y^2) bem como o produto dos pares dos efeitos lineares (xy). Nesta equação, Z representa a absorbância em 510 nm, e as variáveis x e y são: volume de amostra e comprimento da bobina, respectivamente.

A superfície de resposta e a curva de nível correspondente ao modelo ajustado foram construídas e estão mostradas na Figura 29.

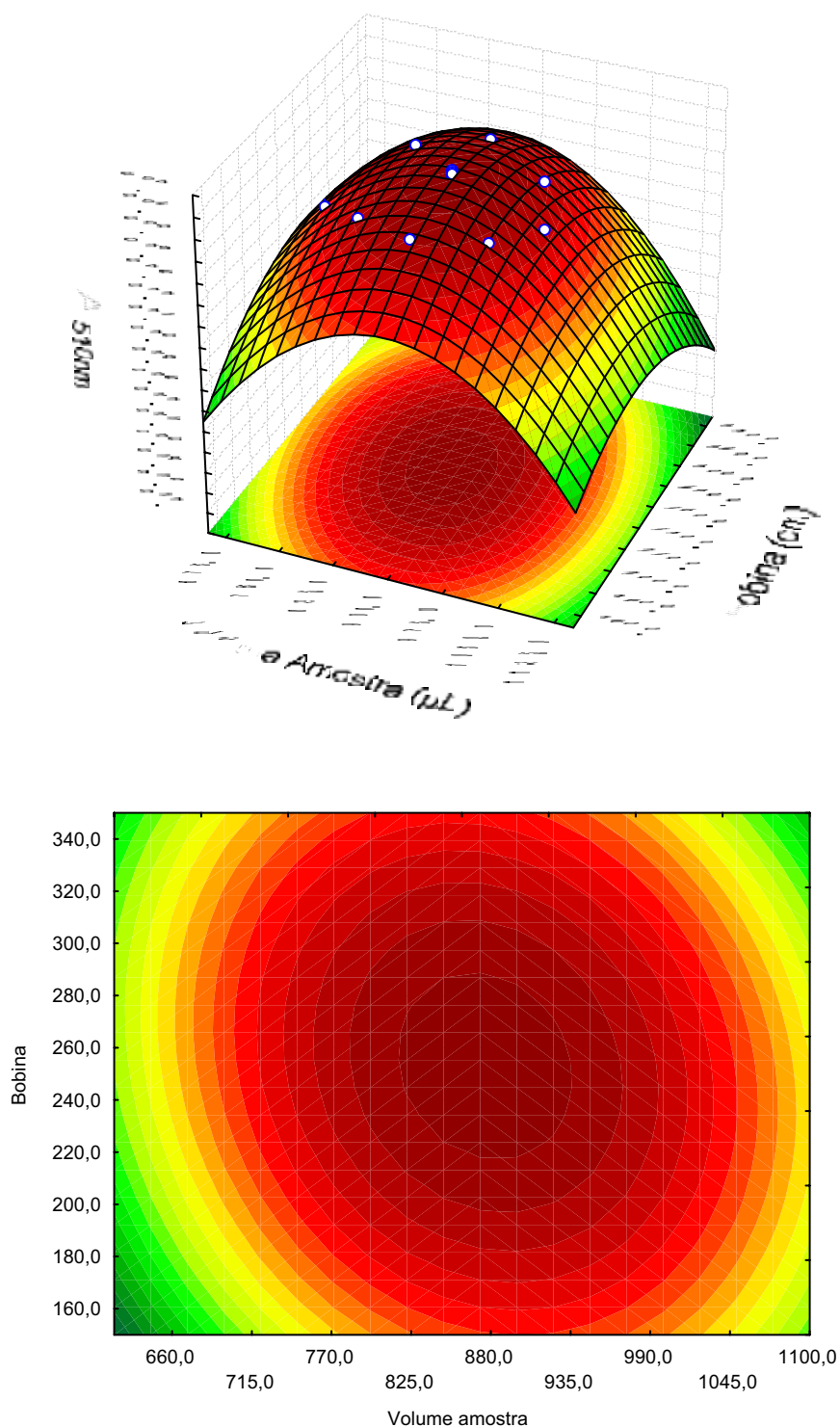


Figura 29. (a) Superfície de resposta otimizada com a sua respectiva curva de nível (b) para a leitura de absorbância em 510 nm em função das variáveis independentes: Volume de amostra e comprimento da bobina reacional. A concentração final de dipirona sódica foi mantida constante ($2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em todos os experimentos.

A análise da Figura 29 indica que dentro do intervalo em que as variáveis independentes foram avaliadas, o valor da variável dependente passa por uma região de máximo, situada na área mais escura do gráfico, a qual representa a condição experimental ótima para a realização da reação proposta. Na curva de nível (Figura 28b) a identificação desta região pode ser feita de forma mais clara. De acordo com estes resultados os maiores valores de absorvância são obtidos quando o volume de amostra é 876 μL e o comprimento da bobina é de 253 cm. Por praticidade, os valores adotados como ótimos foram: volume de amostra de 880 μL (condição de volume infinito) e bobina de 250 cm.

A análise variância (ANOVA) foi realizada no planejamento composto central para verificação da significância do modelo matemático que expressa a relação da resposta (medida de absorvância em 510 nm) com os efeitos dos fatores que a influenciam. Neste estudo verificou-se que o modelo ajustado aos dados experimentais obtidos para o planejamento composto central é capaz de prever com uma confiabilidade de 99,2 % o comportamento da variável dependente ($A_{510\text{nm}}$) frente as variáveis independentes estudadas (Volume de amostra e comprimento da bobina).

Foram realizados experimentos em replicata ($n = 4$) nas condições experimentais estabelecidas, para verificação da concordância entre o resultado obtido experimentalmente com àquele predito pela equação gerada pelo programa Statistica (Eq. 8). Observou-se que o resultado predito pelo modelo matemático (0,50702) para a medida de absorvância nas condições ótimas, concorda com àqueles obtidos experimentalmente [$0,49686 \pm 4,17 \times 10^{-3}$ (R.S.D = 0,84 %)], a um nível de confiança de 95%.

VIII.3.3.1 Otimização das condições químicas

As variáveis químicas que afetam o desenvolvimento da reação entre dipirona e *p*-DAC em meio micelar e de ácido clorídrico diluído foram inicialmente estudadas através de um planejamento fatorial completo 2^3 com o objetivo de realizar uma triagem das variáveis e definir quais eram significativas ou não. Para cada variável dois níveis foram estipulados, um superior (+1) e outro inferior (-1). Para este planejamento foram necessários oito experimentos executados de forma aleatória e

em triplicata. Em todos os experimentos a concentração final de dipirona foi mantida fixa em $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A matriz experimental para as variáveis experimentais avaliadas com os respectivos níveis examinados e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 25.

Tabela 25. Matriz experimental para o planejamento fatorial 2^3 executado para triagem das variáveis químicas do sistema de FIA desenvolvido para determinação de dipirona.

| Ensaio | Variáveis em seus níveis reais | | | Variáveis codificadas | | | $A_{510 \text{ nm}}$ |
|--------|--------------------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------|----|----|---------------------------------|
| | [SDS] mol L^{-1} | [p-DAC] % (m/v) | [HCl] mol L^{-1} | A | B | C | |
| 1 | $1,00 \times 10^{-2}$ | 0,045 | $1,90 \times 10^{-2}$ | -1 | -1 | -1 | $0,7891 \pm 4,2 \times 10^{-3}$ |
| 2 | $2,00 \times 10^{-2}$ | 0,045 | $1,90 \times 10^{-2}$ | +1 | -1 | -1 | $0,7896 \pm 4,9 \times 10^{-3}$ |
| 3 | $1,00 \times 10^{-2}$ | 0,050 | $1,90 \times 10^{-2}$ | -1 | +1 | -1 | $0,8577 \pm 2,7 \times 10^{-3}$ |
| 4 | $2,00 \times 10^{-2}$ | 0,050 | $1,90 \times 10^{-2}$ | +1 | +1 | -1 | $0,9049 \pm 3,1 \times 10^{-3}$ |
| 5 | $1,00 \times 10^{-2}$ | 0,045 | $2,04 \times 10^{-2}$ | -1 | -1 | +1 | $0,8246 \pm 3,6 \times 10^{-3}$ |
| 6 | $2,00 \times 10^{-2}$ | 0,045 | $2,04 \times 10^{-2}$ | +1 | -1 | +1 | $0,8268 \pm 3,5 \times 10^{-3}$ |
| 7 | $1,00 \times 10^{-2}$ | 0,050 | $2,04 \times 10^{-2}$ | -1 | +1 | +1 | $0,9076 \pm 1,1 \times 10^{-3}$ |
| 8 | $2,00 \times 10^{-2}$ | 0,050 | $2,04 \times 10^{-2}$ | +1 | +1 | +1 | $0,9089 \pm 6,2 \times 10^{-3}$ |

A Figura 30 (Gráfico de Pareto) representa os efeitos estimados (obtidos pelo tratamento estatístico dos resultados apresentados na Tabela 25 utilizando o programa Statistica).

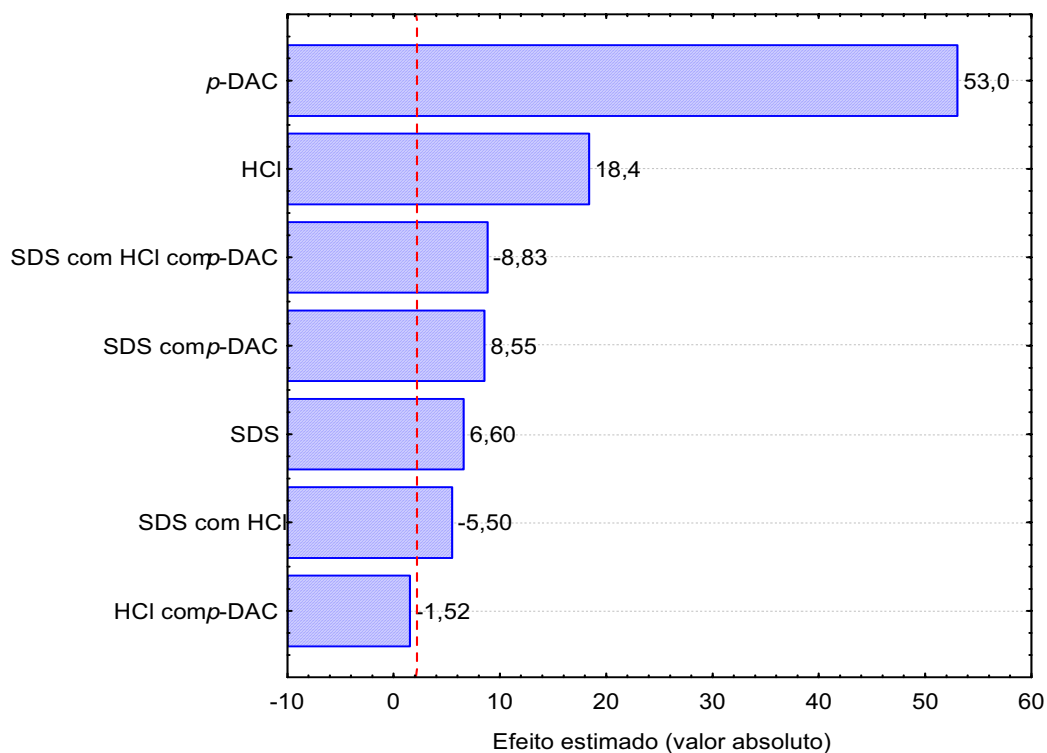


Figura 30. Gráfico dos efeitos principais e de interação estimados para as variáveis estudadas.

O gráfico de Pareto obtido indica que as concentrações de *p*-DAC e HCl são as variáveis mais significativas, com efeito de sinal positivo. A concentração de SDS e todos os efeitos de interação entre as variáveis são pouco influentes. Deste modo, maiores valores de absorvância deverão ser obtidos quando as concentrações de *p*-DAC e HCl forem aumentadas. A concentração de SDS pode ser ajustada no nível superior (+1) estudado ($2,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) uma vez que mostrou pouca influência sobre as leituras de absorvância. Vale lembrar que a concentração de SDS ($2,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) está acima do valor da concentração micelar crítica estabelecida para meio aquoso ($\text{cmc} = 8,10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)²⁴⁷.

Com base nos resultados obtidos no primeiro planejamento, foi dado prosseguimento no processo de otimização através da realização de um planejamento composto central. Para este planejamento a variação na absorvância foi investigada em função das variáveis (ξ_i): concentração de *p*-DAC e concentração de SDS. Os experimentos foram realizados de forma aleatória mantendo-se a concentração de dipirona final fixa em $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. As variáveis (ξ_i) consideradas com seus níveis examinados (reais e codificados) e a matrix

experimental com os resultados obtidos estão mostradas na Tabela 26. Para cada variável (ξ_i) o valor codificado x_i foi determinado de acordo com a Eq. (6)²³⁴ e utilizou-se o programa Statistica, para o tratamento dos resultados.

Tabela 26. Matriz experimental do planejamento composto central para otimização das variáveis químicas do sistema de FIA desenvolvido para a determinação de dipirona, juntamente com os resultados experimentais obtidos.

| Ensaio ^a | Variáveis em seus níveis reais | | Variáveis em seus níveis codificadas | | A _{510nm} |
|---------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------------------|---------|--------------------|
| | [HCl] mol L ⁻¹ | [p-DAC] % (w/v) | Fator A | Fator B | |
| 1 | 2,09 x 10 ⁻² | 0,051 | -1 | -1 | 0,90474 |
| 2 | 2,35 x 10 ⁻² | 0,051 | 1 | -1 | 0,89323 |
| 3 | 2,09 x 10 ⁻² | 0,055 | -1 | 1 | 0,91965 |
| 4 | 2,35 x 10 ⁻² | 0,055 | 1 | 1 | 0,93471 |
| 5 ^b | 2,22 x 10 ⁻² | 0,053 | 0 | 0 | 0,94621 |
| 6 ^b | 2,22 x 10 ⁻² | 0,053 | 0 | 0 | 0,94983 |
| 7 ^b | 2,22 x 10 ⁻² | 0,053 | 0 | 0 | 0,94715 |
| 8 ^b | 2,22 x 10 ⁻² | 0,053 | 0 | 0 | 0,94640 |
| 9 | 2,04 x 10 ⁻² | 0,053 | -1,41 | 0 | 0,92748 |
| 10 | 2,40 x 10 ⁻² | 0,053 | 1,41 | 0 | 0,90460 |
| 11 | 2,22 x 10 ⁻² | 0,050 | 0 | -1,41 | 0,91711 |
| 12 | 2,22 x 10 ⁻² | 0,056 | 0 | 1,41 | 0,93746 |

^a Experimentos realizados com a concentração de SDS mantida fixa em 2,00 x 10⁻² mol L⁻¹.

^b Ponto central executado em replicatas (n = 4)

Os resultados obtidos a partir deste planejamento (Tabela 26) foram ajustados a um modelo matemático quadrático descrito pela Eq. 9, utilizando o programa Statistica, versão 6.0. A superfície de resposta e a curva de nível correspondente ao modelo ajustado foram construídas e estão mostradas na Figura 31.

$$Z = 9,2144 + 42,727 x - 159,61 x^2 + 230,35 y - 2651,85 y^2 + 301,95 xy \quad (\text{Eq. 9})$$

A Eq. 9 inclui os termos lineares (x e y) e quadráticos (x^2 e y^2) bem como o produto dos pares dos efeitos lineares (xy). Nesta equação, Z representa a absorbância em 510 nm, e as variáveis x e y são: [HCl] e de [p-DAC], respectivamente.

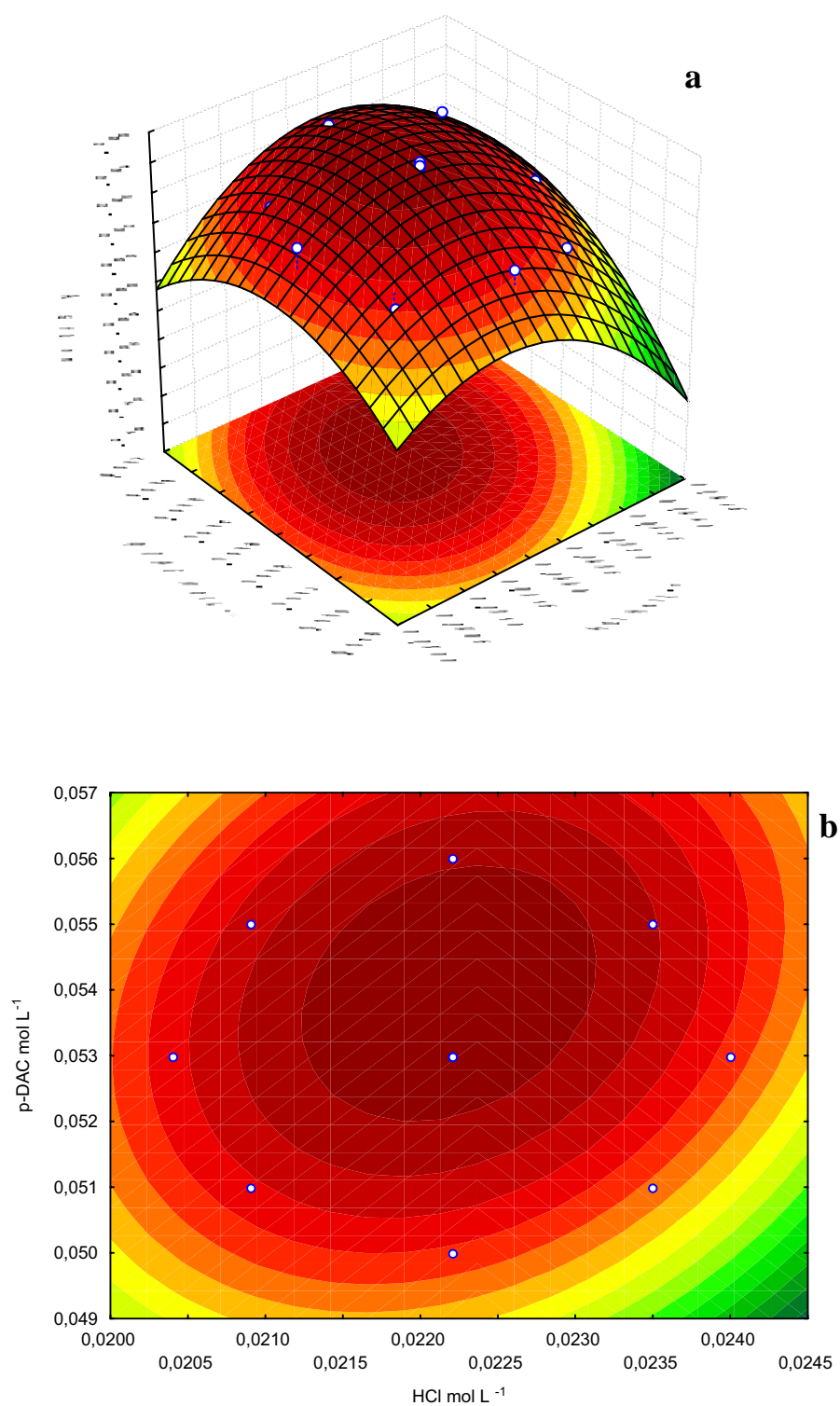


Figura 31. (a) Superfície de resposta otimizada com sua respectiva (b) curva de nível para a medida de absorbância ($\lambda = 510 \text{ nm}$) em função das variáveis independentes: [HCl] e [p-DAC]. A concentração final de dipirona sódica foi mantida constante ($2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em todos os experimentos.

A análise da Figura 31 indica que dentro do intervalo em que as variáveis independentes foram avaliadas, o valor da variável dependente passa por uma região de máximo, situada na área mais escura do gráfico, a qual representa a condição experimental ótima para a realização da reação proposta. Na curva de nível (Figura 30b) a identificação desta região pode ser feita de forma mais clara. De acordo com estes resultados os maiores valores de absorvância são obtidos quando a concentração de HCl é $2,22 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e de *p*-DAC 0,054% (m/v).

Foram realizados experimentos em replicata ($n = 4$) nas condições experimentais determinadas pelo modelo matemático, para verificação da concordância entre o resultado obtido experimentalmente com àquele predito pela equação gerada pelo programa Statistica (Eq. 9). Observou-se que o resultado predito pelo modelo matemático (0,9498) para a leitura de absorvância nas condições otimizadas, concorda com àqueles obtidos experimentalmente [$0,9390 \pm 4,4 \times 10^{-3}$ (R.S.D = 0,46 %)], a um nível de confiança de 95%.

A análise variância (ANOVA) foi realizada para o planejamento composto central para verificação da significância do modelo matemático que expressa a relação da resposta (medida de absorvância em 510 nm) com os efeitos dos fatores que a influenciam. Neste estudo verificou-se que o modelo ajustado aos dados experimentais obtidos para o planejamento composto central é capaz de prever com uma confiabilidade de 89,5 % o comportamento da variável dependente ($A_{510\text{nm}}$) frente as variáveis independentes estudadas (Concentrações de HCl e de *p*-DAC).

VIII.3.4 Verificação da linearidade

Após a otimização das condições experimentais verificou-se a faixa de trabalho onde uma relação linear entre o valor de absorvância e a concentração de dipirona sódica era obtida. Na Figura 32 é mostrado o fiograma obtido para a verificação da linearidade com os resultados apresentados na Tabela 27.

Tabela 27. Valores de absorvância obtidos para a construção da curva analítica para o procedimento em fluxo para determinação de dipirona.

| [dipirona] mol L ⁻¹ | A _{510 nm} ± SD ^a |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| 1,45 x 10 ⁻⁶ | 0,0383 ± 6,0 x 10 ⁻⁴ |
| 2,90 x 10 ⁻⁶ | 0,07597 ± 8,0 x 10 ⁻⁴ |
| 5,80 x 10 ⁻⁶ | 0,15023 ± 6,5 x 10 ⁻⁴ |
| 8,70 x 10 ⁻⁶ | 0,22579 ± 7,7 x 10 ⁻⁴ |
| 1,16 x 10 ⁻⁵ | 0,30175 ± 3,6 x 10 ⁻⁴ |
| 1,45 x 10 ⁻⁵ | 0,38176 ± 2,2 x 10 ⁻⁴ |
| 1,74 x 10 ⁻⁵ | 0,45767 ± 2,1 x 10 ⁻⁴ |
| 2,03 x 10 ⁻⁵ | 0,53419 ± 2,0 x 10 ⁻⁴ |
| 2,32 x 10 ⁻⁵ | 0,61107 ± 1,7 x 10 ⁻⁴ |
| 2,61 x 10 ⁻⁵ | 0,68991 ± 2,1 x 10 ⁻⁴ |
| 2,90 x 10 ⁻⁵ | 0,76515 ± 2,1 x 10 ⁻⁴ |

^a Média ± desvio padrão de 4 medidas.

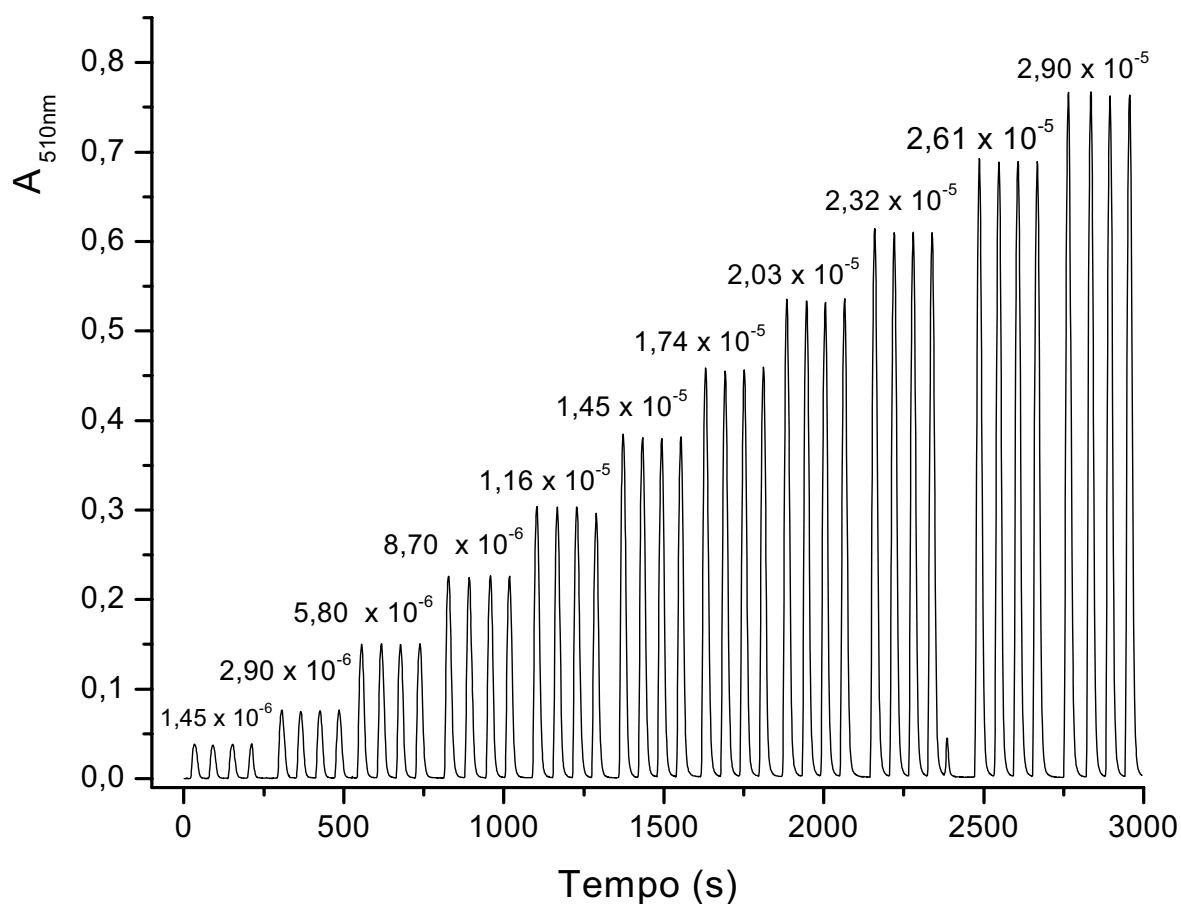


Figura 32. Diagrama da curva analítica. Sinais transientes obtidos na injeção de soluções padrão de dipirona sódica da esquerda para direita (1,45 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ - 2,90 x 10⁻⁵ mol L⁻¹). Cada ponto foi analisado com repetições (n = 4).

Construiu-se a curva analítica colocando em gráfico os valores de $A_{510\text{nm}}$ obtidos (Tabela 27) versus a concentração de dipirona sódica (Figura 33). Uma relação linear foi observada na faixa de concentração de $1,45 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ - $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (equivalente a 0,50 – 10 ppm). Os valores de absorvância medidos em 510 nm para a faixa de concentração de dipirona sódica foram ajustados pela equação de uma reta: $A_{510\text{nm}} = 0,0019 (\pm 0,001) + 2,754 \times 10^4 (\pm 81,1) \times C$, onde C é a concentração de dipirona sódica em mol L^{-1} . O coeficiente de correlação foi 0,9999, indicando uma excelente linearidade do sistema.

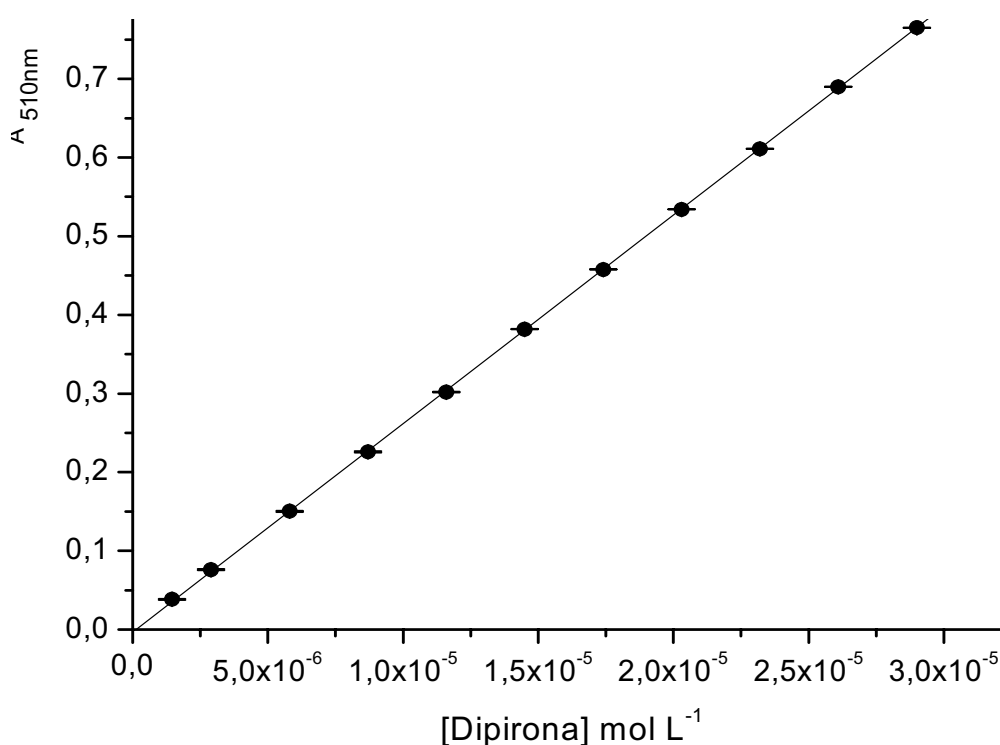


Figura 33. Curva analítica. Concentrações das soluções padrão de Dipirona sódica: $1,45 \times 10^{-6}$ a $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Cada ponto foi analisado com repetições ($n = 4$).

VIII.3.5 Aplicações analíticas

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de dipirona sódica em formulações farmacêuticas (comprimidos e solução oral) adquiridas em farmácias locais (Tabela 13). Os resultados obtidos pela aplicação do método proposto estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28. Determinação de dipirona em formulações farmacêuticas empregando o procedimento FIA desenvolvido.

| Amostras | Valor nominal | Método proposto | | | Método oficial ²³⁹ |
|--------------------------------|---------------|-------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | | Encontrado ^c | t valor (2,78) ^d | F valor (19,00) ^d | Encontrado ^c |
| <i>Comprimidos^a</i> | | | | | |
| A | 320 | 320,3 ± 1,8 | 0,17 | 1,78 | 320,0 ± 2,4 |
| B | 250 | 247,8 ± 1,5 | 1,98 | 3,36 | 244,5 ± 2,6 |
| C | 500 | 494,0 ± 1,4 | 0,19 | 2,94 | 494,3 ± 2,4 |
| D | 500 | 500,3 ± 4,1 | 0,30 | 1,00 | 500,9 ± 3,9 |
| E | 500 | 515,5 ± 5,5 | 0,59 | 3,36 | 517,7 ± 3,3 |
| F | 500 | 496,7 ± 2,5 | 0,28 | 1,96 | 497,4 ± 3,4 |
| <i>Soluções^b</i> | | | | | |
| G | 333 | 337,1 ± 4,9 | 0,07 | 6,25 | 337,3 ± 1,9 |
| H | 500 | 502,0 ± 1,7 | 1,39 | 5,44 | 499,3 ± 2,8 |

^a Dipirona sódica em mg comprimido⁻¹.

^b Dipirona sódica em mg mL⁻¹.

^c Média de três determinados ± desvio padrão.

^d Valor tabelado com um nível de confiança de 95 % com (n - 2) graus de liberdade.

VIII.3.6 Estudo de interferentes

O efeito de cada excipiente foi considerado como interferência quando o sinal de reflectância apresentou erro maior ou igual a 5% na determinação do fármaco²³⁹. A porcentagem de dipirona encontrada nas soluções adicionadas foi de 97 a 102% com coeficientes de variação menores que 3% para três repetições como indicam os resultados apresentados na Tabela 29. Assim, nenhuma interferência foi constatada a partir destes excipientes, sob as condições estudadas.

Tabela 29. Resultados obtidos no estudo de interferentes na aplicação do procedimento FIA proposto para determinação de dipirona sódica.

| Excipientes | Dipirona: excipiente ^a | | Dipirona: excipiente ^b | |
|------------------------------|-----------------------------------|--------|-----------------------------------|--------|
| | Rec. (%) ^c | R.S.D. | Rec. (%) ^c | R.S.D. |
| Estearato de magnésio | 97,3 ± 0,7 | 0,9 | 100,5 ± 0,9 | 0,1 |
| Amido | 99,5 ± 0,5 | 0,1 | 99,7 ± 1,0 | 1,2 |
| Talco | 99,6 ± 1,1 | 1,5 | 101,5 ± 0,5 | 0,9 |
| Sacarina sódica | 99,8 ± 1,0 | 2,0 | 102,0 ± 1,0 | 2,0 |
| Bissulfito de sódio | 98,0 ± 2,0 | 1,0 | 97,0 ± 1,2 | 2,0 |
| Sacarose | 100,5 ± 0,9 | 1,9 | 98,3 ± 0,9 | 2,3 |
| Lactose | 100,3 ± 0,8 | 1,9 | 98,9 ± 2,1 | 2,6 |
| Sorbitol | 99,5 ± 2,0 | 2,3 | 99,5 ± 2,6 | 2,8 |
| Cafeína | 100,2 ± 1,5 | 1,7 | 99,5 ± 1,9 | 1,8 |
| Aspirina | 99,7 ± 0,9 | 0,8 | 101,2 ± 0,9 | 0,6 |
| Ácido ascórbico | 99,6 ± 1,3 | 0,8 | 100,4 ± 0,8 | 1,8 |
| Acetaminofem | 102,0 ± 1,2 | 0,8 | 101,8 ± 0,9 | 0,5 |
| Fenacetina | 99,3 ± 1,1 | 0,7 | 98,3 ± 1,2 | 0,8 |
| Acetanilida | 100,4 ± 0,8 | 0,6 | 98,6 ± 1,3 | 0,9 |
| Oxifenbutazona | 101,3 ± 1,6 | 1,0 | 100,2 ± 1,6 | 1,2 |
| Cloridrato de prometazina | 99,7 ± 1,9 | 0,5 | 101,4 ± 1,9 | 1,4 |
| Cloridrato de adifenina | 99,0 ± 1,6 | 1,3 | 100,6 ± 0,7 | 0,8 |
| Brometo de butilescopolamina | 99,9 ± 0,8 | 1,5 | 101,4 ± 1,3 | 0,8 |
| Salicimida | 100,3 ± 0,3 | 0,5 | 100,9 ± 1,6 | 0,9 |
| Fenobarbital | 98,5 ± 0,9 | 0,6 | 99,9 ± 0,8 | 0,3 |
| Polivinilpirrolidona | 99,7 ± 1,7 | 2,1 | 101,9 ± 1,1 | 1,6 |
| Ácido cítrico | 100,5 ± 1,2 | 0,7 | 99,7 ± 1,2 | 2,2 |
| Benzoato de sódio | 97,0 ± 1,3 | 1,8 | 99,6 ± 2,4 | 1,4 |
| Metilcelulose | 99,8 ± 0,9 | 0,8 | 97,9 ± 2,1 | 0,1 |

^a Relação de massas para dipirona:excipiente 1:1

^b Relação de massas para dipirona:excipiente 1:10

^c Média de três determinados ± desvio padrão.

VIII.3.7. Validação do método em fluxo desenvolvido

Para validação^{223, 235-237,244} do método desenvolvido foram avaliados alguns parâmetros importantes, tais como: exatidão, precisão, limite de detecção²³⁵ ($LD=3 SD^{Br}/\text{inclinação da reta}$), limite de quantificação ($LQ=10 SD^{Br}/\text{inclinação da reta}$), recuperação e repetibilidade.

A precisão e exatidão do método proposto foram avaliadas através da aplicação dos testes F e t, respectivamente. Para tanto os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com àqueles obtidos pela aplicação do método recomendado pela Farmacopéia Brasileira²³⁹ (titulação iodométrica). Em todos os casos, os valores obtidos pelo método proposto mostraram-se em boa concordância com os obtidos pelo método oficial. Os valores de F e t calculados não excederam os valores tabelados, indicando desta forma a precisão e exatidão do método desenvolvido, com um nível de confiança de 95%. As porcentagens médias de recuperação foram de 98,8 – 103,1 % com desvio padrão relativo menor que 2,0% em todos os casos.

Para avaliação da precisão intradia foram realizadas análises em replicatas ($n = 10$) para soluções de uma mesma amostra contendo o equivalente a $1,45 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de dipirona e para estudo da precisão interdia foram executadas análises da amostra durante um período de 3 dias consecutivos. Os resultados obtidos, em termos de coeficiente de variação, foram de 0,7 % e 1,2 %, evidenciando a boa reprodutibilidade do método desenvolvido.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC²⁴⁴ e determinados como sendo de $1,31 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,40 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, indicando uma boa sensibilidade analítica do método desenvolvido.

A repetibilidade do método proposto foi avaliada para uma série de 10 determinações independentes em três níveis de concentração de uma amostra de dipirona (Figura 34). Os desvios padrão relativos (R.S.D.) encontrados foram de 1,4 %, 1,6 % e 0,2 % para a determinação de (A) $2,90 \times 10^{-6}$, (B) $5,80 \times 10^{-6}$ e (C) $1,45 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de dipirona, respectivamente.

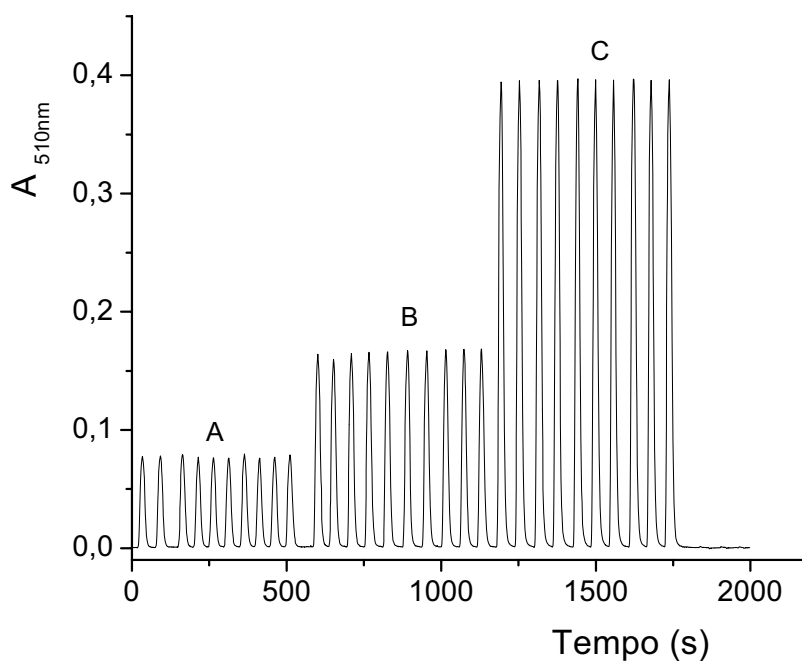


Figura 34. Diagrama para estudo da repetibilidade. Sinais transientes obtidos na injeção de soluções de amostra de dipirona sódica nas concentrações (A): $2,90 \times 10^{-6}$, (B): $5,80 \times 10^{-6}$ e (C): $1,45 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 10$).

VIII.3.7.1. Estudos de adição e recuperação

Estudos de recuperação foram realizados através do método da adição de padrão²³⁸. Neste estudo, quantidades conhecidas de dipirona sódica pura (padrão analítico) foram adicionadas a quatro amostras pré-analisadas (comprimidos e solução oral). De acordo com os resultados obtidos apresentados na Tabela 30, observa-se que as médias percentuais de recuperação de dipirona encontram-se entre 97,3 – 103,0 %, evidenciando novamente a boa exatidão do método proposto, além de mostrar que não há interferência de matriz.

Tabela 30. Resultados de recuperação de dipirona obtidos pelo método da adição de padrão no procedimento de FIA desenvolvido.

| Amostras | Dipirona adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Dipirona encontrada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Recuperação % |
|----------------|---|---|-------------------------|
| A ^a | ---- | 2,00 | |
| | 1,00 | 2,97 | 97,3 |
| | 2,00 | 4,05 | 102,5 |
| | 3,00 | 5,00 | 100,0 |
| | 4,00 | 6,02 | 100,5 |
| | | | $\mu^c = 100,1 \pm 2,1$ |
| B ^a | ---- | 1,99 | |
| | 1,00 | 2,97 | 98,0 |
| | 2,00 | 4,01 | 100,8 |
| | 3,00 | 4,98 | 99,5 |
| | 4,00 | 6,06 | 101,8 |
| | | | $\mu^c = 100,0 \pm 1,6$ |
| C ^b | ---- | 1,98 | |
| | 1,00 | 3,01 | 103,0 |
| | 2,00 | 4,00 | 100,8 |
| | 3,00 | 5,02 | 101,3 |
| | 4,00 | 5,95 | 99,3 |
| | | $\mu^c = 101,1 \pm 1,5$ | |
| D ^b | ---- | 2,01 | |
| | 1,00 | 3,00 | 99,0 |
| | 2,00 | 4,01 | 100,0 |
| | 3,00 | 5,00 | 99,7 |
| | 4,00 | 6,00 | 99,8 |
| | | $\mu^c = 99,6 \pm 0,4$ | |

^a Soluções;

^b Comprimidos;

^c Média \pm desvio padrão (SD) de 3 análises independentes.

