

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE
ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Desenvolvimento de novos procedimentos
analíticos para a determinação de paracetamol
em amostras de medicamentos.**

Rodrigo Sequinel

Dissertação de Mestrado

2008

Rodrigo Sequinel

**DESENVOLVIMENTOS DE NOVOS
PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA A
DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL EM
AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS.**

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

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza

Co-orientadora: Prof. Dra. Helena Redigolo Pezza

Araraquara
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

S479d Sequinel, Rodrigo
Desenvolvimento de novos procedimentos analíticos para a determinação de paracetamol em amostras de medicamentos / Rodrigo Sequinel.
- Araraquara : [s.n], 2009
76 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Leonardo Pezza
Co-orientador: Helena Redigolo Pezza

1. Espectrofotometria. 2. Paracetamol. 3. FIA. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DADOS CURRICULARES

1. Formação Acadêmica

1.1. Graduação

Bacharelado em Química Tecnológica com Ênfase em Química Ambiental

Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR

Período: 2003 a 2006

1.2. Pós-Graduação

Mestrado em Química Analítica

Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Período: 2007 a 2009

2. Trabalhos apresentados em Congresso

- ✓ SEQUINEL, R.; RUFINO, J. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Desenvolvimento de um novo método espectrofotométrico para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia – SP.
- ✓ SEQUINEL, R.; RUFINO, J. L.; SANTOS, J. M.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determinação de ambroxol em formulações farmacêuticas utilizando a combinação spot test-espectroscopia de reflectância difusa. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia – SP.

3. Artigos aceitos para publicação

- ✓ GOTARDO, M. A.; LIMA, L. S.; SEQUINEL, R.; RUFINO, J. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. A simple spectrophotometric method for the determination of methyl dopa using p-chloranil in the presence of hydrogen peroxide. *Eclética Química*, v. 33, n. 2, 2008.

- ✓ SANTINI, A. O.; PEZZA, H. R.; SEQUINEL, R.; RUFINO, J. L.; PEZZA, L. Potentiometric Sensor for Furosemide Determination in Pharmaceuticals, Urine, Blood, Serum and Bovine Milk. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 1, p. 64-73, 2009.
- ✓ LIMA, L. S.; WEINERT, P. L.; LEMOS, S. C.; SEQUINEL, R.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. A environmental friendly reflectometric method for ranitidine determination in pharmaceuticals and urine. *Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 71, p. 1999-2004, 2009.

4. Artigos submetidos

- ✓ SEQUINEL, R.; RUFINO, J. L.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals using microwave assisted hydrolysis and micellar medium. *Eclética Química*.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Carlos e Sueli,

Por todo o esforço a mim dedicado durante
todos esses anos.

Aos meus irmãos, Vanessa e Thiago,

Que sempre proporcionam momentos de alegria
quando estamos juntos.

AGRADEÇO...

Ao Prof. Dr. Leonardo Pezza pela confiança, pela orientação e dedicação ao longo do trabalho;

À Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza pela co-orientação durante a elaboração desta dissertação;

Aos membros da banca examinadora pela atenção e disposição em participar da avaliação crítica deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Massao Ionashiro por contribuir com seus conhecimentos e pela participação nos momentos de confraternização;

Aos colegas de laboratório, um verdadeiro grupo de apoio, composto por Liliane, Patrícia Los, Sahra, Fabrícia, Aline, Laura, Vitor Hugo, Ana Carolina e Raquel pela amizade;

Ao grande amigo Zé Rufino, pelas festas e pela participação efetiva na resolução dos problemas que surgiram durante o trabalho.

Àquele que considero o maior grupo de amigos do instituto de química, encabeçado por João e Tanabi, mas que tem em sua vanguarda eu, Marcão (Paraíba), Sayonara, Gabriel, Rafael (Piá), Zé Renato, Mayra, Marcão, Letícia, Denise, Frodo, Adriano, Cláudio, Freira, Daniel além do pessoal do futebol, todos responsáveis pelo ótimo convívio no dia-a-dia;

A todos os funcionários do Instituto de Química por nos atenderem sempre com bastante presteza e competência.

A CAPES pela bolsa de mestrado;

...OBRIGADO!

RESUMO

Este trabalho propõe o desenvolvimento de novos procedimentos analíticos voltados para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas. Num primeiro momento, o procedimento foi baseado na hidrólise ácida do paracetamol (PCT) à p-aminofenol (PAP), seguido pela instantânea reação deste com p-dimetilaminocinamaldeído (p-DAC), em meio micelar, para formar um produto vermelho, o qual pôde ser monitorado por espectrofotometria ($\lambda_{\text{máx}} = 530 \text{ nm}$), 10 minutos após o início da reação. A hidrólise realizada em forno de microondas foi uma estratégia adotada como alternativa ao moroso processo de hidrólise convencional realizado em banho de água fervente. Estudos preliminares realizados em nosso laboratório, demonstraram ser efetiva a utilização de meio micelar – com dodecil sulfato de sódio (SDS), a fim de tornar o método mais sensível. Em seguida, os efeitos de todos os parâmetros envolvidos no processo analítico foram investigados em detalhes por meio de metodologias de planejamento de experimentos, para determinação das melhores condições experimentais para realização das análises. Sob as condições tidas como ideais, o método apresentou faixa linear de trabalho entre $1,3 \times 10^{-6} - 2,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,2 - 3,9 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), com excelente coeficiente de correlação linear ($r = 0,9996$). O limite de detecção foi de $1,7 \times 10^{-7}$ (30 ng mL^{-1}). Num segundo momento, parte do procedimento analítico foi incorporada a um sistema automatizado de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica. O novo procedimento analítico adotado apresentou uma ampla faixa linear de trabalho, entre $5,37 \times 10^{-6} - 1,29 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,8 - 19,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), com coeficiente de correlação linear de 0,9998. O emprego deste sistema automatizado de análise proporcionou simplicidade e uma maior rapidez na realização das análises. Ambos os procedimentos desenvolvidos foram aplicados na determinação de paracetamol em medicamentos e foram posteriormente comparados com o método oficial para determinação de PCT em formulações farmacêuticas.

Palavras-chave: espectrofotometria; análise por injeção em fluxo; hidrólise; microondas; p-dimetilaminocinamaldeído; meio micelar.

ABSTRACT

This work proposes the development of new analytical procedures for the determination of paracetamol in pharmaceuticals preparations. At first moment, procedure was based in the paracetamol (PCT) acid hydrolysis to p-aminofenol (PAP), followed by the instantaneous reaction of this with p-dimethylaminocinnamaldehyde (p-DAC), in micellar media in order to form a red product, which could be monitored by spectrophotometry ($\lambda_{\text{m\acute{a}x}} = 530 \text{ nm}$), 10 minutes after the beginning of the reaction. The hydrolysis carried out in microwave oven was a strategy adopted like alternative to the slow conventional hydrolysis carried out in boiling water bath. Preliminary studies carried out in the laboratory, showed to be efficient the utilization of micellar media – with dodecil sulphate of sodium (SDS), in order to obtain the most sensible method. Furthermore, the effects of all parameters involved in the analytic process were investigated in details by means of experiments planning methodologies, for determination of the best experimental conditions to carry out the analysis. Under the ideals conditions, the method presented linear work range between $1.3 \times 10^{-6} - 2.6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($0.2 - 3.9 \text{ mL}^{-1}$), with excellent correlation coefficient ($r = 0,9996$). The limit of detection was 1.7×10^{-7} (30 ng mL^{-1}). In a second moment, part of the analytical procedure was incorporated to an automated flow injection analysis with spectrophotometric detection. The adopted new analytical procedure presented a wide linear work range, between $5.37 \times 10^{-6} - 1.29 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($0.8 - 19.5 \text{ mL}^{-1}$), with correlation coefficient of 0.9998. The employment of this automated system of analysis provided simplicity and a bigger quickness in the accomplishment of the analysis. Both the developed procedures were applied in the determination of paracetamol in medicines and were subsequently compared with the official method for the determination of PCT in pharmaceuticals formulations.

Keywords: spectrophotometry; flow injection analysis; hidrolisis; microwave; p-dimethylaminocinnamaldehyde; micellar media.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do paracetamol.	17
Figura 2 – Reator de teflon utilizado para realização da hidrólise do paracetamol em forno de microondas.	31
Figura 3 – Mecanismo proposto para a reação entre p-aminofenol e p-DAC.....	37
Figura 4 – Espectro de absorção do produto colorido formado. (a): ausência de SDS; (b): presença de SDS.	38
Figura 5 – Estabilidade do composto formado pela reação do p-aminofenol com p-DAC em meio ácido. Paracetamol $2,15 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	39
Figura 6 – Gráfico de interação e principais efeitos estimados dos fatores estudados.	43
Figura 7 – (a) Superfície de resposta obtida em função das variáveis concentração de p-DAC e concentração de HCl. (b) Curvas de nível.	45
Figura 8 – Curva analítica para reação entre PCT e p-DAC.	47
Figura 9 – Bomba peristáltica de oito canais	Figura 10 – Injetor comutador manual.. 53
Figura 11 – Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo proposto. BP: bomba peristáltica; I: injetor comutador manual; C: solução carregadora (SDS $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$); A: solução padrão ou amostra; R: solução reagente de p-DAC 0,18% m/v preparada em HCl $6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; L_A : alça de amostragem 120 cm (603 μL); L_B : alça de reagente 80 cm (402 μL); Y: ponto de confluência; B: bobina de reação (280 cm); E: espectrofotômetro (ajustado em 530 nm); D: descarte.	
Figura 12 – Gráfico de interação e principais efeitos estimados dos fatores estudados no planejamento fatorial fracionário 2^{7-3}	59
Figura 13 – Gráfico de interação e principais efeitos estimados dos fatores estudados no planejamento fatorial completo 2^4	61
Figura 14 – Superfície de resposta obtida em função das variáveis concentrações de p-DAC (% m/v) e HCl (mol L^{-1}). A concentração final de PCT foi fixada em $1,72 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	63
Figura 15 – Curva analítica obtida para o sistema FIA. A concentração de PCT variou entre $5,37 \times 10^{-6}$ a $1,29 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	65
Figura 16 – Gráfico dos sinais transientes obtidos na curva analítica. Cada ponto da curva foi analisado em triplicata (n=3).	65

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1</i> – Formulações farmacêuticas analisadas.....	33
<i>Tabela 2</i> – Resultados do planejamento realizado para determinar as melhores condições para realização da hidrólise do paracetamol.	40
<i>Tabela 3</i> – Valores de absorbância obtidos nos ensaios do planejamento fatorial completo.	42
<i>Tabela 4</i> – Variáveis manipuladas no planejamento composto central em seus respectivos níveis, com os resultados obtidos.	44
<i>Tabela 5</i> – Resultados da análise de variância.....	46
<i>Tabela 6</i> – Resultados obtidos da análise de medicamentos pelo método proposto e pelo método oficial.	48
<i>Tabela 7</i> – Resultados da recuperação de paracetamol obtidos pelo método espectrofotométrico desenvolvido.	49
<i>Tabela 8</i> – Resultados das figuras de mérito obtidos para o método espectrofotométrico desenvolvido.	50
<i>Tabela 9</i> – Matriz experimental do planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} realizado para triagem das variáveis do sistema FIA desenvolvido.	58
<i>Tabela 10</i> – Planejamento fatorial completo 2^4 realizado, com todas as variáveis estudadas e seus respectivos níveis.	60
<i>Tabela 11</i> – Matriz experimental adotada na metodologia de superfície de resposta, com as variáveis estudadas e os resultados experimentais obtidos.	62
<i>Tabela 12</i> – Valores de absorbância obtidos para a construção da curva analítica para o procedimento em fluxo para determinação de paracetamol.	64
<i>Tabela 13</i> – Resultados obtidos da análise de medicamentos pelo método proposto e pelo método oficial.	66
<i>Tabela 14</i> – Resultados do estudo de recuperação realizado para o procedimento FIA desenvolvido.	67
<i>Tabela 15</i> – Resultados das figuras de mérito obtidos para o método FIA desenvolvido.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CG – Cromatografia Gasosa

FIA – Análise por injeção em fluxo

UV – Ultravioleta

Vis – Visível

QL – Quimioluminescência

RMN – Ressonância magnética nuclear

EM – Espectroscopia de massas

EC – Eletroforese capilar

p-DAC – *p*-dimetilaminocinamaldeído

PCT – Paracetamol

PAP – P-animofenol

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

AAP – Aminas aromáticas primárias

PTFE – Politetrafluoretileno

RPM – rotações por minuto

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

LISTA DE SÍMBOLOS

W watts

nm nanômetros

μL micro litro

A absorbância

b caminho óptico

C concentração

r coeficiente de correlação linear

ϵ absortividade molar

t Teste t de Student

F Teste F (diferença entre variâncias)

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

SUMÁRIO

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO	16
I.1. Introdução	17
I.2.Revisão Bibliográfica	18
I.2.1. <i>Métodos analíticos para determinação de paracetamol em medicamentos</i>	18
I.2.1.1. ESPECTROFOTOMETRIA	19
I.2.1.2. ELETROQUÍMICA	20
I.2.1.3. ESPECTROFLUORIMETRIA	21
I.2.1.4. QUIMIOLUMINESCÊNCIA	21
I.2.2. <i>Métodos que utilizam técnicas de separação</i>	22
I.2.2.1. CROMATOGRAFIA	22
I.2.2.2. ELETROFORESE CAPILAR.....	22
I.3. Estratégias e técnicas analíticas empregadas neste trabalho: comentários gerais.23	
I.3.1. <i>Utilização de surfactantes: aumento de sensibilidade</i>	23
I.3.1.1. REAÇÃO DO p-DIMETILAMINOCINAMALDEÍDO COM AMINAS AROMÁTICAS PRIMÁRIAS NA PRESENÇA DE SURFACTANTES	23
I.3.2. <i>Automação do Procedimento Analítico</i>	24
I.3.2.1. HIDRÓLISE ASSISTIDA POR RADIAÇÃO DE MICROONDAS	24
I.3.2.2. ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA): CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	26
I.4. Justificativa.....	28
I.5. Objetivos	29
 CAPÍTULO II. ESPECTROFOTOMETRIA: METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	 30
II.1 Parte Experimental	31
II.1.1 <i>Materiais e equipamentos</i>	31
II.1.2 <i>Reagentes e soluções</i>	32
II.1.3 <i>Amostras</i>	33
II.2. Procedimento experimental.....	33
II.2.1. <i>Reação</i>	33
II.2.2. <i>Estudo da estabilidade do produto colorido.....</i>	34
II.2.3. <i>Construção da curva analítica</i>	34
II.2.4. <i>Preparo das amostras</i>	34
II.2.5. <i>Aplicação analítica</i>	35
II.2.6. <i>Estudo de Adição e Recuperação</i>	35
II.3. Resultados e discussões	36
II.3.1. <i>Testes preliminares</i>	37
II.3.2. <i>Estudo da estabilidade do produto colorido.....</i>	38
II.3.3. <i>Otimização da metodologia proposta.....</i>	39
II.3.3.1. ESTUDO DAS VARIÁVEIS ENVOLVIDAS NA HIDRÓLISE DO PARACETAMOL	39