VIII.4. Conclusões

A sensibilidade da reação entre dipirona e *p*-DAC em meio de ácido diluído foi aumentada aproximadamente 5,6 vezes na presença de SDS e este efeito foi utilizado no desenvolvimento de um procedimento de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica muito sensível ($LD = 1.31 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) para a determinação de dipirona.

O método proposto apresenta como vantagens a simplicidade, alta frequência analítica (72 amostras h^{-1}), alta sensibilidade e repetibilidade, uma baixa quantidade de resíduos é gerada e não envolve específicos ou complexos procedimentos de pré-tratamento das amostras.

A aplicação do método para a determinação de dipirona em formulações farmacêuticas (comprimidos e solução oral) foi realizada com sucesso, demonstrando seu potencial uso como uma alternativa vantajosa em relação aos métodos reportados na literatura. Na Tabela 31 estão sumarizadas as principais figuras de mérito para o método proposto.

Tabela 31. Principais figuras de mérito para o método em fluxo desenvolvido para determinação de dipirona sódica.

| PARÂMETRO | |
|---|--|
| Volume de injeção (amostra) | 880 μL |
| Bobina reacional | 250 cm |
| Reagente: <i>p</i> -DAC/HCl | 0,054 % (m/v) em $2,20 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ Fluxo de $1,70 \text{ mL min}^{-1}$ |
| Carregador | SDS $2,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ Fluxo de $3,30 \text{ mL min}^{-1}$ |
| Linearidade | $1,45 \times 10^{-6}$ a $2,90 \times 10^{-5} \text{ M}$ |
| Equação da reta | $y = 1,90 \times 10^{-3} + 2,75 \times 10^4 x$ |
| Coef. de correlação (r) | 0,9999 |
| Frequência Analítica | $72 \text{ amostras hora}^{-1}$ |
| λ nm | 510 |
| LD | $1,31 \times 10^{-7} \text{ M}$ |
| LQ | $4,40 \times 10^{-7} \text{ M}$ |
| Precisão interdia ($1,45 \times 10^{-5} \text{ M}$) | 1,2% (3 dias) |
| Precisão intradia ($1,45 \times 10^{-5} \text{ M}$) | 0,7% (10 repetições) |

Capítulo IX. Desenvolvimento de procedimento de
"screening" de Sulfonamidas em leite e águas
superficiais e aplicação como método quantitativo na
análise de formulações farmacêuticas e urina

IX.1. Parte experimental

IX.1.1 Materiais

As medidas de volume foram efetuadas com buretas classe A e micropipetas “Brand” e “Eppendorf” (10 – 100 μL e 100-1000 μL). A vidraria utilizada no preparo das soluções foi de grau A. Tubos de centrifuga de 15 mL de polipropileno estéril com rosca (Corning, EUA) foram utilizados no preparo das amostras. Membranas de nylon de 0,45 μm (millipore) foram utilizadas para filtrar a fase móvel para o método CLAE e para filtração das amostras de águas superficiais analisadas.

Para o sistema em fluxo Tubos de Tygon[®] foram utilizados para a propulsão das soluções. Para a confecção das alças de amostragem, bobinas reacionais e linhas de condução das soluções tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno foram utilizados. Uma conexão em acrílico foi empregada para confluência das soluções.

Para o procedimento de extração em fase sólida foram utilizados cartuchos de C-18 (500 mg - Varian) e Strata-X (60 mg/3mL - Phenomenex, EUA). Para realização da etapa de EFS no modo *on-line* os cartuchos foram abertos e o material adsorvente separado e empregado na construção de minicolunas.

IX.1.2. Equipamentos

IX.1.2.1. Equipamento de uso geral

As pesagens realizadas em balança analítica AG204, Mettler Toledo. Para solubilização dos reagentes foram utilizados agitadores magnéticos. Banho de ultrassom Thorton foi utilizado no preparo da fase móvel para o sistema CLAE. pHmetro Micronal B-222 foi utilizado nas medidas de pH. Centrífuga Excelsa Baby, modelo 208 N foi utilizada no preparo das amostras de urina e leite bovino.

IX.1.2.2. Sistema de análise por injeção em fluxo

Para o desenvolvimento do procedimento de análise por injeção em fluxo foi utilizado o sistema de análise modular ASIA da Ismatec (Zurique, Suíça) (Figura 24)

equipado com: bomba peristáltica de quatro canais, Ismatec modelo IS 7610 com rotação variável (1 - 50 rpm) para a propulsão das soluções e uma válvula de injeção (6 canais, IS 7630, Rheodyne 5041, EUA) para a injeção das soluções de sulfonamidas e amostras na qual foi inserida a alça de amostragem.

Para o sistema FIA acoplado ao procedimento de extração em fase sólida (EFS) um injetor comutador confeccionado em acrílico foi utilizado para a etapa de EFS (retenção dos analitos, limpeza e eluição).

A detecção foi realizada pelo acoplamento, através de uma interface RS232, a um espectrofotômetro de arranjo de diodos UV-Vis HP 8453A (Hewlett Packard, EUA). As medidas de absorbância foram efetuadas em cubeta de fluxo, com caminho ótico de 1,00 cm e volume interno de 80 μ l, Hewlett Packard (Hewlett Packard, EUA).

IX.1.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

Para a execução das análises quantitativas das amostras previamente analisadas no sistema de screening utilizou-se o método de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em 263 nm, descrito na literatura¹⁴. O sistema utilizado consiste de um cromatógrafo líquido Shimadzu SPD-10A (Shimadzu Seisakusko Kyoto, Japan) equipado com uma bomba LC-10AS Shimadzu, com detector UV-visível (SDR-10A, Shimadzu), e um injetor automático de 20 μ L Rheodyne. Foi utilizada uma coluna analítica de C-18 Microsorb-MVTM 100 Å (250 x 4,6 mm i.d.; Varian, EUA) e pré-coluna C-18 com tamanho de partícula de 5 μ m (2,0 x 4,6 mm i.d.).

A fase móvel utilizada no método CLAE foi uma mistura de metanol:solução aquosa de tampão acetato 0,05 mol L⁻¹ (pH = 3,6) na proporção de 20:80 (v/v) contendo 1% de ácido acético (v/v), bombeada a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹. A área dos picos foi medida em um integrador Shimadzu C-R6A Chromatopac.

IX.1.3. Reagentes e soluções

Para a preparação das soluções foi utilizada água destilada e purificada em sistema Milli-Q Gradiente (Millipore, Bedford, EUA) ($18,2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Todos os reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram de grau analítico e encontram-se listados abaixo.

- *p*-Dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC) (98%, p.a., Aldrich, Milwaukee, EUA);
- HCl 37%(Mallinckrodt, Xalostoc, México);
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) (99,9%, Sigma, St. Louis, EUA),
- Ácido acético glacial 99% (Mallinckrodt, Xalostoc, México);
- Acetato de sódio (99,9%, Fisher, New Jersey, EUA);
- NaOH (98%, Synth, São Paulo, Brasil);
- KCl (99,0 %, Synth, São Paulo, Brasil);
- Metanol, Acetonitrila e Acetato de etila (grau cromatográfico, Mallinckrodt, Xalostoc, México).

As sulfonamidas utilizadas neste trabalho foram adquiridas da Henrifarma, São Paulo, Brasil todas com teor de pureza igual ou superior a 99,5%: Sulfatiazol; Sulfanilamida; Sulfametoxipiridazina; Sulfametoxazol; Sulfametazina sódica; Sulfamezarina e Sulfacetamida sódica. As estruturas químicas destas sulfonamidas estão mostradas na Figura 35.

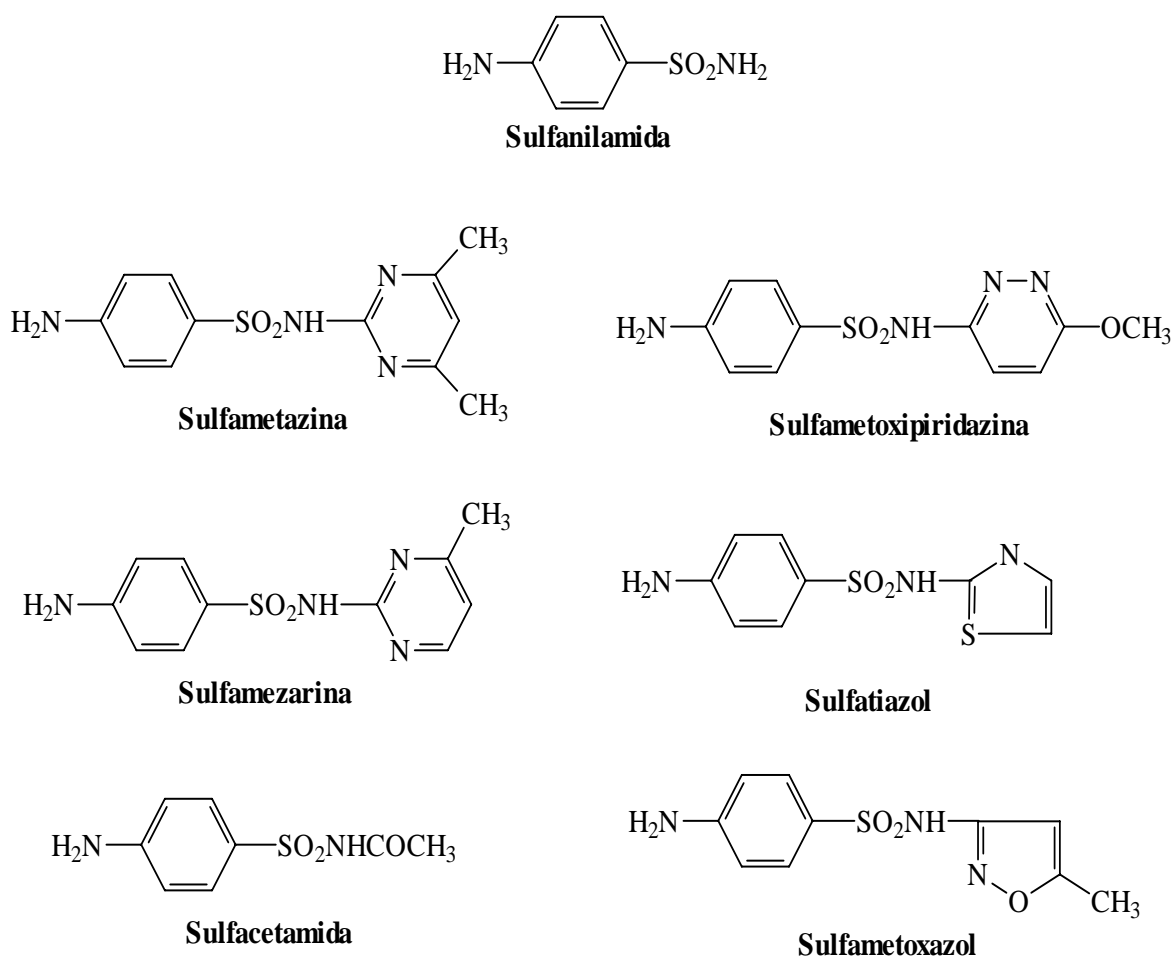


Figura 35. Estrutura química das sulfonamidas estudadas neste trabalho.

As soluções utilizadas neste trabalho foram:

a) Soluções de sulfonamidas de trabalho: Foram preparadas semanalmente soluções estoque $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, pela dissolução de $12,5 \text{ mg}$ de cada sulfonamida com 15 mL de $\text{HCl } 1,20 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ e quantitativamente transferidas para balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água deionizada até a marca. Estas soluções foram acondicionadas em vidros de cor âmbar na geladeira. Soluções padrão foram preparadas a partir de diluições adequadas das soluções estoque com água deionizada e utilizadas na construção das curvas analíticas ($0,050$ a $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o sistema de screening e $0,010$ a $0,170 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o método de CLAE).

Soluções contendo misturas das sulfonamidas em cinco níveis de concentração final (50; 75; 100; 150 e 200 ng mL⁻¹) foram preparadas através de adequada diluição das soluções estoques de modo a obter as concentrações mostradas nas Tabelas 1-5 (Anexo 4). Estas soluções foram utilizadas no estudo da aplicabilidade do método de “*screening*” desenvolvido.

b) Solução estoque de HCl 2,0 mol L⁻¹: foi preparada através da conveniente diluição do HCl concentrado (37,0% m/v) com água deionizada e adequadamente padronizada²⁴². Soluções de trabalho foram preparadas por diluição com água deionizada.

c) Solução de *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC) 0,013 % (m/v): foi preparada pela dissolução de 13,3 mg de *p*-DAC em HCl 3,70 x 10⁻² mol L⁻¹ em balão volumétrico de 100 mL.

d) Solução estoque de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,10 mol L⁻¹: foi preparada semanalmente através da dissolução de 7,12 g de SDS em aproximadamente 100 mL de água deionizada. Esta solução foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água deionizada até a marca. Soluções de trabalho foram convenientemente preparadas através de diluição com água deionizada.

e) Solução de NaOH 1,05 x 10⁻¹ mol L⁻¹: foi preparada pela dissolução de 2,15 g do sólido (pastilhas) em aproximadamente 200 mL de água deionizada. A solução resultante foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 500 mL e o volume completado com água deionizada até a marca. A solução foi padronizada com a solução padrão de HCl 1,20 x 10⁻¹ mol L⁻¹. Soluções de trabalho foram preparadas através de diluição adequada com água deionizada.

f) Solução de KCl 2,0 x 10⁻¹ mol L⁻¹: foi preparada pela dissolução de 7,53 g do sólido em aproximadamente 200 mL de água deionizada. A solução resultante foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 500 mL e o volume

completado com água deionizada até a marca. Esta solução foi utilizada no preparo da solução contendo a mistura de 50 mL KCl ($2,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) com 7,8 mL de HCl ($2,00 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) em balão volumétrico de 200 mL e o volume completado até a marca com água deionizada. O pH final desta solução foi determinado em pHmetro como sendo de 2,2. Esta mistura foi utilizada para o ajuste do pH das soluções de amostras empregando o sistema FIA acoplado a etapa de EFS no modo *on-line*.

g) Fase móvel utilizada no método CLAE para análise quantitativa das amostras positivas ou negativas indicadas pelo procedimento screening: A fase móvel utilizada foi a solução aquosa de acetato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3,6) Metanol (80:20 v/v) e 1% de ácido acético. A fase móvel foi filtrada em membrana de $0,45 \mu\text{m}$ de nylon (Millipore) sob vácuo e degaseificada pelo borbulhamento de nitrogênio durante 30 minutos em ultra-som.

IX.1.4. Amostras

IX.1.4.1 Formulações farmacêuticas

As amostras comerciais de medicamentos contendo sulfacetamida ou sulfametoxazol analisadas estão listadas na Tabela 32. As mesmas foram adquiridas em farmácias locais e analisadas pelo método proposto, dentro dos seus prazos de validade.

Tabela 32 Amostras de medicamentos contendo sulfonamidas analisados pelo procedimento de FIA desenvolvido.

| Amostra | Valor Nominal^a |
|--|----------------------------------|
| Paraqueimol [®] (pomada para queimadura) | 74 mg g ⁻¹ |
| Queimalive [®] (pomada para queimadura) | 74 mg g ⁻¹ |
| Isopto cetapred [®] (pomada oftálmica) | 100 mg g ⁻¹ |
| Isopto cetapred [®] (suspensão oftálmica) | 100 mg mL ⁻¹ |
| Sulnil [®] (suspensão oftálmica) | 100 mg mL ⁻¹ |
| Sulfametoxazol + trimetoprima (suspensão oral) | 40 mg mL ⁻¹ |

^a Valor declarado pelo fabricante

IX.1.4.2. Urina

Amostra de urina de uma pessoa saudável e que não fez uso de medicamentos foi fortificada com quantidades conhecidas de padrão de sulfatiazol, sulfacetamida sódica e uma mistura de ambas as sulfonamidas e na seqüência submetida a tratamentos de extração em fase sólida (EFS) nos modos *off-line* e *on-line*.

IX.1.4.3. Água superficial

Duas amostras de águas superficiais de rios do estado de São Paulo foram coletadas adequadamente conforme laudos de análise apresentados no Anexo 5. Aproximadamente 2 litros de cada uma destas amostras nos foram cedidas e analisadas pelo sistema de *screening* proposto, após a fortificação com quantidades conhecidas de uma mistura dos padrões das sulfonamidas. Tratamentos de extração em fase sólida (EFS) nos modos *off-line* e *on-line* foram empregados no preparo das amostras.

IX.1.4.4. Leite bovino

Amostras de leite longa vida (caixas de 1 litro) foram adquiridas em mercados da cidade de Araraquara e analisadas pelo sistema de *screening* desenvolvido dentro de seus prazos de validade. As amostras analisadas estão sumarizadas na Tabela 33. As amostras foram fortificadas com quantidades conhecidas de uma mistura dos padrões das sulfonamidas e na seqüência submetida a tratamentos de extração em fase sólida (EFS) nos modos *off-line* (utilizando o procedimento convencional de EFS) e *on-line* (utilizando uma minicoluna acoplada ao sistema FIA desenvolvido).

Tabela 33. Amostras de leite analisados pelo procedimento de *screening* desenvolvido.

| Amostras |
|---------------------|
| Jussara – integral |
| Jussara - desnatado |
| Batavo - integral |
| Batavo - desnatado |
| Italac - integral |
| Italac - desnatado |

IX.2. Procedimento experimental

IX.2.1. Construção das curvas analíticas

O diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo otimizado está representado na Figura 36. Esta configuração deixa evidente que a cinética da reação proposta é rápida.

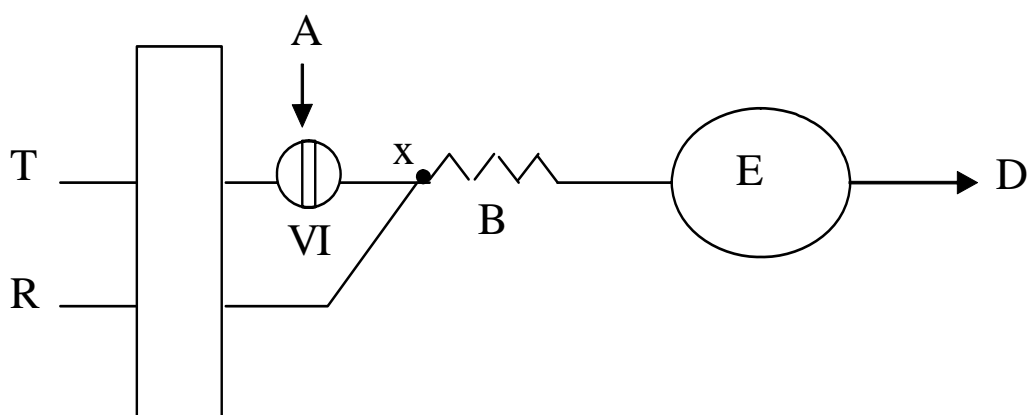


Figura 36. Diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo otimizado para determinação de sulfonamidas. **T** solução transportadora (SDS $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) com vazão de $2,48 \text{ mL min}^{-1}$; **R** solução de reagente de *p*-DAC 0,013 % (m/v) preparada em HCl $3,70 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ com vazão de $1,28 \text{ mL min}^{-1}$; **A** soluções padrão ou amostra (alça de amostragem $505,0 \mu\text{L}$); **VI**: válvula de injeção de 6 canais; **x** ponto de confluência; **B** bobina reacional (40,0 cm); **E** espectrofotômetro (555 nm); **D** descarte.

O diagrama esquemático para o sistema em fluxo otimizado com a etapa de EFS acoplada para o tratamento automatizado das amostras está apresentado na Figura 37.

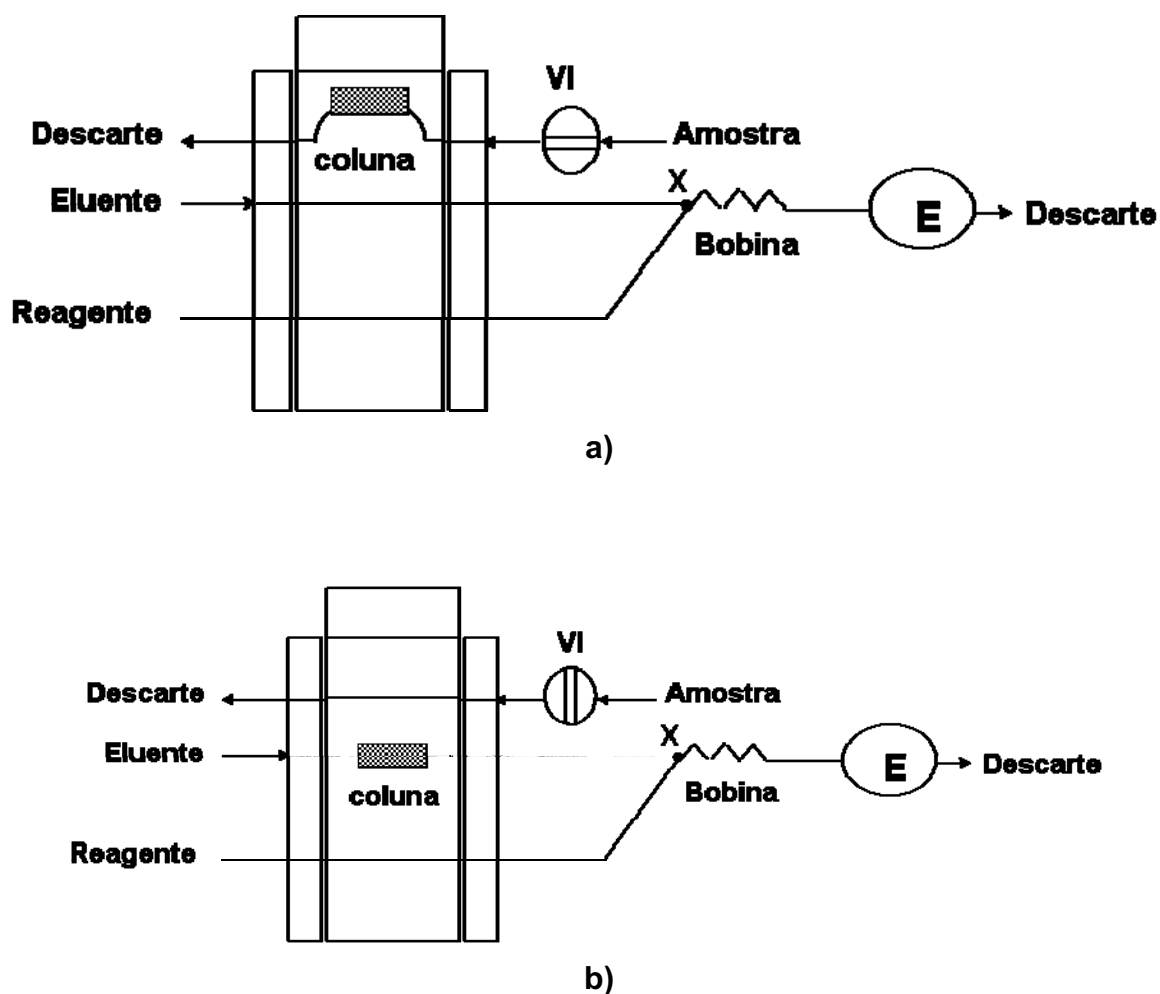


Figura 37. Representação esquemática da configuração do sistema FIA acoplado a EFS para o *screening* de sulfonamidas. **a)** posição de retenção e limpeza; **b)** posição de eluição; VI: válvula de injeção com alça de amostragem de 505 μ L; Bobina reacional de 40 cm; E: espectrofotômetro ($\lambda = 555$ nm); coluna: minicoluna confeccionada.

O modo de operação para ambos os sistemas otimizados são descritos na seqüência.

Em ambos os sistemas, alíquotas de 505 μL das soluções de referência de sulfonamidas individuais ou de uma mistura de sulfonamidas totais contendo o equivalente a 0,050 – 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o sistema não automatizado de preparo de amostras e de 0,05 – 8,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o sistema com preparo de amostra automatizado, foram introduzidas no fluxo transportador. Para o primeiro sistema, o carregador foi a solução de SDS $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e no segundo sistema o carregador foi água deionizada pura, ambas bombeadas a $2,48 \text{ mL min}^{-1}$. No sistema em que a etapa de EFS é realizada no modo *off-line* a solução de SFA selecionada pela alça de amostragem conflui em X (ponto de confluência) com a solução reagente (*p*-DAC 0,013% (m/v) preparada em HCl $3,70 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ bombeada continuamente a uma vazão de $1,42 \text{ mL min}^{-1}$. Após a confluência ocorre a formação do produto colorido rosa no reator B, o qual é monitorado espectrofotometricamente em 555 nm.

Para o sistema com a etapa de EFS *on-line* o volume de amostra selecionado pela alça de amostragem é transportado pelo fluxo carregador de água deionizada até a minicoluna onde as SFAs são retidas. A própria água atua na limpeza da coluna lavando os componentes da matriz não retidos para o descarte. Após etapa de retenção/limpeza a minicoluna é posicionada no caminho do fluxo eluente de SDS $5,00 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. Os sinais transientes foram registrados no computador e transferidos como arquivos ASCII para tratamento no programa Origin 7.0.

A curva analítica foi construída representando-se graficamente os valores de $A_{510\text{nm}}$ em função da concentração de sulfonamida.

IX.2.2. Procedimento de EFS

IX.2.2.1. EFS no modo convencional (*off-line*)

O procedimento de preparo das amostras e pré-tratamento foi semelhante ao descrito por SANTOS et al.²⁷. O cartucho de C-18 (500 mg, Bond Elut - Varian) foi previamente condicionado com 5 mL de metanol e duas porções de 5 mL de água deionizada.

Para a análise das amostras de urina 1 mL de amostra fortificada foi percolada através do cartucho e o eluente descartado. Para a análise das amostras de águas superficiais e leite bovino, 5 mL de amostra foram fortificados e percolados

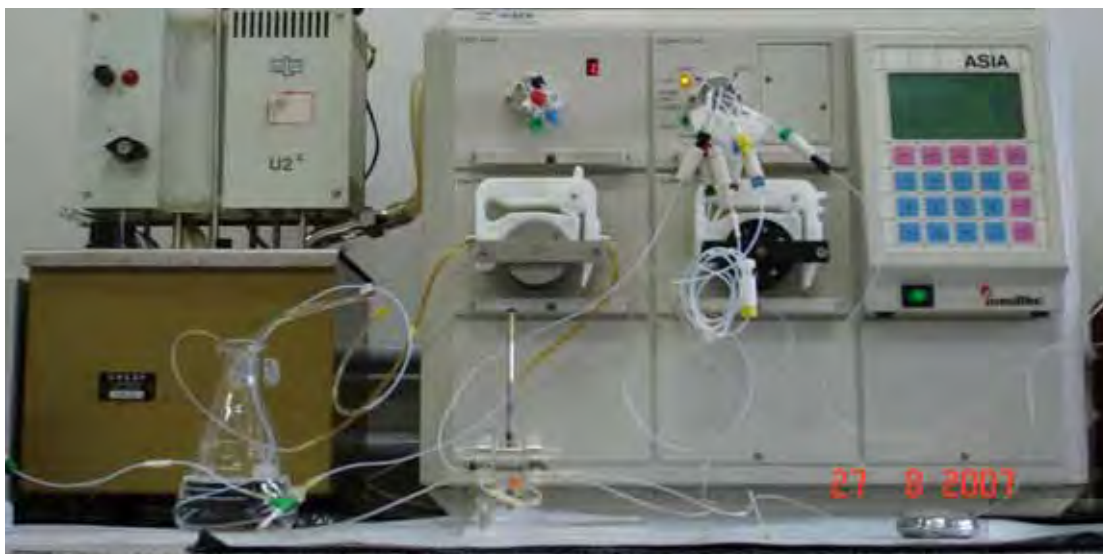
através do cartucho lentamente e o eluente descartado. As amostras de medicamentos não requerem a etapa de EFS.

Para todas as amostras o cartucho foi lavado com duas porções de 2 mL de água deionizada para eliminação dos componentes da matriz e a eluição feita com duas porções de 1 mL de metanol e o eluato coletado em béquer de 10 mL. O solvente foi evaporado até a secura em capela. Os resíduos obtidos para cada amostra e em cada nível de concentração examinado foram retomados em solução de SDS $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; transferidos quantitativamente para balões volumétricos de 5 mL e as soluções analisadas pelo procedimento FIA desenvolvido.

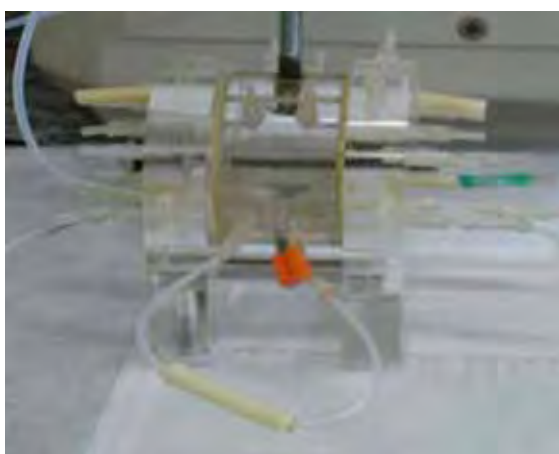
IX.2.2.2. EFS acoplada ao sistema FIA (modo on-line)

Para a realização da etapa de EFS automatizada uma minicoluna contendo o sorvente foi confeccionada em nosso laboratório. Para esta confecção foram utilizados tubos de Tygon[®] MHLL (Ismatec, Suíça) resistentes a solventes orgânicos de dimensões de 2 cm de comprimento e 2,06 mm de d.i., previamente pesados e com uma das extremidades vedada com pequena porção de algodão hidrofílico, para evitar perdas do sorvente. As colunas foram preenchidas manualmente com aproximadamente 27 mg de C-18 ou Strata-X com auxílio de um pequeno funil de vidro e espátula metálica.

A minicoluna foi inserida no sistema FIA entre a alça de amostragem e o ponto de confluência como representado na Figura 36. A Figura 38 representa detalhadamente a minicoluna construída e sua inserção no sistema FIA.



a)



b)



c)

Figura 38. Foto do sistema de FIA acoplado a EFS. **a)** Foto do sistema mostrando a seleção da amostra pela alça de amostragem que na seqüência passa pela minicoluna e após limpeza e eluição conflui com a solução reagente e atinge o detector; **b)** Destaque para a posição de inserção da minicoluna no sistema FIA; **c)** Minicolunas construídas para a EFS.

IX.2.3. Procedimento para o preparo das amostras

IX.2.3.1. Formulações farmacêuticas

IX.2.3.1.1. Suspensão oftálmica

Uma alíquota de amostra equivalente a 5,0 mg de sulfacetamida sódica foi exatamente transferida para béquer de 25 mL contendo 10 mL de água deionizada e 3 mL de HCl $1,20 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ e deixada em agitação magnética por 15 minutos. Esta solução foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 100 mL e o menisco completado com água deionizada. Uma alíquota de 1,00 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25 mL. Na seqüência foram adicionados ao balão 2,50 mL de SDS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e o volume completado com água deionizada até a marca. Esta solução foi então analisada de acordo com o procedimento recomendado descrito no item IX.2.1. para construção da curva analítica empregando o sistema FIA representado na Figura 35.

IX.2.3.1.2. Pomadas para queimadura e oftálmica

Uma porção de amostra equivalente a 5,0 mg de sulfacetamida sódica foi transferida para béquer de 25 mL contendo 10 mL de água deionizada e 3 mL de HCl $1,20 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ e deixada em agitação magnética por 15 minutos. Esta solução foi quantitativamente transferidas para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água deionizada até a marca. Na seqüência 1,00 mL desta solução foi transferido para balão volumétrico de 25 mL, adicionaram-se 2,50 mL de SDS $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ e o volume completado com água deionizada até a marca. Esta solução foi analisada de acordo com o procedimento recomendado descrito no item IX.2.1. para construção da curva analítica empregando o sistema FIA representado na Figura 36.

IX.2.3.1.3. Suspensão oral

Uma alíquota de amostra equivalente a 5,0 mg de sulfametoxazol foi transferida para béquer de 25 mL contendo 10 mL de água deionizada e 3 mL de

HCl $1,20 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ e deixada em agitação magnética por 15 minutos. Esta solução foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água deionizada. Na seqüência 1,00 mL desta solução foi transferido para balão volumétrico de 25 mL, adicionaram-se 2,50 mL de SDS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e o volume completado com água deionizada até a marca. Esta solução foi analisada de acordo com o procedimento recomendado descrito no item IX.2.1. para construção da curva analítica empregando o sistema FIA representado na Figura 36.

IX.2.3.2. Amostras de urina, água superficial e leite bovino

Devido a complexidade da matriz e a possibilidade da existência de interferentes, as amostras de urina, águas superficiais e leite bovino, foram submetidas a uma etapa de EFS para a obtenção de um extrato adequado para análise pelo procedimento FIA proposto.

Foram empregadas a EFS nos modos *on-line* e *off-line*. As soluções para estas amostras foram adequadamente preparadas segundo o modo de EFS empregado. A amostra de leite bovino não pode ser adequadamente analisada utilizando o procedimento de EFS no modo *on-line* devido a interferência da matriz, e por este motivo foi analisada empregando o procedimento de EFS no modo *off-line*. O procedimento de preparo das amostras e pré-tratamento nesta etapa foi semelhante ao descrito por SANTOS et al.²⁷.

Para execução do procedimento com EFS no modo *on-line* as condições experimentais para o preparo de amostra bem como retenção e eluição dos analitos foram baseadas no método proposto por GREEN et al.²⁴⁵.

IX.2.3.2.1. Preparo das amostras para a etapa de EFS off-line.

IX.2.3.2.1.1. Urina

Um volume de 20 mL de urina a temperatura ambiente foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm em Centrifuga Excelsa Baby, modelo 208 N. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e transferido a um béquer de 50 mL. Alíquotas de 2 mL destas amostras foram tomadas, fortificadas separadamente pela

adição de 50 μL de solução padrão de sulfacetamida sódica, sulfametoxazol ou da mistura de todas as sete sulfonamidas nas concentrações 20, 40, 80, 160 e 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de modo que a concentração final de sulfonamidas foi de 0,5; 1; 2; 4 e 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. 100 μL de HCl 1,50 mol L^{-1} foram adicionados e a solução resultante homogeneizada. Para o procedimento de EFS 1 mL da solução foi tomado para análise para cada nível de concentração.

IX.2.3.2.1.2. Água superficial

Aproximadamente 200 mL das amostras foram inicialmente filtrados em membranas de nylon de 0,45 μm . Alíquotas de 5 mL das amostras filtradas foram fortificadas pela adição de 50 μL de solução contendo a mistura de sulfonamidas em concentrações de 0,05, 0,10, 0,20, 0,40 e 0,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de modo que a concentração final de sulfonamidas foi de 50, 100, 200, 400 e 800 ng mL^{-1} . Estes valores referem-se a concentração total da mistura de sulfonamidas. 100 μL de HCl 1,50 mol L^{-1} foram adicionados e a solução resultante homogeneizada e submetida a etapa de EFS.

IX.2.3.2.1.3. Leite bovino

Alíquotas de 5 mL de leite fortificadas pela adição de 50 μL de solução contendo a mistura de sulfonamidas em concentrações de 0,05, 0,10, 0,20, 0,40 e 0,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de modo que a concentração final de sulfonamidas é de 50, 100, 200, 400 e 800 ng mL^{-1} . As alíquotas de amostras (5 mL) fortificadas foram transferidas para tubos de centrifuga de 15 mL. Um volume de 5 mL de HCl 2,0 mol L^{-1} foi adicionado e a mistura homogeneizada em banho de ultra-som por 10 min. A solução foi então, centrifugada a 4000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi submetido então a etapa de EFS.

IX.2.3.2.2. Preparo das amostras para etapa de EFS on-line

IX.2.3.2.2.1. Urina

Alíquotas de 2 mL da amostra de urina centrifugada e fortificadas separadamente com solução padrão de sulfacetamida sódica, sulfametoxazol ou da mistura de todas as sete sulfonamidas nas concentrações de 0,5, 1, 2, 4 e 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume completado até a marca com a solução da mistura de KCl/HCl (pH 2,2). A solução resultante foi submetida diretamente à análise empregando o procedimento FIA com a EFS acoplada *on-line*.

IX.2.3.2.2.2. Água superficial

Alíquotas de 8 mL das amostras de águas superficiais filtradas e fortificadas individualmente com a mistura de todas as sete sulfonamidas nas concentrações de 75, 100, 500 e 1000 ng mL^{-1} foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume completado até a marca com a solução da mistura de KCl/HCl (pH 2,2). As soluções resultantes foram submetidas diretamente à análise empregando o procedimento FIA com a EFS acoplada *on-line*.

IX.2.4. Estudo de interferentes

IX.2.4.1. Interferentes para formulações farmacêuticas

Os excipientes comumente encontrados nas formulações farmacêuticas foram cuidadosamente estudados visando avaliar possíveis interferências que os mesmos poderiam causar sobre a medida de absorvância.

Os excipientes analisados foram: amido, talco, estearato de magnésio, lactose, sacarose, sacarina sódica, sorbitol 70%, cafeína, EDTA dissódico, polivinilpirrolidona, vaselina, dióxido de silício, ácido cítrico, ácido ascórbico, benzoato de sódio, metilcelulose, metabissulfito de sódio e hidrogeno fosfato de sódio.

Neste estudo, soluções individuais contendo sulfacetamida sódica e sulfametoxazol com concentração final de $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ juntamente com o excipiente presente em concentração igual e dez vezes maior à concentração de sulfonamida (em massa) foram submetidas à agitação magnética por 15 minutos em aproximadamente 10 mL de solução de SDS $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Estas soluções foram então filtradas em papel de filtro quantitativo Whatman nº 41, quantitativamente transferidas para balões volumétricos de 25 mL e diluídas com a mesma solução de SDS. Estas soluções foram então analisadas de acordo com o procedimento descrito para a construção da curva analítica.

IX.2.4.2. Interferentes para o sistema de screening

Foram avaliados os efeitos sobre as medidas de absorvância do sistema de *screening* de vários fármacos que eventualmente podem estar presentes nas amostras de analisadas, dentre os quais vários antibióticos.

Neste estudo soluções individuais contendo a mistura de todas as sete sulfonamidas estudadas nesta tese com concentração total final igual a 1000 ng mL^{-1} juntamente com o fármaco presente em concentração igual e dez vezes maior à concentração de sulfonamida (em massa) foram submetidas à agitação magnética por 15 minutos em aproximadamente 10 mL de solução de SDS $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Estas soluções foram então filtradas em papel de filtro quantitativo Whatman nº 41 (quando necessário), quantitativamente transferidas para balões volumétricos de 25 mL e diluídas com a mesma solução de SDS. Uma alíquota de 1,00 mL destas soluções foi transferida para balão volumétrico de 10 mL contendo 1,00 mL de SDS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e diluídas até a marca com água deionizada e analisadas sob as mesmas condições descritas para a construção da curva analítica.

IX.2.5. Análise das amostras de medicamentos pelo método oficial

A Farmacopéia Americana preconiza a CLAE para a separação e determinação quantitativa de sulfacetamida sódica e sulfametoxazol em formulações farmacêuticas²⁴⁶. O método consiste na separação das sulfas em coluna C-18 empregando detecção UV em 254 nm.

Dependendo da amostra uma fase móvel é indicada, assim, para a análise de sulfacetamida sódica em pomadas oftálmicas a fase móvel recomendada consiste na mistura de água-metanol-ácido acético glacial nas proporções de 89:10:1 (v/v/v) com vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Para a análise também de sulfacetamida, porém em soluções oftálmicas a fase móvel consiste na mesma mistura de solventes, diferindo apenas nas proporções que são de 875:12:3 (v/v/v) com vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$.

A análise de sulfametoxazol é efetuada utilizando como fase móvel a mistura de 1,4 litros de água com 400 mL de acetonitrila e 2 mL de trietilamina em balão volumétrico de 2 litros. O pH é ajustado para 5,9 com solução de NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e o volume completado até a marca com água deionizada. A vazão desta fase móvel é $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Sulfametoxazol é separado e determinado em amostras de suspensão oral, utilizando como fase móvel a mistura de 1,4 L de água deionizada com 400 mL de acetonitrila e 2 mL de trietilamina em béquer de 2 L. O pH desta solução é ajustado para 5,9 e o volume completado até a marca com água deionizada. A vazão neste caso é de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Curvas analíticas para cada condição de separação foram construídas injetando soluções padrão (25; 50; 100; 200 e $400 \mu\text{g mL}^{-1}$) de sulfacetamida sódica ou sulfametoxazol. As curvas foram construídas colocando-se em gráfico os valores de área obtidos em função da concentração da solução padrão injetada. As amostras foram analisadas e o valor da área do pico resultante foi convertido em concentração do analito utilizando as equações das curvas analíticas construídas.