II.3.3.2. ESTUDO DAS VARIÁVEIS ENVOLVIDAS NA REAÇÃO ENTRE p-AMINOFENOL E p-DAC	41
II.3.3.2.1. Triagem das variáveis	41
II.3.3.2.2. Metodologia de superfície de resposta.....	43
II.3.4. <i>Curva analítica</i>	46
II.3.5. <i>Aplicação analítica do método desenvolvido</i>	47
II.3.6. <i>Estudo de Adição e Recuperação</i>	48
II.3.7. <i>Validação do método proposto</i>	50
II.4. Conclusão	51
 <i>CAPÍTULO III – ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO: METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÕES</i>	<i>52</i>
III.1. Parte Experimental.....	53
III.1.1. <i>Materiais e Equipamentos</i>	53
III.1.2. <i>Reagentes e soluções</i>	54
III.2. Procedimento experimental	54
III.2.1. <i>Reação</i>	54
III.2.2. <i>Construção da curva analítica</i>	55
III.2.3. <i>Preparação das amostras</i>	56
III.2.4. <i>Estudo de adição e recuperação</i>	56
III.3. Resultados e discussão	57
III.3.1. <i>Triagem das variáveis</i>	57
III.3.2. <i>Metodologia de Superfície de Resposta</i>	61
III.3.4. <i>Curva analítica</i>	63
III.3.5. <i>Aplicação analítica</i>	66
III.3.6. <i>Estudo de adição e recuperação</i>	66
III.3.7. <i>Validação do método proposto</i>	67
III.4. Conclusão.....	68
 <i>CAPÍTULO IV. CONCLUSÕES GERAIS</i>.....	<i>69</i>
 <i>CAPÍTULO V - REFERÊNCIAS</i>.....	<i>71</i>

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

1.1. Introdução

O paracetamol (acetaminofeno, N-acetyl-p-aminofenol) é um fármaco bastante utilizado como analgésico-antipirético, sendo um dos derivados do p-aminofenol. Apresenta-se como um pó branco, inodoro, ligeiramente hidrossolúvel e sua obtenção é feita por acetilação do p-aminofenol com ácido acético glacial e anidrido acético. O paracetamol (PCT), cuja estrutura está ilustrada na Figura 1, possui valor de pKa de 9.5, sendo considerado portanto, um ácido fraco (O'NEIL, 2001, p. 10; SILVA, 1998, p. 395-397).

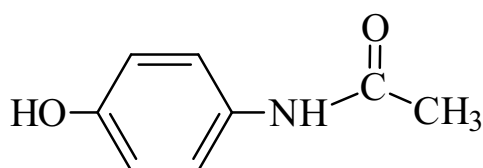


Figura 1 – Estrutura química do paracetamol.

As primeiras observações sobre as propriedades analgésicas e antipiréticas do paracetamol foram feitas ainda no século XIX, quando muitas drogas alternativas estavam sendo testadas no combate à febre e no tratamento de infecções. Desde que entrou no mercado, a droga é encontrada na sua forma pura em comprimidos, cápsulas, supositórios e em soluções, com nomes fantasia de Tylenol, Parador, Parnol, Termofen etc (SILVA, 1998, p. 395-397). Também está presente em uma gama de mais de 200 medicamentos em associação com outros analgésicos, antiinflamatórios e antrigripais. É um dos analgésicos mais consumidos no mundo (ANESTESIOLOGIA, 2007; PATEL; MORTON, 1988).

O paracetamol é um dos fármacos mais utilizados para tratamento de dor e febre em pacientes com dengue. O vírus da dengue é um Flavivirus (portanto do mesmo gênero que o vírus da hepatite C) que causa, em praticamente 100% das pessoas infectadas e que desenvolvem a doença, um quadro de hepatite geralmente caracterizado por degeneração dos hepatócitos. O PCT, por ser uma droga de metabolismo hepático, pode causar agravamento do quadro clínico de pacientes com dengue, principalmente pelo fato de que a diferença entre a dose terapêutica e a tóxica é muito pequena. Em adultos, a dose diária máxima recomendada é de quatro gramas e, para crianças, em miligramas por quilo de peso. A dose tóxica corresponde aproximadamente a três vezes estes valores e pode ser a verdadeira causa de vários óbitos atribuídos à dengue (CARVALHO, 2008; SILVA, 1998).

Após administração oral, o PCT é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, sofre então metabolização hepática (com tempo de meia-vida de aproximadamente 2 horas),

onde é convertido principalmente a sulfato de acetaminofeno e glicuronídico. Quando administrado em doses terapêuticas, os efeitos colaterais são poucos e raros, embora ocorram e se caracterizem por reações cutâneas e alérgicas. Quando se utilizam doses maiores, verifica-se a ocorrência de tontura, excitação e desorientação, podendo provocar hepatotoxicidade grave e toxicidade renal quando em uso contínuo. Casos de intoxicação aguda são potencialmente fatais e, diante desta ocorrência, o diagnóstico deve ser realizado o mais breve possível (AGÊNCIA..., 2007; KATZUNG, 1986, p. 465; RANG, 2001, p. 195; SILVA, 1998).

Os efeitos adversos do paracetamol podem ser agravados pelo fato deste fármaco ser comercializado sem a necessidade de prescrição médica e, estar presente em associação com outros fármacos em determinados medicamentos, fazendo com que muitos consumidores combinem mais de um produto à base de PCT. Estima-se que estes fatores levam milhares de pessoas a tomarem inconscientemente doses tóxicas dessa droga (ANESTESIOLOGIA, 2007).

I.2.Revisão Bibliográfica

I.2.1. Métodos analíticos para determinação de paracetamol em medicamentos

Há diversos métodos citados na literatura para determinação de paracetamol tanto em amostras de medicamentos quanto em fluidos biológicos. Dentre esses, os principais são aqueles que envolvem eletroquímica, espectrofluorimetria, quimioluminescência ou espectrofotometria; sendo que muitas destas técnicas são utilizadas em procedimentos executados por sistemas automatizados. Outros métodos, que envolvem técnicas de separação, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar também já foram empregados em análises de formulações farmacêuticas que contêm paracetamol.

Em geral, alguns destes métodos apresentam desvantagens relacionadas ao tempo gasto no processo analítico, ao consumo de grandes quantidades de reagentes e solventes e à utilização de instrumentos sofisticados e de alto valor agregado.

Adiante segue uma breve descrição das principais técnicas utilizadas em alguns dos métodos encontrados na literatura para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos.

1.2.1.1. ESPECTROFOTOMETRIA

Para a realização de análises de rotina, prevalecem os métodos simples e relativamente mais baratos, e por este motivo, o método espectrofotométrico (tanto o ultravioleta quanto o visível) sempre teve grande utilidade na determinação de fármacos.

Em sua forma pura e, utilizando etanol como solvente, o PCT apresenta um pico máximo de absorção em 250nm (ϵ 13800) na região ultravioleta do espectro eletromagnético (O'NEIL, 2001). Na literatura, alguns trabalhos foram desenvolvidos para determinação direta de paracetamol por meio da absorção da radiação na região ultravioleta do espectro eletromagnético (KOROLKOVAS, 1984, p. 184; PAROJCIC, et al., 2003).

Os métodos que envolvem a espectrofotometria direta, na região do ultravioleta, são bastante sensíveis e confiáveis nas mais variadas aplicações. Entretanto, para análise de formulações farmacêuticas, a técnica apresenta desvantagem pelo fato de que a maioria das substâncias ativas comumente usadas nas associações do paracetamol com outros fármacos absorve fortemente em regiões próximas do espectro ultravioleta. Neste caso, pode ocorrer uma sobreposição espectral ocasionando resultados que podem mascarar a determinação do paracetamol (KNOCHEN; GIGLIO; REIS, 2003; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Quando não há interferências espectrais significativas, a British Pharmacopoeia (1999) – Farmacopéia Britânica, um compêndio sobre testes de controle de qualidade de várias drogas comercializadas mundialmente, preconiza a espectrofotometria na região do ultravioleta (257 nm) para análise de alguns medicamentos cujo princípio ativo é o paracetamol. Entretanto, quando há outros princípios ativos presentes na formulação farmacêutica há a necessidade de realização de etapas de preparação e separação das substâncias interferentes, ou ainda a aplicação de outra técnica mais seletiva. Uma alternativa é a aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência ou ainda a cromatografia em camada fina, como recomendado pela The United States Pharmacopeia (2006). A própria British Pharmacopoeia (2007), uma versão mais recente, preconiza a utilização de um ensaio de titulometria de oxido-redução com sulfato de cério (IV), como método oficial para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas em geral.

Ao contrário do que ocorre na região do ultravioleta, a absorção de fótons na região visível do espectro eletromagnético está restrita a um número limitado de grupos funcionais (chamados cromóforos¹), que contêm elétrons de valência com energias de excitação relativamente baixas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Neste sentido, a técnica de

¹ Termo usado para designar grupamentos químicos, ou compostos que tem a propriedade de conferir cor a uma substância (THOMAZ, 1996).

absorção da radiação visível proporciona uma maior seletividade, pois são empregados reagentes seletivos que reagem com o analito para formação de produtos cromogênicos (que desenvolvem alguma cor).

Como a espectrofotometria na região visível é uma técnica relativamente barata e de grande confiabilidade para determinação de compostos orgânicos, esta tem sido amplamente utilizada para determinação de paracetamol (AFKHAMI; SARLAK; ZAREI, 2006; AFSHARI; LIU, 2001; ANICETO; FATIBELO-FILHO, 2002; BOUHSAIN, et al., 1996; CRIADO, et al., 2000; FILIK; HAYVALI; KILIC, 2005; FILIK, et al., 2006; KNOCHEN; GIGLIO; REIS, 2003; LAVORANTE; PIRES; REIS, 2006; MOHAMED; MOHAMED; SHAMMAT, 1997; NAGARAJA; MURTHY; RANGAPPA, 1998; NI; LIU; KOKOT, 2000; SUARES; VIEIRA; FATIBELLO FILHO, 2005; VAN STADEN; TSANWANI, 2002; WELCH; CONNEY, 1965; XU; LI, 2004).

A maioria dos métodos espectrofotométricos publicados é baseada na reação de hidrólise do paracetamol e a posterior formação de um composto indofenólico, a partir de reações de acoplamento das mais diversas. Os detalhes envolvidos neste processo de hidrólise serão abordados com maior ênfase no item I.3.2.1 (pág. 23).

Outra estratégia bastante empregada na determinação espectrofotométrica de paracetamol é sua oxidação direta, seguida pela reação de acoplamento com um composto fenólico para obtenção de um produto colorido.

Afkhami, Sarlak e Zarei (2006) propuseram um procedimento no qual é realizada uma oxidação direta do paracetamol com íons Fe^{3+} , que por sua vez, são reduzidos a Fe^{2+} e reagem com 1,10-fenantrolina, formando um complexo com forte absorção em 510 nm. Este procedimento requer aquecimento até 60 °C, em solução tampão de acetato (pH 4,5). O método permitiu a determinação de paracetamol em concentrações entre 0,5 – 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

I.2.1.2. ELETROQUÍMICA

A facilidade com que o paracetamol pode ser oxidado em uma pasta de carbono ou com um eletrodo de carbono vítreo fez surgir vários métodos eletroquímicos para determinação de paracetamol (FANG; LONG; YE, 1997; FELIX; BRETT; ANGNES, 2007; GOYAL; SINGH, 2006; SILVA, et al., 2006; WANG; XIE; HU, 2007), os quais geralmente são baseados em técnicas tais como a amperometria e/ou voltametria.

Em trabalho desenvolvido com eletrodo de carbono vítreo e detecção voltamétrica, Goyal e Singh (2006) conseguiram obter uma faixa linear de trabalho de 0,05 – 1,5 mM de

concentração de paracetamol, livre de possíveis interferentes, o bastante para aplicação do método para determinação do fármaco em diferentes medicamentos e em urina.

Félix, Brett e Angnes (2007), propuseram um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA – flow injection analysis) com detecção amperométrica para quantificação de paracetamol em medicamentos. Neste trabalho os autores obtiveram uma alta sensibilidade e uma faixa linear de trabalho de $8,0 \times 10^{-7} - 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Dentre os excipientes usualmente encontrados em medicamentos que contêm paracetamol apenas o ácido ascórbico – quando testado numa proporção equivalente ao paracetamol em massa, mostrou interferência no método.

I.2.1.3. ESPECTROFLUORIMETRIA

Métodos espectrofluorimétricos com baixos limites de detecção também têm sido propostos para a determinação de paracetamol (MOREIRA, et al., 2005; PULGARIN; BERMEJO, 1996; VILCHEZ, et al., 1995). Entretanto, o fato do paracetamol não ser uma espécie fluorescente, requer uma etapa de derivação, ou reação com algum reagente específico, para posterior determinação.

Pulgarin e Bermejo (1996) desenvolveram um método de determinação com um sistema de injeção em fluxo e espectrofluorimetria baseado na reação de oxidação por haxacianoferrato (III). O método abrange uma faixa de concentração de $0,5 - 15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e foi aplicado em medicamentos.

Vilchez et al. (1995) determinaram paracetamol em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos por espectrofluorimetria baseando-se na reação de oxidação por hipoclorito de sódio para gerar o fluoróforo 2,2'-dihydroxy-5,5'-diacetyldiaminebiphenyl. Neste trabalho os autores conseguiram uma faixa linear bastante ampla de $0,1 - 100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, um limite de detecção de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ e um desvio padrão relativo de 1,2% na realização das análises.

I.2.1.4. QUIMIOLUMINESCÊNCIA

Devido à alta sensibilidade e o baixo limite de detecção inerentes à técnica, a quimioluminescência (QL) tem sido aplicada na análise de muitos analitos, dentre os quais o paracetamol (ALAPONT; ZAMORA; CALATAYUD, 1999; EASWARAMOORTHY; YU; HUANG, 2001; RUENGSIAGOON; LIARUANGRATH; TOWNSHEND, 2006). A técnica pode ser aplicada na medida da quimioluminescência induzida pela reação do analito

com um reagente QL ou na medida da inibição da QL que resulta da reação do analito com reagentes QL. O reagente quimioluminescente mais utilizado é o luminol.

Um sistema de análise por injeção em fluxo foi desenvolvido por Easwaramoorthy, Yu e Huang (2001) baseado no efeito inibitório do paracetamol sobre o sistema quimioluminescente luminol-permanganato. O limite de detecção atingido foi de $1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e uma faixa linear entre $2,5 \times 10^{-8}$ – $2,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ foi obtida. Neste trabalho os autores mencionam como moderada as interferências de alguns excipientes tais como, ácido cítrico e ácido ascórbico.

I.2.2. Métodos que utilizam técnicas de separação

I.2.2.1. CROMATOGRAFIA

A determinação simultânea de princípios ativos em produtos farmacêuticos que contêm vários componentes, normalmente requer o uso de técnicas de separação. A cromatografia líquida e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são as técnicas de separação mais usadas para a determinação de paracetamol, tanto em formulações farmacêuticas quanto em fluidos biológicos (BURTON, et al., 1997; DI PIETRA, et al., 1996; FRANETA, et al., 2002; GASCO-LOPEZ; IZQUIERDO-HORNILLOS; JIMINEZ, 1997; JENSEN, et al., 2004; KARTAL, 2001; SHOCKCOR, et al., 1996).

O método descrito por Shockcor et al. (1996) envolve um sistema com três técnicas hifenizadas CLAE-RMN-EM (cromatografia líquida de alta eficiência com ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massas). Esse sistema foi utilizado na determinação de paracetamol e alguns de seus metabólitos em urina e mostrou-se ser eficiente na identificação desses componentes numa matriz complexa. Praticamente no mesmo período Burton et al. (1997) desenvolveram um trabalho muito semelhante com as mesmas técnicas hifenizadas.

Di Pietra et al. (1996) propuseram a determinação simultânea de analgésicos, dentre eles o paracetamol, em várias formulações comerciais, por um sistema CLAE com detector por arranjo de diodos (254 nm). Neste trabalho os autores utilizaram uma coluna de ciano (nitrila), fase reversa – com fase móvel de acetonitrila e fosfato de trietilamonio e atingiram uma faixa de trabalho na ordem de 200 – 1000 µg mL⁻¹ para quantificação de paracetamol.

I.2.2.2. ELETROFORESE CAPILAR

Assim como a CLAE, a eletroforese capilar (EC) é uma técnica de separação muito sensível, que pode ser utilizada como alternativa para determinação de paracetamol em

matrizes complexa onde não seja possível determinar o fármaco diretamente ou por derivação aplicando uma técnica mais simples (LIU, et al., 2007; KUNKEL; GÜNTER; WÄTZIG, 1997; ZHANG, et al., 2000).

O mais recente trabalho desenvolvido por Liu et al. (2007) trata da separação e determinação de quatro princípios ativos em medicamentos, dentre os quais está o paracetamol, por injeção em fluxo – eletroforese capilar, com detecção ultravioleta em 214 nm. O limite de detecção foi de $0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$, com uma faixa linear de $6,2 - 200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

I.3. Estratégias e técnicas analíticas empregadas neste trabalho: comentários gerais

I.3.1. Utilização de surfactantes: aumento de sensibilidade

Entre as ferramentas comumente utilizadas para o aumento da sensibilidade em espectrofotometria incluem-se (ROCHA; TEIXEIRA, 2004): espectrofotometria derivativa, aumento do caminho óptico, separação e concentração do analito, medidas em fase sólida e o uso de surfactantes². Dentre essas, destaca-se o emprego de surfactantes principalmente devido à sua capacidade em modificar algumas propriedades reacionais com conseqüente melhoria em sensibilidade e/ou seletividade analítica (MANIASSO, 2001).

I.3.1.1. REAÇÃO DO p-DIMETILAMINOCINAMALDEÍDO COM AMINAS AROMÁTICAS PRIMÁRIAS NA PRESENÇA DE SURFACTANTES

A reação de condensação com aldeídos é um procedimento bastante comum para a determinação espectrofotométrica de aminas aromáticas primárias (AAP). Para este tipo de aplicação, o melhor reagente orgânico usado é o 4-dimetilaminocinamaldeído (p-DAC), que reage com as AAP para formar um produto final colorido que pertence à classe das bases de Schiff. A faixa ideal de pH para este tipo de reação está entre 2-5 e o comprimento de onda de máxima absorção do produto final situa-se entre 500-560 nm, dependendo das características individuais de cada caso, associadas com a estrutura eletrônica da amina de partida (DORONIN; CHERNOVA; GUSAKOVA, 2004, 2005).

Nas últimas décadas, o uso de surfactantes teve um aumento significativo em praticamente todos os campos da Química Analítica devido à sua capacidade de modificar

² A palavra surfactante é a contração da expressão em inglês que descreve “surface-active agents”. Estes possuem uma superfície ativa, devido à concentração de determinadas espécies em uma região interfásica (MANIASSO, 2001).

diferentes propriedades reacionais associadas, principalmente, à formação de ambientes organizados, também conhecidos como ambientes micelares (DORONIN; CHERNOVA; GUSAKOVA, 2005; MANIASSO, 2001; YATSIMIRSKY; YATSIMIRSKAYA; KASHINAT, 1994).

Os surfactantes podem induzir aumentos favoráveis nas constantes de equilíbrio e propriedades espectrais, inibir reações indesejáveis, tais como fotólises, co-solubilizar amostras não polares, polares, reagentes de derivação e produtos de reações, e ainda acelerar reações por meio da catálise micelar (ESTEVE-ROMERO, 1995).

O efeito cinético do meio micelar na reação de condensação de aldeídos com AAP foi estudado por Yatsmirsky et al. (1994) e por Doronin, Chernova e Gusakova, (2005). Os autores mostraram que a utilização de dodecil sulfato de sódio proporciona um aumento no rendimento da reação, devido ao aumento da concentração de reagente na pseudofase micelar, que poderia favorecer o mecanismo da reação. O agente tensoativo dodecil sulfato de sódio (SDS) é um surfactante aniônico de uso bastante comum em Química Analítica.

I.3.2. Automação do Procedimento Analítico

A automação, além de ser uma alternativa aos procedimentos convencionais de análise química, apresenta vantagens tais como, mínima manipulação de amostras e reagentes, elevada exatidão, precisão, sensibilidade e, principalmente, a diminuição do número de etapas envolvidas em um procedimento analítico (melhora da frequência analítica). A utilização de forno de microondas e sistemas de análise por injeção em fluxo são alguns exemplos dessa busca pela automação.

I.3.2.1. HIDRÓLISE ASSISTIDA POR RADIAÇÃO DE MICROONDAS

Na determinação de paracetamol na região visível, o método espectrofotométrico geralmente é precedido de um processo de conversão química, no qual ocorre a hidrólise do fármaco em meio ácido ou alcalino, para a formação do composto p-aminofenol (PAP – do inglês p-aminophenol). O produto da hidrólise reage então com reagentes cromóforos ou auxocromos³ (numa etapa conhecida como derivação) para formação de produtos cromogênicos, que quando levados a um espectrofotômetro propiciam a determinação indireta

³ Grupo químico que não é capaz de produzir cor própria, mas que pode modificar ou realçar a cor produzida por um cromóforo (THOMAZ, 1996).

do PCT. Os principais reagentes utilizados para este fim são: fenol (WELCH; CONNEY, 1965), o-cresol (CRIADO, et al., 2000), p-xilenol (AFSHARI; LIU, 2001), hidroxiquinolina (BOUHSAIN, et al., 1996), naftoquinona (NAGARAJA; MURTHY; RANGAPPA, 1998), 2,2-(1,4-fenilenodivinileno)bis-8-hidroxiquinolina⁴ (FILIK; HAYVALI; KILIC, 2005) e calixareno (FILIK, et al., 2006).

O tempo necessário para um bom rendimento da hidrólise varia de 30-60 min em banho de água fervente (MOHAMED, F; MOHAMED, A; SHAMAT, 1997; NAGARAJA; MURTHY; RANGAPPA, 1998; WELCH; CONNEY, 1965).

Dentre alguns dos métodos baseados na hidrólise do paracetamol, o descrito por Welch e Conney (1965) envolve uma reação clássica de acoplamento para formação de um composto indofenólico. O método consiste na hidrólise do paracetamol à p-aminofenol com auxílio de um sistema com banho de água fervente por 1h. O p-aminofenol formado reage com fenol em meio básico para formar o composto colorido azul de indofenol, monitorado em 620 nm.

Nagaraja, Murthy e Rangappa (1998) desenvolveram um método semelhante no qual o produto da hidrólise do paracetamol reagiu com 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio, em meio básico, gerando um produto colorido com comprimento de onda de máxima absorção em 570 nm. O método apresentou uma faixa dinâmica em conformidade com a lei de Beer entre 1 – 20 µg mL⁻¹. Ao realizar um estudo sobre o efeito que várias substâncias que acompanham o paracetamol em formulações farmacêuticas poderiam apresentar na realização das medidas espectrofotométricas, os autores constataram que o ácido ascórbico, o cloreto de fenilefrina e o maleato de clorfenamina eram potenciais interferentes nas análises.

A desvantagem gerada na etapa de hidrólise, em decorrência do elevado tempo de espera para converter o paracetamol a p-aminofenol, pode ser consideravelmente diminuída com a utilização de um forno de microondas. A tecnologia de microondas tem sido utilizada para acelerar a hidrólise do paracetamol, tanto em procedimentos totalmente automatizados (BOUHSAIN, et al., 1996, CRIADO, et al., 2000), quanto em procedimentos semi-automatizados (XU; LI, 2004). Nestes o processo de hidrólise é realizada em série, off-line em reatores de PTFE – politetrafluoretileno, ao passo que nos primeiros (que serão detalhados a seguir no item I.3.2.2), o processo é realizado on-line, dentro de um circuito fechado.

Xu e Li (2004) apresentaram um método espectrofotométrico baseado na hidrólise alcalina do paracetamol, em reatores de PTFE, assistida por forno de microondas. Após a

⁴ 2,2-(1,4-phenylenedivinylene)bis-8-hydroxyquinoline – PHHQ.

hidrólise, o reator é aberto e uma alíquota é retirada para realização da reação de derivação. Em seus experimentos os autores afirmam ter obtido uma hidrólise quantitativa do PCT a PAP em somente 90 segundos sob potência de radiação de 640 W, com NaOH 4 mol L⁻¹.

A hidrólise em forno de microondas é uma alternativa efetiva para o procedimento de hidrólise convencional, pois além de proporcionar uma redução drástica no tempo necessário à conversão química do paracetamol, evita problemas associados à perda de analito e à contaminação atmosférica (BLACK; BABO; STEAR, 1988; BURGUERA, M; BURGUERA, J, 1998).

I.3.2.2. ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA): CONSIDERAÇÕES GERAIS

A análise química por injeção em fluxo é um processo analítico automatizado ou semi-automatizado que tem como fundamento a inserção seqüencial de volumes da amostra em um fluido carregador não segmentado, dirigido continuamente para um detector. O carregador pode ser uma solução de reagentes ou um fluido quimicamente inerte com respeito à espécie química de interesse. Este processo de análise química foi introduzido na década de setenta com a finalidade de simplificar o sistema analítico e aumentar o número de amostras analisadas por unidade de tempo (frequência de amostragem) (CALATAYUD, 1993; REIS, 1996; REIS et al., 1993; RUZICKA; HANSEN, 1988).

Enquanto é transportada para o detector a amostra se dispersa no fluido carregador, gerando um gradiente de concentração que depende principalmente do comprimento do percurso analítico e da alça de amostragem e do fluxo do sistema como um todo. Este gradiente de concentração reflete-se na magnitude do sinal gerado pelo detector, um sinal transiente (REIS, 1996).

A reação química tem início a partir da confluência, em vista disso, o percurso analítico pode ser mais curto, tendo como resultado um aumento na velocidade analítica. Uma das características importantes do processo FIA, principalmente quando é empregada a espectrofotometria de absorção molecular, é que a leitura da absorbância pode ser feita sem que a reação tenha sido completada (REIS, 1996). Isso é possível pelo fato das amostras e padrões percorrerem sempre o mesmo caminho, sob as mesmas condições analíticas, antes de chegar ao detector.

Um sistema FIA é constituído por três unidades fundamentais: a de propulsão de fluidos, a de comutação e reação e a de medida (RUZICKA; HANSEN, 1988; ZAGATTO; OLIVEIRA; COLLINS, 1999).

A função da unidade de propulsão é estabelecer um fluxo de volume constante, constituído por uma ou mais soluções e reagentes. Neste caso o dispositivo mais comumente utilizado é o de bombas peristálticas, ajustadas para movimentar as soluções através do percurso analítico em vazão constante (RUZICKA; HANSEN, 1988; ZAGATTO; OLIVEIRA; COLLINS, 1999).

A unidade de comutação tem a função de inserir, no fluxo contínuo, um volume exatamente medido de amostra, com reprodutibilidade e sem interrupção do sistema. Consiste de um injetor/comutador ou válvulas rotatórias. A reação ocorre dentro do percurso analítico (espaço compreendido desde o ponto de injeção da amostra até o detector) (RUZICKA; HANSEN, 1988).