IX.2.6. Estudos de adição e recuperação para formulações farmacêuticas

Estudo de adição e recuperação de fármaco padrão foi realizado com o objetivo de avaliar efeitos de matriz (formulação farmacêutica) nas análises. Para tanto, quantidades conhecidas (100; 200; 300; 400 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$) de sulfacetamida ou sulfametoxazol foram adicionadas nas amostras previamente analisadas contendo o equivalente a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfa. As quantidades do fármaco padrão adicionadas corresponderam a 50, 100, 150 e 200% da quantidade presente na amostra. A análise foi realizada pelo procedimento em fluxo como descrito na etapa para construção da curva analítica.

IX.3. Resultados e Discussão

IX.3.1. Seleção da estratégia analítica

A espectrofotometria UV-Vis é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas⁴⁴.

O uso da espectrofotometria é uma ferramenta muito interessante para o desenvolvimento de métodos de *screening* por ser uma técnica de instrumentação relativamente simples, de fácil operação e menor custo quando comparada às técnicas de separação. Entretanto, seu emprego em métodos de *screening* é pouco difundido devido a baixa sensibilidade oferecida em alguns casos, normalmente superior aquela necessária para análise de traços dependendo da reação proposta.

Entretanto, muitas inovações referentes à espectrofotometria têm sido propostas na literatura. Basicamente estas consistem de estratégias para aumento de sensibilidade, visando ampliação da faixa de aplicação da técnica e permitindo, em alguns casos, que medidas em concentrações da ordem de nmol L^{-1} sejam efetuadas²¹⁰⁻²¹².

Entre as ferramentas comumente utilizadas para o aumento da sensibilidade em espectrofotometria estão²¹⁰⁻²¹²: espectrofotometria derivativa, aumento do caminho óptico, separação e concentração do analito, medidas em fase sólida e o uso de surfactantes. Dentre estas, grande destaque é dado ao emprego de surfactantes, principalmente devido à sua capacidade em modificar algumas propriedades reacionais, com conseqüente melhoria em sensibilidade e/ou seletividade analítica²¹⁰⁻²¹².

As principais características do uso de surfactantes estão relacionadas à formação de ambientes organizados também conhecidos como ambientes micelares. Na presença de surfactantes, o equilíbrio e a cinética das reações, bem como propriedades espectrais, podem ser modificadas. As alterações podem ser observadas para um amplo intervalo de concentração dos surfactantes, acima ou abaixo da sua concentração micelar crítica (cmc)²⁴⁷.

Ambientes micelares podem induzir deslocamentos favoráveis das constantes de equilíbrio e propriedades espectrais, tais como deslocamento batocrômico, inibir

reações indesejáveis, como hidrólise e fotólise, estabilizar intermediários de reações, aumentar a velocidade de reações através da catálise micelar e solubilizar amostras polares e não-polares. Esta última propriedade é de grande importância para a substituição de metodologias tradicionais de extração e/ou separação, baseadas em uso de solventes orgânicos, laboriosas e que muitas vezes oferecem altos riscos ao operador devido à toxicidade e periculosidade dos solventes normalmente empregados.

Desta forma, pode-se destacar o emprego de surfactantes principalmente sob dois aspectos, ambos devido à formação de ambientes quimicamente organizados²¹⁰⁻²¹². O primeiro se refere à melhoria da sensibilidade e/ou seletividade e o segundo, se relaciona a etapas de concentração e/ou separação onde é possível substituir solventes orgânicos na busca de procedimentos “limpos” do ponto de vista da Química Verde^{213,248}.

Com o uso de meios organizados a limitação referente à baixa sensibilidade pode ser solucionada em muitos casos. Para o desenvolvimento de métodos de *screening* a união de procedimentos de análise por injeção em fluxo (FIA)²¹⁴ com detecção espectrofotométrica empregando reações em meio micelar é potencialmente atraente.

A partir destas considerações, neste trabalho procuramos selecionar uma reação colorimétrica que pudesse ser facilmente automatizada em sistemas (FIA) e que demonstrasse sensibilidade analítica adequada para o *screening* de sulfonamidas em níveis de concentração baixos (100 ng mL^{-1})²³.

Na busca por uma reação que atendesse esses requisitos, nossa atenção foi atraída inicialmente para reações clássicas de diazotação e acoplamento utilizando diferentes reagentes, descritas na literatura para determinação de sulfonamidas.

Uma cuidadosa revisão da literatura indicou que o método espectrofotométrico de maior sensibilidade e potencialmente candidato a ser adotado neste trabalho envolvia a reação de diazotação de algumas sulfonamidas, seguida pelo acoplamento com o reagente iminodibenzil, produzindo um composto de coloração azul. Tentativas de reproduzir o método foram efetuadas sem sucesso em nosso laboratório no que diz respeito à sensibilidade descrita no trabalho original.

O uso de meios organizados para melhorar a sensibilidade do procedimento também não apresentou resultados promissores. Adicionalmente, constatou-se que a automatização desta reação necessitava de um sistema de FIA com configuração mais complexa, ou seja, seria necessário o uso de mais de uma confluência devido as várias etapas necessárias para o desenvolvimento da reação. Isto poderia levar a uma baixa sensibilidade (diluição) e baixa frequência analítica (percurso analítico longo) além de necessitar de um controle da temperatura na etapa de formação do sal do diazônio (temperatura baixa é requerida).

Continuando a pesquisa por uma reação capaz de atender aos requisitos acima delineados, nossa atenção foi então atraída para as reações de condensação entre aldeídos, tais como *p*-dimetilaminobenzaldeído (*p*-DAB) e *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC) com aminas aromáticas^{240,241}. Relatos do efeito benéfico da adição de surfactantes ao meio reacional destas reações também foram descritos²⁴³.

As sulfonamidas contêm grupo amino aromático em sua estrutura, e desta forma a reação com *p*-DAB e *p*-DAC é possível. A separação cromatográfica de sulfonamidas seguida de derivatização pós-coluna utilizando *p*-DAB como reagente cromogênico foi relatada por AERTS, et al²⁴⁹.

Testes preliminares foram realizados em nosso laboratório para avaliar a possibilidade de utilizar esta reação entre as sulfonamidas e *p*-DAC para o desenvolvimento de um método de *screening* utilizando procedimento de FIA. Foi observada a formação instantânea de um produto colorido (violeta-rosado) com absorção máxima em 555 nm, após a reação das sulfonamidas (sulfacetamida sódica, sulfanilamida, sulfametazina, sulfamezarina, sulfametoxazol, sulfametoxidipiridazina e sulfatiazol) com *p*-DAC, em meio de ácido clorídrico diluído. Um significativo aumento da sensibilidade também foi observado quando empregamos o uso de meio micelar de SDS para o desenvolvimento da reação com *p*-DAC. Partindo destes resultados selecionamos esta reação para dar continuidade aos estudos.

IX.3.1.2. Mecanismo para a reação utilizada no desenvolvimento do procedimento de screening

As amins por possuírem um par de elétrons livres do átomo de nitrogênio, são excelentes doadores de elétrons e podem, dessa maneira, interagir fortemente com espécies receptoras de elétrons como o *p*-DAC. A reação entre amins aromáticas e *p*-DAC envolve a condensação do grupo amino-protonado, com o grupo carbonila do reagente *p*-DAC produzindo um sal imínio^{240,241}.

Na Figura 39 é apresentado o provável mecanismo da reação entre a sulfonamidas e *p*-DAC, em meio de ácido diluído. Neste esquema a reação foi ilustrada utilizando a sulfamezarina como sulfonamida modelo.

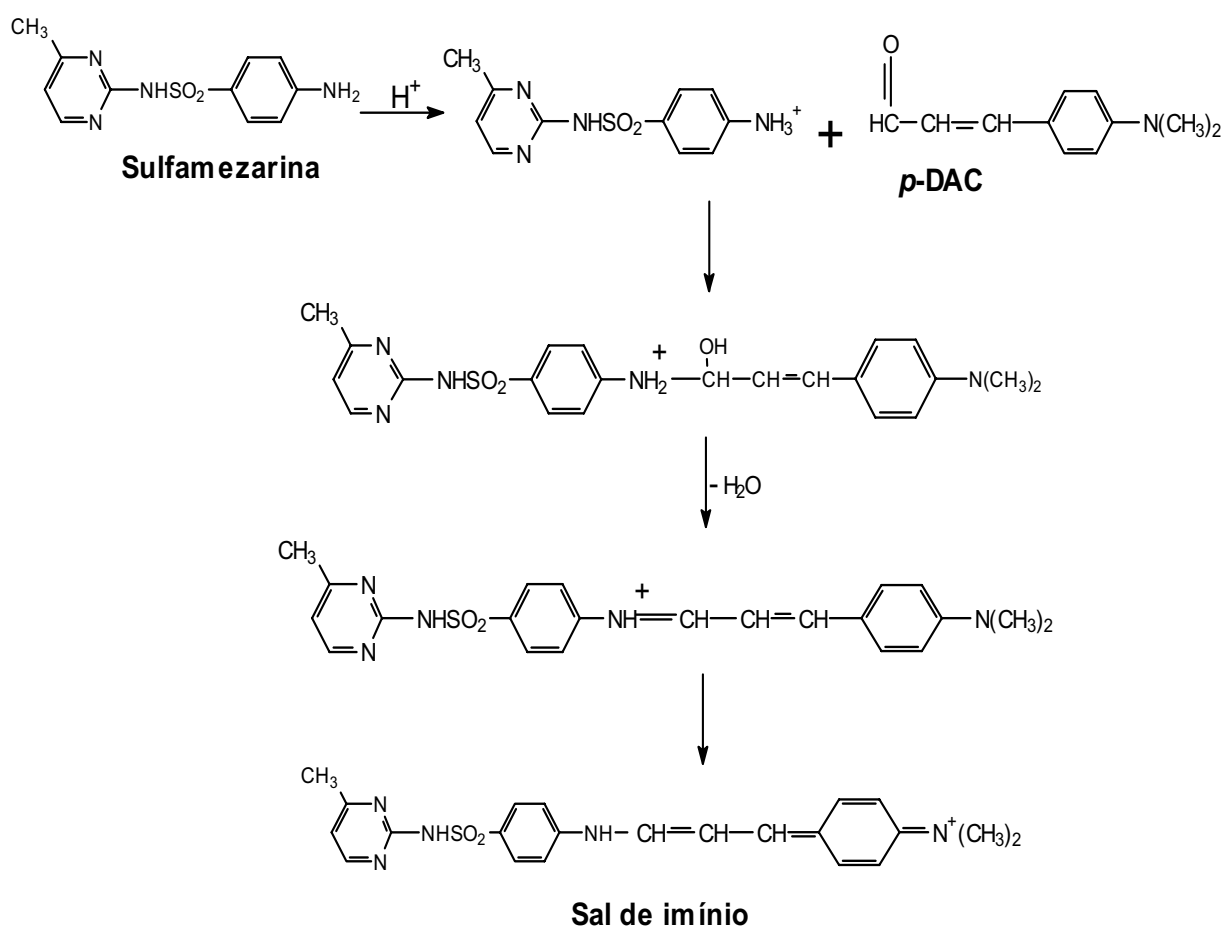


Figura 39. Provável mecanismo para a reação entre sulfamezarina e *p*-DAC em meio ácido.

IX.3.2. Otimização das condições experimentais

Neste trabalho o planejamento de experimentos foi aplicado com o objetivo de encontrar a melhor condição experimental, na qual um valor máximo para a intensidade de absorvância em 555 nm pode ser obtido, ou seja, melhor sensibilidade analítica.

A descrição da estratégia adotada durante a otimização do método de *screening* foi dividida em quatro etapas, como se segue, para dar mais clareza sobre a forma com que os experimentos foram executados, e, facilitar o entendimento.

IX.3.1.1. Etapa 1 - Definição das variáveis químicas para a reação

De acordo com a literatura sabe-se que as reações entre *p*-DAC e aminas ocorrem normalmente em presença de ácido clorídrico diluído ou ácido acético concentrado. Da mesma forma, tem-se conhecimento de que o uso de meios organizados pode melhorar as características analíticas dos métodos espectrofotométricos baseados nesta reação.

Planejamento fatorial completo 2³ foi realizado de modo a selecionar qual seria o melhor ácido para conduzir a reação supracitada e avaliar o efeito exercido pela adição do surfactante aniônico SDS sobre a reação e estimar os valores de concentração a serem utilizados em estudos subseqüentes. Ressalta-se que este estudo foi conduzido no modo espectrofotométrico convencional, ou seja, reação em balões volumétricos. A concentração do reagente *p*-DAC também foi examinada neste estudo para aproximar um valor para posterior otimização pelo procedimento em fluxo.

Para estudos de otimização foi utilizada a sulfamezarina como molécula modelo para classe das sulfonamidas. Neste planejamento as variáveis: concentração de *p*-DAC, efeito da adição de SDS e do ácido utilizado foram avaliadas em dois níveis: alto (+1) e baixo (-1). As variáveis analisadas neste planejamento inicial com os respectivos níveis estudados e a matriz experimental estão apresentadas na Tabela 34. Foram necessários oito experimentos executados de forma aleatória e em duplicata.

Tabela 34. Matriz experimental para o planejamento fatorial completo 2^3 inicial executado para o desenvolvimento do procedimento de *screening*. Concentração final de sulfameazarina foi de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em todos os experimentos.

| Ensaio | Variáveis em seus níveis reais | | | Variáveis em seus níveis codificados | | | $A_{555\text{nm}} \pm \text{SD}^a$ |
|--------|--------------------------------|----------------------|-----------------|--------------------------------------|-------|------------------------------|------------------------------------|
| | SDS (mol L^{-1}) | Tipo de Ácido | p-DAC (%m/v) | SDS (mol L^{-1}) | Ácido | p-DAC (%m/v) ^a | |
| 1 | --- | Acético ^b | 0,005 | -1 | -1 | -1 | $0,1154 \pm 1,0 \times 10^{-4}$ |
| 2 | $9,00 \times 10^{-3}$ | Acético ^b | 0,005 | +1 | -1 | -1 | $0,0200 \pm 3,3 \times 10^{-3}$ |
| 3 | --- | HCl ^c | 0,005 | -1 | +1 | -1 | $0,1103 \pm 9,0 \times 10^{-4}$ |
| 4 | $9,00 \times 10^{-3}$ | HCl ^c | 0,005 | +1 | +1 | -1 | $0,0628 \pm 9,0 \times 10^{-4}$ |
| 5 | --- | Acético ^b | 0,01 | -1 | -1 | +1 | $0,1142 \pm 1,3 \times 10^{-3}$ |
| 6 | $9,00 \times 10^{-3}$ | Acético ^b | 0,01 | +1 | -1 | +1 | $0,1274 \pm 1,2 \times 10^{-3}$ |
| 7 | --- | HCl ^c | 0,01 | -1 | +1 | +1 | $0,1220 \pm 1,4 \times 10^{-4}$ |
| 8 | $9,00 \times 10^{-3}$ | HCl ^c | 0,01 | +1 | +1 | +1 | $0,1265 \pm 4,2 \times 10^{-3}$ |

^a Média \pm desvio-padrão de 3 repetições.

^b 2,00 mL de Ácido acético glacial.

^c 2,00 mL de HCl $2,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 40 (Gráfico de Pareto) representa os efeitos estimados (obtidos pelo tratamento estatístico dos resultados apresentados na Tabela 34 utilizando o programa Statistica) para as variáveis investigadas e a existência ou não de efeitos de interação significativos entre as mesmas.

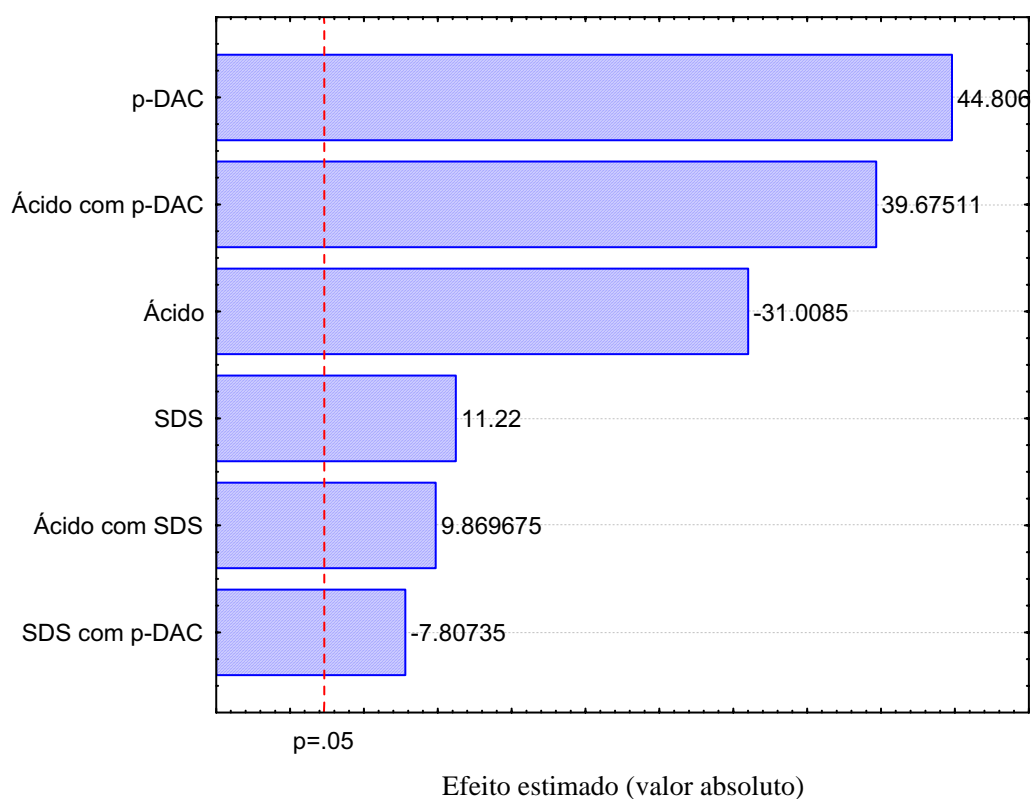


Figura 40. Gráfico dos efeitos principais para as variáveis estudadas no planejamento inicial para otimização do sistema de *screening*.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 39, verifica-se que a variável mais importante dentro das condições estudadas foi a concentração do reagente cromogênico, *p*-DAC. Esta deve ser ajustada no nível alto (+1), o qual corresponde a concentração de 0,01 %(m/v).

Os efeitos individuais do ácido utilizado e da concentração de SDS foram menos influentes, porém significativos. Os resultados indicaram que o ácido para realização dos experimentos corresponde aquele ajustado no nível baixo (-1), ou seja, ácido clorídrico. Já o efeito de SDS deve ser ajustado no nível alto (+1) que corresponde a adição do surfactante ao meio reacional.

Neste ponto, deve-se ressaltar que individualmente não há grandes diferenças entre utilizar HCl ou ácido acético de acordo com os valores de absorvância obtidos (Tabela 34). Entretanto, a Figura 39 indica que há um efeito de interação importante e estatisticamente significativo entre a concentração de *p*-DAC e o ácido utilizado. Desta forma, como o valor numérico do efeito da interação ácido-*p*-DAC tem sinal positivo, para atender esta indicação o nível de ácido deve ser

ajustado em +1. Isto se deve porque o efeito individual do *p*-DAC é o mais importante e de sinal positivo, logo, para que o resultado do efeito da interação seja positivo o ácido deve também ser ajustado neste nível.

Diante destes resultados, selecionou-se o uso do ácido clorídrico e a adição de SDS ao meio reacional para dar prosseguimento aos estudos de otimização.

Entretanto, antes de executar novos planejamentos, foram primeiramente realizados alguns testes para estimar o ganho de sensibilidade observado na reação entre *p*-DAC e todas as sete sulfonamidas que compõem este trabalho pela adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) ao meio reacional.

Foram adicionados em balões volumétricos de 10 mL: 0,750 mL de solução de *p*-DAC 0,010%(m/v) preparada em HCl $3,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, 1,00 mL de solução de sulfonamida 50 ppm e 1,00 mL de SDS $0,100 \text{ mol L}^{-1}$. Paralelamente, prepararam-se as mesmas soluções, porém omitindo-se a adição de SDS ao meio reacional. O volume foi completado com água deionizada até a marca. Brancos analíticos foram adequadamente preparados. Os resultados obtidos neste estudo estão sumarizados na Tabela 35.

Tabela 35. Verificação do efeito da adição de SDS ao meio reacional para o desenvolvimento da reação proposta para o procedimento de *screening*.

| Sulfonamida ^a | Absorbância em 555 nm | | Fator de aumento da sensibilidade |
|--------------------------|-----------------------|--|-----------------------------------|
| | SDS (ausente) | SDS ($1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) | |
| Sulfametoxidipiridazina | 0,04949 | 2,007 | 40,6 |
| Sulfatiazol | 0,05552 | 2,123 | 38,2 |
| Sulfanilamida | 0,07553 | 2,753 | 36,4 |
| Sulfametoxazol | 0,02461 | 2,125 | 86,3 |
| Sulfacetamida sódica | 0,05120 | 1,812 | 35,4 |
| Sulfametazina | 0,02441 | 2,021 | 82,8 |
| Sulfamezarina | 0,05618 | 2,172 | 38,7 |

^aConcentração final de sulfonamidas foi $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Após a realização dos testes pode-se verificar visualmente que a reação em presença de SDS ocorreu instantaneamente após a adição dos reagentes, resultando na formação de um produto de intensa coloração, violeta-rosado ($\lambda = 555 \text{ nm}$). Entretanto, para o mesmo nível de concentração de sulfonamidas testado (5,00 ppm após diluição), o desenvolvimento de coloração foi visivelmente menor quando não se adicionou SDS ao meio reacional. Não foi observado deslocamentos nos espectros de absorção. Os dados da Tabela 35 revelam que um maior aumento na sensibilidade foi observado para o sulfametoxazol (86,3) e o menor para a sulfacetamida (35,4).

Na Figura 41 estão representados os espectros de absorção para os produtos formados na presença e ausência de SDS, evidenciando o aumento significativo da sensibilidade ao se utilizar SDS.

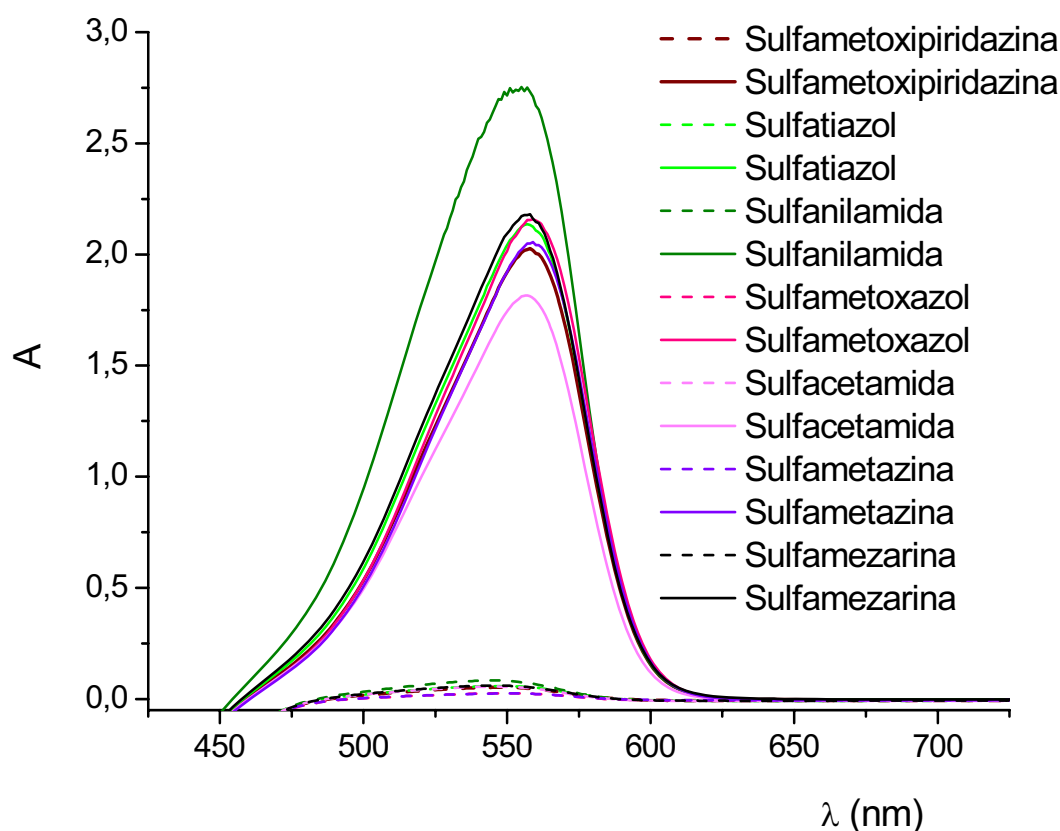


Figura 41. Espectro de absorção do produto colorido formado. Linha cheia: com adição de SDS; Linha tracejada: sem adição de SDS.

IX.2.1.2. Etapa 2 - Seleção da configuração do sistema FIA

Definido o melhor ácido para a execução da reação e o efeito da adição de SDS ao meio reacional partiu-se para a otimização do procedimento em fluxo, isto é, promovendo a reação já no sistema de FIA. Nesta etapa, experimentos foram realizados de modo a selecionar a configuração do sistema FIA que forneceu os melhores resultados em termos de sensibilidade, velocidade das análises e consumo de reagente. Nesta fase não foram utilizados planejamento de experimentos.

Experimentos preliminares foram realizados para testar a configuração do sistema de FIA e aproximar os intervalos a serem estudados na seqüência por planejamento de experimentos. A resposta analisada foi a intensidade da absorbância em 555 nm. Também foi monitorada a estabilidade da linha base, forma do pico resultante e o consumo de reagentes e a velocidade das análises, isto é, a freqüência analítica. As concentrações dos reagentes envolvidos na reação proposta para determinação das sulfonamidas foram selecionadas com base nos testes iniciais realizados em nosso laboratório.

Definiu-se que a configuração do sistema seria a de confluência, onde a amostra é injetada em um fluido carregador e encontra o reagente no ponto de confluência. Adotando esta estratégia uma melhor mistura da amostra com o reagente é alcançada, o que favorece a obtenção de sinais transientes (picos) uniformes e está de acordo com a observação de que a cinética para a reação estudada é rápida.

Definido que o sistema seria aquele em confluência alguns experimentos foram realizados para definir qual a solução carregadora (água pura, solução de SDS, solução de SDS em meio ácido, ou solução de ácido diluído). Também foi verificado o efeito das vazões das soluções carregadora e de reagente. Neste caso foi testado o uso de vazões iguais para ambas as soluções, uma maior vazão para o carregador do que para o reagente e o inverso também.

Quando foi utilizada água pura e/ou solução de ácido clorídrico diluído como solução transportadora, apesar de uma maior sensibilidade os picos obtidos mostraram desdobramentos como mostra a Figura 42 (a).

No entanto, na ausência de SDS a reação não ocorre significativamente, de modo que seu uso é necessário. Tentativas de adicionar o SDS junto com a solução reagente de *p*-DAC preparada em HCl também não demonstraram melhora nos resultados.

Para solucionar tal problema, duas estratégias foram testadas. A primeira foi efetuar a equalização da composição das soluções de amostra e carregador. Desta forma, a solução de sulfamezarina foi preparada em solução contendo SDS na mesma concentração da solução transportadora. A segunda estratégia partiu da verificação do efeito das vazões das soluções carregadoras e do reagente. Neste estudo utilizamos dois tipos de tubos de Tygon[®] para bombear as soluções (carregadora e reagente) um com diâmetro interno de 1,42 mm e o outro com 2,06 mm, mantendo a rotação da bomba fixa em 20 rpm.

Os resultados demonstraram que quando a vazão da solução carregadora foi maior que a do reagente, um melhor resultado é alcançado, em termos de sensibilidade, forma do pico resultante e velocidade analítica (Figura 42 (b)). Isto foi conseguido utilizando para propulsão das soluções transportadora e reagente tubos de Tygon[®] com diâmetro interno de 2,06 mm e 1,42 mm, respectivamente. Quando o contrário foi adotado, assim como quando, vazões iguais foram utilizadas para ambas as soluções, os resultados foram semelhantes àqueles apresentados na Figura 42 (a). Esta observação era esperada, uma vez que com esta estratégia, uma melhor mistura entre as soluções de amostra e reagente é favorecida, conseqüentemente, a sensibilidade e a forma do pico são melhoradas.

No que se refere a velocidade analítica, o uso de maiores vazões obviamente ocasiona a maior freqüência de amostragem. Neste estudo, preocupou-se em manter um consumo adequado de reagentes, sem comprometer a velocidade das análises.

Deste estudo foi concluído que os melhores resultados foram obtidos quando a amostra (sulfamezarina 5,00 ppm – concentração inicialmente testada) foi injetada através da válvula de injeção no fluxo transportador de solução de SDS ($1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ – usando tubos de Tygon de 2,06 mm i.d.) encontrando o fluxo de reagente (*p*-DAC 0,010% (m/v) preparado em HCl 0,030 mol L⁻¹ - usando tubos de Tygon de 1,42 mm i.d.) através de uma confluência.

A Figura 42 (b) mostra os sinais uniformes obtidos adotando-se esta configuração para o procedimento FIA proposto.

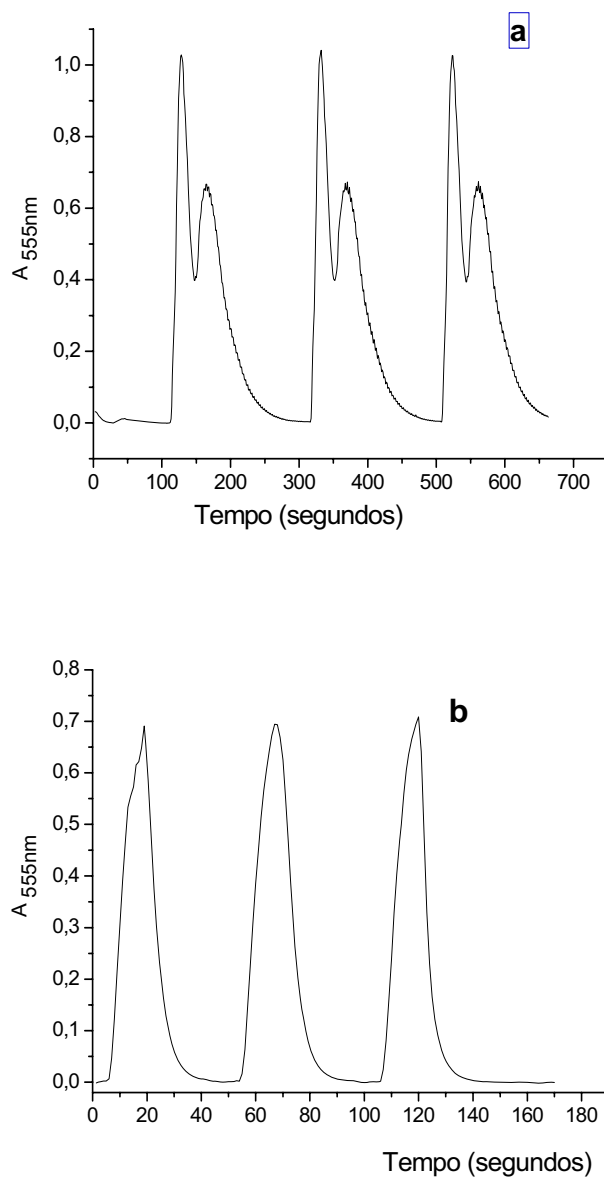


Figura 42. Sinais transientes obtidos no estudo para definição da configuração do sistema FIA. **a)**: picos com desdobramento; **b)**: picos uniformes.

A configuração do sistema em FIA foi então selecionada em modo de confluência, utilizando a injeção de amostra preparada de forma compatível com a composição da solução carregadora passando pelo sistema com vazão maior que a da solução reagente.

IX.2.1.3. Etapa 3 - Otimização das condições experimentais para o procedimento de FIA

Após definição da configuração do sistema FIA, realizou-se um estudo para definição das variáveis mais importantes neste sistema, através de um planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} . Neste planejamento foram estudados os efeitos das variáveis: volume de amostra injetada (utilizando alças de amostragem em diferentes comprimentos), comprimento da bobina de reação, vazão do sistema, concentração de *p*-DAC, concentração de HCl e concentração de SDS.

Este planejamento envolveu a execução de dezesseis experimentos os quais foram executados de forma aleatória e em triplicata. Na Tabela 36 estão listadas as variáveis estudadas e os valores estipulados para cada nível estudado. Na Tabela 37 é apresentada a matriz experimental codificada para o planejamento fracionário juntamente com os resultados obtidos. A concentração de sulfamezarina foi mantida constante em 5,00 ppm em todos os experimentos do planejamento fatorial fracionário.

Neste estudo, o volume de amostra foi variado adotando alças de amostragem de comprimentos diferentes. O estudo da vazão do sistema foi executado pela variação na rotação da bomba, mantendo-se fixo o diâmetro dos tubos de Tygon utilizados para propulsão das soluções, fornecendo os valores de vazão total descritos na Tabela 36. Para propulsão das soluções transportadora e reagente utilizaram-se tubos de Tygon com diâmetro interno de 2,06 mm e 1,42 mm, respectivamente.

Tabela 36. Variáveis examinadas e seus níveis estudados no planejamento fracionário 2^{6-2} realizado para a otimização do procedimento de *screening*.

| Variável | Nível -1 | Nível +1 |
|---|----------|----------|
| <i>p</i> -DAC (% m/v) | 0,008 | 0,010 |
| V_{injetado} (μL) | 250,0 | 477,0 |
| SDS (mol L^{-1}) | 0,008 | 0,010 |
| HCl (mol L^{-1}) | 0,025 | 0,030 |
| Bobina (cm) | 40,0 | 60,0 |
| Vazão total do sistema (mL min^{-1}) | 2,50 | 3,75 |

Tabela 37. Matriz experimental (codificada) para o planejamento fracionário 2^{6-2} realizado para a otimização do procedimento de *screening* com os resultados obtidos.

| Ensaio | Variáveis em seus níveis codificados | | | | | | $A_{555\text{nm}} \pm \text{SD}^a$ |
|--------|--------------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|-------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| | p-DAC (% m/v) | V_{injetado} (μL) | SDS (mol L^{-1}) | HCl (mol L^{-1}) | Bobina (cm) | Vazão (mL min^{-1}) | |
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | $0,5873 \pm 5,4 \times 10^{-3}$ |
| 2 | -1 | +1 | +1 | -1 | -1 | -1 | $0,6473 \pm 5,5 \times 10^{-3}$ |
| 3 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | +1 | $0,6354 \pm 8,1 \times 10^{-3}$ |
| 4 | +1 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | $0,7799 \pm 4,2 \times 10^{-3}$ |
| 5 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | $0,6869 \pm 3,1 \times 10^{-3}$ |
| 6 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | $0,7620 \pm 1,02 \times 10^{-2}$ |
| 7 | -1 | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 | $0,7477 \pm 8,5 \times 10^{-3}$ |
| 8 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | -1 | $0,7031 \pm 3,4 \times 10^{-3}$ |
| 9 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 | -1 | $0,5931 \pm 5,4 \times 10^{-3}$ |
| 10 | +1 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | $0,7985 \pm 1,38 \times 10^{-2}$ |
| 11 | -1 | +1 | -1 | -1 | +1 | +1 | $0,7253 \pm 4,3 \times 10^{-3}$ |
| 12 | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | $0,6752 \pm 0,4 \times 10^{-3}$ |
| 13 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 | $0,8284 \pm 3,0 \times 10^{-3}$ |
| 14 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | $0,8208 \pm 6,8 \times 10^{-3}$ |
| 15 | +1 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | $0,6794 \pm 3,9 \times 10^{-3}$ |
| 16 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | $0,7712 \pm 3,5 \times 10^{-3}$ |

^a Média \pm desvio padrão de 3 determinações

A Figura 43 (Gráfico de Pareto) representa os efeitos estimados (obtidos pelo tratamento estatístico dos resultados apresentados na Tabela 37 utilizando o programa Statistica) para as variáveis investigadas e a existência ou não de efeitos de interação significativos entre as mesmas.

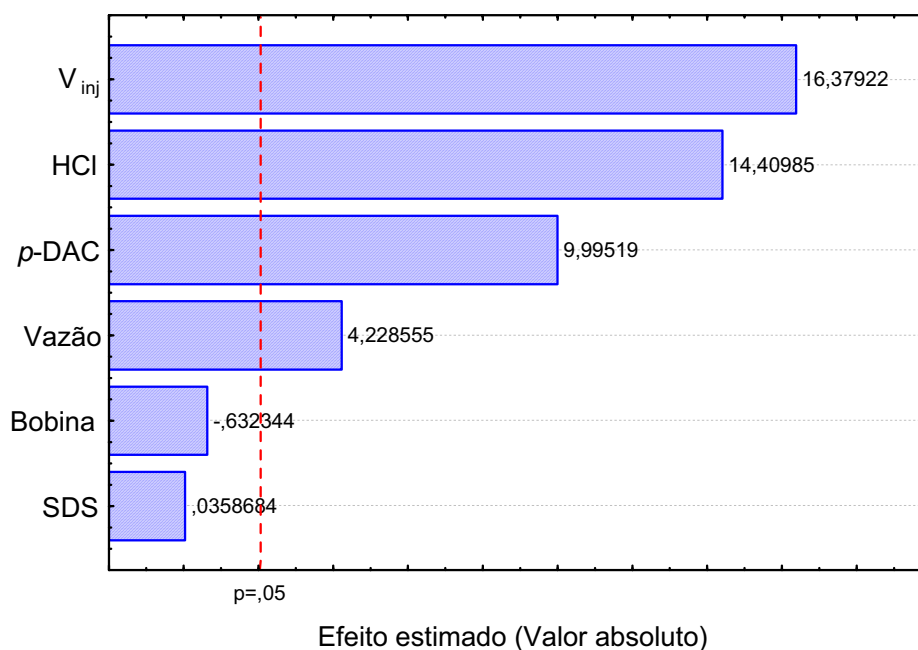


Figura 43. Gráfico dos efeitos principais estimados para as variáveis estudadas.

Os resultados mostrados neste gráfico evidenciam que o volume de amostra injetado apresenta um efeito positivo com maior importância sobre a magnitude de absorvância. Os efeitos individuais, concentração de p-DAC e concentração de HCl também foram significantes, porém menos importantes. Estas três variáveis mostraram que os melhores resultados são obtidos quando as mesmas estão ajustadas no nível +1. Desta forma, as mesmas foram na seqüência otimizadas partindo desta condição.

De outro lado, os efeitos: vazão do sistema, comprimento da bobina e concentração de SDS foram menos importantes e pouco significantes estatisticamente. Desta forma, a bobina foi fixada no nível (-1) (40 cm), a concentração de SDS em $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ e a vazão total do sistema também foi fixada no nível superior (+1) ($3,75 \text{ mL min}^{-1}$).

Com base nos resultados obtidos neste primeiro planejamento o processo de otimização foi continuado realizando-se um planejamento fatorial completo 2^3 para estudo mais aprofundado das três variáveis que se mostraram mais influentes (volume de amostra injetado, concentração de p-DAC e concentração de HCl) sobre a magnitude da absorvância em 555 nm.

Na Tabela 38 é apresentada a matriz experimental para este planejamento com os níveis estudados (reais e codificados) para cada variável juntamente com os resultados obtidos. A concentração de sulfamezarina foi de 5,00 ppm em todos os experimentos, realizados em triplicata.

Tabela 38. Matriz experimental para o planejamento completo 2^3 realizado na otimização do procedimento de *screening*.

| Ensaio | Variáveis em seus níveis reais | | | Variáveis em seus níveis codificados | | | $A_{555nm} \pm SD^a$ |
|--------|--------------------------------|------------------------|---------------|--------------------------------------|------------------------|---------------|-----------------------------------|
| | $V_{injetado}$ | HCl | <i>p</i> -DAC | $V_{injetado}$ | HCl | <i>p</i> -DAC | |
| | (μ L) | (mol L ⁻¹) | (%m/v) | (μ L) | (mol L ⁻¹) | (%m/v) | |
| 1 | 505,0 | $3,00 \times 10^{-2}$ | 0,010 | -1 | -1 | -1 | $0,6749 \pm 2,740 \times 10^{-3}$ |
| 2 | 605,0 | $3,00 \times 10^{-2}$ | 0,010 | +1 | -1 | -1 | $0,6904 \pm 1,862 \times 10^{-3}$ |
| 3 | 505,0 | $4,00 \times 10^{-2}$ | 0,010 | -1 | +1 | -1 | $0,7808 \pm 8,822 \times 10^{-3}$ |
| 4 | 605,0 | $4,00 \times 10^{-2}$ | 0,010 | +1 | +1 | -1 | $0,8855 \pm 2,413 \times 10^{-3}$ |
| 5 | 505,0 | $3,00 \times 10^{-2}$ | 0,015 | -1 | -1 | +1 | $0,6969 \pm 3,574 \times 10^{-3}$ |
| 6 | 605,0 | $3,00 \times 10^{-2}$ | 0,015 | +1 | -1 | +1 | $0,7023 \pm 6,006 \times 10^{-3}$ |
| 7 | 505,0 | $4,00 \times 10^{-2}$ | 0,015 | -1 | +1 | +1 | $0,7874 \pm 3,167 \times 10^{-3}$ |
| 8 | 605,0 | $4,00 \times 10^{-2}$ | 0,015 | +1 | +1 | +1 | $0,8073 \pm 1,195 \times 10^{-2}$ |

^a Média \pm desvio-padrão de 3 repetições.