No final do percurso analítico, a resposta da unidade de detecção do sistema FIA é um sinal transiente, típico de muitas técnicas analíticas. O detector deve ser estável, apresentar volume morto e ter uma resposta rápida. Os principais detectores empregados são: espectrofotômetros UV/Vis, espectrômetros de absorção atômica e de emissão em plasma, potenciômetros e condutivímetros (REIS, 1996; REIS et al., 1993; RUZICKA; HANSEN, 1988).

Os sistemas FIA permitem a implementação de praticamente todas as etapas envolvidas no processo de análise química (amostragem, separações, diluições, pré-concentrações e adição de reagentes). Operações em fluxo são mais fáceis de controlar no tempo e espaço, já que o uso de tubos fechados permite a mistura de reagentes sem a necessidade de manipulação e contaminação externa, favorecendo a formação altamente reprodutível de produtos de reação (REIS, 1996).

Em suma, devido às vantagens encontradas pela automação de procedimentos analíticos, vários métodos para determinação de paracetamol via análise por injeção em fluxo vêm sendo desenvolvidos (ANICETO; FATIBELO-FILHO, 2002; BOUHSAIN, et al., 1996; CRIADO, et al., 2000; FELIX; BRETT; ANGNES, 2007; KNOCHEN; GIGLIO; LIU, et al., 2007; REIS, 2003; LAJORANTE; PIRES; REIS, 2006; PULGARIN; BERMEJO, 1996; RUENGSIAGOON; LIAWRUANGRATH; TOWNSHEND, 2006; SILVA, et al., 2006; SUARES; VIEIRA; FATIBELLO FILHO, 2005; VAN STADEN; TSANWANI, 2002).

Bouhsain et al. (1996) propuseram um sistema totalmente automatizado para determinação de paracetamol em urina, com a hidrólise on-line do paracetamol (assistida por forno de microondas) para formação do p-aminofenol, seguida pela reação com 8-hidroxiquinolina em meio básico. O azul de indofenol formado foi monitorado em 608 nm,

com limite de detecção de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para realização do procedimento de hidrólise on-line, a alça contendo a amostra foi inserida no fluxo carregador, o qual foi direcionado para a bobina de hidrólise (6 metros), localizada na cavidade interna do forno microondas. O fluxo foi então interrompido e o forno foi ligado durante 94 segundos em potência de 140 W. A seguir, o fluxo transportador (com a amostra já hidrolisada) foi direcionado para um banho de gelo, seguido por um dispositivo de separação gás-líquido (onde as bolhas de ar foram removidas), para finalmente reagir com 8-hidroxiquinolina antes de chegar ao detector. O rendimento médio de hidrólise obtido foi de 54%, para uma frequência analítica de 70 amostras h^{-1} .

Criado et al. (2000) desenvolveram um sistema semelhante baseado na reação com o-cresol, também em meio básico, para formação de um produto colorido com forte absorção em 620 nm. O método fundamentou-se no mesmo procedimento, mas neste caso o forno foi ligado durante 120 segundo em 500 W e a bobina de hidrólise era de 12 metros. Assim, sob condições levemente mais rigorosas – maior tempo e utilização de uma bobina maior, apesar de obterem uma menor frequência analítica (20 amostras h^{-1}), os autores atingiram um maior rendimento (95%) e um limite de detecção mais baixo, na ordem de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

1.4. Justificativa

Atualmente, os laboratórios de análises clínicas encontram-se diante de um paradoxo comum: realizar um número cada vez maior de testes, com menores limites de detecção num curto intervalo de tempo, sem, todavia, perder em qualidade e confiabilidade dos resultados. O rigor na avaliação dos resultados, e no estabelecimento dos limites de confiança é condicionado pela complexidade do procedimento, reprodutibilidade e sensibilidade do método, além de outras exigências analíticas incidentes. De modo geral, quanto menor o número de etapas que constituem o método, menor será o erro inerente acumulado e, consequentemente o rigor analítico será atingido.

A cada dia que passa o mercado nacional e mundial fica mais exigente quanto à qualidade dos produtos comercializados. Os casos de falsificação de medicamentos fizeram com que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA adotasse algumas medidas com relação às farmácias de manipulação de medicamentos, para que estas passassem a estar aptas a assegurar as qualidades microbiológicas, químicas e físicas dos insumos farmacêuticos e, principalmente, dos medicamentos comercializados e manipulados (AGÊNCIA..., 2006).

Diante dessas exigências, torna-se evidente a necessidade de desenvolver metodologias analíticas simples, rápidas e sensíveis para realização de testes de controle de qualidade em amostras de medicamentos.

1.5. Objetivos

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica simples, rápida e sensível para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas, utilizando a espectrofotometria na região visível. Este trabalho tem por finalidade ainda:

- ✓ Incorporar parte do procedimento analítico em um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica na região visível, sendo a hidrólise do fármaco assistida em forno de microondas;
- ✓ Utilizar metodologias de planejamento de experimentos para otimização dos parâmetros no procedimento experimental.

CAPÍTULO II.
ESPECTROFOTOMETRIA
METODOLOGIA, RESULTADOS E
DISCUSSÕES

II.1 Parte Experimental

II.1.1 Materiais e equipamentos

Para realização das medidas espectrofotométricas foi utilizado um espectrofotômetro portátil USB4000 da Ocean Optics (faixa de trabalho de 200 – 850 nm), controlado por um software OOI Base 32, SpectrSuite (Ocean Optics).

Para a hidrólise do paracetamol foi utilizado um forno de microondas doméstico Panasonic – modelo Júnior, o qual possui prato rotatório, 2450 MHz de frequência do magnetron e potência máxima de 1100 W, além de reatores de teflon hermeticamente fechados (Figura 2), equipados com tampa rosca e com volume interno de 100 mL.



Figura 2 – Reator de teflon utilizado para realização da hidrólise do paracetamol em forno de microondas.

Para facilitar a dissolução e solubilização das amostras e reagentes, utilizou-se um aparelho sonificador (Ultra som BRANSON, modelo 3210).

As pesagens foram feitas em balança analítica marca A&D Company, modelo GR-200.

Micropipetas Eppendorf (10-100 μL e 100-1000 μL) foram usadas para efetuar as medidas de volume.

II.1.2 Reagentes e soluções

Paracetamol (acetaminofeno), reagente da Purifarma – Brasil, de pureza > 99,42%, foi utilizado na preparação das soluções de referência (solução padrão). Foram utilizados ainda, excipientes de grau farmacêutico nos estudos de possíveis interferentes. Os demais reagentes utilizados foram todos de grau P.A.:

- p-dimetilaminocinamaldeído (p-DAC) 98%, Acros Organics, Estados Unidos;
- Dodecil sulfato de sódio (SDS), Sigma, St. Louis – EUA;
- Ácido Clorídrico 37%, Merck, Brasil;
- Hidróxido de sódio, Merck, Brasil;

Amostras comerciais de medicamentos contendo paracetamol foram adquiridas em farmácias locais.

As soluções de trabalho foram preparadas da seguinte forma:

- a) Solução estoque de paracetamol $4,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$:** esta solução foi preparada dissolvendo-se aproximadamente 325mg de PCT em água desionizada, em um balão volumétrico de 500 mL completado com o mesmo solvente. Esta solução é estável por pelo menos 30 dias.
- b) Solução estoque de dodecil sulfato de sódio (SDS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$:** preparada pela dissolução de aproximadamente 29g de dodecil sulfato de sódio em água desionizada, em balão volumétrico de 1000 mL, completado com o mesmo solvente.
- c) Solução aquosa ácida de p-DAC 0,2%:** foram preparadas diariamente, pela dissolução de 100mg de p-DAC em balão volumétrico de 50 mL, contendo 5 mL de solução de HCl $0,6 \text{ mol L}^{-1}$. O volume do balão foi completado com água desionizada.
- Obs: Essa concentração de HCl foi utilizada somente nas fases de planejamento fatorial completo e de metodologia de superfície de resposta. Depois de otimizadas as condições experimentais, foi utilizada solução de HCl $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ para dissolver o reagente.
- d) Solução estoque de HCl 8 mol L^{-1} :** preparada em balão volumétrico de 100 mL, a partir de conveniente diluição do HCl concentrado (37%) com água desionizada. Esta solução foi adequadamente padronizada (VOGEL, 1981). As soluções de trabalho foram preparadas por diluição com água deionizada.
- e) Solução estoque de NaOH 1 mol L^{-1} :** esta solução foi preparada a partir da dissolução de aproximadamente 4g de NaOH em béquer com 50 mL de água desionizada. O conteúdo do béquer foi transferido quantitativamente para balão de 100 mL e o

volume foi completado com o mesmo solvente. Esta solução foi padronizada com ftalato ácido de potássio (VOGEL, 1981).

II.1.3 Amostras

Amostras de diferentes lotes comerciais de medicamentos contendo paracetamol, dentro de seus respectivos prazos de validade, foram adquiridas em farmácias locais da cidade de Araraquara-SP. A Tabela 1 traz a relação de medicamentos analisados, alguns na forma de comprimidos e outros na forma de solução oral (gotas).

Tabela 1 – Formulações farmacêuticas analisadas.

Amostras comerciais	Forma	Conteúdo nominal*
A	Comprimido	500
B	Comprimido	750
C	Comprimido	500
D	Comprimido	500
E	Solução oral/gotas	200
F	Solução oral/gotas	200

* Conteúdo nominal: mg PCT/comprimido ou mg PCT/ml de solução.

II.2. Procedimento experimental

II.2.1. Reação

A reação se processa após a hidrólise do paracetamol à p-aminofenol. Para isto, uma alíquota de 5 mL da solução estoque de PCT $4,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi transferida, com auxílio de pipeta volumétrica, para um reator de teflon equipado com tampa rosca, ao qual foram ainda adicionados 5 mL de solução de HCl 4 mols L^{-1} . O reator foi hermeticamente fechado, colocado no centro da cavidade interna de um forno de microondas e irradiado durante 120s em potência de 770 W (potência média-alta, que corresponde a 70% da potencia máxima). Aguardou-se o resfriamento do sistema durante 10 min e uma alíquota de 1 mL do produto hidrolisado foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, ao qual foi acrescentado 1,8 mL de NaOH 1 mol L^{-1} (para eliminar o excesso de acidez proveniente da hidrólise), sendo o volume do balão completado com água desionizada. Esta solução foi denominada solução A. Uma alíquota de 100 μL da solução A foi transferida, com auxílio de micropipeta, para balão volumétrico de 10 mL, onde foram acrescentados 1,85 mL de solução aquosa ácida de p-DAC 0,2% m/v (que contém HCl $1,48 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e 2 mL de solução de SDS 0,1 mol L^{-1} . O volume do balão foi completado com água desionizada e, na seqüência, transcorridos 10

minutos (ver item II. 3.2, pág 37) após o início da reação, foram realizadas as leituras espectrofotométricas em comprimento de onda de 530nm.

II.2.2. Estudo da estabilidade do produto colorido

Para a verificação da estabilidade do produto colorido formado seguiu-se o procedimento supramencionado (item II.2.1 - Reação). Após o acréscimo do surfactante e do reagente cromogênico, houve acompanhamento do valor de absorbância do produto final durante 60 minutos, em intervalos de tempo de 5 minutos.

II.2.3. Construção da curva analítica

A curva analítica foi construída a partir das concentrações ideais estabelecidas para os reagentes na fase de otimização das variáveis. Para construção da curva foram adicionados volumes fixos de reagentes a 7 balões volumétricos: 1,85 mL de solução aquosa ácida de p-DAC $1,14 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (que contém HCl $1,78 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e 2,00 mL de solução de SDS $1,00 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. A seguir, foram adicionadas alíquotas de 100-1200 μL da solução A (solução de paracetamol neutralizada após a hidrólise – descrita no item 2.1.6), de modo que, a concentração final de paracetamol variou no intervalo de $1,30 \times 10^{-6}$ a $2,60 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

O volume dos balões foi completado com água desionizada. As soluções foram homogeneizadas para que em seguida fossem realizadas as leituras de absorbâncias em 530 nm.

II.2.4. Preparo das amostras

Para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas, as amostras foram preparadas da seguinte maneira:

a) Comprimidos: 20 comprimidos de um mesmo lote da amostra comercial foram pesados separadamente em balança analítica para determinação da média das massas. Os comprimidos foram então macerados em gral de ágata até a obtenção de um pó fino e homogêneo. A partir da massa média dos comprimidos, uma porção equivalente a 130mg do fármaco foi pesada, dissolvida (com auxílio de ultra-som por 10 minutos) em balão volumétrico de 200 mL com água desionizada; este foi completado com o mesmo solvente. A solução foi então filtrada em papel de filtro Whatman 41 e do

filtrado foi retirada uma alíquota de 5 mL para realização da hidrólise e posterior análise, conforme procedimento descrito no item II.2.1 (Reação).

b) Solução oral/gotas: primeiramente o frasco contendo o medicamento foi agitado vigorosamente para homogeneizar a solução. A seguir, uma alíquota contendo uma porção equivalente a 130 mg do fármaco foi transferida (com auxílio de micropipeta) para um balão volumétrico de 200 mL contendo água desionizada. O balão permaneceu em banho de ultra-som por 10 minutos para favorecer a dissolução e a seguir o volume do balão foi completado com o mesmo solvente. Desta solução foi retirada uma alíquota de 5 mL para realização da hidrólise e posterior análise, conforme procedimento descrito no item II.2.1.

II.2.5. Aplicação analítica

As amostras foram analisadas pelo método proposto, cujo procedimento está descrito no item 2.2.1, e os resultados provenientes destas análises foram comparados com os resultados obtidos pelo método oficial. A British Pharmacopoeia (2001) preconiza como método oficial para determinação de paracetamol em medicamentos a espectrofotometria na região do ultravioleta.

II.2.6. Estudo de Adição e Recuperação

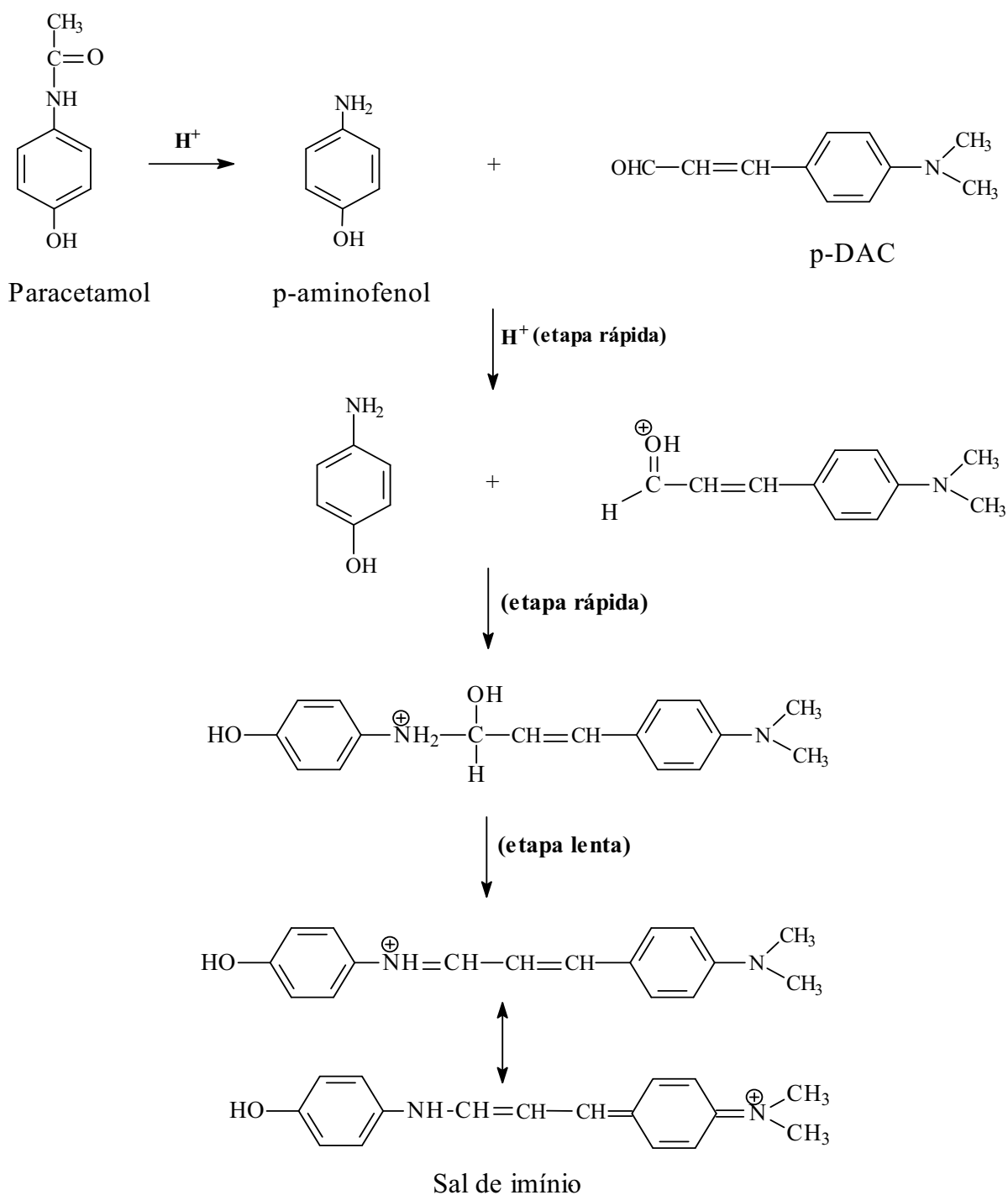
A interferência da matriz (medicamento – com todos os excipientes e princípios ativos prescritos na bula) pode introduzir erros sistemáticos nas determinações analíticas. Para investigar as possíveis interferências da matriz, realizou-se um estudo de adição e recuperação.

Neste estudo tanto a amostra de medicamento quanto a solução padrão de PCT foram hidrolisadas segundo procedimento previamente descrito (item 2.2.1). As amostras com concentração equivalente a $1,29 \mu\text{g mL}^{-1}$ de paracetamol, tiveram quantidades conhecidas ($0,64$; $1,29$; $1,93$ e $2,57 \mu\text{g mL}^{-1}$) de PCT padrão adicionadas às mesmas. As concentrações do padrão adicionadas correspondem a 50; 100; 150 e 200% à quantidade de paracetamol presente na amostra de medicamento. Os ensaios foram realizados em triplicata em balões volumétricos de 10 mL, completados com água desionizada e, deste modo, a concentração final de paracetamol variou no intervalo de $1,29 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $3,86 \mu\text{g mL}^{-1}$ (dentro do intervalo da curva analítica). As análises foram realizadas segundo procedimento descrito no item II.2.1.

II.3. Resultados e discussões

O p-dimetilaminocinamaldeído (p-DAC) é um reagente analítico utilizado especialmente para a detecção e determinação espectrofotométrica de aminas aromáticas primárias. Neste caso, o paracetamol – caracterizado pela presença da função amida, deve passar por um processo de conversão química (hidrólise) para viabilizar a reação.

A hidrólise ácida do paracetamol produz o composto p-aminofenol, que reage em meio ácido com p-DAC via condensação do grupo amino aromático com o grupo carbonila do aldeído, produzindo um intermediário α -aminoálcool, que perde uma molécula de água, produzindo no final um sal de imínio, um composto intensamente colorido que pode ser monitorado em 530 nm. O mecanismo proposto para a reação (Figura 3) foi baseado em outros mecanismos descritos na literatura para a formação deste sal (DORONIN; CHERNOVA; GUSAKOVA, 2004, 2005).



Esquema 1

Figura 3 – Mecanismo proposto para a reação entre p-aminofenol e p-DAC, adaptado do mecanismo proposto por Doronin et al. (2004; 2005).

II.3.1. Testes preliminares

Experimentos preliminares realizados em nosso laboratório revelaram que a reação ocorre exclusivamente em meio ácido, visto ser essencial a etapa de formação do

α -aminoálcool (vide Figura 3). Além disso, constatou-se que na presença de SDS houve um significativo aumento na sensibilidade da reação.

É conhecida a capacidade dos surfactantes em mudar o equilíbrio, a cinética e as propriedades espectrais dos meios reacionais em que são empregados. Por formarem meios organizados (meios micelares), são muito utilizados para alterar ou melhorar as características dos procedimentos analíticos (DORONIN; CHERNOVA; GUSAKOVA, 2005; MANIASSO, 2001; YATSIMIRSKY; YATSIMIRSKAYA; KASHINAT, 1994).

No presente estudo o efeito do dodecil sulfato de sódio (SDS – surfactante aniônico) foi investigado na reação entre o p-aminofenol e p-DAC em meio de ácido clorídrico diluído. Na Figura 4 estão representados os espectros de absorção para os produtos formados na presença e ausência de SDS. Houve um aumento de aproximadamente 5 vezes na magnitude do sinal analítico em presença de SDS, o que torna evidente o aumento significativo na sensibilidade da reação.

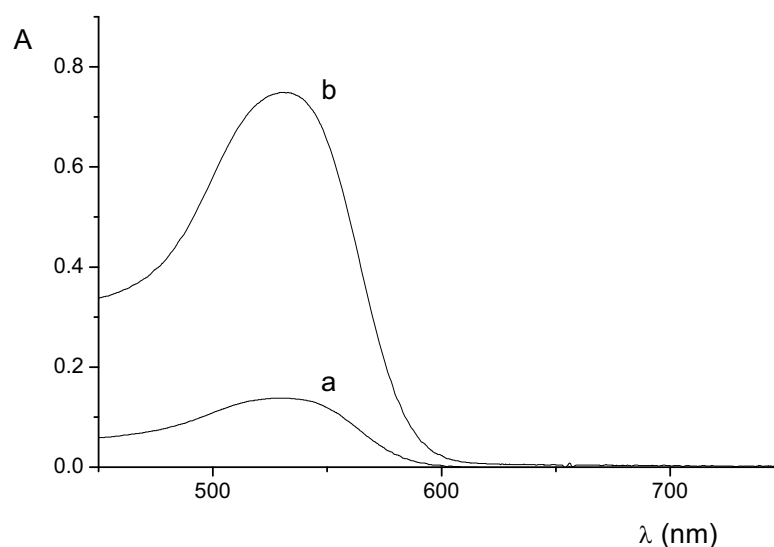


Figura 4 – Espectro de absorção do produto colorido formado. (a): ausência de SDS; (b): presença de SDS.

II.3.2. Estudo da estabilidade do produto colorido

O estudo da estabilidade do produto final da reação tem como finalidade observar o período de tempo no qual as medidas espectrofotométricas podem ser realizadas sem que haja variação nas respostas de absorbância.

A Figura 5 mostra que o composto p-aminofenol (obtido pela hidrólise do PCT) reage quase que instantaneamente com p-DAC em meio micelar ácido e, com 10 minutos transcorridos do início da reação, permanece estável por pelo menos 60 minutos.

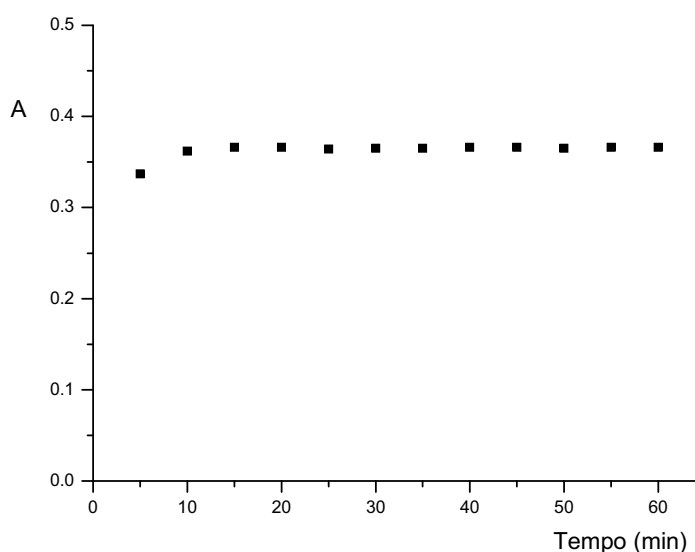


Figura 5 – Estabilidade do composto formado pela reação do p-aminofenol com p-DAC em meio ácido. Paracetamol $2,15 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

II.3.3. Otimização da metodologia proposta

Diante da viabilidade da reação entre o p-aminofenol e p-DAC, estudos foram realizados a fim de estipular as condições ideais para realização das análises, com o objetivo de melhorar a sensibilidade do método proposto e, concomitantemente, atingir limites de quantificação mais baixos. O procedimento de otimização dos parâmetros foi dividido em duas etapas principais. Num primeiro momento foram estudadas as principais variáveis envolvidas no processo de hidrólise do paracetamol. Num segundo momento, foram manipuladas as principais variáveis envolvidas na reação entre o produto hidrolisado (p-aminofenol) e o reagente cromogênico (p-DAC).

II.3.3.1. ESTUDO DAS VARIÁVEIS ENVOLVIDAS NA HIDRÓLISE DO PARACETAMOL

Como não ocorre reação direta entre o paracetamol e o reagente p-dimetilaminocinamaldeído, foi necessário um processo prévio de conversão química, no qual o PCT foi hidrolisado em meio ácido para formação quantitativa do composto p-aminofenol.

Observou-se que três fatores têm bastante influência sobre o rendimento da hidrólise: o tempo de hidrólise (tempo de exposição às microondas), a potência do forno de microondas e a concentração do ácido. Os primeiros experimentos realizados em potência mais elevada

(1100 W – potência máxima do aparelho) ocasionaram perda indesejada do analito provavelmente em decorrência da alta pressão exercida dentro do reator. Além disso, a utilização do forno de microondas em potência máxima, para pequenos volumes de amostras, acabaria sobrecarregando o aparelho ao longo das etapas de desenvolvimento do método. Por outro lado, uma potência muito baixa acarretaria um maior tempo de hidrólise e, conseqüentemente, as análises tornar-se-iam mais demoradas e tediosas. Essas evidências fizeram com que a potência do aparelho fosse fixada em 770 W (70% da máxima) e, deste modo, apenas as variáveis tempo de hidrólise e concentração do ácido foram estudados a fim de se chegar ao melhor rendimento para a hidrólise ácida do paracetamol. A Tabela 2 apresenta os resultados do planejamento fatorial completo (um estudo de interação entre fatores/variáveis) realizado para este estudo.

A espectrofotometria na região do ultravioleta foi utilizada como fator de avaliação do rendimento de hidrólise. Como o paracetamol (não hidrolisado) apresenta forte absorção no comprimento de onda de 245nm, ao passo que, o p-aminofenol apresenta máxima absorção em 275, o melhor rendimento para hidrólise seria equivalente ao maior decréscimo no sinal de absorbância registrado em 245nm. Neste caso, um rendimento teórico de 100% representaria que todo paracetamol teria sido hidrolisado e convertido em p-aminofenol (não haveria absorbância em 245nm, apenas em 275nm).

Tabela 2 – Resultados do planejamento realizado para determinar as melhores condições para realização da hidrólise do paracetamol.

Ensaio	[HCl] (mol L ⁻¹)	Tempo (s)	Rendimento (%)
1	4	120	97,9
2	4	120	96,9
3	8	120	99,4
4	8	120	99,1
5	4	180	101,4
6	4	180	101,4
7	8	180	101,6
8	8	180	102,0

Como mostra a Tabela 2, o rendimento da hidrólise foi maior com o aumento na concentração de HCl e no tempo de hidrólise. Entretanto, altas concentrações do ácido e um

elevado tempo de residência dentro do forno ocasionaram um efeito negativo no rendimento. Isto provavelmente ocorreu devido à degradação do fármaco sob condições mais extremas. Por outro lado, sob condições relativamente mais brandas, foram obtidos rendimentos de hidrólise próximos de 97% com 120s e HCl 4 mol L⁻¹. Para garantir um rendimento próximo de 100% e ao mesmo tempo evitar utilizar as condições mais extremas que pudessem ocasionar a degradação do fármaco, foram utilizados HCl 4 mol L⁻¹ e tempo de 120s nos experimentos posteriores, além da potencia previamente fixada em 770 W.