A Figura 44 (Gráfico de Pareto) representa os efeitos estimados (obtidos pelo tratamento estatístico dos resultados apresentados na Tabela 38 utilizando o programa Statistica) para as variáveis investigadas. Os resultados mostrados neste gráfico de Pareto evidenciam que a concentração de HCl apresenta um efeito, de sinal positivo, com maior importância sobre a intensidade de absorvância. Na seqüência o efeito da concentração do *p*-DAC apresenta significativa influência sobre a intensidade da absorvância. O efeito individual, volume de amostra injetado é a variável menos importante dentro do intervalo de estudo.

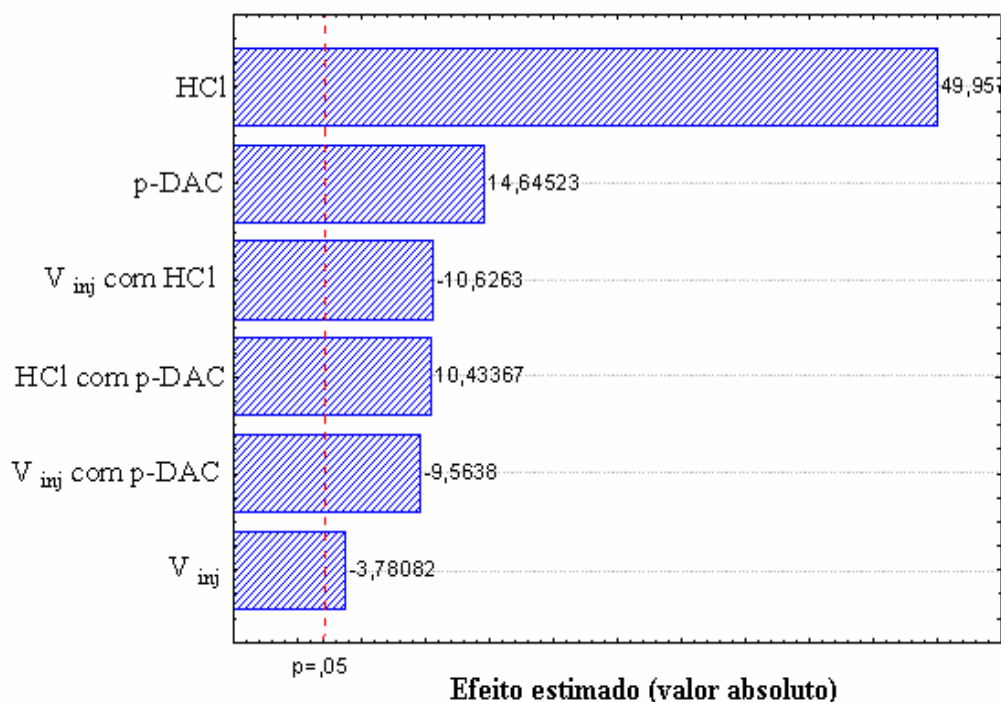


Figura 44. Gráfico dos efeitos principais e de interação estimados para as variáveis estudadas.

Foi dado prosseguimento à otimização através da realização de um planejamento composto central. Este planejamento consiste de uma parte referente ao planejamento fatorial 2^2 , n corridas centrais (0) e quatro corridas axiais situadas a uma distância $\pm 1,414$ do centro (0)²³⁴. Para tanto foram necessários doze experimentos, sendo o ponto central realizado em replicatas ($n = 4$) para estimar o erro experimental.

As variáveis (ξ_i) (concentração de *p*-DAC e concentração de HCl) consideradas com seus níveis examinados (reais e codificados) e a matriz experimental com os resultados obtidos estão mostradas na Tabela 39. Os experimentos no ponto central foram realizados em replicatas ($n = 4$) e os resultados foram analisados utilizando o programa Statistica, versão 6.0. Os experimentos foram realizados de forma aleatória mantendo-se a concentração de sulfamezarina final fixa em 5,00 ppm. Para cada variável (ξ_i) o valor codificado x_i é determinado de acordo com a Eq. (6)²³⁴.

Tabela 39. Matriz experimental para o planejamento composto central realizado para a otimização do procedimento de *screening*.

| Ensaio | Variáveis reais | | Variáveis codificadas | | A _{555nm} |
|--------|-----------------|----------------------------|-----------------------|-------|--------------------|
| | p-DAC (% m/v) | HCl (mol L ⁻¹) | A | B | |
| 1 | 0,0086 | 0,0295 | -1 | -1 | 0,8754 |
| 2 | 0,0139 | 0,0295 | +1 | -1 | 0,8840 |
| 3 | 0,0086 | 0,0423 | -1 | +1 | 0,8283 |
| 4 | 0,0139 | 0,0423 | +1 | +1 | 0,9216 |
| 5 | 0,0113 | 0,0359 | 0 | 0 | 0,9313 |
| 6 | 0,0113 | 0,0359 | 0 | 0 | 0,9468 |
| 7 | 0,0113 | 0,0359 | 0 | 0 | 0,9439 |
| 8 | 0,0113 | 0,0359 | 0 | 0 | 0,9347 |
| 9 | 0,0075 | 0,0359 | -1,41 | 0 | 0,8410 |
| 10 | 0,0150 | 0,0359 | +1,41 | 0 | 0,9233 |
| 11 | 0,0113 | 0,0269 | 0 | -1,41 | 0,8647 |
| 12 | 0,0113 | 0,0449 | 0 | +1,41 | 0,8712 |

Os resultados obtidos a partir deste planejamento (Tabela 39) foram ajustados a um modelo matemático quadrático descrito pela Equação 10, utilizando o programa Statistica, versão 6.0. A equação 10 inclui os termos lineares (x e y) e quadráticos (x² e y²) bem como o produto dos pares dos efeitos lineares (xy). Nesta equação, Z representa a absorbância em 555 nm, e as variáveis x e y são: concentração de e concentração de p-DAC e HCl, respectivamente.

$$Z = - 2,706 \times 10^{-1} + 53,49x - 9,916 \times 10^3 x^2 + 47,72 y - 861,2 y^2 - 1,251 \times 10^1 xy \quad (\text{Eq. 10})$$

A superfície de resposta e a correspondente curva de nível para o modelo ajustado foram construídas e estão mostradas na Figura 45. A análise desta figura indica que dentro do intervalo em que as variáveis independentes foram avaliadas, o valor da absorbância passa por uma região de máximo, situada na área mais escura do gráfico, a qual representa a condição experimental ótima para a realização da reação proposta. De acordo com estes resultados os maiores valores de absorbância são obtidos quando a concentração de p-DAC é 0,013% (m/v) e de HCl $3,70 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

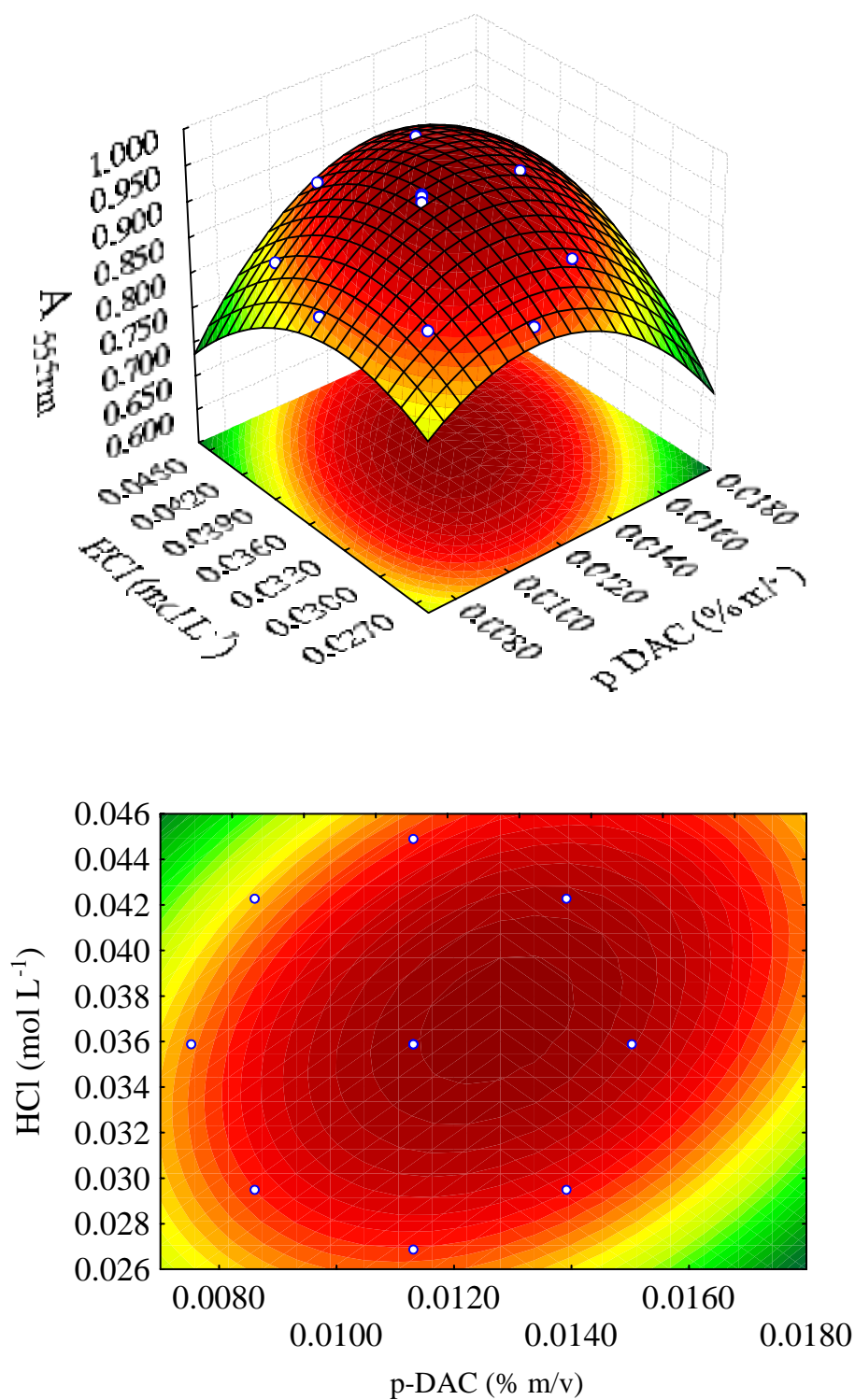


Figura 45. Superfície de resposta e a correspondente curva de nível otimizada para a leitura de absorbância ($\lambda = 555 \text{ nm}$) em função das variáveis independentes: Concentração de *p*-DAC e concentração de HCl. A concentração final de sulfamezarina foi mantida constante (5,00 ppm) em todos os experimentos.

Foram realizados experimentos em replicata ($n = 4$) nas condições experimentais determinadas pelo modelo matemático, para verificação da concordância entre o resultado obtido experimentalmente com àquele predito pela equação 10. Observou-se que o valor de absorvância predito pelo modelo matemático (0,9463) para a medida nas condições ótimas, concorda com àqueles obtidos experimentalmente [$0,9304 \pm 1,202 \times 10^{-3}$ (RSD = 2,40 %)], a um nível de confiança de 95%.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados do planejamento foi realizada para verificação da significância do modelo matemático obtido. Esta análise expressa a relação entre a resposta (medida de absorvância em 555 nm) com os efeitos dos fatores que a influenciam. Neste estudo verificou-se que o modelo ajustado aos dados experimentais obtidos para o planejamento composto central é capaz de prever com uma confiabilidade de 98,7 % o comportamento da variável dependente ($A_{555\text{nm}}$) frente as variáveis independentes estudadas (concentrações de *p*-DAC e HCl).

IX.2.1.4. Etapa 4 – Otimização dos parâmetros envolvidos na extração em fase sólida acoplada ao sistema FIA

A EFS é uma técnica muito útil para a separação e pré-concentração de analitos. É amplamente empregada na etapa de preparo das amostras, pois permite uma melhora na sensibilidade e/ou seletividade do método analítico. Entretanto, no modo convencional (off-line) é uma técnica um tanto quanto complicada e demorada²⁵⁰⁻²⁵².

Uma das principais vantagens dos procedimentos em fluxo é a possibilidade de automatizar uma enorme variedade de técnicas de preparo de amostras, possibilitando fácil manipulação das amostras e aumento na velocidade analítica, precisão e exatidão²⁵².

Entre as técnicas de preparo de amostras comumente acopladas aos sistemas em fluxo, está a EFS. Com esta estratégia, os procedimentos ficam mais simples e possibilitam análises em tempos menores, com menor consumo inclusive de solventes orgânicos. Nestes sistemas, a coluna de EFS pode ser empregada para eliminação de interferentes de uma matrix complexa, bem como para uma pré-

concentração dos analitos. Adicionalmente, a aplicação desta técnica no preparo de amostras *on-line* é muito versátil, pois, a posição de inserção de colunas de EFS em procedimentos automatizados é bastante diversificada²⁵²⁻²⁵⁴.

Para aplicação do procedimento em fluxo desenvolvido no *screening* de sulfonamidas em amostras complexas, tais como urina, águas superficiais e leite bovino, propusemos neste trabalho o emprego da EFS acoplada ao sistema FIA. Nosso objetivo foi realizar o pré-tratamento de amostras *on-line*, para eliminação dos interferentes da matriz.

Parâmetros considerados importantes foram otimizados utilizando-se de planejamento de experimentos. As condições experimentais para esta etapa do estudo foram baseadas no trabalho descrito por GREEN et al.²⁴⁵. Estes autores propuseram a determinação de sulfadoxina em amostras de sangue com determinação espectrofotométrica após etapa de EFS em cartucho de C-18. A eluição da sulfadoxina é realizada com solução de SDS em meio alcalino. Com base nestes dados a automatização da etapa de EFS foi avaliada acoplada ao procedimento em fluxo desenvolvido.

Após definição da otimização dos parâmetros do sistema FIA, a aplicação do procedimento na análise de amostras complexas (urina, águas superficiais, leite bovino) foi realizada utilizando-se a etapa de tratamento da amostra de EFS acoplada diretamente ao sistema FIA de modo que as amostras tivessem o seu tratamento automatizado.

Neste sentido, utilizando as condições experimentais já otimizadas para o procedimento FIA uma minicoluna contendo material adsorvente foi confeccionada e os fatores envolvidos nesta etapa foram otimizados. A minicoluna foi introduzida no sistema entre a alça de amostragem e o ponto de confluência com o reagente cromogênico (*p*-DAC).

Adotando esta estratégia o volume de alça de amostragem otimizado anteriormente é introduzido na minicoluna por uma solução carregadora. Nesta etapa as sulfonamidas são retidas no material adsorvente e o próprio carregador atua como solução de limpeza lavando a coluna e eliminando os componentes da matriz que não são adsorvidos.

Os fatores que podem influenciar no sucesso da etapa de EFS *on-line* foram examinados através de um planejamento fatorial fracionário 2^{6-3} no qual foram avaliadas seis variáveis em dois níveis e como mostra a Tabela 40.

Tabela 40. Fatores e seus respectivos níveis examinados para a otimização do procedimento de EFS no modo *on-line*.

| Fatores | Níveis | |
|-------------------------|---|--|
| | -1 | +1 |
| Tempo de injeção (s) | 15 | 45 |
| Tempo de limpeza (s) | 10 | 30 |
| Tempo de eluição (s) | 20 | 50 |
| Material adsorvente | C-18 | Strata-X |
| Eluente | SDS 0,05 mol L ⁻¹ preparado em NaOH 0,01 mol L ⁻¹ | SDS 0,05 mol L ⁻¹ contendo 6 % de metanol (v/v) |
| Carregador para amostra | H ₂ O | solução KCl/HCl (pH 2,2) |

Este planejamento envolveu a execução de oito experimentos os quais foram executados de forma aleatória e em triplicata. Na Tabela 41 é apresentada a matriz experimental codificada para o planejamento fracionário juntamente com os resultados obtidos. A concentração de sulfamezarina foi mantida constante em 5,00 ppm em todos os experimentos deste planejamento fatorial fracionário.

Tabela 41. Matriz experimental (codificada) para o planejamento fracionário 2^{6-3} realizado para a otimização do procedimento de EFS no modo *on-line* com os resultados obtidos.

| Ensaio | Variáveis em seus níveis codificados | | | | | | $A_{555nm} \pm SD^a$ |
|--------|--------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------|--------------------|---------------------------------|
| | Eluição ^a | Injeção ^a | Limpeza ^a | Material adsorvente | Eluente | Carregador amostra | |
| 1 | -1 | -1 | -1 | +1 | +1 | +1 | $0,3265 \pm 2,2 \times 10^{-3}$ |
| 2 | -1 | +1 | +1 | -1 | -1 | +1 | $0,8503 \pm 5,1 \times 10^{-3}$ |
| 3 | +1 | +1 | -1 | +1 | -1 | -1 | $1,1832 \pm 7,6 \times 10^{-3}$ |
| 4 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | $0,6955 \pm 1,9 \times 10^{-3}$ |
| 5 | +1 | -1 | +1 | -1 | +1 | -1 | $0,4114 \pm 1,3 \times 10^{-3}$ |
| 6 | -1 | -1 | +1 | +1 | -1 | -1 | $0,3161 \pm 4,8 \times 10^{-2}$ |
| 7 | +1 | -1 | -1 | -1 | -1 | +1 | $0,3754 \pm 2,0 \times 10^{-3}$ |
| 8 | -1 | +1 | -1 | -1 | +1 | -1 | $0,9058 \pm 2,5 \times 10^{-3}$ |

^a Média \pm desvio-padrão de três determinações.

A Figura 46 (Gráfico de Pareto) representa os efeitos estimados obtidos pelo tratamento estatístico dos resultados apresentados na Tabela 41.

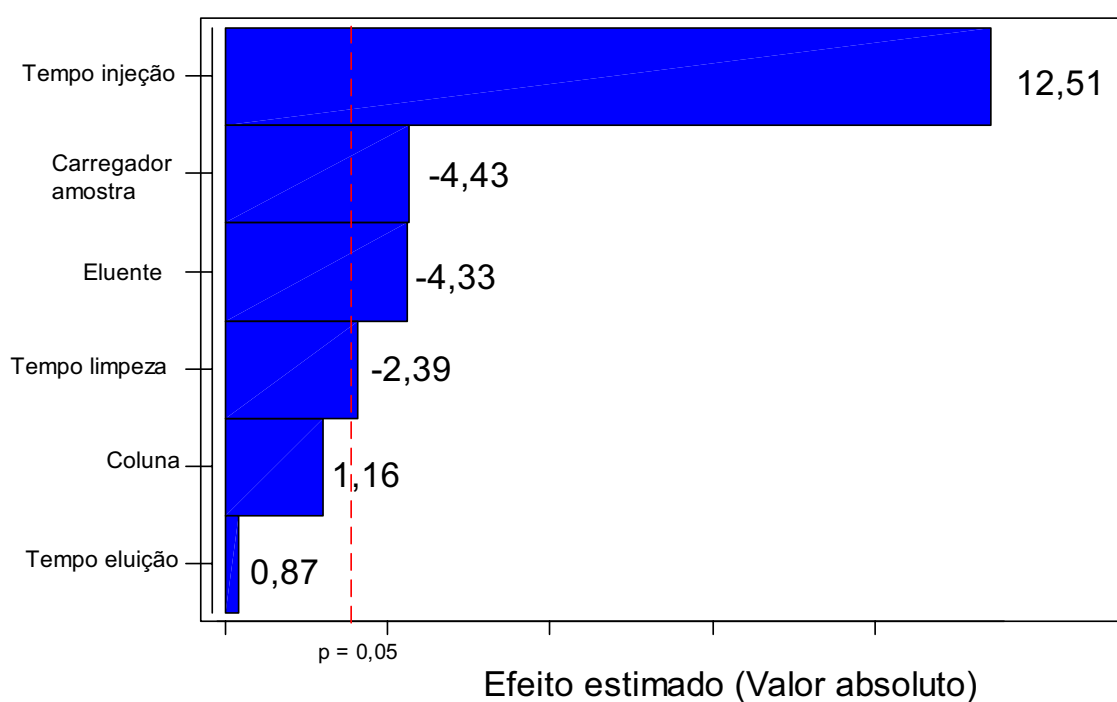


Figura 46. Gráfico dos efeitos principais para as variáveis estudadas na otimização da EFS *on-line*.

Os resultados (Figura 46) indicam que para as variáveis investigadas o tempo de injeção é a mais importante estatisticamente. As variáveis: carregador da amostra e eluente apresentam pequena significância estatística enquanto as demais não foram importantes dentro dos níveis examinados.

Para dar prosseguimento ao procedimento de otimização, as variáveis menos importantes (tempo de limpeza, material da coluna e tempo de eluição) foram fixadas nos níveis baixo (-1), alto (+1) e alto (+1), respectivamente. Apesar da natureza do carregador da amostra e do eluente mostrarem algum efeito sobre a resposta analítica, estas variáveis também foram fixadas no nível baixo (-1) de acordo com os resultados indicados pelo gráfico de Pareto (Figura 46).

O tempo de injeção da amostra foi na seqüência otimizado pelo procedimento convencional de modo univariado, no qual todas as demais variáveis foram fixadas em seus melhores níveis examinados e variou-se o tempo de injeção de 30 a 80 segundos. Os experimentos para cada tempo estudado foram realizados em triplicata e os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 42 e graficamente representados na Figura 47.

Tabela 42. Resultados obtidos na otimização do tempo de injeção da amostra para o procedimento FIA com EFS *on-line* no modo univariado.

| Tempo de injeção da amostra (segundos) | $A_{555\text{nm}} \pm \text{S.D.}^a$ |
|--|--------------------------------------|
| 30 | $0,5284 \pm 2,3 \times 10^{-3}$ |
| 35 | $0,6193 \pm 1,5 \times 10^{-3}$ |
| 40 | $0,6797 \pm 6,9 \times 10^{-3}$ |
| 45 | $0,7262 \pm 1,8 \times 10^{-3}$ |
| 50 | $0,7572 \pm 1,0 \times 10^{-3}$ |
| 55 | $0,7541 \pm 1,7 \times 10^{-3}$ |
| 60 | $0,7534 \pm 1,2 \times 10^{-2}$ |
| 70 | $0,6965 \pm 6,8 \times 10^{-3}$ |
| 80 | $0,5576 \pm 9,8 \times 10^{-3}$ |

^a Média \pm desvio oadrão de três determinações.

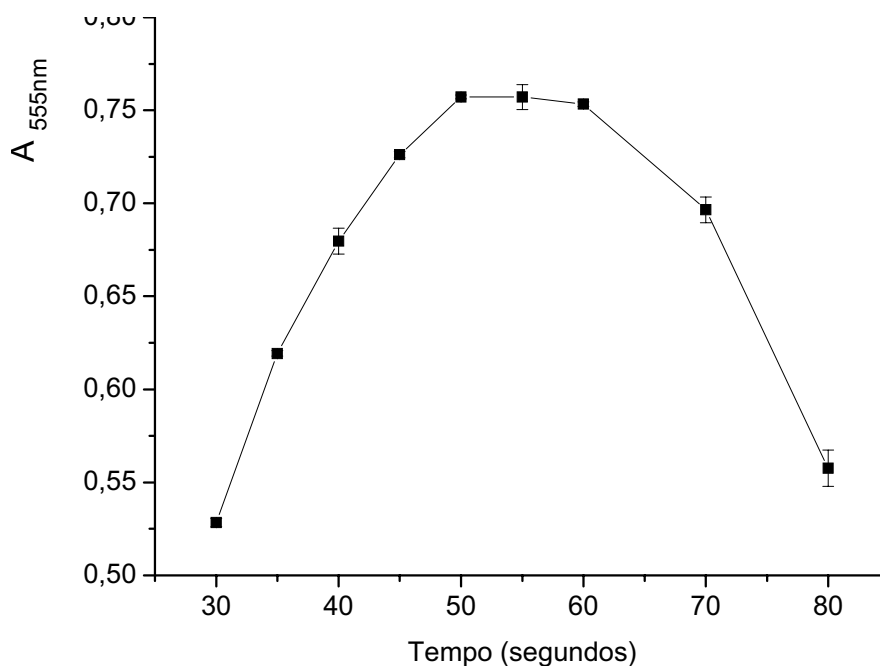


Figura 47. Representação gráfica dos resultados obtidos na otimização do tempo de injeção da amostra para o procedimento FIA com EFS *on-line* no modo univariado.

Os resultados obtidos na otimização univariada do tempo de injeção mostram que entre 50 e 60 segundos de injeção da amostra a magnitude de absorbância em 555nm permanece praticamente inalterada. Após 60 segundos há um decréscimo no valor da absorbância, indicando que o analito deixa de ser totalmente retido na minicoluna de C-18, sendo provavelmente levada junto com o carregador para o descarte. Selecionamos desta forma, o tempo de 50 segundos para injeção da amostra, considerando que com este tempo um valor máximo de absorbância é obtido e simultaneamente há um ganho na frequência analítica. O sistema FIA com a etapa de EFS *on-line* com as condições experimentais otimizadas está representado na Figura 36.

IX. 3.4. Construção das curvas analíticas

IX.3.4.1. Procedimento em fluxo com preparo das amostras não automatizado

Após a otimização do sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) utilizando a sulfonamida – Sulfamezarina como molécula modelo, o sistema desenvolvido foi aplicado para a análise das demais sulfonamidas.

Foram construídas curvas analíticas individuais para todas as sulfonamidas, utilizando o sistema otimizado representado na Figura 36 durante três dias para verificação da repetibilidade. Os valores de absorvância obtidos neste estudo estão apresentados no Anexo 6.

Na Figura 48 são mostradas as curvas analíticas obtidas no estudo de linearidade para cada uma das sulfonamidas estudadas (dados apresentados no Anexo 6). A faixa de concentração em que uma relação linear foi observada entre o valor de $A_{555\text{nm}}$ e a concentração das sulfonamidas foi de $0,050 - 5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e as equações destas curvas estão apresentadas na Tabela 43 bem como os limites de detecção ($LD = 3 SD^{\text{Branco}} / \text{inclinação da reta}$) e de quantificação ($LQ = 10 SD^{\text{Branco}} / \text{inclinação da reta}$) determinados de acordo com as recomendações da IUPAC²⁴⁴.

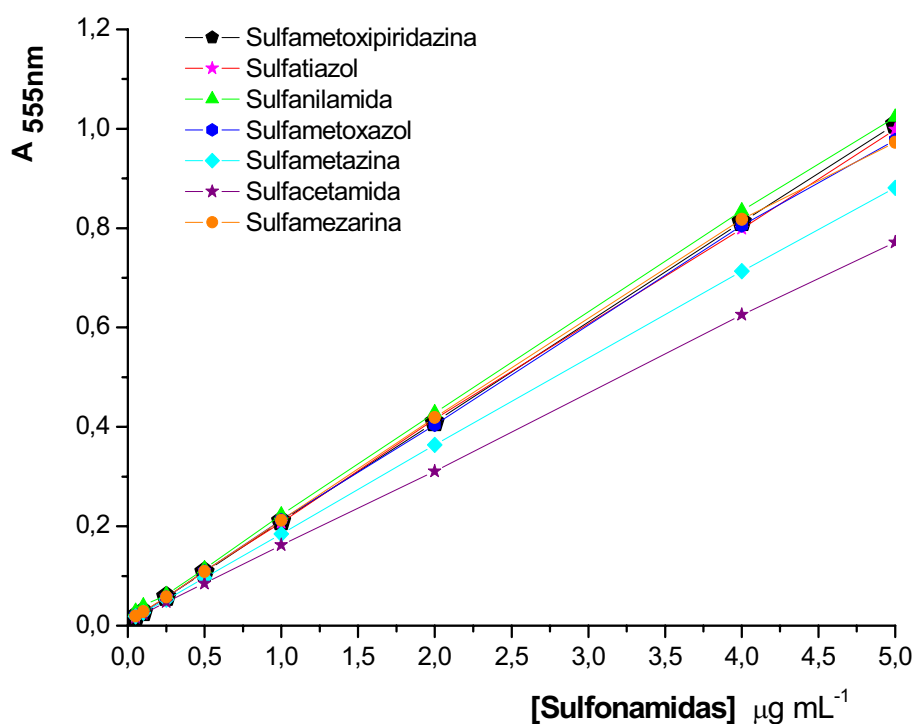


Figura 48. Curvas analíticas para as sulfonamidas estudadas. As concentrações das soluções padrão de sulfonamidas compreendem a faixa de concentração de $0,050$ a $5,00$ ppm. Cada ponto foi analisado em replicatas ($n = 3$).

A Figura 49 representa os sinais transientes obtidos no monitoramento da absorvância em função do tempo durante a construção da curva analítica. Nesta figura são representados os resultados obtidos para a sulfametazina.

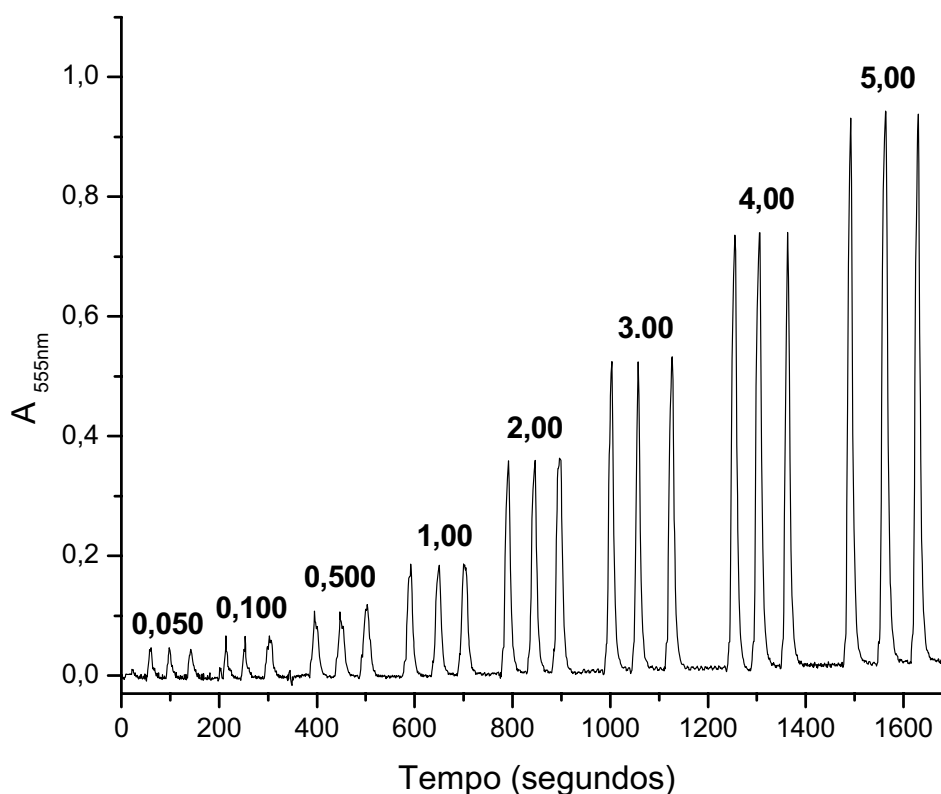


Figura 49. Diagrama obtido no registro dos sinais transientes obtidos no monitoramento da absorvância em 555 nm em função do tempo durante a construção da curva analítica para sulfametazina. Da esquerda para direita são apresentados os valores de concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 43. Relação linear observada para cada uma das sulfonamidas estudadas pelo procedimento FIA desenvolvido para o *screening* com tratamento das amostras não automatizado.

| Sulfonamida | Equação da reta ($y = a + bx$) ^a | r^2 | LD ^b (ppb) | LQ ^c (ppb) |
|----------------------|---|--------|-----------------------|-----------------------|
| Sulfadipiridazina | $y = 7,252 \times 10^{-3} + 0,2024 x$ | 0,9999 | 9,6 | 32,0 |
| Sulfatiazol | $y = 1,002 \times 10^{-2} + 0,1980 x$ | 0,9999 | 9,9 | 33,0 |
| Sulfametazina | $y = 9,858 \times 10^{-3} + 0,1751 x$ | 0,9999 | 11,1 | 36,9 |
| Sulfamezarina | $y = 1,318 \times 10^{-2} + 0,1962 x$ | 0,9994 | 9,9 | 33,0 |
| Sulfacetamida sódica | $y = 8,330 \times 10^{-3} + 0,1547 x$ | 0,9999 | 12,6 | 42,0 |
| Sulfametoxazol | $y = -1,373 \times 10^{-2} + 0,1978 x$ | 0,9999 | 9,9 | 33,0 |
| Sulfanilamida | $y = -1,267 \times 10^{-2} + 0,2066 x$ | 0,9999 | 9,4 | 31,3 |

^a y = absorvância em 555nm, a = coeficiente linear, b = coeficiente angular e x = concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

^b LD = limite de detecção;

^c LQ = limite de quantificação.

IX.3.4.2. Procedimento em fluxo acoplado a extração em fase sólida para o preparo das amostras automatizado

Para a aplicação do sistema de *screening* em amostras complexas como urina, águas superficiais e leite bovino, a etapa de preparo de amostras é indispensável para garantir a obtenção de resultados fidedignos.

Neste sentido, a extração em fase sólida (EFS) é uma ferramenta interessante, pois pode ser automatizada após alguns ajustes das condições experimentais. Neste trabalho, esta estratégia foi adotada e otimizada para análise de amostras de urina e águas superficiais. As amostras de leite não apresentaram resultados satisfatórios e por este motivo só puderam ser adequadamente analisadas empregando a extração em fase sólida convencional, utilizando cartucho de C-18 e eluição em metanol, após precipitação e separação das proteínas constituintes da matriz.

Utilizando o sistema em fluxo acoplado a EFS novo estudo de linearidade para a sulfacetamida (sulfa selecionada anteriormente para o *screening*) foi efetuado para a análise das amostras. Os valores de absorvância obtidos neste estudo estão apresentados no Anexo 7.

Na Figura 50 é apresentada uma curva analítica obtida neste estudo. A faixa de concentração em que uma relação linear foi observada entre o valor de $A_{555\text{nm}}$ e a concentração das sulfonamidas foi de 0,050 – 8,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A relação matemática que representa esta curva é dada pela equação: $A_{555\text{nm}} = 0,02858 (\pm 0,0013) + 0,09627 (\pm 4,9 \times 10^{-4}) \times C$, onde C = concentração de sulfacetamida sódica em $\mu\text{g mL}^{-1}$, com coeficiente de correlação de 0,999.

A Figura 51 representa os sinais transientes obtidos no monitoramento da absorvância em função do tempo durante a construção da curva analítica. Nesta figura são representados os resultados obtidos para a sulfametazina.

Os limites de detecção ($LD = 3 \text{ SD}^{\text{Branco}} / \text{inclinação da reta}$) e de quantificação ($LQ = 10 \text{ SD}^{\text{Branco}} / \text{inclinação da reta}$) determinados de acordo com as recomendações da IUPAC²⁴⁴ foram de 13,9 ng mL^{-1} e 46,3 ng mL^{-1} , respectivamente.

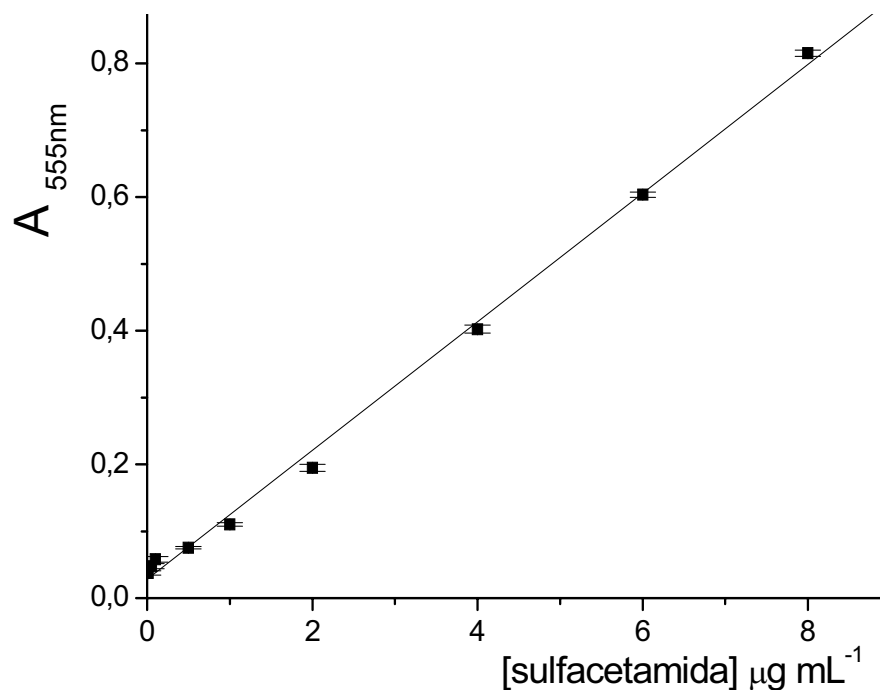


Figura 50. Curva analítica com medidas de triplica obtidas para sulfacetamida sódica pelo procedimento em fluxo acoplado a EFS.

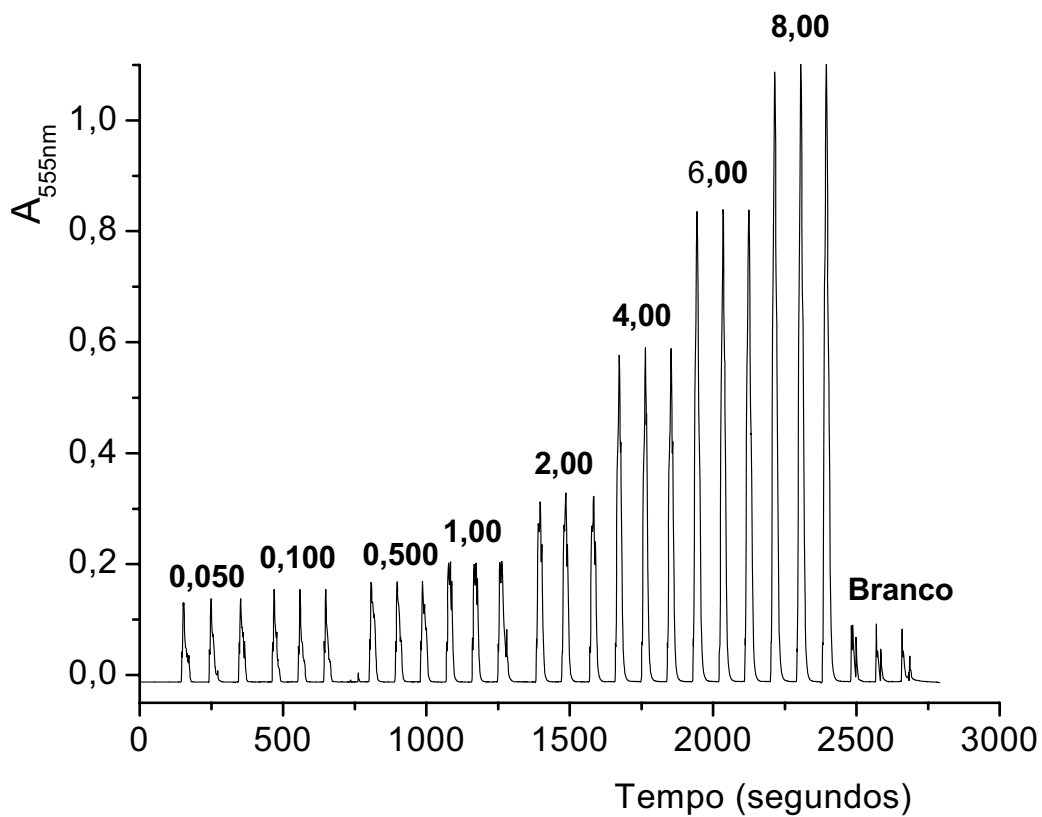


Figura 51. Diagrama obtido no registro dos sinais transientes obtidos no monitoramento da absorbância em 555 nm em função do tempo durante a construção da curva analítica para sulfacetamida sódica. Valores de concentração dados em $\mu\text{g mL}^{-1}$. As medidas foram feitas em triplicata e as últimas referem-se à medida do branco.

IX.3.5. Screening de sulfonamidas em água fortificada com os analitos

Para verificação da aplicabilidade do sistema de screening, várias amostras fortificadas (preparadas pela adição de soluções padrão dos analitos em água) em diferentes concentrações de mistura de sulfonamidas foram analisadas pelo procedimento de FIA desenvolvido. A concentração de corte foi definida como 100 ppb (correspondente ao limite máximo de resíduo permitido)²³.

Um importante requisito para a determinação do conteúdo total de sulfonamidas em uma amostra utilizando o sinal analítico (fiagrama - absorbância em 555nm em função do tempo de análise), é que todas as sulfonamidas apresentem resposta semelhante¹⁹³.

Em nosso estudo observou-se que todas as sulfonamidas investigadas mostraram absorção máxima em 555 nm. Entretanto, pequenas diferenças na sensibilidade foram observadas quando comparados os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas (Tabela 43).

Para classificar uma amostra em positiva ou negativa de acordo com a concentração de corte (100 ppb) é preciso definir qual é o melhor procedimento a ser seguido. Desta forma, assumir que todos os analitos apresentam sinal semelhante àquele de maior sensibilidade pode conduzir a resultados falsos negativos. De outro lado assumir que todos respondem de forma semelhante àquele analito de menor sensibilidade, resultados falsos negativos são evitados. Obviamente, falsos positivos podem ser obtidos, entretanto, isto não seria preocupante do ponto de vista de garantir a segurança para a saúde do consumidor, uma vez que estas amostras seriam encaminhadas para análises confirmatórias.

Selecionou-se então a curva analítica obtida para a sulfacetamida sódica (Tabela 43) para efetuar a classificação das amostras, pois falsos negativos seriam minimizados nesta condição.

Um resultado é considerado como falso negativo quando uma amostra enriquecida com uma concentração do analito maior que 100 ng mL⁻¹ apresenta resposta correspondente a uma concentração menor do que este valor. Já um resultado falso positivo é definido quando a amostra enriquecida com concentração menor que 100 ng mL⁻¹, apresenta resposta equivalente a uma concentração maior

do que este valor. Para tanto, um estudo sistemático foi conduzido com análise em cinco níveis de concentração: 50, 75, 100, 150 e 200 ng mL⁻¹ (Anexo 1 – Tabelas de 1 a 5).

Na concentração de corte (100 ng mL⁻¹) foram analisadas 127 amostras (equivalente a misturas de todas as combinações possíveis de sulfonamidas em concentrações iguais, de forma que a concentração total fosse 100 ng mL⁻¹). Para cada um dos demais níveis de concentração foram analisadas 43 amostras selecionadas dentre as 127 combinações possíveis. No total, foram analisadas 299 amostras e os resultados obtidos neste estudo estão apresentados nas Tabelas 1 a 5 (Anexo 1).

IX.3.5.1. Confiabilidade do sistema de screening desenvolvido

IX.3.5.1.1. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

Este estudo teve por objetivo confirmar o resultado obtido nas análises pelo sistema de *screening*. Para tanto, das 299 amostras analisadas pelo método de *screening* desenvolvido somente 15 apresentaram resultados positivos ou negativos e estas foram então, analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta para confirmar estes resultados obtidos além de possibilitar a quantificação de cada uma das sulfonamidas presentes na amostra.

Empregou-se o método cromatográfico descrito na literatura¹³, fazendo-se uma pequena modificação no fluxo da fase móvel que foi reduzido de 1,0 mL min⁻¹ para 0,6 mL min⁻¹. O método originalmente foi proposto para a separação e quantificação de seis sulfonamidas em amostras de mel. Dentre as sulfonamidas analisadas no trabalho original, cinco foram utilizadas neste trabalho (sulfacetamida, sulfatiazol, sulfametaxozol, sulfametoxipiridazina, e sulfamezarina). No presente trabalho, além destas cinco sulfonamidas, a separação e quantificação de sulfametazina e sulfanilamida também foi efetuada com resultados satisfatórios como mostra a Figura 52.

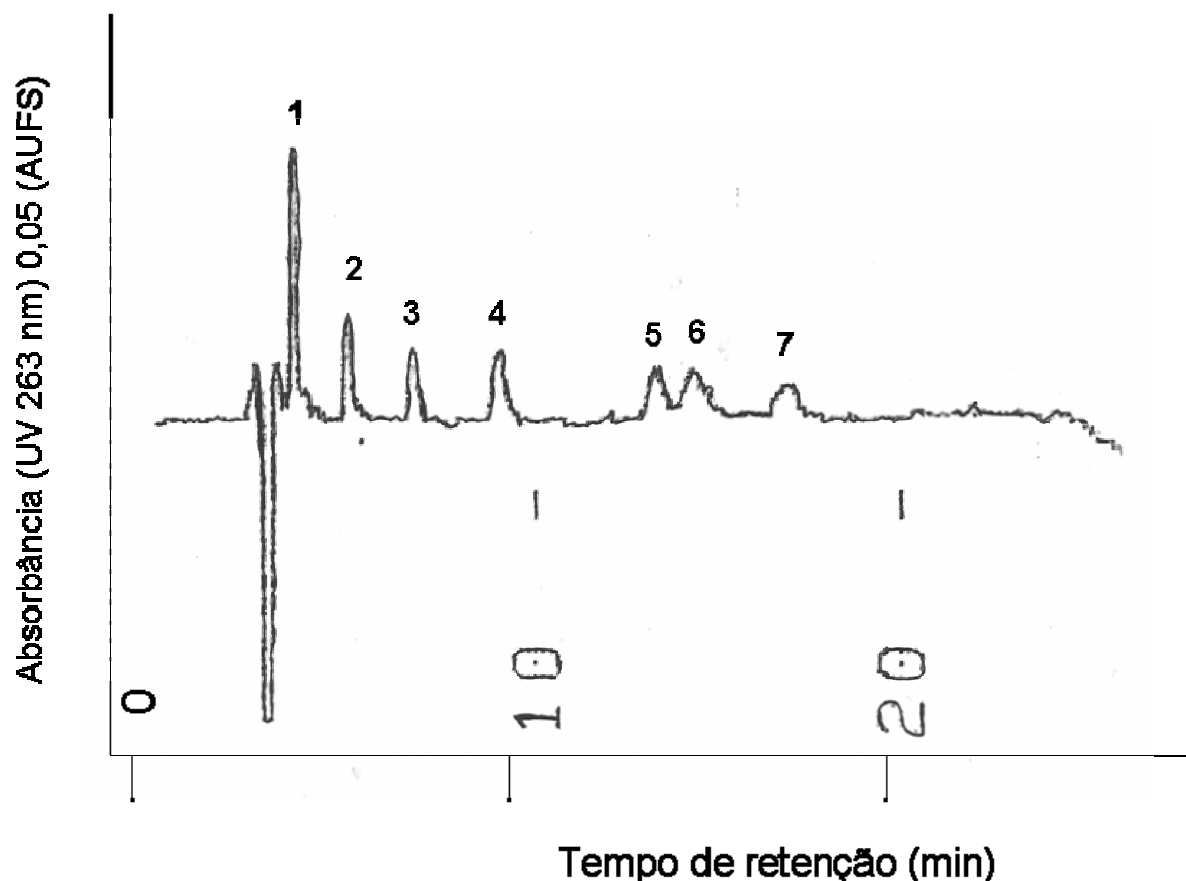


Figura 52. Cromatograma obtido para a separação das sulfonamidas estudadas neste trabalho utilizando as condições descritas no procedimento experimental. Concentração individual para as sulfas é de 20 ng mL^{-1} : 1: sulfanilamida; 2: sulfacetamida sódica; 3: sulfatiazol; 4: Sulfamezarina; 5: sulfametazina; 6: sulfametoxipiridazina e 7: sulfametoxazol.

IX.3.5.2.1.1. Construção das curvas analíticas pelo método cromatográfico

Para a quantificação individual das sulfonamidas foram construídas curvas analíticas colocando-se em gráfico os valores de área do pico obtido versus a concentração de sulfonamida. Verificou-se uma relação linear para todas as sulfonamidas estudadas no intervalo de concentração de $0,010$ a $0,170 \mu\text{g mL}^{-1}$. A Figura 53 representa as curvas analíticas obtidas pelo método de CLAE-UV. Os valores de área obtidos para os picos registrados no sistema cromatográfico apresentados no Anexo 8.

Na Tabela 44 estão representadas as equações matemáticas que representam a relação linear obtida para cada um dos analitos estudados.

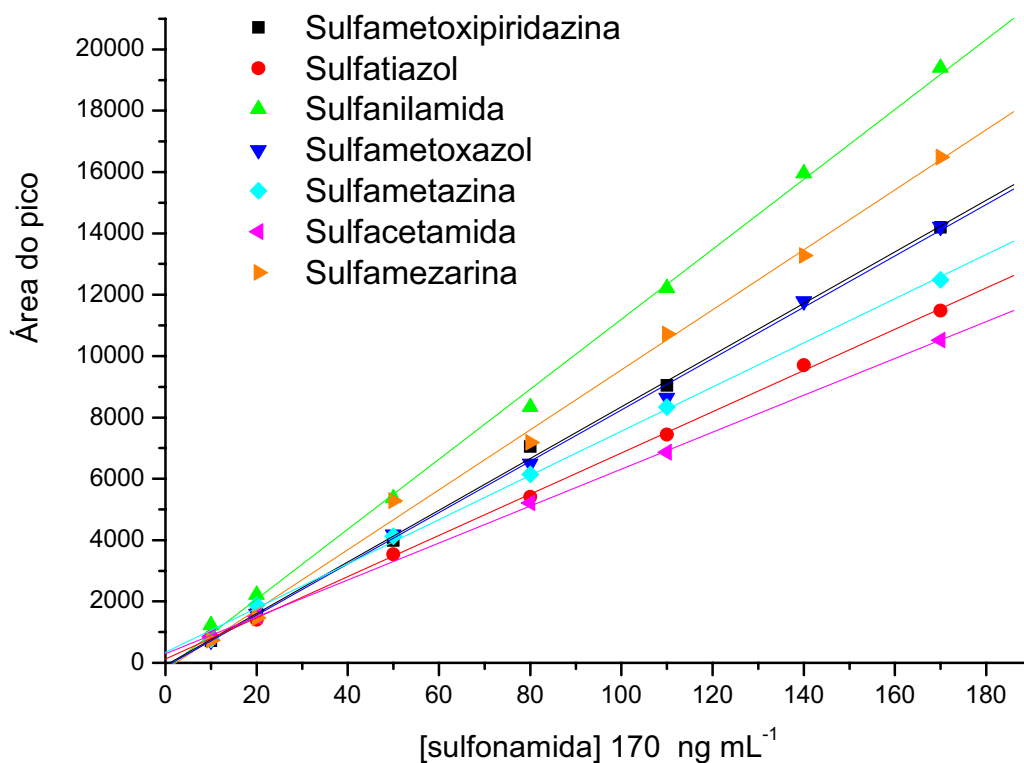


Figura 53. Curvas analíticas obtidas pelo método CLAE-UV para soluções padrão de sulfonamidas na faixa de concentrações de 10,0 a 170,0 ng mL^{-1} .

Tabela 44. Relação linear observada para cada uma das sulfonamidas estudadas pelo procedimento de CLAE utilizado para as medidas de quantificação.

| Sulfonamida | Equação da reta ($y = a + bx$) [*] | r^2 |
|----------------------|---|--------|
| Sulfadipiridazina | $y = -84,45 + 85,29 x$ | 0,9992 |
| Sulfatiazol | $y = 118,4 + 67,23 x$ | 0,9997 |
| Sulfametazina | $y = -212,2 + 114,1 x$ | 0,9990 |
| Sulfamezarina | $y = -127,7 + 83,73 x$ | 0,9991 |
| Sulfacetamida sódica | $y = 338,7 + 72,11 x$ | 0,9992 |
| Sulfametoxazol | $y = 294,0 + 60,19 x$ | 0,9999 |
| Sulfanilamida | $y = -230,0 + 97,83 x$ | 0,9993 |

* y = Área do pico, a = coeficiente linear, b = coeficiente angular e x = concentração em ng mL^{-1} .

IX.3.5.3. Definição da percentagem de falsos resultados fornecidos pelo método de screening

As amostras analisadas pelo método de *screening* desenvolvido (299 amostras) e que apresentaram resultados falsos (positivos ou negativos) foram apenas quinze (Anexo 1, Tabelas de 1 a 5). Para confirmar estes resultados e definir a percentagem de falsos resultados apresentadas pelo *screening* estas quinze amostras foram analisadas por CLAE-UV e os resultados encontram-se apresentados na Tabela 45.

Tabela 45. Resultados obtidos na análise confirmatória – CLAE das amostras falsas (positivas e negativas) obtidas pela análise no procedimento de *screening*.

| Amostra | Resultado Screening | [SFA] total (ng mL ⁻¹) | Método CLAE | | | | | | | [Sulfonamida] total encontrada (ng mL ⁻¹) |
|-----------------|---------------------|------------------------------------|--|------|------|------|------|------|------|---|
| | | | [Sulfonamidas] encontrada individualmente (ng mL ⁻¹) | | | | | | | |
| | Resposta | | A | B | C | D | E | F | G | |
| 1 ^a | Positiva | 102,3 | 10,0 | - | 10,1 | 9,8 | 9,9 | - | 10,1 | 49,9 |
| 2 ^a | Positiva | 105,8 | 25,6 | - | 25,5 | - | - | - | 25,1 | 76,2 |
| 3 ^a | Positiva | 107,4 | - | - | - | - | - | - | 99,9 | 99,9 |
| 4 ^b | Negativa | 81,1 | 33,2 | 32,8 | - | - | 33,5 | - | - | 99,5 |
| 5 ^b | Negativa | 86,9 | 32,7 | - | 33,2 | 32,8 | - | - | - | 98,7 |
| 6 ^b | Negativa | 81,2 | 33,0 | - | - | 33,4 | 33,1 | - | - | 99,5 |
| 7 ^b | Negativa | 81,2 | - | 32,1 | 33,4 | - | - | 32,0 | - | 97,5 |
| 8 ^a | Positiva | 113,7 | - | - | - | - | 33,3 | 33,8 | 34,5 | 101,6 |
| 9 ^a | Positiva | 109,3 | 25,0 | 25,9 | - | 26,9 | - | - | 26,4 | 104,2 |
| 10 ^b | Negativa | 88,8 | - | 23,5 | 25,8 | 24,4 | - | 25,5 | - | 99,2 |
| 11 ^a | Positiva | 111,5 | - | - | 25,5 | 26,0 | - | 25,3 | 25,9 | 102,7 |
| 12 ^b | Negativa | 86,8 | 20,0 | 20,5 | 19,9 | 19,3 | 20,3 | - | - | 100,0 |
| 13 ^b | Negativa | 90,6 | - | 20,6 | - | 20,7 | 19,5 | 18,0 | 20,2 | 99,0 |
| 14 ^a | Positiva | 105,5 | 21,2 | 15,3 | 16,9 | - | 16,6 | 16,3 | 16,2 | 102,5 |
| 15 ^a | Positiva | 107,3 | - | 16,4 | 16,5 | 16,9 | 17,1 | 16,1 | 17,6 | 100,6 |

^a Amostra correspondente a mistura de sulfonamidas destacado em azul no anexo 4.

^b Amostra correspondente a mistura de sulfonamidas destacado em amarelo no anexo 4.

A = Sulfadipiridazina;

B = Sulfatiazol;

C = Sulfametazina;

D = Sulfamezarina;

E = Sulfacetamida sódica;

F = Sulfametoxazol;

G = Sulfanilamida.

A Figura 54 representa a porcentagem de falsos resultados obtidos na qual é possível constatar que a porcentagem de falsos resultados foi baixa. Estes resultados refletem a excelente aplicabilidade do método desenvolvido.

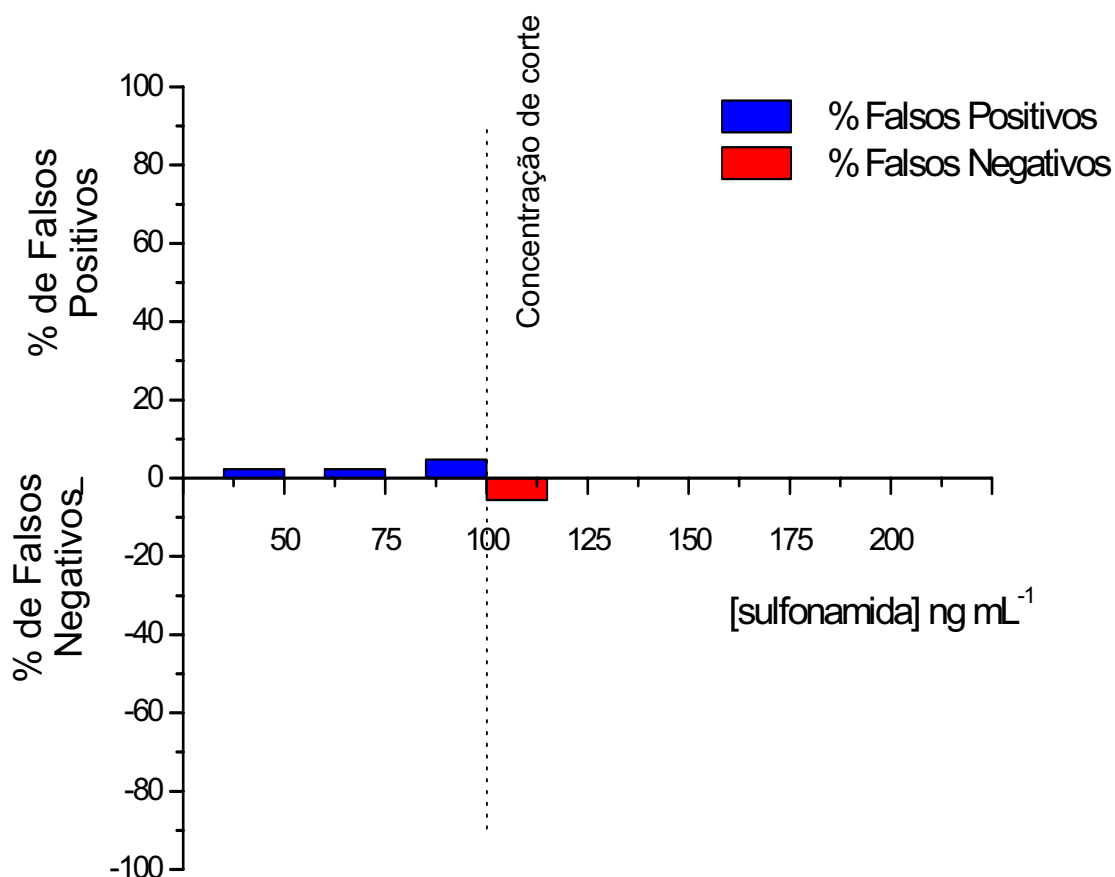


Figura 54. Porcentagem de falsos positivos e falsos negativos obtidos no screening de sulfonamidas em amostras aquosas sintéticas.

Foram obtidos falsos resultados somente nas concentrações menores (50 e 75 ng mL⁻¹) e na própria concentração de corte (100 ng mL⁻¹). Obtiveram-se 5,56 % de resultados falsos negativos, ou seja, das 127 amostras analisadas no nível de concentração 100 ng mL⁻¹ apenas sete amostras deram um resultado negativo. Esta porcentagem é considerada baixa para um sistema de screening e demonstra que o método desenvolvido pode ser utilizado com confiabilidade.

A obtenção de falsos resultados é especialmente importante para os resultados falsos negativos, uma vez que de acordo com a prática usual, estas amostras não seriam analisadas pelos métodos de confirmação, apesar de na realidade conterem resíduos das sulfonamidas em níveis de concentração acima dos tolerados. A obtenção de resultados falsos positivos, não seria tão problemática considerando que estas amostras devem ser submetidas aos experimentos confirmatórios antes de, por exemplo, serem liberadas para uso.

Entretanto, neste estudo, a porcentagem de falsos positivos obtida foi baixa, sendo de 2,33% para os níveis de concentração de 50 e 75 ng mL⁻¹ (equivalente a uma amostra dentre as 43 analisadas em cada um dos níveis de concentração) e 4,72 % na concentração de corte (equivalente a seis amostras do total de 127 amostras). Estas porcentagens também são consideradas baixas num sistema de screening e novamente evidenciam a aplicabilidade do método desenvolvido com confiabilidade dos resultados.

IX.3.6. Aplicação do procedimento em fluxo para sulfonamidas em amostras reais

IX.3.6.1. Screening em amostras de urina

As sulfonamidas após administração aos pacientes são absorvidas estabelecendo níveis terapêuticos de 500 – 1000 mg L⁻¹ na urina¹²⁷. A aplicação do procedimento em fluxo desenvolvido na análise de amostras de urina diretamente não é possível devido aos componentes da matriz que podem interferir nas medidas, principalmente a uréia que reage com o *p*-DAC. Deste modo, para uma análise precisa e exata a separação dos interferentes da matriz antes das análises é indispensável.

A determinação de SFAs em urina foi efetuada adotando para o preparo das amostras a técnica de EFS, tanto no modo convencional (*off-line*) como acoplada ao sistema de fluxo (*on-line*). É importante observar que os níveis de concentração em que as SFAs podem ser encontradas na urina são muito superiores àqueles que este método permite analisar. Portanto, a etapa de EFS não teve por objetivo pré-concentrar os analitos, e sim, eliminar os interferentes da matriz.

Os resultados obtidos em ambos os procedimentos estão apresentados na Tabela 46. Os resultados foram muito bons para os dois modos de preparo de amostras. Entretanto, a aplicação do modo de EFS *on-line* apresenta as vantagens de maior rapidez das análises, recuperações mais próximas de 100%. Isto se dá possivelmente ao fato de que no modo *off-line* podem ocorrer perdas do analito durante as etapas de retenção/eluição e reconstituição do resíduo.

Tabela 46. Resultados de recuperação de sulfonamidas obtidos na aplicação do sistema de *screening* em amostra de urina.

| SFA | [SFA] | EFS <i>off-line</i> | | EFS <i>on-line</i> | |
|----------------------|---|--|-----------------------|--|-----------------------|
| | adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | [SFA] recuperada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a | Rec. (%) ^a | [SFA] recuperada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a | Rec. (%) ^a |
| SFC | 0,50 | 0,46 ± 0,01 | 92,0 ± 2,0 | 0,48 ± 0,01 | 96,0 ± 2,0 |
| | 1,00 | 0,93 ± 0,03 | 93,0 ± 3,0 | 0,99 ± 0,04 | 99,0 ± 4,0 |
| | 2,00 | 1,93 ± 0,05 | 96,5 ± 2,5 | 1,97 ± 0,07 | 98,5 ± 3,5 |
| | 4,00 | 3,87 ± 0,03 | 96,8 ± 0,8 | 3,94 ± 0,11 | 98,5 ± 2,8 |
| | 6,00 | 5,80 ± 0,08 | 95,0 ± 1,3 | 5,93 ± 0,08 | 98,8 ± 1,4 |
| SFMz | 0,50 | 0,45 ± 0,02 | 90,0 ± 4,0 | 0,47 ± 0,01 | 94,0 ± 2,0 |
| | 1,00 | 0,93 ± 0,02 | 93,0 ± 2,0 | 0,98 ± 0,03 | 98,0 ± 3,0 |
| | 2,00 | 1,90 ± 0,04 | 95,0 ± 2,0 | 1,95 ± 0,05 | 97,5 ± 2,5 |
| | 4,00 | 3,85 ± 0,06 | 96,6 ± 2,0 | 3,89 ± 0,07 | 97,3 ± 1,8 |
| | 6,00 | 5,81 ± 0,09 | 96,8 ± 1,5 | 5,90 ± 0,05 | 98,8 ± 1,4 |
| Mistura ^b | 0,50 | 0,47 ± 0,01 | 94,0 ± 2,0 | 0,48 ± 0,01 | 96,0 ± 2,0 |
| | 1,00 | 0,95 ± 0,02 | 95,0 ± 2,0 | 0,98 ± 0,02 | 98,0 ± 2,0 |
| | 2,00 | 1,93 ± 0,07 | 97,2 ± 3,7 | 1,96 ± 0,04 | 96,0 ± 2,0 |
| | 4,00 | 3,89 ± 0,05 | 97,3 ± 1,3 | 3,91 ± 0,09 | 97,8 ± 2,3 |
| | 6,00 | 5,88 ± 0,09 | 98,0 ± 1,5 | 5,94 ± 0,17 | 99,0 ± 2,8 |

SFC = sulfacetamida e SFMz = sulfametoxazol

^a Média ± desvio padrão de 3 determinações

^b A concentração total refere-se à soma de quantidades iguais das sete SFA.

IX.3.6.2. Screening em amostras de águas superficiais

A aplicação do procedimento em fluxo desenvolvido na análise de amostras de águas superficiais diretamente não é recomendada devido à possibilidade de interferência de matriz, uma vez que o conteúdo de matéria orgânica dissolvida é bastante variado e complexo. Assim, da mesma forma como a análise de urina, a separação dos interferentes da matriz antes das análises é indispensável.

A determinação de SFAs em águas superficiais (dois rios do estado de São Paulo) foi efetuada adotando a técnica de EFS para o preparo das amostras, tanto no modo convencional (*off-line*) como acoplada ao sistema de fluxo (*on-line*). Os resultados obtidos em ambos os procedimentos estão apresentados na Tabela 47.

Tabela 47. Resultados de recuperação de sulfonamidas obtidos na aplicação do sistema de *screening* em amostras de águas superficiais.

| Amostra | [SFA] adicionada (ppb) ^a | EFS <i>off-line</i> | | EFS <i>on-line</i> | |
|---------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| | | [SFA] recuperada (ppb) ^b | Rec. (%) ^b | [SFA] recuperada (ppb) ^b | Rec. (%) ^b |
| Rio A | 50 | 47,0 ± 0,9 | 94,0 ± 1,8 | 47,9 ± 1,1 | 95,8 ± 2,2 |
| | 100 | 94,0 ± 2,5 | 94,0 ± 2,5 | 94,7 ± 2,3 | 94,7 ± 2,3 |
| | 200 | 190,7 ± 3,5 | 95,4 ± 1,8 | 196,7 ± 0,8 | 98,4 ± 0,4 |
| | 400 | 386,3 ± 5,8 | 96,6 ± 1,5 | 396,7 ± 7,7 | 99,2 ± 1,9 |
| | 800 | 768,0 ± 6,3 | 96,0 ± 0,8 | 784,0 ± 5,6 | 98,0 ± 0,7 |
| Rio B | 50 | 46,1 ± 0,3 | 92,2 ± 0,6 | 47,3 ± 0,4 | 94,6 ± 0,7 |
| | 100 | 93,5 ± 1,8 | 93,5 ± 1,8 | 95,1 ± 0,9 | 95,1 ± 0,9 |
| | 200 | 184,3 ± 1,4 | 92,2 ± 0,7 | 191,0 ± 0,8 | 95,5 ± 0,4 |
| | 400 | 385,0 ± 6,0 | 96,3 ± 1,5 | 393,6 ± 2,4 | 98,4 ± 0,6 |
| | 800 | 781,9 ± 8,0 | 97,7 ± 1,0 | 791,3 ± 3,6 | 98,9 ± 0,4 |

^a A concentração total refere-se a soma de quantidades iguais das sete SFA.

^b Média ± desvio padrão de 3 determinações

Os resultados da Tabela 47 também foram muito bons para os dois modos de preparo de amostras. Entretanto, novamente a aplicação do modo de EFS *on-line* apresenta as vantagens de maior rapidez das análises, recuperações mais próximas de 100% pelos mesmos motivos discutidos nos resultados obtidos na análise de urina.

IX.3.6.3. Screening em amostras de leite

A análise de amostras de leite é a mais complicada devido a maior complexidade da matriz. Neste tipo de amostra, é necessário primeiramente separar as proteínas. Isto é realizado, normalmente pela precipitação com ácido e/ou solventes orgânicos^{27,28} para na seqüência empregar a EFS e só depois efetuar a análise propriamente dita.

Testes foram realizados em nosso laboratório com intuito de empregar a EFS no modo *on-line* para o preparo das amostras. A injeção direta de amostras de leite fortificadas com os analitos não foi possível devido à precipitação das proteínas em linha. Isto causa o entupimento dos canais no sistema em fluxo.

Como estratégia, testamos então, efetuar a precipitação prévia das proteínas e injetar o sobrenadante. Para a precipitação com solvente orgânico, testamos o uso de metanol, acetonitrila e acetato de etila. Para os dois primeiros solventes, o sobrenadante obtido não era completamente límpido. O sobrenadante obtido na precipitação com acetato de etila foi o mais límpido, entretanto, os resultados também não foram promissores em nenhum dos casos. Possivelmente ao efetuarmos a precipitação das proteínas em meio orgânico houve incompatibilidade do solvente orgânico com o meio aquoso adotado no sistema em fluxo, resultando em sinais analíticos com desdobramento e baixa reprodutibilidade. A etapa de limpeza da minicoluna provavelmente teria que ser efetuada por tempos maiores para a remoção completa da matriz, entretanto, isto implicaria em diminuição na frequência analítica.

Devido aos resultados insatisfatórios obtidos na precipitação em meio orgânico, testamos a precipitação das proteínas em meio ácido²⁷ utilizando solução de HCl 1 mol L⁻¹. Neste caso, os sinais analíticos registrados não mostraram mais os desdobramentos dos picos. Porém, a intensidade dos picos foi muito acima da

esperada, demonstrando uma forte interferência, provavelmente pela baixa eficiência na eliminação das proteínas.

Seria necessário um estudo mais detalhado para o aprimoramento das condições para a aplicação da EFS diretamente no sistema em fluxo. Entretanto, devido a falta de tempo para tal estudo, o preparo de amostras utilizando a EFS foi realizado adotando o modo *off-line*, o qual já é bem documentado na literatura²⁸. Apesar da etapa de EFS convencional ser um pouco mais demorada, o método desenvolvido neste trabalho não deixa de ser uma alternativa muito vantajosa para o seu emprego no *screening* de SFAs.

Os resultados obtidos neste estudo foram muito bons e estão apresentados na Tabela 48.

Tabela 48. Resultados de recuperação de sulfonamidas obtidos na aplicação do sistema de *screening* em amostras de leite.

| Amostra | [SFA] adicionada (ppb) ^a | EFS <i>off-line</i> | |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| | | [SFA] recuperada (ppb) ^b | Rec. (%) ^b |
| Leite Italc integral | 50 | 47,7 ± 0,7 | 95,4 ± 1,3 |
| | 100 | 96,1 ± 0,3 | 96,1 ± 0,3 |
| | 200 | 200,4 ± 3,2 | 100,2 ± 1,6 |
| | 400 | 398,2 ± 0,6 | 99,5 ± 0,1 |
| | 800 | 801,1 ± 3,9 | 100,2 ± 0,5 |
| Leite Italc desnatado | 50 | 47,1 ± 0,7 | 94,3 ± 1,4 |
| | 100 | 96,5 ± 1,4 | 96,5 ± 1,4 |
| | 200 | 194,5 ± 0,8 | 97,3 ± 0,4 |
| | 400 | 379,9 ± 3,3 | 95,0 ± 0,9 |
| | 800 | 797,6 ± 3,8 | 99,7 ± 0,5 |
| Leite Jussara integral | 50 | 47,1 ± 1,4 | 94,2 ± 2,7 |
| | 100 | 96,2 ± 0,2 | 96,2 ± 0,2 |
| | 200 | 194,1 ± 0,8 | 97,0 ± 0,4 |
| | 400 | 379,7 ± 3,3 | 94,9 ± 0,9 |
| | 800 | 798,1 ± 1,0 | 99,8 ± 0,1 |
| Leite Jussara desnatado | 50 | 46,4 ± 0,7 | 92,8 ± 1,3 |
| | 100 | 96,5 ± 0,9 | 96,5 ± 0,9 |
| | 200 | 189,3 ± 4,5 | 94,7 ± 2,3 |
| | 400 | 384,9 ± 1,9 | 96,2 ± 0,5 |
| | 800 | 795,1 ± 0,4 | 99,4 ± 0,1 |
| Leite Batavo integral | 50 | 47,1 ± 0,3 | 94,1 ± 0,5 |
| | 100 | 94,4 ± 0,7 | 94,4 ± 0,7 |
| | 200 | 193,8 ± 0,2 | 96,9 ± 0,1 |
| | 400 | 379,7 ± 2,0 | 94,9 ± 0,5 |
| | 800 | 789,7 ± 3,8 | 98,7 ± 0,5 |
| Leite Batavo desnatado | 50 | 46,6 ± 0,8 | 92,9 ± 1,4 |
| | 100 | 96,5 ± 2,6 | 96,5 ± 2,6 |
| | 200 | 191,5 ± 3,3 | 95,8 ± 1,7 |
| | 400 | 381,0 ± 0,9 | 95,2 ± 0,3 |
| | 800 | 783,7 ± 9,2 | 98,0 ± 1,2 |

^a A concentração total refere-se a soma de quantidades iguais das sete SFA.

^b Média ± desvio padrão de 3 determinações.

IX.3.6.4. Aplicação do procedimento em fluxo para determinação de sulfas em formulações farmacêuticas

O procedimento de FIA desenvolvido foi aplicado como método quantitativo para a determinação de sulfacetamida e sulfametoxazol em formulações farmacêuticas adquiridas em farmácias locais (Tabela 31). Estas amostras não necessitam da etapa de EFS, sendo o preparo das amostras constituído apenas por dissolução e diluição como descrito no item IX.2.3.1. para o preparo das amostras de medicamentos.

Como não foram observadas interferências de matriz, a análise de formulações farmacêuticas foi efetuada sem a necessidade de etapas de preparo das amostras para separação prévia dos analitos. As amostras requerem apenas dissolução adequada e diluição para uma concentração compatível com a curva analítica. Os resultados obtidos pela aplicação do método em fluxo desenvolvido foram muito bons e estão apresentados na Tabela 49.

Tabela 49. Resultados obtidos na análise de medicamentos a base de sulfas pelo procedimento FIA desenvolvido.

| Amostras | Conteúdo nominal | Método proposto Encontrado | t ^d (2,78) | F ^d (19,0) | Método oficial ²⁴⁶ Encontrado |
|------------------------------------|------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| Queimalive (pomada tópica) | 74 ^a | 73,0 ± 0,6 | 1,80 | 4,00 | 73,7 ± 0,3 |
| Paraqueimol (pomada tópica) | 74 ^a | 74,1 ± 0,5 | 0,34 | 1,00 | 74,2 ± 0,5 |
| Isopto cetapred (pomada oftálmica) | 100 ^a | 100,5 ± 0,4 | 1,77 | 3,06 | 101,2 ± 0,7 |
| Isopto cetapred (suspensão) | 100 ^b | 100,9 ± 0,8 | 0,64 | 1,78 | 103,9 ± 0,6 |
| Sulnil (suspensão) | 100 ^b | 100,9 ± 0,6 | 2,06 | 2,25 | 100,8 ± 0,4 |
| Sulfametoxazol (suspensão oral) | 40 ^b | 41,2 ± 0,7 | 0,68 | 5,44 | 40,8 ± 0,3 |

^a mg por grama;

^b mg por mL;

^c n = 3;

^d P = 0,05– 95% de significância com (n – 2) graus de liberdade.

IX.3.6.4.1. Validação do método em fluxo para análise de formulações farmacêuticas

A precisão e exatidão do método proposto foram avaliadas através da aplicação dos testes F e t, respectivamente²³⁶. Para tanto os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com àqueles obtidos pela aplicação dos métodos oficiais descritos na farmacopéia americana²⁴⁶. Em todas as amostras analisadas os valores obtidos pelo método proposto mostraram-se em boa concordância com os obtidos pelo método de referência. Os valores de F e t calculados não excederam os valores tabelados, indicando desta forma a precisão e exatidão do método desenvolvido, com um nível de confiança de 95%.

Para avaliação da precisão intradia foram realizadas análises (n = 10) para soluções de uma mesma amostra contendo o equivalente a 0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfacetamida e para estudo da precisão interdia foram executadas análises repetidas, da mesma amostra, durante um período de 5 dias consecutivos. Os resultados obtidos, em termos de coeficiente de variação, foram de 0,7% e 1,3%, evidenciando a boa reprodutibilidade do método desenvolvido.

IX.3.6.4.1.1. Estudos de adição e recuperação

Neste estudo, quantidades conhecidas de sulfacetamida ou sulfametoxazol (padrão analítico) foram adicionadas às amostras pré-analisadas. De acordo com os resultados obtidos (Tabela 50), observou-se que as médias percentuais de recuperação de variaram de 99,0 – 101,4 %, evidenciando novamente a boa exatidão do método proposto, além de mostrar que não há interferência significativa de matriz.

Tabela 50. Resultados de recuperação de sulfonamidas em formulações farmacêuticas.

| Amostra | [Sulfa] adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | [Sulfa] encontrada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | % recuperação |
|-----------------------------|---|---|-------------------------|
| Queimalive | ---- | 1,00 | ---- |
| | 0,50 ^a | 1,49 | 98,0 |
| | 1,00 ^a | 1,99 | 99,0 |
| | 1,50 ^a | 2,49 | 99,3 |
| | 2,00 ^a | 3,99 | 99,5 |
| | | | $\mu^c = 99,0 \pm 0,7$ |
| Paraqueimol | ---- | 0,99 | ---- |
| | 0,50 ^a | 1,49 | 100,0 |
| | 1,00 ^a | 2,00 | 101,0 |
| | 1,50 ^a | 2,50 | 100,7 |
| | 2,00 ^a | 3,02 | 101,5 |
| | | | $\mu^c = 100,8 \pm 0,6$ |
| Isopto cetapred (pomada) | ---- | 1,00 | ---- |
| | 0,50 ^a | 1,51 | 102,0 |
| | 1,00 ^a | 2,00 | 100,0 |
| | 1,50 ^a | 2,48 | 98,7 |
| | 2,00 ^a | 3,00 | 100,0 |
| | | | $\mu^c = 100,2 \pm 1,4$ |
| Isopto cetapred (gotas) | ---- | 1,01 | ---- |
| | 0,50 ^a | 1,52 | 102,0 |
| | 1,00 ^a | 2,02 | 101,0 |
| | 1,50 ^a | 2,52 | 100,7 |
| | 2,00 ^a | 3,05 | 102,0 |
| | | | $\mu^c = 101,4 \pm 0,7$ |
| Sulnil | ---- | 0,99 | ---- |
| | 0,50 ^a | 1,50 | 102,0 |
| | 1,00 ^a | 1,98 | 99,0 |
| | 1,50 ^a | 2,49 | 100,0 |
| | 2,00 ^a | 3,01 | 101,0 |
| | | | $\mu^c = 100,5 \pm 1,3$ |
| Sulfametoxazol | ---- | 1,01 | ---- |
| | 0,50 ^b | 1,51 | 100,0 |
| | 1,00 ^b | 2,02 | 101,0 |
| | 1,50 ^b | 2,54 | 102,0 |
| | 2,00 ^b | 3,01 | 100,0 |
| | | | $\mu^c = 100,8 \pm 1,0$ |

^a Sulfonamida adicionada é sulfacetamida^b Sulfonamida adicionada é sulfametoxazol^c Média \pm desvio padrão de 4 determinações.

IX.3.7. Estudo de interferentes

IX.3.7.1. Interferentes em formulações farmacêuticas

Um estudo de interferentes foi realizado a fim de comprovar a ausência de interferência de matriz na análise de amostras de medicamentos. Para tanto os excipientes comumente encontrados nas formulações farmacêuticas de sulfonamidas foram cuidadosamente estudados.

O efeito de cada excipiente foi considerado como interferência quando o sinal de absorvância apresentou erro maior ou igual a 3 % na determinação do fármaco²³⁹. Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados na Tabela 51. As porcentagens de recuperação variaram de 97,8 a 102,0 % com coeficientes de variação menores que 3% para três repetições. Assim, nenhuma interferência foi constatada a partir destes excipientes, sob as condições estudadas.

Tabela 51. Resultados obtidos no estudo de interferentes em formulações farmacêuticas contendo SFAs.

| Excipientes | SFA: excipiente ^a | | SFA: excipiente ^b | |
|---------------------------------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|
| | Rec. (%) ^c | R.S.D. | Rec. (%) ^c | R.S.D. |
| Estearato de magnésio | 100,7 ± 0,8 | 0,8 | 100,2 ± 0,8 | 0,8 |
| Amido | 101,2 ± 0,9 | 0,9 | 99,0 ± 0,8 | 0,8 |
| Talco | 100,2 ± 0,3 | 0,3 | 101,2 ± 0,8 | 0,8 |
| Sacarina sódica | 100,9 ± 1,6 | 1,6 | 101,8 ± 0,7 | 0,7 |
| Metabissulfito de sódio | 98,5 ± 2,2 | 2,2 | 101,1 ± 0,6 | 0,6 |
| Sacarose | 99,3 ± 1,4 | 1,4 | 100,2 ± 1,0 | 1,0 |
| Lactose | 98,3 ± 0,1 | 0,1 | 98,5 ± 0,5 | 0,5 |
| Sorbitol | 99,0 ± 0,8 | 0,8 | 102,0 ± 1,7 | 1,7 |
| Cafeína | 98,5 ± 0,1 | 0,1 | 100,2 ± 0,8 | 0,8 |
| Dióxido de silício | 97,8 ± 1,2 | 1,2 | 99,0 ± 0,8 | 0,8 |
| Ácido ascórbico | 100,5 ± 0,9 | 0,9 | 101,2 ± 0,8 | 0,8 |
| Polivinilpirrolidona | 101,1 ± 2,0 | 2,0 | 101,8 ± 0,7 | 0,7 |
| Ácido cítrico | 97,8 ± 1,9 | 2,0 | 101,1 ± 0,6 | 0,6 |
| Benzoato de sódio | 98,2 ± 2,6 | 2,6 | 100,2 ± 1,0 | 1,0 |
| Metilcelulose | 98,4 ± 2,8 | 2,8 | 98,5 ± 0,5 | 0,5 |
| K ₂ HPO ₄ | 97,9 ± 1,8 | 1,8 | 99,3 ± 1,4 | 1,4 |

^a Relação de massas para SFAs:excipiente 1:1

^b Relação de massas para SFAs:excipiente 1:10

^c Média ± desvio padrão de 3 determinações.