Sob as condições tidas como ideais, estudou-se a repetibilidade do rendimento da hidrólise. O rendimento médio observado foi de 97.3% ±0.9 para cinco repetições, muito próximo e bastante condizente com outros trabalhos já publicados e que também envolvem hidrólise do paracetamol (CRIADO, et al., 2000; XU; LI, 2004).

II.3.3.2. ESTUDO DAS VARIÁVEIS ENVOLVIDAS NA REAÇÃO ENTRE p-AMINOFENOL E p-DAC

II.3.3.2.1. Triagem das variáveis

As principais variáveis envolvidas no procedimento analítico foram selecionadas de acordo com o conhecimento prévio adquirido ao longo dos testes qualitativos preliminares executados no laboratório. Nestes testes foi confirmado que a reação entre o produto hidrolisado e o reagente p-DAC ocorre somente em meio ácido e que a presença de agente surfactante (SDS) proporciona um aumento de sensibilidade.

Para determinar o grau de influência de cada uma destas variáveis no sistema, realizou-se um planejamento fatorial completo 2³ (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995). Neste planejamento, os três fatores envolvidos, concentração de p-DAC, concentração de HCl e concentração de SDS foram manipulados em dois níveis: baixo (-) e alto (+). Para que todas as combinações possíveis entre os níveis dos fatores fossem avaliadas, foram necessários 8 ensaios diferentes, realizados em duplicata, perfazendo um total de 16 ensaios. Os resultados destas combinações foram obtidos em valores de absorbância, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de absorbância obtidos nos ensaios do planejamento fatorial completo.

Ensaio	[p-DAC] (% m/v)	[SDS] (mol L ⁻¹)	[HCl] (mol L ⁻¹)	A _{530 nm}
1	0,01	0,01	0,03	0,4428
2	0,02	0,01	0,02	0,6216
3	0,02	0,01	0,02	0,6230
4	0,01	0,02	0,03	0,4650
5	0,02	0,02	0,03	0,5691
6	0,01	0,01	0,02	0,4958
7	0,01	0,02	0,02	0,4953
8	0,02	0,01	0,03	0,5776
9	0,01	0,02	0,03	0,4647
10	0,02	0,01	0,03	0,5762
11	0,02	0,02	0,02	0,6174
12	0,02	0,02	0,03	0,5741
13	0,02	0,02	0,02	0,6189
14	0,01	0,01	0,03	0,4567
15	0,01	0,02	0,02	0,4998
16	0,01	0,02	0,02	0,4943

Obs: Em todos os ensaios a concentração de PCT foi fixada em $4,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

O resultado do planejamento pode ser visualizado com mais clareza através do gráfico de Pareto (Figura 6), o qual fornece uma representação geométrica sobre a magnitude da influência de cada fator, bem como a interação entre os fatores. De acordo com a figura, os fatores que ultrapassaram graficamente a linha de significância (grau de confiança de 95%) exerceram uma influência estatisticamente significativa sobre a reação. Neste caso, observou-se que a concentração de p-DAC foi o fator preponderante; este fator apresentou um efeito estimado positivo, ou seja, uma melhor resposta foi obtida quando ajustado em seu nível mais alto (+). Outro fator importante, a concentração de HCl, teve um efeito estimado negativo (-21,46), ou seja, uma melhor resposta foi obtida quando este fator foi ajustado em nível mais baixo. Por outro lado, a concentração de SDS não apresentou uma influência significativa segundo as variações estabelecidas no planejamento fatorial completo. Diante desta constatação, a concentração de SDS provavelmente estava muito próxima de sua condição ideal e, por este motivo, foi fixada em seu nível mais alto (tem efeito estimado positivo), equivalente a 2×10^{-2} mol L⁻¹, para realização dos experimentos seguintes.

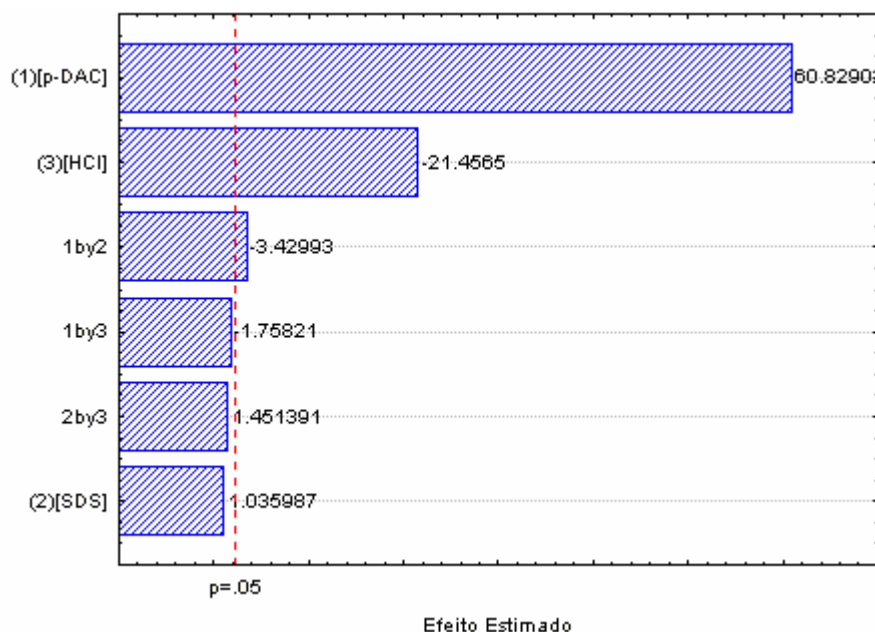


Figura 6 – Gráfico de interação e principais efeitos estimados dos fatores estudados.

II.3.3.2.2. Metodologia de superfície de resposta

As variáveis cujos efeitos foram mais significativos (concentração de p-DAC e concentração de HCl), selecionadas no processo de triagem, foram estudadas por meio da metodologia de superfície de resposta para se chegar à condição ideal de formação do produto colorido e consequentemente, melhorar a sensibilidade do novo método proposto. Neste caso, foi elaborado um planejamento composto central (planejamento em estrela), no qual as duas variáveis foram manipuladas em cinco níveis (-1,41; -1; 0; +1; +1,41), como informa a Tabela 4. Os níveis referentes ao ponto central foram estudados em quatro repetições (n=4), perfazendo um total de 12 experimentos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

Tabela 4 – Variáveis manipuladas no planejamento composto central em seus respectivos níveis, com os resultados obtidos.

Ensaio	Variáveis não codificadas		Variáveis codificadas		$A_{(530\text{ nm})}$
	[p-DAC] (%)	[HCl] (mol L ⁻¹ x 10 ⁻²)	[p-DAC]	[HCl]	
1	0,03	2,75	0	+1,41	0.3579
2	0,037	2,60	+1	+1	0.3942
3	0,04	2,20	+1,41	0	0.3702
4	0,02	2,20	-1,41	0	0.3466
5	0,037	1,82	+1	-1	0.4166
6	0,03	2,20	0	0	0.3831
7	0,03	2,20	0	0	0.3826
8	0,03	2,20	0	0	0.3806
9	0,03	2,20	0	0	0.3842
10	0,023	1,82	-1	-1	0.3688
11	0,03	1,65	0	-1,41	0.4018
12	0,023	2,60	-1	+1	0.3444

Obs: uma fração constante da concentração de HCl é proveniente da solução padrão de p-DAC 0,2% (m/v), a qual já foi preparada em solução de HCl 0,06 mol L⁻¹. Para completar a concentração final de HCl necessária para realização do planejamento, utilizou-se uma solução de HCl 1 mol L⁻¹. Os experimentos foram realizados em balões volumétricos de 10 mL e em todos os ensaios a concentração final de paracetamol foi 2,15x10⁻⁵ mol L⁻¹.

As coordenadas da superfície de resposta, mostradas na Tabela 4, foram geradas com auxílio de um software específico (Statistica 6.0). Estas coordenadas localizam-se a uma distância máxima de $\sqrt{2}$ unidades (ou 1,41 unidades) codificadas do ponto central (este codificado como ponto 0). Todos estes pontos estão, portanto, sobre uma circunferência de raio $\sqrt{2}$, conforme ilustra a Figura 7.

Os resultados obtidos a partir deste planejamento foram processados por meio do software e foram ajustados a um modelo matemático quadrático descrito pela Equação 1.

$$z = 0,2734 + 13,0630x - 183,2929x^2 - 0,8151y + 0,9683y^2 + 1,1378xy \quad \text{Eq. 1}$$

A Eq. 1 inclui os termos lineares (x e y) e quadráticos (x² e y²). Nesta equação, z corresponde à variável dependente ($A_{530\text{nm}}$) frente às variáveis independentes estudadas, que neste caso foram as concentrações de p-DAC (x) e HCl (y).

Os efeitos dos fatores, inter-relacionados em todos os respectivos níveis, de forma linear e quadrática forneceram uma imagem tridimensional de superfície de resposta na região investigada, a qual pode ser visualizada na Figura 7 (a).

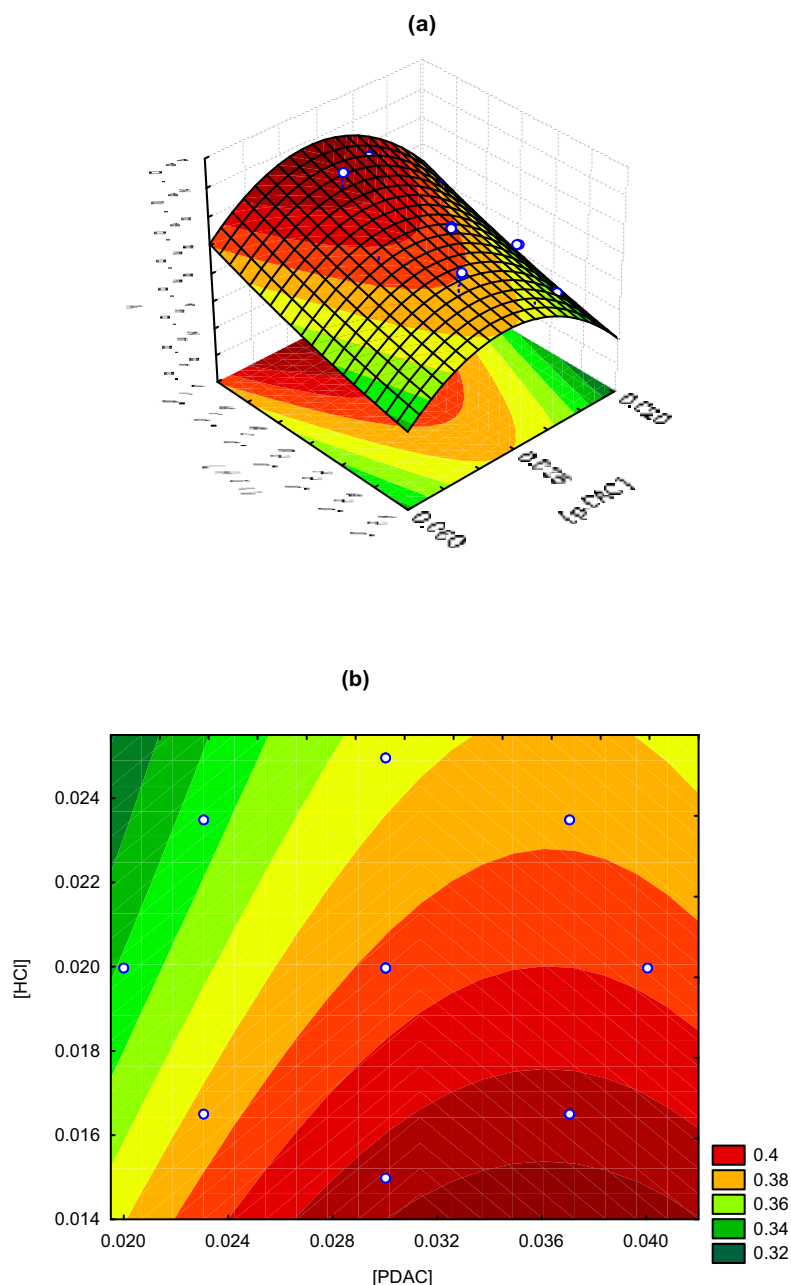


Figura 7 – (a) Superfície de resposta obtida em função das variáveis concentração de p-DAC e concentração de HCl. **(b)** Curvas de nível.

Podemos notar neste caso, pela Figura 7 (a), que a imagem se trata de um plano inclinado obliquamente em relação aos eixos e com sentido ascendente da direita para a esquerda. Assim, para obtenção de melhores resultados, a região experimental deveria ser

deslocada para menores valores de concentração de HCl. Mas, neste caso, a concentração já estava em seu nível crítico, ou seja, abaixo desta concentração, não ocorreria a solubilização do reagente p-DAC. Deste modo, embora a melhor condição experimental não tenha sido obtida em seu ponto ótimo, por uma questão de impedimento químico, o gráfico apontou uma tendência em direção à obtenção de melhores resultados e, por este motivo, a concentração de HCl foi fixada em $1,48 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, seu nível mais baixo possível. Já a concentração de p-DAC foi fixada em 0,037% m/v.

Foi aplicada uma análise de variância ANOVA (Tabela 5) para verificar a significância do modelo matemático obtido no planejamento composto central. Na análise de variância foram levadas em consideração algumas fontes de variação que poderiam interferir na superfície de resposta tais como, a presença de pontos residuais, uma possível falta de ajuste e o erro puro (erros aleatórios).

Tabela 5 – Resultados da análise de variância.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de graus de liberdade	Média quadrática
(1)pdac (L)	0.004164	1	0.004164
pdac (Q)	0.001062	1	0.001062
(2)HCl (L)	0.003068	1	0.003068
HCl (Q)	0.000019	1	0.000019
1L por 2L	0.000001	1	0.000001
Falta de ajuste	0.001618	3	0.000539
Puro erro	0.00181	15	0.0001
Total	0.010061	23	—

Verificou-se que tanto a falta de ajuste quanto o erro puro foram insignificantes para o caso estudado e que os dados experimentais obtidos no planejamento composto central foram capazes de prever com confiabilidade o comportamento da variável absorvância frente às variáveis independentes estudadas.