IX.3.7.2. Interferentes em geral – screening

Um estudo da possível interferência de vários fármacos foi efetuado para examinar a confiabilidade do sistema de *screening* desenvolvido para a análise de SFAs. Os fármacos examinados neste estudo e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 52.

Tabela 52. Resultados obtidos no estudo de interferentes no procedimento de *screening*.

| Excipientes | SFA: excipiente ^a | | SFA: excipiente ^b | |
|----------------------------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|
| | Rec. (%) ^c | R.S.D. | Rec. (%) ^c | R.S.D. |
| Norflaxina | 101,1 ± 0,6 | 0,6 | 99,0 ± 0,8 | 0,8 |
| Ciprofloxacina | 100,2 ± 1,0 | 1,0 | 101,2 ± 0,8 | 0,8 |
| Azitromicina | 98,5 ± 0,5 | 0,5 | 101,8 ± 0,7 | 0,7 |
| Clortalidona | 102,0 ± 1,7 | 1,7 | 101,1 ± 0,6 | 0,6 |
| Ibuprofeno | 100,2 ± 0,8 | 0,8 | 100,2 ± 1,0 | 1,0 |
| Mesalazina | 99,0 ± 0,8 | 0,8 | 98,5 ± 0,5 | 0,5 |
| Captopril | 101,2 ± 0,8 | 0,8 | 98,5 ± 0,5 | 0,5 |
| Ranitidina | 101,8 ± 0,7 | 0,7 | 102,0 ± 1,7 | 1,7 |
| Furosemida | 101,1 ± 0,6 | 0,6 | 100,2 ± 0,8 | 0,8 |
| Hidroclorotiazida | 100,2 ± 1,0 | 1,0 | 99,0 ± 0,8 | 0,8 |
| Propranolol | 98,5 ± 0,5 | 0,5 | 101,2 ± 0,8 | 0,8 |
| Paracetamol | 100,5 ± 0,9 | 0,1 | 101,8 ± 0,7 | 0,7 |
| Doxiciclina | 99,7 ± 1,0 | 1,2 | 101,1 ± 0,6 | 0,6 |
| Dipirona sódica | 101,5 ± 0,5 | 0,9 | 100,2 ± 1,0 | 1,0 |
| n-acetilcisteína | 102,0 ± 1,0 | 2,0 | 98,5 ± 0,5 | 0,5 |
| Metildopa | 97,3 ± 0,7 | 0,9 | 100,5 ± 0,9 | 0,1 |
| Metoclopramida | 99,5 ± 0,5 | 0,1 | 99,7 ± 1,0 | 1,2 |
| Citrato de sildenafil | 99,6 ± 1,1 | 1,5 | 101,5 ± 0,5 | 0,9 |
| Diclofenaco | 99,8 ± 1,0 | 2,0 | 102,0 ± 1,0 | 2,0 |
| PABA | 165,0 ± 5,0 | 3,0 | 820,0 ± 10,0 | 1,2 |
| Bumetanida | 100,5 ± 0,9 | 1,9 | 105,0 ± 1,7 | 1,6 |
| Riboflavina | 100,3 ± 0,8 | 1,9 | 98,9 ± 2,1 | 2,6 |
| Ampicilina | 99,5 ± 2,0 | 2,3 | 99,5 ± 2,6 | 2,8 |
| Cloridrato de tetraciclina | 100,2 ± 1,5 | 1,7 | 99,5 ± 1,9 | 1,8 |
| Metronidazol | 99,7 ± 0,9 | 0,8 | 101,2 ± 0,9 | 0,6 |
| Rifampicina | 99,6 ± 1,3 | 0,8 | 100,4 ± 0,8 | 1,8 |
| Trimetoprima | 102,0 ± 1,2 | 0,8 | 101,8 ± 0,9 | 0,5 |
| Diazepam | 99,3 ± 1,1 | 0,7 | 98,3 ± 1,2 | 0,8 |
| Clorpramida | 100,4 ± 0,8 | 0,6 | 98,6 ± 1,3 | 0,9 |
| Mebendazol | 101,3 ± 1,6 | 1,0 | 100,2 ± 1,6 | 1,2 |
| Isoniazida | 99,7 ± 1,9 | 0,5 | 101,4 ± 1,9 | 1,4 |
| Bromoprida | 105,3 ± 1,2 | 1,1 | 235,6 ± 3,7 | 1,6 |
| Atenolol | 99,9 ± 0,8 | 1,5 | 101,4 ± 1,3 | 0,8 |
| Cloranfenicol | 100,3 ± 0,3 | 0,5 | 130,0 ± 2,6 | 2,0 |
| Kanamicina | 98,5 ± 0,9 | 0,6 | 99,9 ± 0,8 | 0,3 |

^a Relação de massas para SFAs:excipiente 1:1

^b Relação de massas para SFAs:excipiente 1:10

^c Média ± desvio padrão de 3 determinações.

A partir dos resultados obtidos (Tabela 52) verifica-se que apenas alguns fármacos mostraram interferir no método proposto. Entre estes, o PABA é o que apresenta a maior interferência, o que era esperado, visto que este é o precursor das moléculas de SFAs e também apresenta grupo amino aromático em sua estrutura (Figura 3).

A bromoprida também apresentou leve interferência quando presente na mesma concentração em massa, e uma interferência mais acentuada quando presente em concentrações superiores a de SFAs. Na análise de formulações farmacêuticas isto não é um problema visto que a bromoprida é um antiemético e não é formulada concomitantemente com as SFAs.

Os demais fármacos que demonstraram interferência foram apenas a bumetanida e o cloranfenicol, quando presentes em concentrações superiores a de SFAs. Bumetanida é um diurético e não está presente em formulações farmacêuticas contendo SFAs, entretanto, pode ser encontrada na urina de pacientes que a utilizam. Para análise neste caso, seria necessário separar a bumetanida das SFAs.

O cloranfenicol está presente em algumas formulações farmacêuticas (Sulnil - solução oftálmica) junto com a sulfacetamida sódica. Entretanto, nestas formulações estes dois fármacos (sulfacetamida sódica:cloranfenicol) a proporção é de 20:1, logo, cloranfenicol não apresenta interferência nas análises.

IX.4. Conclusões

Neste trabalho foi proposto o desenvolvimento de um método de *screening* simples, rápido e sensível para detecção de sulfonamidas em níveis de concentração baixos (100 ppb). Como estratégias analíticas foram empregados: procedimento de análise por injeção em fluxo, que permite a automatização das análises conferindo então ao método, maior rapidez nas análises e para detecção foi utilizada a técnica espectrofotométrica. Para conseguir a sensibilidade adequada para fins de *screening* adotou-se o uso de meios organizados (micelas) para promoção da reação como estratégia.

Desta forma, foi possível desenvolver um método de *screening* com características importantes, pois requer instrumentação relativamente simples e de baixo custo, é de fácil operação, fornece resultados rapidamente e com elevada confiabilidade, permite a redução do consumo de amostras e reagentes e apresenta sensibilidade adequada para aplicação como *screening* de sulfonamidas, de acordo com o limite de corte de 100 ppb. Adicionalmente, a aplicação na análise de amostras de urina e águas superficiais pode ser efetuada com preparo de amostras automatizado, sendo mais uma vantagem para o método desenvolvido.

Planejamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta foram utilizados para otimização dos experimentos. O uso destas ferramentas estatísticas permitiu que os experimentos fossem planejados e conduzidos de forma adequada com economia em termos de custos (reagentes e solventes) e tempo. Excelente linearidade e a ausência de interferência dos excipientes comumente presentes nas formulações farmacêuticas foram observadas.

O método desenvolvido para o *screening* das sulfonamidas foi aplicado como método quantitativo para análise de sulfacetamida sódica e sulfametoxazol em formulações farmacêuticas, com excelentes resultados em termos de precisão e exatidão quando comparados com os métodos preconizados na Farmacopéia Americana.

A Tabela 53 sumariza as principais figuras de mérito do método de FIA proposto para o *screening* e determinação das sulfonamidas.

Tabela 53. Figuras de mérito do método de FIA proposto para análise de sulfonamidas.

| PARÂMETRO | |
|---|--|
| Volume de injeção (amostra) | 505 µL |
| Bobina reacional | 40 cm |
| Reagente: <i>p</i> -DAC/HCl | 0,013 % (m/v) em $3,70 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ Fluxo de $1,28 \text{ mL min}^{-1}$ |
| Carregador (sistema sem EFS acoplada) | SDS $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ Fluxo de $2,48 \text{ mL min}^{-1}$ |
| Carregador (sistema com EFS acoplada) | SDS $5,00 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ preparado em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Fluxo de $2,48 \text{ mL min}^{-1}$ |
| Linearidade | 0,05 – 5,00 ppm (50 – 5000 ppb) |
| Freqüência Analítica (sistema sem EFS acoplada) | 80 amostras hora ⁻¹ |
| Freqüência Analítica (sistema com EFS acoplada) | 40 amostras hora ⁻¹ |
| λ nm | 555 |
| LD (sistema sem EFS acoplada) | 9,4 até 12,6 ppb |
| LD (sistema com EFS acoplada) | 13,9 ppb |
| LQ (sistema sem EFS acoplada) | 31,3 até 42,0 ppb |
| LQ (sistema com EFS acoplada) | 46,3 ppb |
| Precisão interdia (0,50 ppm) | 0,7% (5 dias) |
| Precisão intradia (0,50 ppm) | 1,3% (10 repetições) |
| Consumo de SDS por determinação | 6,9 µg |
| Consumo de <i>p</i> -DAC por determinação | 0,13 µg |
| Consumo de HCl (37%) por determinação | 3,5 µL |

Capítulo X. Conclusões gerais

X.1. Conclusões gerais

Neste trabalho foi proposto o desenvolvimento de um método de *screening* simples, rápido e sensível para detecção de sulfonamidas em níveis de concentração baixos (100 ppb). Como estratégias analíticas foram empregados: procedimento de análise por injeção em fluxo, que permite a automatização das análises conferindo então ao método, maior rapidez nas análises. Para detecção foi utilizada a técnica espectrofotométrica a qual é relativamente mais barata e de fácil aquisição e operação. Para conseguir a sensibilidade adequada para fins de *screening* adotou-se o uso de meios organizados (micelas) para promoção da reação como estratégia.

Desta forma, foi possível desenvolver um método de *screening* com características importantes, tais como: utiliza instrumentação relativamente simples e de baixo custo, é de fácil operação, fornece resultados rapidamente e com elevada confiabilidade, permite a redução do consumo de amostras e reagentes e apresenta sensibilidade adequada para aplicação como *screening* de sulfonamidas, de acordo com o limite de corte de 100 ppb.

Também foram desenvolvidos neste trabalho métodos analíticos para a determinação quantitativa de fármacos de reconhecida importância em formulações farmacêuticas. A determinação quantitativa de Citrato de sildenafil (Viagra[®]), Dipirona sódica e Sulfonamidas (Sulfametoxazol e Sulfacetamida sódica) foram efetuadas empregando técnicas analíticas simples, rápidas, precisas, exatas e de baixo custo relativo.

Planejamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta foram utilizados para otimização dos experimentos em todos os métodos desenvolvidos. O uso destas ferramentas estatísticas permitiu que os experimentos fossem planejados e conduzidos de forma adequada com economia em termos de custos (reagentes e solventes) e tempo. Excelente linearidade e a ausência de interferência dos excipientes comumente presentes nas formulações farmacêuticas foram observadas.

Os métodos foram aplicados com sucesso na determinação de citrato de sildenafil, dipirona sódica, sulfametoxazol e sulfacetamida sódica em formulações

farmacêuticas, com excelentes resultados em termos de precisão e exatidão quando comparados com os métodos empregados como referência.

O *screening* de sulfonamidas em amostras complexas, tais como urina, água superficial e leite bovino foram realizados com sucesso. Amostras de urina e águas superficiais tiveram seu preparo automatizado, conferindo ao procedimento rapidez nas análises, sem a necessidade de empregar solventes orgânicos, caracterizando o procedimento como limpo, dentro dos princípios da Química Verde.

Os métodos também apresentaram sensibilidade analítica adequada para o propósito a que foram aplicados com grande reprodutibilidade. Pelos testes estatísticos verifica-se que os métodos apresentam boa precisão e exatidão. Desta forma, neste trabalho são descritos propostas viáveis para a análise de fármacos em medicamentos, urina, águas superficiais e leite bovino, oferecendo vantagens relacionadas à simplicidade operacional, rapidez, baixo consumo de reagentes e de solventes além de não necessitarem de pré-tratamento da amostra.

Capítulo XI. Perspectivas Futuras

XI.1. Perspectivas Futuras

Diante dos resultados obtidos no desenvolvimento desta Tese de Doutorado, perspectivas de trabalhos futuros puderam ser visualizadas, dentre as quais estão o estudo de formulações fora do prazo de validade técnica. Neste sentido, o objetivo é adaptar os métodos desenvolvidos para a determinação de medicamentos que já tiveram seu prazo de validade expirado, mas que, no entanto, ainda podem ser utilizados sem prejuízos à saúde dos consumidores. Para tanto, serão necessários avaliar pontos importantes quanto a seletividade e sensibilidade dos métodos para eventuais produtos de degradação dos fármacos investigados.

Com relação ao método de *screening* pretende-se aprofundar o estudo no que se refere ao tratamento das amostras, de modo a possibilitar o tratamento completamente automatizado. Uma possibilidade é uso de membranas de diálise. Também poderá ser ampliado o espectro de amostras analisadas. Além disso, a aplicação dos métodos de confirmação (CLAE-EM) poderá ser executada quando houver disponibilidade do equipamento.

Capítulo XII. Referências

XII. Referências

1 ROZENFELD, S. Avaliação do uso dos medicamentos como estratégia para a reorientação da política de insumos em saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 5, n. 4, p. 388-402, Out./Dez. 1989.

2 STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R. D.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro Brazil. **Sci. Total Environ.**, v. 225, n. 1/2, p.135-141, Jan. 1999.

3 BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p. 523- 530, jul./ago. 2003.

4 BARROS, G. M. S.; JESUS, N. M.; SILVA, M. H. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo c, comercializado na cidade de Salvador. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 2, n. 3, p. 69-73, 2001.

5 HUANG, X.; YUAN, D.; HUANG, B. Simple and rapid determination of sulfonamides in milk using ether-type column liquid chromatography. **Talanta**, v. 72, n. 4, p. 1298-1301, June 2007.

6 KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in bovine's milk. **J. Chromatogr. A.**, v. 1149, n. 1, p. 102-111, May 2007.

7 KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Validation of a liquid chromatography–mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk. **J. Chromatogr. A.**, v. 1140, n. 1/2, p. 147-156, Jan. 2007.

8 FELTRIN, C. W.; MELLO, A. M. S.; SANTOS, J. G. R.; MARQUES, M. V.; SEIBEL, N. M.; FONTOURA, L. A. M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p. 80-82, jan./fev. 2007.

9 GUGGISBERG, D.; MOOSER, A. E.; KOCH, H. Methods for determination of sulphonamides in meat. **J. Chromatogr.**, v. 64, n. 1/2, p. 425-437, Oct. 1992.

10 LU, K.; CHEN, C.; LEE, M. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography–mass spectrometry. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 1082-1087, May 2007.

11 KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their hydroxy/N-4-acetyl metabolites with gradient liquid chromatography in chicken plasma, tissues, and eggs. **Talanta**, v. 67, n. 1, p. 54-58, July 2005.

12 FURUSAWA, N. Rapid high-performance liquid chromatographic determining technique of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and sulfaquinoxaline in eggs without use of organic solvents. **Anal. Chim. Acta**, v. 481, n. 2, p. 255-259, Apr. 2003.

13 KAUFMANN, A.; ROTH, S.; RYSER, B.; WIDMER, M. Quantitative LC/MS-MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey. **J. AOAC Int.**, v. 85, n. 4, p. 853-860, July 2002.

14 ZOTOU, A.; VASILIADOU, C. Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection. **Chromatographia**, v. 64, n. 5/6, p. 307-311, Sept. 2006.

15 KRIVOHLAVEK, A.; SMIT, Z.; BASTINAC, M.; ZUNTAR, I.; PLAVSIC-PLAVSIC, F. The determination of sulfonamides in honey by high performance liquid chromatography-mass spectrometry method (LC/MS). **J. Sep. Sci.**, v. 28, n. 13, p. 1434-1439, July 2005.

16 PANG, G. F.; CAO, Y. Z.; FAN, C. L.; ZHANG, J. J.; LI, X. M.; LI, Z. Y.; JIA, G. Q. Liquid chromatography-fluorescence detection for simultaneous analysis of sulfonamide residues in honey. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 376, n. 4, p. 534-541, June 2003.

17 PASTORE, K. O paraíso dos remédios falsificados: como opera a máfia que transformou o Brasil num dos campeões da fraude de medicamentos. **Revista Veja**, v. 31, n. 1554, p. 40, jul. 1998. Disponível em: <<http://veja.abril.com.br/080798/sumario.html>>. Acesso em: 27 out. 2007.

18 ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **A importância da farmacovigilância:** monitorização da segurança dos medicamentos. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/importancia.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2005.

19 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Medicamento falsificado. **Boletim Informativo**, n. 68, p. 6-8, out., 2006. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/medicamentos/index.efm?ent2&carregar=2&action=mostrar&c>>. Acesso em: 08 dez. 2004.

20 ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Medicamentos e Tecnologia – notícias:** oficina traça planos para o combate à falsificação de medicamentos no Brasil. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/medicamentos/index.cfm?ent=2&carregar=2&action=mostrar&c>>. Acesso em: 08 dez. 2004.

21 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE n ° 1876, de 26 de novembro de 2004. Determina como medida de interesse sanitário, a interdição cautelar, em todo território nacional, do medicamento Dipirona sódica, 500mg/ml, solução oral, lote 020804 L, data de fabricação 05/2004, data de validade 05/2007, fabricado pela empresa Medquímica Indústria Farmacêutica Ltda, por não atender as exigências regulamentares próprias e demais requisitos técnicos especificados na concessão de seu registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 nov. 2004.

22 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE n ° 1191, de 23 de julho de 2004. Determina a apreensão em todo território nacional do produto Dipirona Sódica, solução injetável, ampola 2 ml Lote 02115, fabricado em 01/06/2003, com validade até 01/06/2005, fabricado pela empresa EQUIPI FX Indústria Farmacêutica Ltda, por não atender as exigências regulamentares da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**. Brasília, 26 jul. 2004.

23 THE COUNCIL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. European Community Commission Regulation n°. 2377/1990 EEC, laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Council Regulation (EEC) n°. 2377/1990 of 26 June 1990. **Off. J. Eur. Commun.**, n. L224, p. 1-8, aug. 1990. Disponível em:
<<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31990R2377:EN:HTML>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

24 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n ° 253, de 16 de setembro de 2003. Cria Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVet. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003.

25 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of certain veterinary drug residues in food**. Geneve: 1990. (Technical Report Series, 799).

26 COSTA, E. O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Rev. Higiene Alimentar**, v. 10, n. 44, p. 15-17, June 1996.

27 SANTOS, B.; LISTA, A.; SIMONET, B. M.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. Screening and analytical confirmation of sulfonamide residues in milk by capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 26, n. 7/8, p. 1567-1575, Mar. 2005.

28 ZAYAS-BLANCO, F.; GARCIA-FALCÓN, M. S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatographic separation with ultraviolet detection. **Food Control**, v. 15, n. 5, p. 375-378, July 2004.

29 THE EXTRA pharmacopoeia: evaluated information on the world's drugs and medicines. 31st ed., London: The Royal Pharmaceutical Society, 1996. p. 39-40.

30 LEVY, M.; ZYLBERKATZ, E.; ROSENKRANZ, B. Clinical pharmacokinetics of dipyron and its metabolites. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 28, n. 3, p. 216-234, Mar. 1995.

31 ERGÜN, H.; FRATTARELLI, D. A. C.; ARANDA, J. V. Characterization of the role of physicochemical factors on the hydrolysis of dipyron. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 35, n. 3, p. 479-487, May 2004.

32 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n°. 1.260, de 15 de agosto de 2001. Determina a publicação do relatório final do Painel internacional de avaliação da segurança da dipirona. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2001.

33 BUDAVALI. S. (Ed.). **The Merck index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological. 13 rd ed. New Jersey: Merck & Co., 2001. p. 589-590.

34 MELO, J. M. S. **Dicionário de especialidades farmacêuticas**. 30. ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2001/02. p. 96.

35 TSUJIMURA, A.; YAMANAKA, M.; TAKAHASHI, T.; MIURA, H.; NISHIMURA, K.; KOGA, M.; OWASA, A.; TAKEYAMA, M.; MATSUMIYA, K.; TAKAHARA, S.; OKUYAMA, A. The clinical studies of sildenafil for the ageing male. **Int. J. Androl.**, v. 25, n. 1, p. 28-33, Feb. 2002.

36 PIFZER Ltda. **Viagra: citrato de sildenafil**. São Paulo: Laboratório Pfizer, 2000. 84 p. Monografia do produto.

37 POTTS, A.; GRACE, V.; GAVEY, N.; VARES, T. Viagra stories: challenging erectile dysfunction. **Soc. Sci. Med.**, v. 59, n. 3, p. 489-499, Aug. 2004.

38 NEVES, G.; RATES, S. M. K.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Agentes dopaminérgicos e o tratamento da disfunção erétil. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 949-957, nov./dec. 2004

39 BUDAVALI. S. (Ed.). **The Merck index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological. 13 rd ed. New Jersey: Merck & Co., 2001. p. 1523.

40 RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 577-594.

41 GEHRING, T. A.; GRIFFIN, B.; WILLIAMS, R.; GEISEKER, C.; RUSHING, L. G.; SIITONEN, P. H. Multiresidue determination of sulfonamides in edible catfish, shrimp and salmon tissues by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection. **J. Chromatogr. B.**, v. 840, n. 2, p. 132-138, Aug. 2006.

42 METWALLY, M. S. Primaquine phosphate as a promising substitute for n-(1-naphthyl)ethylenediamine: II. Analysis of sulfa drugs in pharmaceutical dosage forms and biological samples. **Anal. Sci.**, v. 15, n. 10, p. 979-984, Oct. 1999.

43 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. **Scifinder scholar**. Version 2004.2. Columbus, c2004. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br>>. Acesso em: 03 out 2007.

44 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5th ed. New York: Saunders College Publishing 1998.

45 ABURJAI, T.; AMRO, B. I.; AIEDEH, K.; ABUIRJEIE, M.; AL-KHALIL, S. Second derivative ultraviolet spectrophotometry and HPTLC for the simultaneous determination of vitamin C and dipyrone. **Pharmazie**, v. 55, n. 10, p. 751-754, Oct. 2000.

46 ERK, N.; ONUR, F. Simultaneous spectrophotometric determination of analgin and lidocaine hydrochloride in injection solutions. **STP Pharm. Sci.**, v. 6, n. 3, p. 216-220, 1996.

47 ERK, N.; ONUR, F. Simultaneous determination of analgine and paracetamol in tablets by spectrophotometric methods. **Anal. Lett.**, v. 30, n. 6, p. 1201-1210, Apr. 1997.

48 ACAR, N.; ONUR, F. Spectrophotometric simultaneous analysis of analgin-adamon mixture in injection preparations. **Anal. Lett.**, v. 29, n. 5, p. 763-773, Mar. 1996.

49 ERK, N.; ONUR, F. Spectrophotometric simultaneous determination of analgin and hyoscine N-butyl bromide in sugar-coated tablets. **Anal. Lett.**, v. 29, n. 3, p. 369-380, Feb. 1996.

50 DOGAN, H. N. Simultaneous determination of acetaminophen, dipyrone and caffeine in pharmaceutical preparations by the absorbance ratio technique. **Pharmazie**, v. 51, n. 10, p. 773-774, Oct. 1996.

51 BOZDOGAN, A.; ACAR, A. M.; KUNT, G.; CAGLAR, H. Simultaneous determination of paracetamol, metamizol sodium and caffeine in tablet preparations by partial least-squares spectrophotometric calibration. **Pharmazie**, v. 49, n. 6, p. 457-458, June 1994.

- 52 ELSADEK, M.; SALEM, H.; KHIER, A. A. 1st derivative spectrophotometric method for determination of ascorbic-acid and analgin in combination. **Spectros. Lett.**, v. 23, n. 1, p. 77-86, Jan. 1990.
- 53 ELSAYED, M. A. H.; ABDINE, H.; ABDELHAMID, M. E. Application of difference spectrophotometry to the determination of dipyrone. **Analyst**, v. 104, n. 1239, p. 568-572, June 1979.
- 54 MORELLI, B. Determination of binary mixtures of analgesic and spasmolytic drugs in pure and dosage forms by derivative spectrophotometry. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 33, n. 3, p. 423-433, Oct. 2003.
- 55 VASSILEVA-ALEXANDROVA, P.; SHISHMANOV, P. S. Spectrophotometric determination of dipyrone with neotetrazolium chloride. **Anal. Chem.**, v. 47, n.8, p. 1432-1435, July 1975.
- 56 PEZZA, L.; TUBINO, M.; MELIOS, C. B.; PEZZA, H. R. Rapid spot test analysis for the detection of dipyrone in pharmaceutical preparations. **Anal. Sci.**, v. 16, n. 3, p. 313-315, Mar. 2000.
- 57 SAKIARA, K. A.; PEZZA, L.; MELIOS, C. B.; PEZZA, H. R.; MORAES, M. Spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations by using chromotropic acid. **Farmaco**, v. 54, n. 9, p. 629-635, Sept. 1999.
- 58 QURESHI, S. Z.; SAEED, A.; HAQUE, S. Some observations on a simple method for the determination of novalgin in drug formulations with iron(III)-1,10-phenanthroline. **Microchem. J.**, v. 41, n. 3, p. 362-365, 1990.
- 59 QURESHI, S. Z.; SAEED, A.; HASSAN, T. Spectrophotometric determination of novalgin in tablets by use of potassium iodate. **Talanta**, v. 36, n. 8, p. 869-871, Aug. 1989.
- 60 BUHL, F.; HACHULA, U. Spectrophotometric determination of antipyrine, pyramidon and novalgin by using cerium (III)-arsenzo(III)reaction. **Chem. Anal. (Warsaw)**, v. 26, n. 3, p. 395-400, Mar. 1981.
- 61 BUHL, F.; HACHULA, U. Spectrophotometric method for the determination of piramidone and novalgin in systems: iron(3+)/2,2'-bipyridyl and iron(3+)/1,10-phenanthroline. **Chem. Anal. (Warsaw)**, v. 29, n. 4, p. 483-489, Apr. 1984.
- 62 ABDINE, H.; SOLIMAN, S. A.; MORCOS, M. G. Colorimetric determination of dipyrone. **J. Pharm. Sci.**, v. 62, n. 11, p. 1834-1836, Nov. 1973.

63 VASSILEVA-ALEXANDROVA, P. Spectrophotometric determination of analgin with monozolium and ditetrazolium salts. **Microchim. Acta.**, v. 66, n. 3/4, p. 247- 252, May 1976.

64 SASTRY, C. S. P.; RAO, A. R. Spectrophotometric determination of some analgesic and anti-inflammatory agents with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride. **Microchim. Acta**, v. 97, n. 3/4, p. 237-244, May 1989.

65 TEIXEIRA, M. F. S.; MARCOLINO JUNIOR, L. H.; FATIBELLO FILHO, O.; DOCKAL, E. R.; CAVALHEIRO, E. T. G. Voltammetric determination of dipyron using a N,N-ethylenebis(salicylideneaminato)oxovanadium(IV) modified carbon-paste electrode. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 15, n. 6, p. 803-808, Nov./Dec. 2004.

66 BELAL, F. Simultaneous polarographic determination of ascorbic acid and dipyron in pharmaceutical preparations. **Electroanalysis**, v. 4, n. 5, p. 589-593, May 1992.

67 ALTUN, M. L. HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyron. **Turkish J. Chem.**, v. 26, n. 4, p. 521-528, Aug. 2002.

68 SENYUVA, H. Z. AKSAHIN, I. OZCAN, S. KABASAKAL, B. V. Rapid, simple and accurate liquid chromatography-diode array detection validated method for the determination of dipyron in solid and liquid dosage forms. **Anal. Chim. Acta**, v. 547, n. 1, p. 73-77, Aug. 2005.

69 BARANOWSKA, I.; MARKOWSKI, P; BARANOWSKI, J. Simultaneous determination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography method. **Anal. Chim. Acta**, v. 570, n. 1, p. 46-58, June 2006.

70 GOLUBITSKII, G. B.; BUDKO, E. V.; IVANOV, V. M. Quantitative analysis of pentalgin N tablets by gradient and isocratic high-performance liquid chromatography. **J. Anal. Chem.**, v. 61, n. 1, p. 67-71, Jan. 2006.

71 AGUNDEZ, J. A. G.; MARTINEZ, C.; MARTIN, R.; BENITEZ, J. Determination of aminopyrine, dipyron and their metabolites in urine by high-performance liquid chromatography. **Ther. Drug Monit.**, v. 16, n. 3, p. 316-322, June 1994.

72 RAU, H. L.; AROOR, A. R.; RAO, P. G. High performance liquid chromatographic determination of analgin and ibuprofen in combined dosage forms. **Indian Drugs**, v. 29, n. 2, p. 94-96, Nov. 1991.

73 RAU, H. L.; AROOR, A. R.; RAO, P. G. High performance liquid chromatographic determination of analgin and diazepam in combined dosage forms. **Indian Drugs**, v. 29, n. 2, p. 92-94, Nov. 1991.

74 KATZ, E. Z.; GRANIT, L.; DRAYER, D. E.; LEVY, M. Simultaneous determination of dipyrone metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 305, n. 2, p. 477-484, Feb. 1984.

75 PEREIRA, A. V.; PENCKOWSKI, L.; VOSGERAU, M.; SASSA, M. F.; FATIBELLO FILHO, O. Spectrophotometric determination of metamizole in pharmaceutical formulations by flow injection triiodide generation. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 553-557, jul./ago. 2002.

76 LIMA, J. L. F. C.; OLIVEIRA, S. S. M.; SANTOS, J. L. M.; ZAGATTO, E. A. G. Multi-pumping flow system for the spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 32, n. 4/5, p. 1011-1017, Aug. 2003.

77 MARCOLINO, L. H.; SOUSA, R. A.; FATIBELLO, O.; MORAES, F. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Flow-injection spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical formulations using ammonium molybdate as chromogenic reagent. **Anal. Lett.**, v. 38, n. 14, p. 2315-2326, 2005.

78 BAUTISTA, J. A. G.; ZAMORA, L. L.; GARCIA-MATEO, J. V.; MARTINEZ-CALATAYUD, J. Indirect catalytic spectrophotometric determination of metamizol following oxidation by lead dioxide immobilized in a polyester resin bed. **Anal. Lett.**, v. 29, n. 15, p. 2667-2678, 1996.

79 MEDEIROS, E. P.; CASTRO, S. L.; FORMIGA, F. M.; SANTOS, S. R. B.; ARAUJO, M. C. U.; NASCIMENTO, V. B. A flow injection method for biamperometric determination of dipyrone in pharmaceuticals. **Microchem. J.**, v. 78, n. 1, p. 91-96, Sept. 2004.

80 PAIXAO, T. R. L. C.; CAMARGO, M. R.; BERTOTTI, M. Diffusion layer titration of dipyrone in pharmaceuticals at a dual-band electrochemical cell. **Talanta**, v. 61, n. 5, p. 725-732, Dec. 2003.

81 MARCOLINO JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; CAVALHEIRO, E. T. G.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection amperometric determination of dipyrone in pharmaceutical formulations using a carbon paste electrode. **Farmaco**, v. 58, n. 10, p. 999-1004, Oct. 2003.

82 ALBUQUERQUE, J. S.; SILVA, V. L.; LIMA, F.; ARAUJO, A. N.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Determination of dipyrone in pharmaceutical products by flow injection analysis with potentiometric detection. **Anal. Sci.**, v. 19, n. 5, p. 691-694, May 2003.

83 MUNOZ, R. A. A.; MATOS, R. C.; ANGNES, L. Amperometric determination of dipyrone in pharmaceutical formulations with a flow cell containing gold electrodes from recordable compact discs. **J. Pharm. Sci.** v. 90, n. 12, p. 1972-1977, Dec. 2001.

- 84 PEREZ-RUIZ, T.; MARTINEZ, C. L.; TOMAS, V. Flow-injection determination of Novalgin using amperometric detection at a glassy carbon electrode. **J. Pharm. Biom. Anal.** v. 12, n. 9, p. 1109-1113, Sept. 1994.
- 85 MARCOLINO, L. H.; BONIFACIO, V. G.; FATIBELLO FILHO, O.; TEIXEIRA, M. F. S. Flow injection turbidimetric determination of dipyron using a solid-phase reactor containing silver chloride immobilized in a polyester resin. **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 783-787, set./out. 2005.
- 86 SONG, Z. H.; ZHANG, N. In vitro detecting ultra-trace novalgin in medicine and human urine by chemiluminescence. **Talanta**, v. 60, n. 1, p. 161-170, May 2003.
- 87 HUANG, Y.; ZHANG, C.; ZHANG, X.; ZHANG, Z. Chemiluminescence analysis of menadione sodium bisulfite and analgin in pharmaceutical preparations and biological fluids. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 21, n. 4, p. 817-825, Dec. 1999.
- 88 HUANG, Y.; ZHANG, C.; ZHANG, X.; ZHANG, Z. Cerium(IV)-based chemiluminescence analysis of analgin. **Anal. Lett.**, v. 32, n. 5, p. 933-943, 1999.
- 89 DARAGHMEH, N.; AL-OMARI, M.; BADWAN, A. A.; JABER, A. M. Y. Determination of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 25, n. 3/4, p. 483-492, June 2001.
- 90 ERGUN, B.; SARACOGLU, A.; ILGIN, S.; ATKOSAR, Z.; KIRCALI, K.; ALTIOKKA, G. Validation of a reversed-phase HPLC method for the analysis of sildenafil citrate in pharmaceutical preparations and in spiked human plasma. **J. Liq. Chrom. Related Techn.**, v. 28, n. 10, p. 1539-1548, June 2005.
- 91 ZHU, X. L.; XIAO, S.; CHEN, B.; ZHANG, F.; YAO, S. Z.; WAN, Z. T.; YANG, D. J.; HAN, H. W. Simultaneous determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil as forbidden components in natural dietary supplements for male sexual potency by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **J. Chrom. A**, v. 1066, n. 1/2, p. 89-95, Feb. 2005.
- 92 ABOUL-ENEIN, H. Y.; HEFNAWY, M. M. Rapid determination of sildenafil citrate in pharmaceutical preparations using monolithic silica HPLC column. **J. Liq. Chrom. Related Techn.**, v. 26, n. 17, p. 2897-2908, Oct. 2003.
- 93 TRACQUI, A.; LUCES, B. HPLC-MS for the determination of sildenafil citrate (Viagra®) in biological fluids, application to the salivary excretion of sildenafil after oral intake. **J. Anal. Toxicol.**, v. 27, n. 2, p. 88-94, Mar. 2003.

94 DINESH, N. D.; VISHUKUMAR, B. K.; NAGARAJA, P.; GOWDA, N. M. M.; RANGAPPA, K. S. Stability indicating RP-LC determination of sildenafil citrate (viagra) in pure form and in pharmaceutical samples. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 29, n. 4, p. 743-748, July 2002.

95 ABD-ELBARY, A.; FODA, N. H.; EL-GAZAYERLY, O. N. Stability indicating high performance liquid chromatographic assay for the determination of sildenafil citrate in bulk and in formulations. **Chromatographia**, v. 59, n. 9/10, p. 561-566, May 2004.

96 NAGARAJU, V.; SREENATH, D.; TIRUMALA RAO, J.; NAGESWARA RAO, R. Separation and determination of synthetic impurities of sildenafil (viagra) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Anal. Sci.**, v. 19, n. 7, p. 1007-1011, July 2003.

97 TSENG, M. C.; LIN, J. H. Determination of sildenafil citrate adulterated in a dietary supplement capsule by LC/MS/MS. **J. Food Drug Anal.**, v. 10, n. 2, p. 112-119, June 2002.

98 JUNG, B. H.; MOON, D.; CHUNG, B. C. HPLC determination of sildenafil and its demethylated metabolite, Uk-103,320, in cat plasma with solid-phase extraction for the pharmacokinetic study. **Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.**, v. 46, n. 2, p. 40-45, 2001.

99 LEE, M.; MIN, D. I. Determination of sildenafil citrate in plasma by high-performance liquid chromatography and a case for the potential interaction of grapefruit juice with sildenafil citrate. **Therap. Drug Monit.**, v. 23, n. 1, p. 21-26, Feb. 2001.

100 SEGALL, A. I.; VITALE, M. F.; PERZ, V. L.; PALACIOS, M. L.; PIZZORNO, M. T. Reversed-phase HPLC determination of sildenafil citrate in the presence of its oxidative induced degradation products. **J. Liq. Chrom. Related Technol.**, v. 23, n. 9, p. 1377-1386, May 2000.

101 QIN, W.; LI, S. F. Y. An ionic liquid coating for determination of sildenafil and UK-103,320 in human serum by capillary zone electrophoresis-ion trap mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 23, n. 4, p. 4110-4116, Dec. 2002.

102 FLORES, J. R.; NEVADO, J. J. B.; PENALVO, G. C.; DIEZ, N. M. Development of a micellar electrokinetic capillary chromatography method for the determination of 3 drugs employed in the erectile dysfunction therapy. **J. Chrom. B: Anal. Techn. Biom. Life Sci.**, v. 811, n. 2, p. 231-236, Nov. 2004.

103 NEVADO, J. J. B.; FLORES, J. R.; PENALVO, G. C.; FARINAS, N. R. Micellar electrokinetic capillary chromatography for the determination of viagra and its metabolite (uk-103,320) in human serum. **Electrophoresis**, v. 22, n. 10, p. 2004-2009, June 2001.

104 NEVADO, J. J. B.; LFERENA, M. J. V.; SALCEDO, A. M. C.; FLORES, J. R. Development of a capillary gas chromatographic method with flame ionization detection for the simultaneous determination of sildenafil and its n-demethylated metabolite in biological fluids. **J. Sep. Sci.**, v. 25, n. 12, p. 767-772, Aug. 2002.

105 BERZAS, J. J.; RODRIQUEZ, J.; VILLASENOR, M. J.; CONTENTO, A. M.; CABELLO, M. P. Validation of a capillary gas chromatographic method for the determination of sildenafil citrate in its pharmaceutical formulations (viagra). Experimental design for evaluating the ruggedness of the method. **Chromatographia**, v. 55, n. 9/10, p. 601-606, May 2002.

106 BERZAS, J. J.; RODRIGUEZ, J.; CASTANEDA, G.; VILLASENOR, M. J. Voltammetric behavior of sildenafil citrate (viagra) using square wave and adsorptive stripping square wave techniques – determination in pharmaceutical products. **Anal. Chim. Acta**, v. 417, n. 2, p. 143-148, July 2000.

107 RODRIGUEZ, J.; BERZAS, J. J.; CASTANEDA, G.; RODRIGUEZ, N. Determination of sildenafil citrate (Viagra) and its metabolite (UK-103,320) by square-wave and adsorptive stripping square wave voltammetry: total determination in biological samples. **Talanta**, v. 62, n. 2, p. 427-432, Feb. 2004.

108 OZKAN, S. A.; USLU, B.; ZUMAN, P. Electrochemical oxidation of sildenafil citrate (viagra) on carbon electrodes. **Anal. Chim. Acta**, v. 501, n. 2, p. 227-233, Jan. 2004.

109 OTHMAN, A. M.; RIZK, N. M. H.; EL-SHAHAWI, M. S. Polymer membrane sensors for sildenafil citrate (Viagra) determination in pharmaceutical preparations. **Anal. Chim. Acta**, v. 515, n. 2, p. 303-309, July 2004.