II.3.4. Curva analítica

Após a otimização das condições experimentais foi construída a curva analítica (Figura 8) num intervalo em que há relação linear entre a concentração de paracetamol e a medida de absorvância em 530 nm.

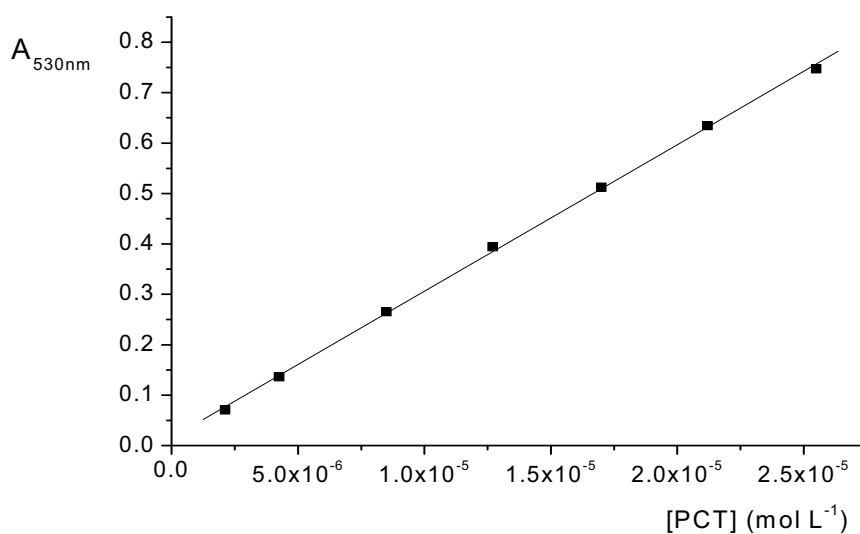


Figura 8 – Curva analítica para reação entre PCT e p-DAC.

A lei de Beer foi obedecida para uma faixa de concentração de paracetamol que variou de $1,3 \times 10^{-6} - 2,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (equivalente a $0,2 - 3,9 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). A equação de regressão linear obtida foi: $A_{530nm} = 0,0154 (\pm 0,005) + 2,907 \times 10^4 (\pm 3,4 \times 10^2)C$, a qual apresentou um coeficiente de correlação de 0,9996, indicando a excelente linearidade da curva analítica.

II.3.5. Aplicação analítica do método desenvolvido

O método desenvolvido foi aplicado na quantificação de paracetamol presente em amostras de medicamentos amplamente consumidos no país. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 6 e estão em excelente concordância com os resultados obtidos pelo método oficial (BRITISH, 2001). Os valores calculados de “t” e “F” não excederam os valores teóricos tabelados, confirmando a exatidão e precisão do método em um nível de confiança de 95%.

Tabela 6 – Resultados obtidos da análise de medicamentos pelo método proposto e pelo método oficial.

Amostras	Valor nominal ^a	Método proposto ^b	Método oficial ^b	t (2,78) ^c	F (19,0) ^c
A	500	501,2±3,5	501,0±2,4	0,10	2,1
B	750	751,3±3,8	749,8±2,6	0,58	2,1
C	500	502,3±3,0	507,0±2,5	2,08	1,4
D	500	499,1±4,3	500,3±2,8	0,43	2,4
E	200 [*]	199,6±1,9	202,2±1,6	1,84	1,4
F	200 [*]	202,7±2,3	199,6±1,3	2,05	3,1

^a mg PCT/comprimido^{*} mg PCT/ml de solução oral ou gotas.^b Média ± desvio padrão das medidas; n=3.^c Valores teóricos tabelados para os testes t e F em um nível de confiança de 95%.

II.3.6. Estudo de Adição e Recuperação

Uma vez que as amostras comerciais de medicamentos à base de paracetamol contêm uma quantidade razoavelmente grande de excipientes em suas formulações, foi realizado um estudo de adição e recuperação a fim de determinar a potencialidade de interferência da matriz na aplicação do método proposto. De acordo com os resultados obtidos, apresentados na Tabela 7, observa-se que as médias percentuais de recuperação de paracetamol encontram-se entre 96,9 – 103,9%, evidenciando novamente a exatidão do método proposto e a ausência de efeitos significativos da matriz nas análises.

Tabela 7 – Resultados da recuperação de paracetamol obtidos pelo método espectrofotométrico desenvolvido, para uma concentração inicial de paracetamol no medicamento de $1,30 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Amostra	Padrão adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
A	-	1,30	
	0,64	1,94	100,0
	1,29	2,64	103,9
	1,93	3,22	99,5
	2,57	3,85	99,2
			$\mu = 100,6 \pm 2,2$
B	-	1,29	
	0,64	1,95	103,1
	1,29	2,60	101,6
	1,93	3,22	100,0
	2,57	3,78	96,9
			$\mu = 100,4 \pm 2,7$
C	-	1,28	
	0,64	1,92	100,3
	1,29	2,57	100,4
	1,93	3,19	99,1
	2,57	3,84	99,5
			$\mu = 99,6 \pm 0,5$
D	-	1,30	
	0,64	1,95	101,4
	1,29	2,62	102,5
	1,93	3,26	101,6
	2,57	3,85	99,1
			$\mu = 101,2 \pm 1,4$
E	-	1,31	
	0,64	1,96	101,4
	1,29	2,64	103,1
	1,93	3,24	100,0
	2,57	3,86	99,1
			$\mu = 101,0 \pm 1,7$
F	-	1,30	
	0,64	1,95	101,6
	1,29	2,62	102,5
	1,93	3,25	101,0
	2,57	3,85	99,2
			$\mu = 101,0 \pm 1,3$

II.3.7. Validação do método proposto

Alguns dos principais parâmetros estudados na validação do método estão disponíveis na Tabela 8.

Os limites de detecção e quantificação foram determinados conforme procedimentos descritos por Skoog, Holler e Nieman (2002) e Long e Winefordner (1983) os quais seguem recomendação da IUPAC. Para obtenção destes valores, foram realizadas 20 medidas de absorbância de amostras em branco (sem analito) no comprimento de onda de absorção máxima. Os valores exatos de LOD e LOQ, foram obtidos a partir das Equações 2 e 3, onde “ σ ” é o desvio padrão das vinte medidas do branco e “b”, o coeficiente angular da reta (para a curva analítica).

$$\text{LOD} = 3 \sigma / b \quad \text{Eq. 2}$$

$$\text{LOQ} = 10 \sigma / b \quad \text{Eq. 3}$$

Tabela 8 – Resultados das figuras de mérito obtidos para o método espectrofotométrico desenvolvido.

Parâmetros	Resultados
λ (nm)	530
Faixa Linear (mol L ⁻¹)	$1,3 \times 10^{-6} - 2,6 \times 10^{-5}$
Limite de detecção (mol L ⁻¹)	$1,7 \times 10^{-7}$
Limite de quantificação (mol L ⁻¹)	$5,7 \times 10^{-7}$
Correlação linear (R)	0,9996
Coeficiente linear (a)	0,0154
Coeficiente angular (b)	29070

A robustez do método foi avaliada continuamente durante a fase do planejamento fatorial, quando foram verificados os efeitos principais de cada um dos fatores envolvidos no procedimento analítico. Ao final de todo processo de planejamento e depois de estabelecidas as condições ideais, o método mostrou-se robusto, ou seja, apresentou a característica de não ser afetado por pequenas variações ocorridas nos parâmetros de operação.

Os estudos de exatidão (proximidade do valor admitido como verdadeiro) e precisão (dispersão de resultados de ensaios independentes) estão relacionados com os testes “t” e “F”

respectivamente. Os resultados destes testes foram apresentados na Tabela 6 (p. 47); que mostra a comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto e pelo método oficial para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas.

II.4. Conclusão

O método espectrofotométrico desenvolvido teve seus principais parâmetros avaliados por meio de ferramentas quimiométricas, a partir das quais as condições ideais para a realização das análises foram determinadas.

Sob as condições pré-determinadas, um rendimento de hidrólise próximo de 100% foi obtido em apenas 2 minutos com a utilização de um forno de microondas e, ficou evidente o aumento da sensibilidade analítica, principalmente com a utilização do meio micelar. Isso permitiu que um limite de detecção extremamente baixo fosse alcançado, por volta de $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, o mais baixo encontrado dentre os métodos espectrofotométricos descritos para determinação de paracetamol.

Os resultados provenientes das análises realizadas pelo método desenvolvido apresentaram precisão, seletividade, sensibilidade e estão em excelente concordância com os resultados obtidos pelo método oficial recomendado pela Farmacopéia Britânica para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas.

*CAPÍTULO III -
ANÁLISE POR INJEÇÃO EM
FLUXO
METODOLOGIA, RESULTADOS E
DISCUSSÕES*

III.1. Parte Experimental

III.1.1. Materiais e Equipamentos

O sistema de análise por injeção em fluxo utilizado para automatização do procedimento analítico anteriormente proposto foi constituído de:

- Bomba peristáltica, marca Gilson, modelo Minipuls 3, origem francesa, equipada com 8 canais com capacidade de operação em velocidade de até 48 rpm (incrementos de 0,1 rpm) (Figura 9).
- Sistema de detecção espectrofotométrico: vide item II. 1.1 (Materiais e equipamentos – p. 30)
- Injetor comutador manual para injeção do reagente e das amostras (Figura 10);
- Para propulsão das soluções foram utilizados tubos peristálticos de tygon de diferentes diâmetros (1.6 e 1.0mm para propulsão da amostra e reagente respectivamente). Foram utilizados ainda, tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno para fazer o arranjo das linhas de carreamento das soluções, bobinas reacionais e alças de amostragem e de reagentes.



Figura 9 – Bomba peristáltica de oito canais utilizada no sistema FIA proposto.



Figura 10 – Injetor comutador manual.

Além deste sistema, a mesma estrutura e instrumentos usados no desenvolvimento do método espectrofotométrico convencional foram utilizados nesta etapa de automatização.

Desta forma, a detecção dos sinais transientes foi realizada no mesmo espectrofotômetro, agora equipado com cubeta de fluxo com caminho ótico de 1,0 cm e volume interno de 500 μL .

III.1.2. Reagentes e soluções

As soluções de trabalho foram preparadas a partir dos mesmos reagentes e soluções anteriormente citados (item II.1.2; p. 31), da seguinte forma:

- a) **Solução estoque de paracetamol $4,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$** : esta solução foi preparada dissolvendo-se 325mg de PCT em 5 mL de metanol, em balão volumétrico de 50 mL. O volume final do balão foi completado com água desionizada. Esta solução é estável por pelo menos 30 dias.
- b) **Solução estoque de dodecil sulfato de sódio (SDS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$** : descrita no item II.1.2.
- c) **Solução de p-DAC 0,18% m/v**: foi preparada pela dissolução de 90 mg de p-DAC em 5 mL de solução de HCl $0,6 \text{ mol L}^{-1}$, em balão volumétrico de 50 mL. O volume final do balão foi completado com água desionizada.
- d) **Solução estoque de HCl 8 mol L^{-1}** : descrita no item II.1.2. Soluções de trabalho foram preparadas por diluição com água desionizada.
- e) **Solução estoque de NaOH 1 mol L^{-1}** : descrita no item II.1.2.

III.2. Procedimento experimental

III.2.1. Reação

A reação se processa após a hidrólise do paracetamol à p-aminofenol, a qual foi realizada em série, off-line, da mesma forma em que foi realizada no método espectrofotométrico anteriormente descrito. Como no caso anterior, o excesso de acidez proveniente da hidrólise foi eliminado com acréscimo de NaOH para se obter uma solução denominada solução A. Uma alíquota de 1 mL desta solução A foi transferida, com auxílio de micropipeta, para balão volumétrico de 10 mL, onde foram acrescentados 2 mL de solução de SDS $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. O volume do balão foi completado com água desionizada e, na sequência, esta solução foi injetada no sistema de análise por injeção em fluxo, por zonas coalescentes, o qual tem seu diagrama esquemático ilustrado na Figura 11. Depois de introduzida no fluxo carreador (solução carregadora de SDS $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), a amostra

entrou em contato com o reagente (p-DAC 0,18% m/v preparado em $\text{HCl } 6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) no ponto de confluência Y. Após o ponto de confluência, iniciou-se a formação do produto colorido, que passou ainda pelo reator B até chegar ao detector ajustado em 530 nm. Os sinais transientes foram então registrados e analisados pelo software Origin 7.0.

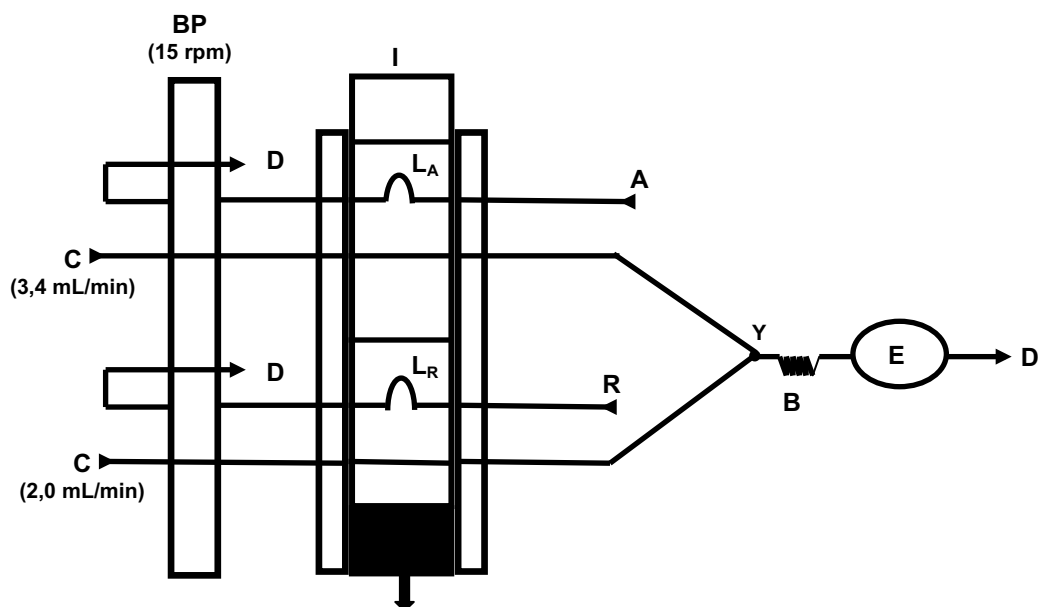


Figura 11 – Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo proposto. **BP**: bomba peristáltica; **I**: injetor comutador manual; **C**: solução carregadora ($\text{SDS } 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$); **A**: solução padrão ou amostra; **R**: solução reagente de p-DAC 0,18% m/v preparada em $\text{HCl } 6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; **L_A**: alça de amostragem 120 cm (603 μL); **L_R**: alça de reagente 80 cm (402 μL); **Y**: ponto de confluência; **B**: bobina de reação (280 cm); **E**: espectrofotômetro (ajustado em 530 nm); **D**: descarte.