110 HASSAN, S. S. M.; ELNEMMA, E. M.; MAHMOUD, W. H.; MOHAMMED, A. H. K. Continuous potentiometric monitoring of viagra (sildenafil) in pharmaceutical preparations using novel membrana sensors. **J. Appl. Electrochem.**, v. 36, n. 2, p. 139-146, Feb. 2006.

111 DINESH, N. D.; NAGARAJA, P.; GOWDA, N. M. M.; RANGAPPA, K. S. Extractive spectrophotometric methods for the assay of sildenafil citrate (viagra) in pure form and in pharmaceutical formulations. **Talanta**, v. 57, n. 4, p. 757-764, June 2002.

112 AMIN, A. S.; EL-BESHBESHY, A. M. Utility of certain sigma and pi-acceptors for the spectrophotometric determination of sildenafil citrate (viagra). **Microchim. Acta**, v. 137, n. 1/2, p. 63-69, Sept. 2001.

113 ALTIOKKA, G.; ATKOSAR, Z.; SENER, E.; TUNCEL, M. Fia of sildenafil citrate using UV-detection. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 25, n. 2, p. 339-342, May 2001.

114 WAWER, I.; PISKLAK, M.; CHILMONCZYK, Z. ^1H , ^{13}C , ^{15}N NMR analysis of sildenafil base and citrate (Viagra) in solution, solid state and pharmaceutical dosage forms. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 38, p. 865-870, Aug. 2005.

115 LIU, SHAO-PU; FAN, LI; HU, XIAO-LI; LIU, ZHONG-FANG; LI, SHAN. Resonance rayleigh-scattering method for the determination of sildenafil citrate in a pharmaceutical formulation using evans blue. **Anal. Sci.**, v. 22, n. 6, p. 819-823, June 2006.

116 ABOURASHED, E. A.; ABDEL-KADER, M. S.; HABIB, A. A. M. HPTLC determination of sildenafil in pharmaceutical products and aphrodisiac herbal preparations. **J. Planar Chromatogr. Modern TLC**, v. 18, n. 105, p. 372-376, Sept./Oct. 2005.

117 MAURIN, J. K.; PLUCINSKI, F.; MAZUREK, A. P.; FIJALEK, Z. The usefulness of simple X-ray powder diffraction analysis for counterfeit control-the Viagra example. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 43, n. 4, p. 1514-1518, Mar. 2007.

118 STEAD, S.; RICHMOND, S.; SHARMAN, M.; STARK, J.; GEIJP, E. A new approach for detection of antimicrobial drugs in food: premi[®] test coupled to scanner technology. **Anal. Chim. Acta**, v. 529, n. 1/2, p. 83-88, Jan. 2005.

119 STEAD, S.; SHARMAN, M.; HARBIN, J. A.; GIBSON, E.; RICHMOND, S.; STARK, J.; GEIJP, E. Meeting maximum residue limits: an improved screening technique for the rapid detection of antimicrobial residues in animal food products. **Food Add. Contam.**, v. 21, n. 3, p. 216-221, Mar. 2004.

120 WANG, S.; ZHANG, H. Y.; WANG, L.; DUAN, Z. J.; KENNEDY, I. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: a review. **Food Add. Contam.**, v. 23, n. 4, p. 362-384, Apr. 2006.

121 AERTS, M. M. L.; HOGENBOOM, A. C.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical strategies for the screening of the veterinary drugs and their residues in edible products. **J. Chromatog. B**, v. 667, n. 1, p. 1-40, May 1995.

122 NAGARAJA, P.; SUNITHA, K. R.; VASANTHA, R. A.; YATHIRAJAN, H. S. Iminodibenzyl as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 53, n. 2, p. 187-192, Mar. 2002.

123 NAGARAJA, P.; YATHIRAJAN, H. S.; SUNITHA, K. R.; VASANTHA, R. A. A new, sensitive, and rapid spectrophotometric method for the determination of sulfa drugs. **J. AOAC Int.**, v. 85, n. 4, p. 869-874, July/Aug. 2002.

124 NAGARAJA, P.; YATHIRAJAN, H. S.; RAJU, C. R.; VASANTHA, R. A.; NAGENDRA, P.; KUMAR, M. S. H. 3-Aminophenol as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivative. **Farmaco**, v. 58, n. 12, p. 1295-1300, Dec. 2003.

125 NAGARAJA, P.; NAIK, S. D.; SHRESTHA, A. K.; SHIVAKUMAR, A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations. **Acta Pharm.**, v. 57, n. 3, p. 333-342, Sept. 2007.

126 RAMOS, G. R.; ROMERO, J. S. E.; ALVAREZ-COQUE, M. C. G. Colorimetric determination of arylamines and sulphonamides by diazotization and coupling in a micellar solution. **Anal. Chim. Acta**, v. 223, n.1, p. 327-337, 1989.

127 SALINAS, F.; MANSILLA, A. E.; NEVADO, J. J. B. Derivative spectrophotometric determination of sulphonamides by the Bratton-Marshall reaction. **Anal. Chim. Acta**, v. 233, n. 1, p. 289-294, 1990.

128 METWALLY, M. E. S. Primaquine phosphate as a promising substitute for n-(1-naphthyl)ethylenediamine. II. Analysis of sulfa drugs in pharmaceutical dosage forms and biological samples. **Anal. Sci.**, v. 15, n.10, p. 979-984, Oct. 1999.

129 MÁRQUEZ, M.; SILVA, M.; PÉREZ-BENDITO, D. Kinetic determination of sulphonamides at the millimolar level by the continuous addition of reagent technique. **Anal. Chim. Acta**, v. 237, n. 1, p. 353-359, 1990.

130 TENA, M. T.; CASTRO, M. D.; VALCÁRCEL, M. Flow-through photometric sensor for determination of sulfonamides. **Analyst**, v. 119, n. 7, p. 1625-1628, July 1994.

131 NEVADO, J. J. B.; GALLEGU, J. M. L.; LAGUNA, P. B. Determination of sulphamethazine and sulphathiazole in mixtures using 3-methyl-2-benzothiazolin-2-one hydrazone in the presence of Fe (III) by ration spectra derivatization. **Analisis**, v. 22, n. 1, p. 226-229, 1994.

132 AMIN, A. S.; EL-SAYED, G. O.; ISSA, Y. M. Application of alizarine derivatives as chromogenic reagents for the spectrophotometric determination of some sulfa drugs. **Microchem. J.**, v. 51, n. 3, p. 367-373, June 1995.

133 AMIN, A. S.; ZAREH, M. M. Acetylacetone-formaldehyde reagent for the spectrophotometric determination of some sulfa drugs in pure and dosage forms. **Microchim. Acta**, v. 124, n. 3/4, p. 227-233, Sept. 1996.

134 AL-BACHI, M. Q.; SALIH, E. S.; SALEM, M. S. Application of promethazine hydrochloride as a chromogenic reagent for the spectrophotometric determination of certain sulphonamide drugs. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 337, n. 4, p. 408-411, Jan. 1990.

135 ROYBAL, J. E.; PFENNING, A. P.; TURNIPSEED, S. B.; GONZALES, S. A. Application of size-exclusion chromatography to the analysis of shrimp for sulfonamide residues. **Anal. Chim. Acta**, v. 483, n. 1/2, p. 147-152, Apr. 2003.

136 BOGIALLI, S.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; SERGI, M. Confirmatory analysis of sulfonamide antibacterials in bovine liver and kidney: extraction with hot water and liquid chromatography coupled to a single- or triple-quadrupole mass spectrometer. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 17, n. 11, p. 1146-1156, June 2003.

137 BOGIALLI, S.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; POLCI, M. L. Rapid confirmatory assay for determining 12 sulfonamide antimicrobials in milk and eggs by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 15, p. 4225-4232, July 2003.

138 VAN RHIJN, J. A.; LASAROMS, J. J. P.; BERENDSEN, B. J. A.; BRINKMAN, U. A. T. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk. **J. Chromatogr. A**, v. 960, n. 1/2, p. 121-133, June 2002.

139 ZHENG, M.; HY, L.; HALL S. F., KITTS D. D., MCERLANE, K. M. High-performance liquid chromatographic analysis of romet-30 in Chinook salmon: wash-out time, tissue distribution in muscle, liver and skin, and metabolism of sulphadimethoxine. **J. Chromatogr. A**, v. 670, n. 1/2, p. 77-88, June 1994.

140 YANG TCC, YANG, IL, LIAO, LJ. Determination of sulphonamide residues in milk by online microdialysis and HPLC. **J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn.**, v. 27, n. 3, p. 501-510, 2004.

141 KIM, D. H., CHOI, J. O., KIM, J.; LEE, D. W. Application of a polymeric solid phase extraction for the analysis of sulphonamides in milk by LC/MS. **J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn.**, v. 26, n. 7, p. 1149-1159, Apr. 2003.

142 FURUSAWA, N. Determining the procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine in edible animal tissues. **Biom. Chromatogr.**, v. 15, n. 4, p. 235-239, 2001.

143 FURUSAWA, N. Liquid-chromatographic determination of sulphadimidine in milk and eggs. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 364, n. 3, p. 270-272, May 1999.

144 POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; MITROWSKA, K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. **J. Chromatogr. A.**, v. 1087, n. 1/2, p. 259-264, Sept. 2005.

145 KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Toxic/harmful solvents-free technique for HPLC determination of six sulfonamides in meat. **J. Liq. Chromatogr. Related Technol.**, v. 26, n. 17, p. 2931-2939, Oct. 2003.

146 AKAY, C.; OZKAN, S. A. Simultaneous LC determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 30, n. 4, p. 1207-1213, Nov. 2002.

147 FURUSAWA, N.; KISHIDA, K. High-performance liquid chromatographic procedure for routine residue monitoring of seven sulfonamides in milk. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 371, n. 7, p. 1031-1033, Dec. 2001.

148 KISHIDA, K.; FURUSAWA, N. Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulfonamides in chicken. **J. Chromatogr. A.**, v. 937, n. 1/2, p. 49-55, Dec. 2001.

149 NEVADO, J. J. B.; PENALVO, G. C.; BERNARDO, F. J. G. Simultaneous determination of sulfamethoxypyridazine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine and their associated compounds by liquid chromatography. **Anal. Chim. Acta**, v. 442, n. 2, p. 241-248, Sept. 2001.

150 GRANDE, B. C.; FALCON, M. S. G.; COMESANA, M. R.; GANDARA, J. S. Determination of sulfamethazine and trimethoprim in liquid feed premixes by HPLC and diode array detection, with an analysis of the uncertainty of the results. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 7, p. 3145-3150, June 2001.

151 KAO, Y. M.; CHANG, M. H.; CHENG, C. C.; CHOU, S. S. Multiresidue determination of veterinary drugs in chicken and swine muscles by high performance liquid chromatography. **J. Food Drug Anal.**, v. 9, n. 2, p. 84-95, 2001.

152 SMEDLEY, M. D. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk: collaborative study. **J. AOAC Int.**, v. 77, n. 5, p. 112-122, 1994.

153 WU, Y. L.; LI, C.; LIU, Y. J.; SHEN, J. Z. Validation method for the determination of sulfonamide residues in bovine milk by HPLC. **Chromatographia**, v. 66, n. 3/4 p. 191-195, Aug. 2007.

154 SALISBURY, C. D. C.; SWEET, J. C.; MUNRO, R. Determination of sulfonamide residues in the tissues of food animals using automated precolumn derivatization and liquid chromatography with fluorescence detection. **J. AOAC Int.**, v. 87, n. 5, p. 1264-1268, Dec. 2004.

- 155 MAUDENS, K. E.; ZHANG, G. F.; LAMBERT, W. E. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **J. Chromatogr. A**, v. 1047, n. 1, p. 87-92, Aug. 2004.
- 156 TSAI, C. E.; KONDO, F. Liquid chromatographic determination of fluorescent derivatives of 6 sulfonamides in bovine serum and milk. **J. AOAC Int.**, v. 78, n. 3, p. 674-678, 1995.
- 157 LINDBERG, R.; JARNHEIMER, P. A.; OLSEN, B.; JOHANSSON, M.; TYSKLIND, M. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. **Chemosphere**, v. 57, n. 10, p. 1479-1488, Dec. 2004.
- 158 SHAO, B.; DONG, D.; WU, Y. N.; HU, J. Y.; MENG, J.; TU, X. M.; XU, S. K. Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 546, n. 2, p. 174-181, Aug. 2005.
- 159 RENEW, J. E.; HUANG, C. H. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1042, n. 1/2, p. 113-121, July 2004.
- 160 VOLMER, D. A. Multiresidue determination of sulfonamide antibiotics in milk by short column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Comm. Mass Spectrom.**, v. 10, n. 13, p. 1615-1620, 1996.
- 161 LI, S. G.; ZHAO, J. M.; WANG, W. X.; JIN, Y.; DU, Y. G. Simultaneous determination of ten sulfa drugs in chicken meat by high performance liquid chromatography coulometric array detector. **Chinese J. Anal. Chem.**, v. 33, n. 4, p. 442-446, Apr. 2005.
- 162 CHIAVARINO, B.; CRESTONI, M. E.; DI MARZIO, A.; FORNARINI, S. Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. **J. Chromatogr. B**, v. 706, n. 2, p. 269-277, Mar. 1998.
- 163 CANNAVAN, A.; HEWITT, S. A.; BLANCHFLOWER, W. J.; KENNEDY, D. G. Gas chromatographic mass spectrometric determination of sulfamethazine in animal tissues using a methyl/trimethylsilyl derivative. **Analyst**, v. 121, n. 10, p. 1457-1460, Oct. 1996.
- 164 TAKATSUKI, K.; KIKUCHI, T. Gas chromatographic mass spectrometric determination of six sulfonamide residues in egg and animal tissues. **J. AOAC Int.**, v. 73, n. 6, p. 886-892, 1990.

- 165 GOODSPEED, D. P.; SIMPSON, R. M.; ASHWORTH, R. B.; SHAFER, J. W.; COOK, H. R. Sensitive and specific gas-liquid chromatographic spectrophotometric screening procedure for trace levels of five sulfonamides in liver, kidney, and muscle tissue. **J. AOAC Int.**, v. 61, n. 5, p. 1050-1053, 1978.
- 166 CARIGNAN, G.; CARRIER, K. Quantitation and confirmation of sulfamethazine residues in swine muscle and liver by LC and GC/MS. **J. AOAC Int.**, v. 74, n. 3, p. 479-482, 1991.
- 167 REEVES, V. B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry. **J. Chromatogr. B.**, v. 723, n. 1, p. 127-137, Feb. 1999.
- 168 NG, C. L.; LEE, H. K.; LI, S. F. Y. Determination of sulphonamides in pharmaceuticals by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr.**, v. 632, n. 1/2, p. 165-170, 1993.
- 169 FUH, M. R. S.; CHU, S. Y. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Anal. Chim. Acta**, v. 499, n. 1, p. 215-221, Dec. 2003.
- 170 KATZ, S. E.; SIEWIERSKI, M. Bacillus stearothermophilus disc assay: a review. **J. AOAC Int.**, v. 78, n. 6, p. 1408-1415, 1995.
- 171 RUELA, I. C. A.; LIMA, J. A.; SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. Otimização e validação de método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Cien. Technol. Aliment.**, v. 21, n. 1, p. 139-146, jan./abr. 2005.
- 172 CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Aplicabilidade dos conjuntos para detecção de resíduos de antibióticos no leite em propriedades leiteiras. **O Biológico**, v. 62, n. 1, Jan./June 2000. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v62_1/aplicabilidade_dos_conjuntos_par.htm>. Acesso em: 20 jun 2007.
- 173 PASTOR-NAVARRO, N.; GALLEGU-IGLESIAS, E.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides application to bee honey analysis. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 923-933, Feb. 2007.
- 174 ZHANG, H.; WANG, L.; ZHANG, Y.; FANG, G.; ZHENG, W.; WANG, S. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for seven sulfonamides residues and investigation of matrix effects from different food samples. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 6, p. 2079-2084, Feb. 2007.

175 O'KEEFFE, M.; CRABBE, P.; SADEN, M.; WICHERS, J.; PETEGHEM, C. V.; KOHEN, F.; PIERACCINI, G.; MONETI, G. Preliminary evaluation of a lateral flow immunoassay device for screening urine samples for the presence of sulphamethazine. **J. Immunol. Methods**, v. 278, n. 1, p. 117-126, July 2003.

176 WANG, X.; LI, K.; SHI, D.; XIONG, N.; JIN, X.; XI, J.; BI, D. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for rapid detection of sulfonamides in eggs and chicken muscles. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 6, p. 2072-2078, Feb. 2007.

177 MSAGATI, T. A. M.; NGILA, J. C. Voltammetric detection of sulfonamides at a poly(3-methylthiophene) electrode. **Talanta**, v. 58, n. 3, p. 605-610, Sept. 2002.

178 BERZAS, J. J.; RODRIGUEZ, J.; CASTANEDA, G. Partial least squares method in the análisis by square wave voltammetry: simultaneous determination of sulphamethoxyypyridazine and trimethoprim. **Anal. Chim. Acta**, v. 349, n. 1/3, p. 303-311, Aug. 1997.

179 KOTOUCEK, M.; RUZICKOVA, J.; CECHOVA, I. Employment of differential pulse polarography and adsorptive voltammetry for the determination of some sulfonamides. **Microchim. Acta**, v. 2, n. 1/3, p. 109-117, Jan. 1989.

180 MALECKI, F.; STAROSCIK, R. Potentiometric determination of sulfonamides with a silver sulfide electrode. **Anal. Chim. Acta**, v. 139, n. 1, p. 353-357, July 1982.

181 YAO, S. Z.; SHIAO, J.; NIE, L. H. Sulpha drug sensitive membrane electrodes and their analytical applications. **Talanta**, v. 34, n. 12, p. 977-982, 1987.

182 VALCARCEL, M.; GALLEGO, M.; MONTERO, R. Indirect continuous automatic determination of pharmaceuticals by atomic absorption spectroscopy. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 8, n. 8/12, p. 655-661, 1990.

183 MONTERO, R.; GALLEGO, M.; VALCARCEL, M. Indirect atomic absorption spectrometric determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations and urine by continuous precipitation. **J. Anal. Atomic Spect.**, v. 3, n. 5, p. 725-729, Aug. 1988.

184 AYAD, M.; ELAZIZ, L. A.; ELKHEIR, A. Atomic absorption determination of certain sulfonamides via their metal complexes. **Anal. Lett.**, v. 16, n. 16, p. 1335-1342, 1983.

185 AGARWAL, S. P.; WALASH, M. I.; BLAKE, M. I. Spectrophotometric titration of sulfonamides with bromate-bromide solution. **J. Pharm. Sci.**, v. 61, n. 5, p. 779-780, May 1972.

- 186 VERMA, K. K.; TYAGI, P.; GULATI, A. K. Determination of mixtures of sulfonamides by titration with chloramine-T. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 5, n. 1, p. 51-58, 1987.
- 187 BIEGANOWSKA, M. L.; PETRUCZYNIK, A. Thin-layer and column chromatography of sulfonamides on aminopropyl silica gel. **Chromatographia**, v. 43, n. 11/12, p. 654-658, Dec. 1996.
- 188 MEDINA, A. R.; GARCIA, M. C. C.; DIAZ, A. M. A flow analysis system for the rapid determination of sulfonamides using a solid phase photometric sensing zone. **Anal. Lett.**, v. 35, n. 2, p. 269-282, 2002.
- 189 EVGENÉV, M. I.; GARMONOV, S. Y.; SHAKIROVA, L. S. Flow-injection determination of sulfanilamides in drugs and biological fluids with spectrophotometric detection. **J. Anal. Chem.**, v. 57, n. 1, p. 64-70, Jan. 2002.
- 190 FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, M. L.; BARRALES, P. O.; TORNE, G. R.; DÍAZ, A. M. A flow injection sensor for simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by using sephadex SP- C25 for continuous on-line separation and solid phase UV transduction. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 31, n. 4, p. 669-677, Mar. 2003.
- 191 DIEZ, N. M.; PEÑA, A. M.; GARCIA, M. C. M.; GIL, D. B.; CAÑADA, F. C. Fluorimetric determination of sulphaguanidine and sulphamethoxazole by host guest complexation in β -cyclodextrin and partial least squares calibration. **J. Fluoresc.**, v. 17, n. 3, p. 309-318, May 2007.
- 192 DIEZ, R.; SARABIA, L.; ORTIZ, M. C. Optimization of analytical conditions and validation of a fluorescence method for the determination of sulfadiazine in milk. **Anal. Bional. Chem.**, v. 388, n. 4, p. 957-968, June 2007.
- 193 VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, S.; GALLEGU, M. Simple screening systems in analytical chemistry. **Trac. Trends Anal. Chem.**, v. 18, n. 11, p. 685-694, Nov. 1999.
- 194 PENA, R.; ALCARAZ, M. C.; ARCE, L.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. Screening of aflotoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, v. 967, n. 2, p. 303-314, Aug. 2002.
- 195 CÁRDENAS, S.; GALLEGU, M.; VALCÁRCEL, M. Evaporative light scattering detector: a new tool for screening purposes. **Anal. Chim. Acta**, v. 402, n.1/2, p. 1-5, Dec. 1999.
- 196 VALCÁRCEL, M.; GALLEGU, M. Current and future screening systems, **Anal. Bional. Chem.**, v. 381, n. 1, p. 81-83, Jan. 2005.

197 TENA, M. T.; CASTRO, M. D. L.; VALCÁRCEL, M. Preliminary operations: a pending goal of today's analytical chemistry. **Anal. Proc.**, v. 30, n. 6, p. 276-279, 1993.

198 KRÄMER, P. M.; FRANKE, A.; STANDFUSS-GABISH, C. Flow injection immunoaffinity analysis (FIIAA) - a screening technology for atrazine and diuron in water samples. **Anal. Chim. Acta**, v. 399, n. 1/2, p. 89-97, Nov. 1999.

199 GAUDIN, V.; FONTAINE, J.; MARIS, P. Screening of penicillin residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay: comparison of chemical and enzymatic sample pre-treatment. **Anal. Chim. Acta**, v. 436, n. 2, p. 191, June 2001.

200 ZOUGAGH, M.; REDIGOLO, H.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. Screening and confirmation of PAHs in vegetable oil samples by use of supercritical fluid extraction in conjunction with liquid chromatography and fluorimetric detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 525, n.2, p. 265-271, Nov. 2004.

201 GAMBART, D.; CÁRDENAS, S.; GALLEGO, M.; VALCÁRCEL, M. Na automated screening system for benzodiazepines in human urine. **Anal. Chim. Acta**, v. 366, n. 1/3, p. 93-102, June 1998.

202 NOZAL, L.; ARCE, L.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. Development of a screening method for analytical control of antibiotic residues by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Anal. Chim. Acta**, v. 523, n. 1, p. 21-28, Oct. 2004.

203 GFRERER, M.; LANKMAYR, E. Screening, optimization and validation of microwave assisted extraction for the determination of persistent organochlorine pesticides. **Anal. Chim. Acta**, v. 533, n.2, p. 203-211, Mar. 2005.

204 MARTINS JÚNIOR, H. A.; KUSSUMI, T. A.; WANG, A. Y.; LEBRE, D. T. A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 2, p. 397-405, Mar./Apr. 2007.

205 REIG, M.; MORA, L.; NAVARRO, J. L.; TOLDRÁ, F. A chromatography method for the screening and confirmatory detection of dexamethasone. **Meat Sci.**, v. 74, n. 4, p. 676-680, Dec. 2006.

206 MORRA, V.; DAVIT, P.; CAPRA, P.; VINCENTI, M.; DI STILO, A.; BOTRÉ, F. Fast gas chromatographic mass spectrometric determination of diuretics and masking agents in human urine – development and validation of a productive screening protocol for antidoping analysis. **J. Chromatogr. A**, v. 1135, n. 2, p. 219-229, Dec. 2006.

207 SANTOS, S. M.; HENRIQUES, M.; DUARTE, A. C.; ESTEVES, V. I. Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 731-737, Feb. 2007.

208 TARBIN, J. A.; CLARK, P.; SHEARER, G. Screening of sulphonamides in egg using gas-chromatography mass selective detection and liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. B.**, v. 729, n. 1, p. 127-138, June, 1999.

209 LINDERBERG, R. H.; WENNERBERG, P.; JOHANSSON, M. I.; TYSKLIND, M.; ANDERSSON, B. A. V. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly man flows in five sewage treatment plants in Sweden. **Environ. Sci. Technol.**, v. 39, n. 10, p. 3421-3429, Apr. 2005.

210 ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, set./out. 2004.

211 MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, jan./feb. 2001.

212 ESTEVE-ROMERO, J. S.; SIMÓ-ALFONSO, E. F.; GARCIA-ALVAREZ-COQUE, M. C.; RAMIS-RAMOS, G. Micelar enhanced spectrophotometric determination of organic species. **Trac. Trends Anal. Chem.**, v. 14, n. 1, p. 29-37, Jan. 1995.

213 SILVA, F. M.; LACERDA, P. S. B.; JONES, J. J. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 103-110, jan./feb. 2005.

214 RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. **Flow injection analysis**. New York: John Wiley, 1998.

215 WENDLANT, W. W.; HECHT, H. G. **Reflectance spectroscopy**. New York: Interscience Publishers, 1996.

216 KEALEY, D. Quantitative reflectometry. 1. Principles and scope. **Talanta**, v. 19, n. 12, p. 1563-1569, Dec. 1972.

217 GHAUCH, A.; TURNAR, C.; FACHINGER, C.; RIMA, J.; CHAREF, A.; SUPTIL, J.; MARTIN-BOUYER, M. Use of diffuse reflectance spectrometry in spot test reactions for quantitative determination of cations in water. **Chemosphere**, v. 40, n. 12, p. 1327-1333, June 2000.

- 218 NARAYANASWAMY, R. Optical chemical sensors: transduction and signal processing. **Analyst**, v. 118, p.317-322, Apr. 1993.
- 219 TUBINO, M.; ROSSI, A. V.; MAGALHÃES, M. E. A. Quantitative spot tests of Fe (III), Cr (VI) and Ni (II) by reflectance measurements. **Anal. Lett.**, v. 30, n. 2, p.271-282, Jan. 1997.
- 220 GOTARDO, M. A. Desenvolvimento de métodos para análise de medicamentos utilizando reflectância difusa e espectrofotometria. 2006. 173 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- 221 REINECKE, D.; JENSEN, A.; FISTER, F.; SCHERNAU, U. Quantitative determination of organic compounds by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 60, n. 11, p. 1221-1224, June 1988.
- 222 FREI, R. W.; MACNEIL, J. D. **Diffuse reflectance spectroscopy in environmental problem-solving**. Cleveland: CRC, 1973. 220 p.
- 223 LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. **Anal. Chem.**, v. 55, n. 7, p. 712A-724A, June 1983.
- 224 ABDELLATEF, H. E. Utility of certain π -acceptors or the spectrophotometric determination of perindopril. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 17, n. 8, p.1267-1271, Sept. 1998.
- 225 ADIKWU, M. U.; OFOKANSI, K. C. Spectrophotometric determination of moclobemide by charge-transfer complexation. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 16, n. 3, p.529-532, Nov. 1997.
- 226 BEBAWY, L. I.; EL-KOUSY, N.; SUDDIK, J. K.; SHOKRY, M. Spectrophotometric determination of fluoxetine and sertraline using chloranil, 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone and iodine. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 21, n. 1, p.133-142, Oct. 1999.
- 227 WEINERT, P. L.; PEZZA, H. R.; OLIVEIRA, J. E.; PEZZA, L. A simplified spectrophotometric method for routine analysis of saccharin in commercial noncaloric sweeteners. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 26, p. 7788-7792, Dec. 2004.
- 228 CIAPINA, E. G.; SANTINI, A. O.; WEINERT, P. L.; GOTARDO, M. A.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Spectrophotometric determination of diclofenac in pharmaceutical preparations assisted by microwave oven. **Eclética Quim.**, v. 30, n. 1, p. 29-36, 2005.

229 SILVA, L. A. Desenvolvimento de método espectrofotométrico para determinação de azitromicina em formulações farmacêuticas. 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

230 BENATSKY, M.; TOMIK, B. Peroxides in organic solvents. **Chem. Listy**, v. 82, n. 7, p. 759-762, 1988.

231 WERKEMA, M. C. C.; AGUIAR, S. **Planejamento e análise de experimentos**: como identificar e avaliar as principais variáveis influentes em um processo. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, 1996.

232 WERKEMA, M. C. C.; AGUIAR, S. **Otimização estatística de processos**: como determinar a condição de operação de um processo que leva ao alcance de uma meta de melhoria. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, 1996.

233 BARROS, B. N.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Ed. Unicamp, 2001.

234 REZZOUG, S. A.; CAPART, R. Assessment of wood liquefaction I acidified ethylene glycol using experimental design methodology. **En. Conv. Manag.**, v. 44, p. 781-792, 2003.

235 LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004.

236 MILLER, J. C.; MILLER, J. N. **Statistics for Analytical Chemistry**. 2nd ed. London: Ellis Horwood, 1992.

237 RODRÍGUEZ, L. Q.; CAMPAÑA, A. M. G.; LINARES, C. J.; CEBA, M. R. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. **Anal. Lett.**, v. 26, n. 6, p. 1243-1458, 1993.

237 BADER, M. A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. **J. Chem. Educ.**, v. 57, n. 10, p. 703-706, Oct. 1980.

239 FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

240 SAEED, A.; HAQUE, S.; QURESHI, S. Z. Resin bead detection and spectrophotometric determination of oxyphenbutazone with p-dimethylaminocinnamaldehyde – application to bulk drug and dosage forms. **Talanta**, v. 40, n. 12, p. 1867-1871, 1993.

241 EL SHERIF, A. A.; WALASH, M. I.; EL-TARRAS, M. F.; OSMAN, A. O. Colorimetric determination of two nonsteroidal anti-inflammatory drugs using p-dimethylaminocinnamaldehyde. **Anal. Lett.**, v. 30, n. 10, p. 1881-1896, 1997.

242 VOGEL, A. I. **Análise inorgânica quantitativa**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1981.

243 DORONIN, S. Y.; CHERNOVA, R. K.; GUSAKOVA, N. N. Condensation of p-dimethylaminocinnamaldehyde with aniline and substituted anilines in micellar media. **Russian J. General Chem.**, v. 75, n. 2, p. 261-267, 2005.

244 THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

245 GREEN, M. D.; MOUNT, D. L.; TODD, G. D. Determination of sulfadoxine concentrations in whole blood using C18 solid phase extraction, sodium dodecyl sulfate and dimethylaminocinnamaldehyde. **Analyst**, v. 120, p. 2623-2626, Oct. 1995.

246 UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP 27 the national formulary USP 27-NF22. 27th ed. Rockville: MD, 2004.

247 HINZE, L. W.; SRINIVASAN, N.; SMITH, T. K.; I, S.; HOSHINO, H. **Advances in multidimensional luminescence**. Amsterdam: Elsevier, 1991, v. 1, p. 149-206.

248 LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. Green chemistry: os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Quím. Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, jan./feb. 2003.

249 AERTS, M. M. L.; BEED, W. M. J.; BRINKMAN, U. A. Monitoring of veterinary drug residues by a combination of continuous flow techniques and column-switching high-performance liquid chromatography. I. Sulphonamides in egg, meat and milk using post-column derivatization with dimethylaminobenzaldehyde. **J. Chromatogr.**, v. 435, n. 1, p. 97-112, Jan. 1988.

250 SATINSKY, D.; KARLICEK, R.; SVOBODA, A. Using on-line solid phase extraction for flow-injection spectrophotometric determination salbutamol. **Anal. Chim. Acta**, v. 455, n. , p. 103-109, 2002.

251 MEIRELES, J.; SKLENAROVÁ, H.; SATINSKY, D.; SOLICH, P.; ARAÚJO, A. N.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Determination of bopindolol using the flow injection technique coupled with solid phase extraction. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 33, n. 5, p. 1149-1153, Dec. 2003.

252 TZANAVARAS, P. D.; THEMELIS, D. G. Review of recent applications of flow injection spectrophotometry to pharmaceutical analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 588, n. 1, p. 1-9, Apr. 2007.

A Simplified Reflectometric Method for the Rapid Determination of Dipyrone in Pharmaceutical Formulations

Patrícia L. Weinert, Leonardo Pezza and Helena R. Pezza*

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, CP 355, 14801-970 Araraquara-SP, Brazil

Este artigo descreve um método simples, portátil e ambientalmente amigável para a rápida determinação de dipirona em medicamentos empregando a espectroscopia de reflectância difusa. O método proposto está baseado nas medidas de reflectância do composto alaranjado produzido na reação de *spot-test* entre dipirona e *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC), em meio ácido, usando papel de filtro como suporte sólido. Metodologias de planejamento de experimentos foram utilizadas para a otimização das condições experimentais. Todas as medidas de reflectância foram efetuadas em 510 nm e o intervalo linear foi de $1,42 \times 10^{-4}$ - $2,85 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, com coeficiente de correlação de 0,999. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram de $1,20 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $4,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente. A precisão intradia e interdia foi avaliada na análise de uma solução de dipirona $7,90 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (n = 10). Os coeficientes de variação foram 1,1 e 0,9%, respectivamente. O método proposto foi aplicado com êxito na determinação de dipirona em amostras comerciais de medicamentos. Não foram observadas interferências dos excipientes comuns em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos pelo método proposto estão em boa concordância com aqueles obtidos pelo procedimento da Farmacopéia Brasileira num nível de confiança de 95%.

This paper describes a simple, portable and environmentally friendly method for the rapid determination of dipyrone in pharmaceuticals by using diffuse reflectance spectroscopy. The proposed method is based on the reflectance measurements of the orange compound produced from the spot test reaction between dipyrone and *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (*p*-DAC), in acid medium, using a filter paper as solid support. Experimental design methodologies were used to optimize the measurement conditions. All reflectance measurements were carried out at 510 nm and the linear range was from 1.42×10^{-4} - 2.85×10^{-3} mol L⁻¹, with a correlation coefficient of 0.999. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 1.20×10^{-5} mol L⁻¹ and 4.00×10^{-5} mol L⁻¹, respectively. The intraday precision and interday precision were studied for 10 replicate analyses of 7.90×10^{-4} mol L⁻¹ dipyrone solution. The coefficients of variation were 1.1 and 0.9%, respectively. The proposed method was applied successfully to the determination of dipyrone in commercial brands of pharmaceuticals. No interferences were observed from the common excipients in formulations. The results obtained by the proposed method were favorably compared with those given by the Brazilian Pharmacopoeia procedure at 95% confidence level.

Keywords: dipyrone, reflectance spectroscopy, spot test, pharmaceutical formulations

Flow-injection Spectrophotometric Determination of Novalgin in Pharmaceuticals Using Micellar Medium

Patrícia Los WEINERT,* João Roberto FERNANDES,** Leonardo PEZZA,*
and Helena Redigolo PEZZA**†

**Instituto de Química-UNESP, P. O. Box 355, CEP 14801-970, Araraquara, SP, Brazil*

***Departamento de Química-FC/UNESP, 17033-360, Bauru, SP, Brazil*

A sensitive flow-injection (FI) procedure with spectrophotometric detection in a micellar medium is proposed for the determination of novalgin. The method is based on the instantaneous formation of a red-orange product ($\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$) after the reaction between novalgin and *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (*p*-DAC) in a dilute acid medium. The sensitivity of this reaction was increased by a factor of 5.6 in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS). Experimental design methodologies were used to optimize the chemical and FI variables. The calibration curve was linear in the range of 1.45×10^{-6} to $2.90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ with an excellent correlation coefficient ($r = 0.9999$). The detection limit was $1.31 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 20$, RSD = 2.0%). No interferences were observed from the common excipients. The results obtained by the proposed method were favorably compared with those given by the iodometric reference method at 95% confidence level.

(Received April 23, 2007; Accepted July 17, 2007; Published December 10, 2007)

Introduction

Novalgin (sodium salt of 1-phenyl-2,3-dimethyl-4-methylaminomethane sulphonate-5-pyrazolone; analgin, dipyrone, metamizol) is a pyrazolone derivate widely used as an analgesic, antipyretic and antispasmodic in several pharmaceutical formulations.¹ It was introduced into clinical practice in 1922. Due to its strong analgesic effect, available parenteral formulation and low cost, novalgin is extensively used in many countries.^{2,3}

Various methods have been established for the quantitative determination of novalgin in pharmaceutical formulations including titrimetry in aqueous^{4,5} and non-aqueous⁶ media, HPLC with UV detection,⁷⁻⁹ voltammetry,¹⁰ polarography¹¹ and spectrophotometry.¹²⁻¹⁸

Nowadays, more strict regulation related to the quality control of pharmaceuticals has led to increasing demands for the automation of the analytical assays carried out in appropriate control laboratories. Flow injection analysis (FIA) is a versatile instrumental tool due to its simplicity, small sample volumes, low reagent consumption, and high reproducibility; such analysis generally allows the acquisition of a great number of analytical data at low cost and in a relatively short analysis time.¹⁹ Flow injection procedures employing various types of detection has also been applied for novalgin analysis in pharmaceuticals, such as: amperometric,²⁰ turbidimetric,²¹ potentiometric,²² chemilumimetric,²³ fluorimetric²⁴ and spectrophotometric^{25,26} detection. To the best of our knowledge, there are no reports on flow-injection spectrophotometric determination of novalgin in micellar media.

The analytical utility of micelles is evident in a wide variety

of analytical techniques from instrumental to classical wet chemical methods of analysis. Micelles can increase the molar absorptivity of the chromophore, modify equilibrium constants and reaction yields, shift spectral bands, co-solubilize samples, reagents and products, and catalyze reactions.²⁷

The micellar medium can improve the spectrophotometric detection in flow injection analysis by providing an increase in the formation rate of the chromophore and an increase in the sensitivity.²⁷ In addition, the surfactants can also be useful in softening the experimental conditions required to carry out the reaction, such as: reducing the temperature or acid and reagent concentrations.^{27,28} This is of interest for simplification of manual and automated analytical procedures, and will contribute to green chemistry,²⁹ due to its capability of decreasing the reagent consumption and as a consequence, minimizing effluent generation.

The present work describes a FI spectrophotometric procedure for the determination of novalgin using sodium dodecyl sulfate (SDS) micellar medium to greatly improve the sensitivity of the condensation of *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (*p*-DAC) with novalgin, in acid medium. Experimental design approaches and the response surface analysis methodology were used as methods of maximizing the response.

The development and validation of the proposed FI spectrophotometric procedure in micellar medium and its application to novalgin determination in pharmaceuticals are described. The proposed procedure is highly sensitive, simple, and rapid, does not involve heating steps and has very small sample consumption when compared with other procedures.

Experimental

Apparatus

The flow-through measurements were carried out using an

† To whom correspondence should be addressed.

**DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE CITRATO DE SILDENAFIL
(VIAGRA[®]) EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Patrícia Los Weinert, Leonardo Pezza e Helena Redigolo Pezza *

Instituto de Química - UNESP, CP 355, CEP 14801-970

Araraquara, SP, Brasil

***e-mail: hrpezza@iq.unesp.br**

Química Nova, 00, 000-000, 2008.

Tabela 1. Screening para o nível de concentração 50,0 ppb.

| n° | [Sulfonamidas] adicionada (ppb) | | | | | | | [sulfonamida] encontrada (ppb) |
|----|---------------------------------|------|------|------|------|------|------|--------------------------------|
| | A | B | C | D | E | F | G | |
| 1 | 50,0 | | | | | | | 49,1 |
| 2 | | 50,0 | | | | | | 52,7 |
| 3 | | | 50,0 | | | | | 51,0 |
| 4 | | | | 50,0 | | | | 52,0 |
| 5 | | | | | 50,0 | | | 52,2 |
| 6 | | | | | | 50,0 | | 50,6 |
| 7 | | | | | | | 50,0 | 50,4 |
| 8 | 25,0 | | | | | | 25,0 | 47,9 |
| 9 | | 25,0 | 25,0 | | | | | 49,1 |
| 10 | | 25,0 | | | 25,0 | | | 48,3 |
| 11 | | | 25,0 | | | | 25,0 | 51,1 |
| 12 | | | | 25,0 | 25,0 | | | 48,6 |
| 13 | | | | | | 25,0 | 25,0 | 51,4 |
| 14 | | | 25,0 | 25,0 | | | | 50,0 |
| 15 | 16,7 | 16,7 | | | 16,7 | | | 50,1 |
| 16 | 16,7 | | 16,7 | | | | 16,7 | 52,9 |
| 17 | 16,7 | | | | 16,7 | 16,7 | | 49,5 |
| 18 | | 16,7 | 16,7 | 16,7 | | | | 50,6 |
| 19 | | | 16,7 | 16,7 | | | 16,7 | 50,8 |
| 20 | | | | | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 47,6 |
| 21 | 16,7 | | | 16,7 | 16,7 | | | 48,7 |
| 22 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | | | | 47,1 |
| 23 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | | | | 12,5 | 48,2 |
| 24 | 12,5 | | 12,5 | 12,5 | 12,5 | | | 51,1 |
| 25 | 12,5 | | | 12,5 | | 12,5 | 12,5 | 47,2 |
| 26 | | 12,5 | | 12,5 | 12,5 | | 12,5 | 51,4 |
| 27 | 12,5 | 12,5 | | | 12,5 | | 12,5 | 48,6 |
| 28 | | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | | | 49,3 |
| 29 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | | | 50,7 |
| 30 | 10,0 | 10,0 | | | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 48,8 |
| 31 | 10,0 | | 10,0 | 10,0 | 10,0 | | 10,0 | 102,3 |
| 32 | | | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 50,3 |
| 33 | | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | | 10,0 | 51,1 |
| 34 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | | 10,0 | | 10,0 | 53,6 |
| 35 | 10,0 | 10,0 | | 10,0 | 10,0 | | 10,0 | 50,9 |
| 36 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | | 48,0 |
| 37 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | | 8,33 | 51,7 |
| 38 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | | 8,33 | 8,33 | 52,3 |
| 39 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 51,8 |
| 40 | 8,33 | 8,33 | | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 48,2 |
| 41 | 8,33 | | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 51,0 |
| 42 | | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 49,9 |
| 43 | 7,14 | 7,14 | 7,14 | 7,14 | 7,14 | 7,14 | 7,14 | 52,0 |

* Caixa azul refere-se a resultados falsos positivos

A = Sulfadipiridazina;

B = Sulfatiazol;

C = Sulfametazina;

D = Sulfamezarina;

E = Sulfacetamida sódica;

F = Sulfametoxazol;

G = Sulfanilamida.

Tabela 2. Screening para o nível de concentração 75,0 ppb.

| n° | [Sulfonamidas] adicionada (ppb) | | | | | | | [sulfonamida] encontrada (ppb) |
|----|---------------------------------|------|------|------|------|------|------|--------------------------------|
| | A | B | C | D | E | F | G | |
| 1 | 75,0 | | | | | | | 85,6 |
| 2 | | 75,0 | | | | | | 73,3 |
| 3 | | | 75,0 | | | | | 76,3 |
| 4 | | | | 75,0 | | | | 76,0 |
| 5 | | | | | 75,0 | | | 78,2 |
| 6 | | | | | | 75,0 | | 73,5 |
| 7 | | | | | | | 75,0 | 71,3 |
| 8 | 32,5 | | | | | | 32,5 | 76,0 |
| 9 | | 32,5 | 32,5 | | | | | 75,4 |
| 10 | | 32,5 | | | 32,5 | | | 75,4 |
| 11 | | | 32,5 | | | | 32,5 | 76,5 |
| 12 | | | | 32,5 | 32,5 | | | 74,7 |
| 13 | | | | | | 32,5 | 32,5 | 72,6 |
| 14 | | | 32,5 | 32,5 | | | | 75,6 |
| 15 | 25,0 | 25,0 | | | 25,0 | | | 75,9 |
| 16 | 25,0 | | 25,0 | | | | 25,0 | 105,8 |
| 17 | 25,0 | | | | 25,0 | 25,0 | | 75,4 |
| 18 | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | | | 74,6 |
| 19 | | | 25,0 | 25,0 | | | 25,0 | 75,1 |
| 20 | | | | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 73,6 |
| 21 | 25,0 | | | 25,0 | 25,0 | | | 74,1 |
| 22 | 18,8 | 18,8 | 18,8 | 18,8 | | | | 77,3 |
| 23 | 18,8 | 18,8 | 18,8 | | | | 18,8 | 74,8 |
| 24 | 18,8 | | 18,8 | 18,8 | 18,8 | | | 73,7 |
| 25 | 18,8 | | | 18,8 | | 18,8 | 18,8 | 75,8 |
| 26 | | 18,8 | | 18,8 | 18,8 | | 18,8 | 78,2 |
| 27 | 18,8 | 18,8 | | | 18,8 | | 18,8 | 75,2 |
| 28 | | 18,8 | 18,8 | 18,8 | 18,8 | | | 72,1 |
| 29 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | | | 77,6 |
| 30 | 15,0 | 15,0 | | | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 74,4 |
| 31 | 15,0 | | 15,0 | 15,0 | 15,0 | | 15,0 | 76,0 |
| 32 | | | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 72,7 |
| 33 | | 15,0 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | | 15,0 | 77,2 |
| 34 | 15,0 | 15,0 | 15,0 | | 15,0 | | 15,0 | 74,8 |
| 35 | 15,0 | 15,0 | | 15,0 | 15,0 | | 15,0 | 74,0 |
| 36 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | | 75,0 |
| 37 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | | 12,5 | 73,2 |
| 38 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | | 12,5 | 12,5 | 76,5 |
| 39 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 72,7 |
| 40 | 12,5 | 12,5 | | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 77,2 |
| 41 | 12,5 | | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 77,4 |
| 42 | | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 73,5 |
| 43 | 10,7 | 10,7 | 10,7 | 10,7 | 10,7 | 10,7 | 10,7 | 76,9 |

* Caixa azul refere-se a resultados falsos positivos

A = Sulfadipiridazina;

B = Sulfatiazol;

C = Sulfametazina;

D = Sulfamezarina;

E = Sulfacetamida sódica;

F = Sulfametoxazol;

G = Sulfanilamida.

Tabela 3. Screening para o nível de concentração de 100,0 ppb.

| n° | [Sulfonamidas] adicionada (ppb) | | | | | | | [sulfonamida] encontrada (ppb) |
|----|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------------|
| | A | B | C | D | E | F | G | |
| 1 | 100,0 | | | | | | | 97,9 |
| 2 | | 100,0 | | | | | | 101,8 |
| 3 | | | 100,0 | | | | | 103,7 |
| 4 | | | | 100,0 | | | | 103,6 |
| 5 | | | | | 100,0 | | | 99,4 |
| 6 | | | | | | 100,0 | | 102,4 |
| 7 | | | | | | | 100,0 | 107,4 |
| 8 | 50,0 | 50,0 | | | | | | 99,5 |
| 9 | 50,0 | | 50,0 | | | | | 102,7 |
| 10 | 50,0 | | | 50,0 | | | | 103,2 |
| 11 | 50,0 | | | | 50,0 | | | 99,1 |
| 12 | 50,0 | | | | | 50,0 | | 101,9 |
| 13 | 50,0 | | | | | | 50,0 | 104,1 |
| 14 | | 50,0 | 50,0 | | | | | 102,6 |
| 15 | | 50,0 | | 50,0 | | | | 104,0 |
| 16 | | 50,0 | | | 50,0 | | | 102,6 |
| 17 | | 50,0 | | | | 50,0 | | 104,4 |
| 18 | | 50,0 | | | | | 50,0 | 97,2 |
| 19 | | | 50,0 | 50,0 | | | | 103,9 |
| 20 | | | 50,0 | | 50,0 | | | 102,1 |
| 21 | | | 50,0 | | | 50,0 | | 102,4 |
| 22 | | | 50,0 | | | | 50,0 | 99,9 |
| 23 | | | | 50,0 | 50,0 | | | 102,4 |
| 24 | | | | 50,0 | | 50,0 | | 103,5 |
| 25 | | | | 50,0 | | | 50,0 | 103,7 |
| 26 | | | | | 50,0 | 50,0 | | 98,1 |
| 27 | | | | | 50,0 | | 50,0 | 102,0 |
| 28 | | | | | | 50,0 | 50,0 | 104,5 |
| 29 | 33,3 | 33,3 | 33,3 | | | | | 98,1 |
| 30 | 33,3 | 33,3 | | 33,3 | | | | 99,1 |
| 31 | 33,3 | 33,3 | | | 33,3 | | | 81,1 |
| 32 | 33,3 | 33,3 | | | | 33,3 | | 104,1 |
| 33 | 33,3 | 33,3 | | | | | 33,3 | 100,8 |
| 34 | 33,3 | | 33,3 | 33,3 | | | | 86,9 |
| 35 | 33,3 | | 33,3 | | 33,3 | | | 102,7 |
| 36 | 33,3 | | 33,3 | | | 33,3 | | 102,4 |
| 37 | 33,3 | | 33,3 | | | | 33,3 | 100,6 |
| 38 | 33,3 | | | 33,3 | 33,3 | | | 81,2 |
| 39 | 33,3 | | | 33,3 | | 33,3 | | 102,2 |
| 40 | 33,3 | | | 33,3 | | | 33,3 | 99,2 |
| 41 | 33,3 | | | | 33,3 | 33,3 | | 100,5 |
| 42 | 33,3 | | | | 33,3 | | 33,3 | 98,5 |
| 43 | 33,3 | | | | | 33,3 | 33,3 | 101,9 |
| 44 | | 33,3 | 33,3 | 33,3 | | | | 100,0 |
| 45 | | 33,3 | 33,3 | | 33,3 | | | 99,1 |
| 46 | | 33,3 | 33,3 | | | 33,3 | | 81,2 |
| 47 | | 33,3 | 33,3 | | | | 33,3 | 100,1 |
| 48 | | 33,3 | | 33,3 | 33,3 | | | 102,5 |
| 49 | | 33,3 | | 33,3 | | 33,3 | | 99,6 |
| 50 | | 33,3 | | 33,3 | | | 33,3 | 101,8 |
| 51 | | 33,3 | | | 33,3 | 33,3 | | 100,7 |
| 52 | | 33,3 | | | 33,3 | | 33,3 | 97,3 |

| | | | | | | | | |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 53 | | 33,3 | | | | 33,3 | 33,3 | 97,1 |
| 54 | | | 33,3 | 33,3 | 33,3 | | | 102,0 |
| 55 | | | 33,3 | 33,3 | | 33,3 | | 99,1 |
| 56 | | | 33,3 | 33,3 | | | 33,3 | 97,1 |
| 57 | | | 33,3 | | 33,3 | 33,3 | | 102,2 |
| 58 | | | 33,3 | | 33,3 | | 33,3 | 100,3 |
| 59 | | | 33,3 | | | 33,3 | 33,3 | 99,3 |
| 60 | | | | 33,3 | 33,3 | 33,3 | | 97,1 |
| 61 | | | | 33,3 | 33,3 | | 33,3 | 102,5 |
| 62 | | | | 33,3 | | 33,3 | 33,3 | 101,2 |
| 63 | | | | | 33,3 | 33,3 | 33,3 | 113,7 |
| 64 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | | | 97,5 |
| 65 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | | | 103,5 |
| 66 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | | 25,0 | | 96,9 |
| 67 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | | | 25,0 | 103,8 |
| 68 | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | | | 100,2 |
| 69 | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | | 25,0 | | 103,1 |
| 70 | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | | | 25,0 | 109,3 |
| 71 | 25,0 | 25,0 | | | 25,0 | 25,0 | | 102,9 |
| 72 | 25,0 | 25,0 | | | 25,0 | | 25,0 | 104,1 |
| 73 | 25,0 | 25,0 | | | | 25,0 | 25,0 | 103,0 |
| 74 | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | | 102,6 |
| 75 | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | | 104,4 |
| 76 | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | | | 25,0 | 97,7 |
| 77 | 25,0 | | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | | 103,0 |
| 78 | 25,0 | | 25,0 | | 25,0 | | 25,0 | 104,2 |
| 79 | 25,0 | | 25,0 | | | 25,0 | 25,0 | 100,5 |
| 80 | 25,0 | | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | 101,3 |
| 81 | 25,0 | | | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | 104,4 |
| 82 | 25,0 | | | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | 99,2 |
| 83 | 25,0 | | | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 102,5 |
| 84 | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | | 96,4 |
| 85 | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | | 88,8 |
| 86 | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | | 25,0 | 99,4 |
| 87 | | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | | 100,6 |
| 88 | | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | | 25,0 | 103,6 |
| 89 | | 25,0 | 25,0 | | | 25,0 | 25,0 | 104,6 |
| 90 | | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | 104,0 |
| 91 | | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | 102,9 |
| 92 | | 25,0 | | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | 102,1 |
| 93 | | 25,0 | | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 99,8 |
| 94 | | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | 99,9 |
| 95 | | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | 99,5 |
| 96 | | | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | 111,5 |
| 97 | | | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 100,7 |
| 98 | | | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 100,2 |
| 99 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | | | 86,8 |
| 100 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | | 20,0 | | 97,1 |
| 101 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | | | 20,0 | 104,9 |
| 102 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | | 20,0 | 20,0 | | 99,1 |
| 103 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | | 20,0 | | 20,0 | 96,7 |
| 104 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | | | 20,0 | 20,0 | 99,3 |
| 105 | 20,0 | 20,0 | | 20,0 | 20,0 | 20,0 | | 99,2 |
| 106 | 20,0 | 20,0 | | 20,0 | 20,0 | | 20,0 | 98,7 |
| 107 | 20,0 | 20,0 | | 20,0 | | 20,0 | 20,0 | 98,9 |
| 108 | 20,0 | 20,0 | | | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 97,0 |

| | | | | | | | | |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 109 | 20,0 | | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | | 98,4 |
| 110 | 20,0 | | 20,0 | 20,0 | 20,0 | | 20,0 | 96,5 |
| 111 | 20,0 | | 20,0 | 20,0 | | 20,0 | 20,0 | 97,0 |
| 112 | 20,0 | | 20,0 | | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 96,9 |
| 113 | 20,0 | | | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 97,1 |
| 114 | | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | | 96,9 |
| 115 | | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | | 20,0 | 98,5 |
| 116 | | 20,0 | 20,0 | 20,0 | | 20,0 | 20,0 | 98,8 |
| 117 | | 20,0 | 20,0 | | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 97,1 |
| 118 | | 20,0 | | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 90,6 |
| 119 | | | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 96,3 |
| 120 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | | 97,8 |
| 121 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | | 16,7 | 97,2 |
| 122 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | | 16,7 | 16,7 | 101,5 |
| 123 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 105,5 |
| 124 | 16,7 | 16,7 | | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 97,4 |
| 125 | 16,7 | | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 99,6 |
| 126 | | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 107,3 |
| 127 | 14,3 | 14,3 | 14,3 | 14,3 | 14,3 | 14,3 | 14,3 | 99,0 |

* Caixa azul refere-se a resultados falsos positivos

* Caixa amarela refere-se a resultados falsos negativos

A = Sulfadipiridazina;

B = Sulfatiazol;

C = Sulfametazina;

D = Sulfamezarina;

E = Sulfacetamida sódica;

F = Sulfametoxazol;

G = Sulfanilamida.

Tabela 4. Screening para o nível de concentração 150,0 ppb.

| n° | [Sulfonamidas] adicionada (ppb) | | | | | | | [Sulfonamida] encontrada (ppb) |
|----|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------------|
| | A | B | C | D | E | F | G | |
| 1 | 150,0 | | | | | | | 148,8 |
| 2 | | 150,0 | | | | | | 150,6 |
| 3 | | | 150,0 | | | | | 151,3 |
| 4 | | | | 150,0 | | | | 151,3 |
| 5 | | | | | 150,0 | | | 148,6 |
| 6 | | | | | | 150,0 | | 149,9 |
| 7 | | | | | | | 150,0 | 148,8 |
| 8 | 75,0 | | | | | | 75,0 | 150,7 |
| 9 | | 75,0 | 75,0 | | | | | 147,7 |
| 10 | | 75,0 | | | 75,0 | | | 147,6 |
| 11 | | | 75,0 | | | | 75,0 | 145,2 |
| 12 | | | | 75,0 | 75,0 | | | 148,7 |
| 13 | | | | | | 75,0 | 75,0 | 152,1 |
| 14 | | | 75,0 | 75,0 | | | | 148,9 |
| 15 | 50,0 | 50,0 | | | 50,0 | | | 153,2 |
| 16 | 50,0 | | 50,0 | | | | 50,0 | 142,1 |
| 17 | 50,0 | | | | 50,0 | 50,0 | | 155,5 |
| 18 | | 50,0 | 50,0 | 50,0 | | | | 150,3 |
| 19 | | | 50,0 | 50,0 | | | 50,0 | 145,5 |
| 20 | | | | | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 146,3 |
| 21 | 50,0 | | | 50,0 | 50,0 | | | 147,0 |
| 22 | 37,5 | 37,5 | 37,5 | 37,5 | | | | 148,9 |
| 23 | 37,5 | 37,5 | 37,5 | | | | 37,5 | 151,8 |
| 24 | 37,5 | | 37,5 | 37,5 | 37,5 | | | 154,1 |
| 25 | 37,5 | | | 37,5 | | 37,5 | 37,5 | 157,0 |
| 26 | | 37,5 | | 37,5 | 37,5 | | 37,5 | 150,2 |
| 27 | 37,5 | 37,5 | | | 37,5 | | 37,5 | 149,7 |
| 28 | | 37,5 | 37,5 | 37,5 | 37,5 | | | 152,5 |
| 29 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | | | 152,7 |
| 30 | 30,0 | 30,0 | | | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 156,8 |
| 31 | 30,0 | | 30,0 | 30,0 | 30,0 | | 30,0 | 153,2 |
| 32 | | | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 146,5 |
| 33 | | 30,0 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | | 30,0 | 140,1 |
| 34 | 30,0 | 30,0 | 30,0 | | 30,0 | | 30,0 | 154,2 |
| 35 | 30,0 | 30,0 | | 30,0 | 30,0 | | 30,0 | 152,4 |
| 36 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | 156,6 |
| 37 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | 150,2 |
| 38 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | 146,0 |
| 39 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 153,2 |
| 40 | 25,0 | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 156,5 |
| 41 | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 153,1 |
| 42 | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 152,0 |
| 43 | 21,4 | 21,4 | 21,4 | 21,4 | 21,4 | 21,4 | 21,4 | 144,7 |

A = Sulfadipiridazina;

B = Sulfatiazol;

C = Sulfametazina;

D = Sulfamezarina;

E = Sulfacetamida sódica;

F = Sulfametoxazol;

G = Sulfanilamida.

Tabela 5. Screening para o nível de concentração 200,0 ppb.

| n° | [Sulfonamidas] adicionada (ppb) | | | | | | | [Sulfonamidas] encontrada (ppb) |
|----|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------------------------|
| | A | B | C | D | E | F | G | |
| 1 | 200,0 | | | | | | | 207,0 |
| 2 | | 200,0 | | | | | | 210,6 |
| 3 | | | 200,0 | | | | | 204,4 |
| 4 | | | | 200,0 | | | | 203,5 |
| 5 | | | | | 200,0 | | | 206,6 |
| 6 | | | | | | 200,0 | | 208,8 |
| 7 | | | | | | | 200,0 | 206,2 |
| 8 | 100,0 | | | | | | 100,0 | 199,3 |
| 9 | | 100,0 | 100,0 | | | | | 201,8 |
| 10 | | 100,0 | | | 100,0 | | | 204,4 |
| 11 | | | 100,0 | | | | 100,0 | 198,3 |
| 12 | | | | 100,0 | 100,0 | | | 201,2 |
| 13 | | | | | | 100,0 | 100,0 | 203,8 |
| 14 | | | 100,0 | 100,0 | | | | 200,5 |
| 15 | 66,7 | 66,7 | | | 66,7 | | | 199,4 |
| 16 | 66,7 | | 66,7 | | | | 66,7 | 202,4 |
| 17 | 66,7 | | | | 66,7 | 66,7 | | 204,2 |
| 18 | | 66,7 | 66,7 | 66,7 | | | | 205,5 |
| 19 | | | 66,7 | 66,7 | | | 66,7 | 203,6 |
| 20 | | | | | 66,7 | 66,7 | 66,7 | 201,2 |
| 21 | 66,7 | | | 66,7 | 66,7 | | | 197,5 |
| 22 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | | | | 207,1 |
| 23 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | | | | 50,0 | 206,7 |
| 24 | 50,0 | | 50,0 | 50,0 | 50,0 | | | 206,1 |
| 25 | 50,0 | | | 50,0 | | 50,0 | 50,0 | 273,7 |
| 26 | | 50,0 | | 50,0 | 50,0 | | 50,0 | 206,7 |
| 27 | 50,0 | 50,0 | | | 50,0 | | 50,0 | 205,8 |
| 28 | | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | | | 206,0 |
| 29 | 40,0 | 40,0 | 40,0 | 40,0 | 40,0 | | | 199,3 |
| 30 | 40,0 | 40,0 | | | 40,0 | 40,0 | 40,0 | 199,0 |
| 31 | 40,0 | | 40,0 | 40,0 | 40,0 | | 40,0 | 200,4 |
| 32 | | | 40,0 | 40,0 | 40,0 | 40,0 | 40,0 | 198,5 |
| 33 | | 40,0 | 40,0 | 30,0 | 40,0 | | 40,0 | 201,4 |
| 34 | 40,0 | 40,0 | 40,0 | | 40,0 | | 40,0 | 198,2 |
| 35 | 40,0 | 40,0 | | 40,0 | 40,0 | | 40,0 | 201,8 |
| 36 | 33,3 | 33,3 | 33,3 | 33,3 | 33,3 | 33,3 | | 196,0 |
| 37 | 33,3 | 33,3 | 33,3 | 33,3 | 33,3 | | 33,3 | 204,9 |
| 38 | 33,3 | 33,3 | 33,3 | 33,3 | | 33,3 | 33,3 | 212,8 |
| 39 | 33,3 | 33,3 | 33,3 | | 33,3 | 33,3 | 33,3 | 207,6 |
| 40 | 33,3 | 33,3 | | 33,3 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 211,2 |
| 41 | 25,0 | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 207,4 |
| 42 | | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 207,0 |
| 43 | 21,4 | 21,4 | 21,4 | 21,4 | 21,4 | 21,4 | 21,4 | 207,6 |

A = Sulfadipiridazina;

B = Sulfatiazol;

C = Sulfametazina;

D = Sulfamezarina;

E = Sulfacetamida sódica;

F = Sulfametoxazol;

G = Sulfanilamida.

Amostra: Água do Ribeirão dos Porcos – S: 21°26'705; WO: 48°30'956; A: 505m
Coletada pelo Dr. Ademir dos Santos – CRQ IV 04412606, em 14 de Junho de 2007.

Tabela 1. Resultados para fins de orientação.

| PARÂMETROS | CONCENTRAÇÃO | VMP CONAMA 357 (mg L ⁻¹) |
|---|--------------|---|
| Óleos e graxas (mg L ⁻¹) | VA | VA |
| Cor (mg Pt L ⁻¹) | 14,00 | 75 |
| Turbidez (UNT) | 6,00 | 100 |
| DBO ₅ (20°C) (mg L ⁻¹ de O ₂) | 7,80 | 5 |
| Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹) | 7,20 | 5 |
| pH | 7,55 | 6,0 a 9,0 |
| Alumínio dissolvido (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,1 |
| Nitrogênio amoniacal (mg L ⁻¹) | <0,50 | 3,70 |
| Arsênio total (mg L ⁻¹) | <0,01 | 0,01 |
| Bário total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,7 |
| Berílio total (mg L ⁻¹) | <0,04 | 0,04 |
| Boro total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,5 |
| Benzeno (mg L ⁻¹) | <0,001 | 0,005 |
| Benzo-a-pireno (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,05 |
| Cádmio total (mg L ⁻¹) | <0,001 | 0,001 |
| Cianeto livre (mg L ⁻¹) | <0,005 | 0,005 |
| Chumbo total (mg L ⁻¹) | <0,01 | 0,01 |
| Cloreto total (mg L ⁻¹) | 2,50 | 250 |
| Cloro residual total (mg L ⁻¹) | <0,01 | 0,01 |
| Cobalto total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,05 |
| Cobre dissolvido (mg L ⁻¹) | <0,009 | 0,009 |
| Crômio total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,05 |
| 1,1-dicloroeteno (mg L ⁻¹) | <0,001 | 0,003 |
| 1,2-dicloroetano (mg L ⁻¹) | <0,001 | 0,01 |
| Fenóis (índices) (mg L ⁻¹) | <0,003 | 0,003 |
| Ferro dissolvido (mg L ⁻¹) | 0,55 | 0,3 |
| Fluoreto total (mg L ⁻¹) | 0,11 | 1,4 |
| Fósforo total (ambiente lóxico) (mg L ⁻¹) | <0,10 | 0,1 |
| Lítio total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 2,5 |
| Manganês total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,1 |
| Mercúrio total (mg L ⁻¹) | <0,0002 | 0,0002 |
| Níquel total (mg L ⁻¹) | <0,025 | 0,025 |
| Nitrato (mg L ⁻¹) | 0,15 | 10 |
| Nitrito (mg L ⁻¹) | <0,005 | 1,0 |
| Prata total (mg L ⁻¹) | <0,01 | 0,01 |
| Pentaclorofenol (µg L ⁻¹) | <0,002 | 0,009 |
| Selênio total (mg L ⁻¹) | <0,01 | 0,01 |

Cont.

| | | |
|--|--------|-------|
| Sólidos totais dissolvidos (mg L ⁻¹) | 57,53 | 500 |
| Substâncias tensoativas (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,5 |
| Sulfato total (mg L ⁻¹) | <1,00 | 250 |
| Sulfeto total (mg L ⁻¹) | <0,002 | 0,002 |
| Tetracloroetano (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,01 |
| Tricloroetano (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,03 |
| Tetracloroeto de carbono (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,002 |
| 2,4,6-triclorofenol | <0,002 | 0,01 |
| Urânio total (mg L ⁻¹) | <0,02 | 0,02 |
| Vanádio total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,1 |
| Zinco total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,18 |
| Aldrin + Dieldrin (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,005 |
| Clordano (µg L ⁻¹) | <0,005 | 0,04 |
| DDT (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,002 |
| Endrin (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,004 |
| Endossulfan (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,056 |
| Epóxido de heptacloro + heptacloro (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,01 |
| Lindano (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,02 |
| Metóxicloro (µg L ⁻¹) | <0,002 | 0,03 |
| Dodecacloro pentaciclododecano (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,01 |
| PCB's (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,001 |
| Toxafeno (µg L ⁻¹) | <0,002 | 0,01 |
| Demeton (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,1 |
| Gution (µg L ⁻¹) | <0,005 | 0,005 |
| Malation (µg L ⁻¹) | <0,005 | 0,1 |
| Paration (µg L ⁻¹) | <0,005 | 0,04 |
| Carbaril (µg L ⁻¹) | <0,005 | 0,02 |
| Organofosforados e carbamatos totais (µg L ⁻¹) | <0,002 | 10 |
| 2,4-D (µg L ⁻¹) | <0,005 | 4 |
| 2,4,5-TP (µg L ⁻¹) | <0,005 | 10,0 |
| 2,4,5-T (µg L ⁻¹) | <0,005 | 2,0 |

Notas:

- (VMP) Valor máximo permitido pela Resolução CONAMA 357 de 17 de Março de 2005 para águas doces de classe 2.

- Os metais foram determinados por Espectrometria de Emissão Atômica – ICP-OES ou Espectrometria de Absorção Atômica – EAA, de acordo com metodologias recomendadas pelo Standard Methods for Examination of Water and Wastewater – 20^a Edição. - PAHs: EPA, Método 610, validado p/ método 8100 - Carbamatos - Método EPA 8321A- HPLC; 2,4D - Método EPA 8321A/ 2,4T- 8321A / Clorados- 8020 , 8082 / Acrilamida 8032 - BTEX: EPA Test methods for evaluating solid waste - v. 1B - Laboratory Manual Physical/Chemical Methods. Métodos 3810, 8020.

Conclusão: De acordo com os parâmetros determinados e listados neste resultado analítico, trata-se de água que atende os padrões de qualidade estabelecidos pela Resolução CONAMA 357 de 17 de Março de 2005 para águas doces de classe 2.

Amostra: Água da Represa Fucci – S: 21°24'788; WO: 48°30'851; A: 523m –
Chácara Fucci – Estrada Municipal Taquaritinga a Guariroba - (Coletada pelo Dr. Ademir dos Santos
– CRQ IV 04412606, em 14 de Junho de 2007).

Tabela 2. Resultados para fins de orientação.

| PARÂMETROS | CONCENTRAÇÃO | CONAMA 357 (mg L ⁻¹) |
|---|--------------|----------------------------------|
| Óleos e graxas (mg L ⁻¹) | VA | VA |
| Cor (mg Pt L ⁻¹) | 41,00 | 75 |
| Turbidez (UNT) | 3,00 | 100 |
| DBO ₅ (20°C) (mg L ⁻¹ de O ₂) | 6,00 | 5 |
| Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹) | 7,20 | 5 |
| pH | 7,21 | 6,0 a 9,0 |
| Alumínio dissolvido (mg L ⁻¹) | <0,10 | 0,1 |
| Nitrogênio amoniacal (mg L ⁻¹) | <0,50 | 3,70 |
| Arsênio total (mg L ⁻¹) | <0,01 | 0,01 |
| Bário total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,7 |
| Berílio total (mg L ⁻¹) | <0,04 | 0,04 |
| Boro total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,5 |
| Benzeno (mg L ⁻¹) | <0,001 | 0,005 |
| Benzo-a-pireno (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,05 |
| Cádmio total (mg L ⁻¹) | <0,001 | 0,001 |
| Cianeto livre (mg L ⁻¹) | <0,005 | 0,005 |
| Chumbo total (mg L ⁻¹) | <0,01 | 0,01 |
| Cloreto total (mg L ⁻¹) | 1,40 | 250 |
| Cloro residual total (mg L ⁻¹) | <0,01 | 0,01 |
| Cobalto total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,05 |
| Cobre dissolvido (mg L ⁻¹) | <0,009 | 0,009 |
| Crômio total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,05 |
| 1,1-dicloroeteno (mg L ⁻¹) | <0,001 | 0,003 |
| 1,2-dicloroetano (mg L ⁻¹) | <0,001 | 0,01 |
| Fenóis (índices) (mg L ⁻¹) | <0,003 | 0,003 |
| Ferro dissolvido (mg L ⁻¹) | 0,59 | 0,3 |
| Fluoreto total (mg L ⁻¹) | 0,11 | 1,4 |
| Fósforo total (ambiente lótico) (mg L ⁻¹) | <0,10 | 0,1 |
| Lítio total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 2,5 |
| Manganês total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,1 |
| Mercúrio total (mg L ⁻¹) | <0,0002 | 0,0002 |
| Níquel total (mg L ⁻¹) | <0,025 | 0,025 |
| Nitrato (mg L ⁻¹) | 0,09 | 10 |
| Nitrito (mg L ⁻¹) | <0,005 | 1,0 |
| Prata total (mg L ⁻¹) | <0,01 | 0,01 |
| Pentaclorofenol (µg L ⁻¹) | <0,002 | 0,009 |
| Selênio total (mg L ⁻¹) | <0,01 | 0,01 |

Cont.

| | | |
|--|--------|-------|
| Sólidos totais dissolvidos (mg L ⁻¹) | 37,80 | 500 |
| Substâncias tensoativas (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,5 |
| Sulfato total (mg L ⁻¹) | <1,00 | 250 |
| Sulfeto total (mg L ⁻¹) | <0,002 | 0,002 |
| Tetracloroetano (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,01 |
| Tricloroetano (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,03 |
| Tetracloroeto de carbono (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,002 |
| 2,4,6-triclorofenol | <0,002 | 0,01 |
| Urânio total (mg L ⁻¹) | <0,02 | 0,02 |
| Vanádio total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,1 |
| Zinco total (mg L ⁻¹) | <0,05 | 0,18 |
| Aldrin + Dieldrin (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,005 |
| Clordano (µg L ⁻¹) | <0,005 | 0,04 |
| DDT (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,002 |
| Endrin (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,004 |
| Endossulfan (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,056 |
| Epóxido de heptacloro + heptacloro (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,01 |
| Lindano (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,02 |
| Metóxicloro (µg L ⁻¹) | <0,002 | 0,03 |
| Dodecacloro pentaciclodecano (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,01 |
| PCB's (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,001 |
| Toxafeno (µg L ⁻¹) | <0,002 | 0,01 |
| Demeton (µg L ⁻¹) | <0,001 | 0,1 |
| Gution (µg L ⁻¹) | <0,005 | 0,005 |
| Malation (µg L ⁻¹) | <0,005 | 0,1 |
| Paration (µg L ⁻¹) | <0,005 | 0,04 |
| Carbaril (µg L ⁻¹) | <0,005 | 0,02 |
| Organofosforados e carbamatos totais (µg L ⁻¹) | <0,002 | 10 |
| 2,4-D (µg L ⁻¹) | <0,005 | 4 |
| 2,4,5-TP (µg L ⁻¹) | <0,005 | 10,0 |
| 2,4,5-T (µg L ⁻¹) | <0,005 | 2,0 |

Notas:

- (VMP) Valor máximo permitido pela Resolução CONAMA 357 de 17 de Março de 2005 para águas doces de classe 2.

- Os metais foram determinados por Espectrometria de Emissão Atômica – ICP-OES ou Espectrometria de Absorção Atômica – EAA, de acordo com metodologias recomendadas pelo Standard Methods for Examination of Water and Wastewater – 20^a Edição. - PAHs: EPA, Método 610, validado p/ método 8100 - Carbamatos - Método EPA 8321A- HPLC; 2,4D - Método EPA 8321A/ 2,4T- 8321A / Clorados- 8020 , 8082 / Acrilamida 8032 - BTEX: EPA Test methods for evaluating solid waste - v. 1B - Laboratory Manual Physical/Chemical Methods. Métodos 3810, 8020.

- **Conclusão:** De acordo com os parâmetros determinados e listados neste resultado analítico, trata-se de água que atende os padrões de qualidade estabelecidos pela Resolução CONAMA 357 de 17 de Março de 2005 para águas doces de classe 2.

Araraquara, 20 de Julho de 2007.

Tabela 1. Dados de absorvância obtidos no estudo da linearidade no procedimento de *screening* desenvolvido.

| [SFA] ppm | A ₅₅₅ ± SD ^a | A ₅₅₅ ± SD ^a | A ₅₅₅ ± SD ^a | A ₅₅₅ ± SD ^a | A ₅₅₅ ± SD ^a | A ₅₅₅ ± SD ^a | A ₅₅₅ ± SD ^a |
|-----------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | Sulfatiazol | Sulfacetamida | Sulfametoxazol | Sulfamezarina | Sulfametazina | Sulfamilamida | Sulfametoxipiriazina |
| 0,05 | 0,0181 ± 8,00 x 10 ⁻⁵ | 0,0158 ± 1,41 x 10 ⁻⁴ | 0,0200 ± 3,54 x 10 ⁻³ | 0,0194 ± 3,70 x 10 ⁻⁴ | 0,0188 ± 6,50 x 10 ⁻⁴ | 0,0287 ± 4,88 x 10 ⁻³ | 0,0181 ± 8,00 x 10 ⁻⁵ |
| 0,10 | 0,0281 ± 5,44 x 10 ⁻⁴ | 0,0237 ± 1,80 x 10 ⁻⁴ | 0,0271 ± 7,07 x 10 ⁻⁵ | 0,0281 ± 1,76 x 10 ⁻⁴ | 0,0263 ± 7,10 x 10 ⁻⁵ | 0,0398 ± 2,82 x 10 ⁻⁴ | 0,0281 ± 5,44 x 10 ⁻⁴ |
| 0,25 | 0,0572 ± 1,71 x 10 ⁻⁴ | 0,0478 ± 6,51 x 10 ⁻⁴ | 0,0572 ± 5,66 x 10 ⁻⁴ | 0,0577 ± 3,92 x 10 ⁻⁴ | 0,0528 ± 2,12 x 10 ⁻⁴ | 0,0629 ± 4,95 x 10 ⁻⁴ | 0,0572 ± 1,71 x 10 ⁻⁴ |
| 0,50 | 0,1098 ± 3,98 x 10 ⁻⁴ | 0,0846 ± 2,47 x 10 ⁻⁴ | 0,1091 ± 7,78 x 10 ⁻⁴ | 0,1091 ± 2,00 x 10 ⁻⁴ | 0,0964 ± 7,78 x 10 ⁻⁴ | 0,1148 ± 4,95 x 10 ⁻⁴ | 0,1098 ± 3,98 x 10 ⁻⁴ |
| 1,00 | 0,20774 ± 6,67 x 10 ⁻³ | 0,1624 ± 2,00 x 10 ⁻⁴ | 0,2129 ± 1,70 x 10 ⁻³ | 0,2120 ± 1,03 x 10 ⁻³ | 0,1846 ± 4,17 x 10 ⁻⁵ | 0,2230 ± 2,83 x 10 ⁻³ | 0,20774 ± 6,67 x 10 ⁻³ |
| 2,00 | 0,4158 ± 3,15 x 10 ⁻³ | 0,3108 ± 3,15 x 10 ⁻³ | 0,4040 ± 3,25 x 10 ⁻³ | 0,4194 ± 4,10 x 10 ⁻³ | 0,3641 ± 1,32 x 10 ⁻³ | 0,4289 ± 6,29 x 10 ⁻³ | 0,4158 ± 3,15 x 10 ⁻³ |
| 4,00 | 0,7990 ± 3,55 x 10 ⁻² | 0,6256 ± 8,83 x 10 ⁻³ | 0,8052 ± 1,41 x 10 ⁻³ | 0,8177 ± 6,92 x 10 ⁻⁴ | 0,7138 ± 3,50 x 10 ⁻³ | 0,8350 ± 1,41 x 10 ⁻⁴ | 0,7990 ± 3,55 x 10 ⁻² |
| 5,00 | 0,9987 ± 2,01 x 10 ⁻² | 0,7716 ± 1,46 x 10 ⁻² | 0,9780 ± 1,58 x 10 ⁻² | 0,9728 ± 9,14 x 10 ⁻³ | 0,88142 ± 3,90 x 10 ⁻⁴ | 0,9987 ± 1,40 x 10 ⁻³ | 0,9987 ± 2,01 x 10 ⁻² |

Tabela 1. Dados de absorvância obtidos no estudo da linearidade para o sistema em fluxo acoplado a EFS *on-line*.

| [sulfacetamida sódica] ppm | $A_{555\text{nm}} \pm \text{SD}^a$ |
|-------------------------------|------------------------------------|
| 0,01 | $0,04047 \pm 3,52 \times 10^{-3}$ |
| 0,05 | $0,05586 \pm 1,12 \times 10^{-4}$ |
| 0,10 | $0,06839 \pm 1,74 \times 10^{-3}$ |
| 0,50 | $0,08064 \pm 1,30 \times 10^{-3}$ |
| 1,00 | $0,11509 \pm 1,94 \times 10^{-3}$ |
| 2,00 | $0,24067 \pm 8,24 \times 10^{-3}$ |
| 4,00 | $0,49732 \pm 7,28 \times 10^{-3}$ |
| 6,00 | $0,74985 \pm 1,86 \times 10^{-3}$ |
| 8,00 | $0,99924 \pm 8,67 \times 10^{-3}$ |

^a média e desvio padrão para 3 determinações.

Tabela 1. Valores de área obtidos para a construção das curvas analíticas para as sulfonamidas pelo método CLAE.

| [SFA] ppb | A \pm SD ^a | | A \pm SD ^a | | A \pm SD ^a | | A \pm SD ^a | | A \pm SD ^a | |
|-----------|-------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
| | Sulfametoxipiridazina | Sulfatiazol | Sulfamilamida | Sulfametoxazol | Sulfametazina | Sulfacetamida | Sulfamezarina | Sulfametazina | Sulfacetamida | Sulfamezarina |
| 10 | 721 \pm 41 | 851 \pm 87 | 1227 \pm 115 | 734 \pm 48 | 771 \pm 28 | 845 \pm 20 | 728 \pm 26 | 1886 \pm 127 | 1514 \pm 19 | 1466 \pm 108 |
| 20 | 1580 \pm 14 | 1403 \pm 26 | 2220 \pm 40 | 1601 \pm 55 | 4132 \pm 153 | 4200 \pm 57 | 5284 \pm 197 | 6149 \pm 161 | 5207 \pm 60 | 7178 \pm 232 |
| 50 | 3986 \pm 129 | 3536 \pm 73 | 5363 \pm 9 | 4185 \pm 47 | 8341 \pm 270 | 6865 \pm 177 | 10716 \pm 518 | 10537 \pm 860 | 9238 \pm 71 | 13271 \pm 383 |
| 80 | 7050 \pm 61 | 5411 \pm 136 | 8336 \pm 105 | 6498 \pm 82 | 6149 \pm 161 | 5207 \pm 60 | 7178 \pm 232 | 6149 \pm 161 | 5207 \pm 60 | 7178 \pm 232 |
| 110 | 9042 \pm 69 | 74637 \pm 157 | 12216 \pm 132 | 8642 \pm 283 | 8341 \pm 270 | 6865 \pm 177 | 10716 \pm 518 | 8341 \pm 270 | 6865 \pm 177 | 10716 \pm 518 |
| 140 | 12707 \pm 921 | 9703 \pm 125 | 15956 \pm 180 | 11786 \pm 147 | 10537 \pm 860 | 9238 \pm 71 | 13271 \pm 383 | 10537 \pm 860 | 9238 \pm 71 | 13271 \pm 383 |
| 170 | 14202 \pm 286 | 11484 \pm 495 | 19391 \pm 258 | 14222 \pm 102 | 12482 \pm 116 | 10515 \pm 141 | 16487 \pm 672 | 12482 \pm 116 | 10515 \pm 141 | 16487 \pm 672 |