III.2.2. Construção da curva analítica

A curva analítica foi obtida a partir da solução estoque padrão de paracetamol. Para construção da curva foram tomadas alíquotas de 25–600 μL da solução A (solução de paracetamol obtida após a hidrólise – descrita no item II.2.1) em balões volumétricos de 10 mL. Foram adicionadas alíquotas de 2 mL de solução de SDS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em cada um dos balões, sendo o volume final completado com água desionizada. Estes balões foram levados ao sistema FIA (cuja configuração ideal está esquematizada acima) para injeção, reação e detecção em 530 nm. A concentração final de paracetamol variou no intervalo de $5,37 \times 10^{-6}$ a $1,29 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (que corresponde a 0,81 a 19,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

III.2.3. Preparação das amostras

Para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas, as amostras foram preparadas da seguinte maneira:

- a) Comprimidos:* 20 comprimidos de um mesmo lote da amostra comercial foram pesados separadamente em balança analítica para determinação da média das massas. Os comprimidos foram então macerados em gral de ágata até a obtenção de um pó fino e homogêneo. A partir da massa média dos comprimidos, uma porção equivalente a 160mg do fármaco foi pesada, dissolvida (com auxílio de ultra-som por 10 minutos) em 2,5 mL de metanol (utilizado para facilitar a dissolução do paracetamol) em balão volumétrico de 25 mL; em seguida o volume do balão foi completado com água desionizada. A solução foi então filtrada em papel de filtro Whatman 41, quando necessário, e do filtrado foi retirada uma alíquota de 5 mL para realização da hidrólise.
- b) Solução oral/gotas:* primeiramente o frasco contendo o medicamento foi agitado vigorosamente para homogeneizar a solução. A seguir, uma alíquota contendo uma porção equivalente a 320 mg do fármaco foi transferida (com auxílio de micropipeta) para um balão volumétrico de 50 mL contendo 5 mL de metanol. O balão permaneceu em banho de ultra-som por 10 minutos e a seguir o conteúdo do balão foi completado com água desionizada. Desta solução foi retirada uma alíquota de 5 mL para realização da hidrólise.

III.2.4. Estudo de adição e recuperação

Para cada amostra distinta de medicamento, transferiu-se alíquotas com concentração de paracetamol equivalente a $3,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para balões volumétricos de 10 mL, aos quais foram acrescentadas alíquotas de solução padrão de PCT em proporções equivalentes a 0, 50, 100 e 200% em relação à concentração inicial predeterminada de $3,25 \mu\text{g mL}^{-1}$. O volume final dos balões foi completado com água desionizada e, deste modo, a concentração final de paracetamol (solução padrão + amostra de medicamento) variou no intervalo de $3,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $9,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ (dentro dos limites da curva analítica). Os ensaios foram realizados em triplicata e todas as amostras foram analisadas do mesmo modo, segundo procedimento descrito no item III.2.1.

III.3. Resultados e discussão

Os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico convencional comprovaram a viabilidade da reação entre o produto da hidrólise do paracetamol (o composto p-aminofenol) e p-DAC, em meio micelar ácido.

Com a finalidade de tornar o método espectrofotométrico desenvolvido ainda mais vantajoso com relação à simplicidade e tempo para realização das análises, uma parte do procedimento analítico foi incorporada em um sistema de análise por injeção em fluxo.

III.3.1. Triagem das variáveis

Em princípio, a parte central de um sistema em fluxo por zonas coalescentes (em que tanto a amostra quanto o reagente são injetados por meio de alças) corresponde à faixa que vai desde o ponto de introdução da amostra e reagente até o detector. Durante este percurso há vários fatores ou parâmetros do sistema que podem influenciar de alguma forma a magnitude do sinal analítico registrado pelo detector em 530 nm. Neste caso, os principais parâmetros envolvidos na configuração do sistema foram avaliados por meio de um planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} (7 fatores avaliados em dois níveis – resolução IV) a fim de estimar quais destes fatores exercem maior influência sobre a intensidade do sinal analítico.

Os fatores avaliados neste planejamento foram: comprimento das alças de amostra e reagente, comprimento da bobina reacional, velocidade da bomba (responsável pela vazão do sistema), concentrações de reagente e ácido clorídrico e a concentração de SDS na solução carregadora. A hidrólise do paracetamol, requisito fundamental para ocorrência da reação, foi efetuada off-line (fora do sistema FIA) sob as mesmas condições experimentais praticadas no método convencional.

Este planejamento envolveu a execução de 16 experimentos os quais foram realizados de forma aleatória e em duplicata. Na Tabela 9 estão disponíveis as variáveis analisadas, seus respectivos níveis e os resultados obtidos.

Tabela 9 – Matriz experimental do planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} realizado para triagem das variáveis do sistema FIA desenvolvido.

Ordem	[SDS] (mol L ⁻¹)	[p-DAC] (% m/v)	[HCl] (mol L ⁻¹)	Vazão / vel. Bomba (rpm)	Alça A. (cm)	Alça R. (cm)	Bobina (cm)	A _{530nm}
1	0,02	0,10	0,08	20	80	60	200	0,229 0,228
2	0,02	0,05	0,1	15	80	80	200	0,148 0,147
3	0,01	0,10	0,1	20	80	80	200	0,186 0,180
4	0,02	0,10	0,1	15	100	60	200	0,307 0,320
5	0,01	0,05	0,1	20	100	60	200	0,118 0,112
6	0,02	0,05	0,08	20	100	80	200	0,154 0,153
7	0,01	0,10	0,08	15	100	80	200	0,352 0,349
8	0,01	0,05	0,08	15	80	60	200	0,184 0,182
9	0,02	0,10	0,08	15	80	80	250	0,369 0,371
10	0,01	0,05	0,1	15	100	80	250	0,193 0,195
11	0,01	0,05	0,08	20	80	80	250	0,154 0,153
12	0,02	0,05	0,1	20	80	60	250	0,119 0,117
13	0,01	0,10	0,1	15	80	60	250	0,297 0,299
14	0,01	0,10	0,08	20	100	60	250	0,285 0,286
15	0,02	0,10	0,1	20	100	80	250	0,264 0,259
16	0,02	0,05	0,08	15	100	60	250	0,230 0,231

Obs: a concentração de paracetamol foi fixada em $2,15 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para todos os ensaios.

O gráfico de Pareto (Figura 12), obtido a partir dos resultados (medidos em função da absorbância) deste planejamento fatorial fracionário, mostra que as variáveis que mais exercem influência sobre a magnitude do sinal de absorbância são a concentração de p-DAC, a velocidade da bomba, a concentração de HCl, o tamanho da bobina e o tamanho da alça de amostragem. Sendo assim, estes parâmetros foram estudados com maiores detalhes em um novo planejamento fatorial, ao passo que, a concentração de SDS e o tamanho da alça de reagente, por não exercerem influência tão significativa no sistema, foram, portanto, consideradas como próximas de suas condições tidas como ideais para realização das análises. Deste modo, a concentração de SDS foi fixada em $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e a alça de reagente em 80 cm (que corresponde a 402 μL) para realização das medidas subsequentes. Alguns dos efeitos de interação entre as algumas das variáveis apresentaram certo nível de influência sobre o sistema, mas com menor importância estatística.

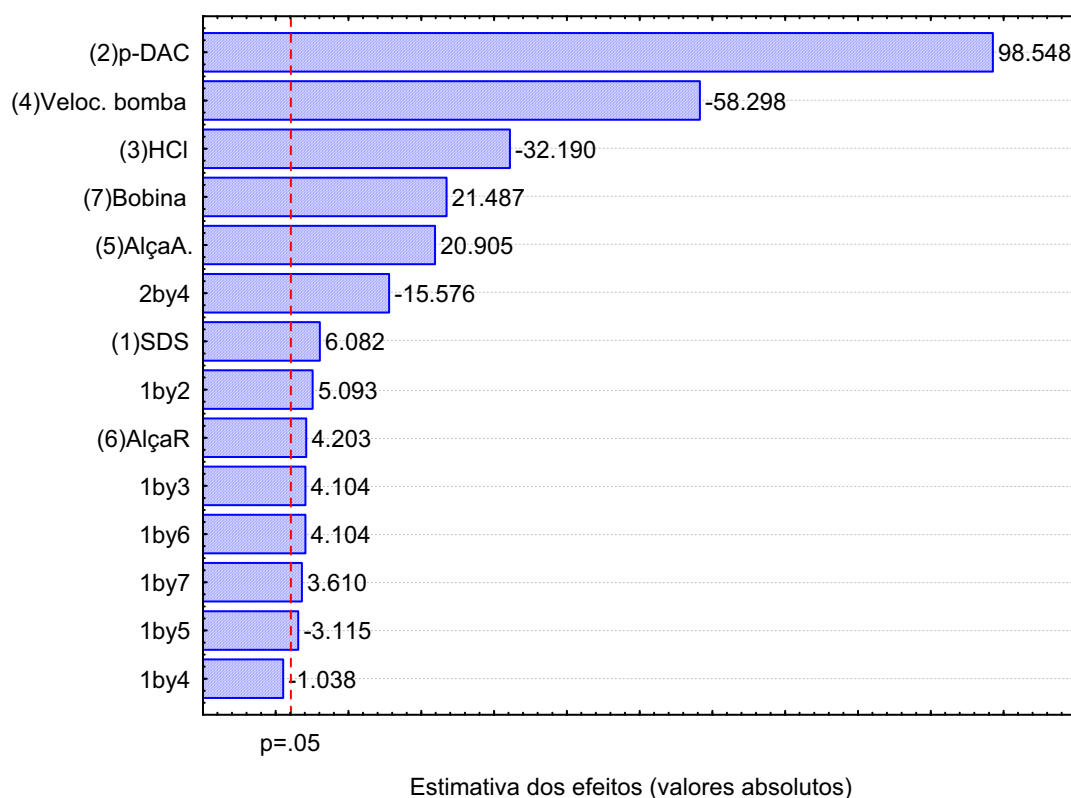


Figura 12 – Gráfico de interação e principais efeitos estimados dos fatores estudados no planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} .

A velocidade de rotação da bomba, que está diretamente relacionada à vazão com que as soluções passam pelo percurso analítico, foi evidentemente um dos parâmetros mais determinantes do sistema. Ao analisar o gráfico de Pareto, nota-se que o aumento da vazão

exerceu uma influência negativa sobre a magnitude do sinal de absorbância, a reação precisaria de mais tempo para que melhores respostas fossem obtidas. Assim, para obtenção de melhores resultados a velocidade da bomba deveria ser diminuída no mínimo para baixo de 15 rpm. Entretanto, em velocidades menores ocorreram indesejadas variações ou perturbações no sinal analítico, provavelmente em decorrência de um gradiente de índice de refração entre a amostra e o reagente (ocasionada pela composição muito distinta entre as soluções). Este gradiente pode ter ocorrido em virtude da ineficiente mistura entre o reagente e a solução padrão em vazões mais baixas e que podem ter provocado oscilações no sinal analítico durante a realização das leituras no detector. A mistura irregular entre reagente e solução carregadora ou a amostra, constitui uma das principais fontes de ruído em sistemas FIA [8]. Para evitar este tipo de problema no procedimento proposto e, por conveniência, para permitir uma frequência analítica relativamente boa, a velocidade da bomba foi fixada no limite mínimo de 15 rpm para realização dos experimentos posteriores.

Tendo fixado a concentração de SDS, a alça de reagente e a velocidade da bomba, foi realizado um planejamento fatorial completo no qual os parâmetros analisados, bem como seus níveis estudados estão disponíveis na Tabela 10.

Tabela 10 – Planejamento fatorial completo 2^4 realizado, com todas as variáveis estudadas e seus respectivos níveis.

Ordem	[p-DAC] (% m/v)	[HCl] (mol L ⁻¹)	Alça A. (cm)	Bobina (cm)	A _{530nm}	
1	0,14	0,08	120	250	0.628	0.627
2	0,08	0,06	120	250	0.476	0.472
3	0,08	0,08	120	250	0.383	0.382
4	0,14	0,06	120	250	0.776	0.760
5	0,08	0,06	100	250	0.435	0.430
6	0,08	0,08	100	250	0.352	0.350
7	0,14	0,06	100	250	0.688	0.695
8	0,14	0,08	100	250	0.568	0.564
9	0,14	0,08	100	280	0.610	0.599
10	0,14	0,06	100	280	0.768	0.765
11	0,08	0,06	100	280	0.453	0.455
12	0,08	0,08	100	280	0.367	0.368
13	0,08	0,08	120	280	0.404	0.396
14	0,14	0,08	120	280	0.644	0.645
15	0,14	0,06	120	280	0.801	0.800
16	0,08	0,06	120	280	0.495	0.499

Obs: a concentração de paracetamol foi fixada em $1,72 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para todos os ensaios.

Como resultado deste planejamento foi obtido um novo Gráfico de Pareto (Figura 13). Os resultados mostrados neste gráfico evidenciaram que os parâmetros que mais afetaram a magnitude do sinal analítico foram as concentrações de p-DAC e HCl. Por outro lado, os tamanhos da alça de amostra e da bobina também foram significantes, porém menos importantes quando comparados com os dois parâmetros anteriores e, assim, foram fixados para a realização dos experimentos posteriores. Por exercerem uma influência positiva sobre o sistema ambos os parâmetros foram fixados em seus níveis mais altos estudados, 120 cm para a alça de amostra e 280 cm para a bobina.

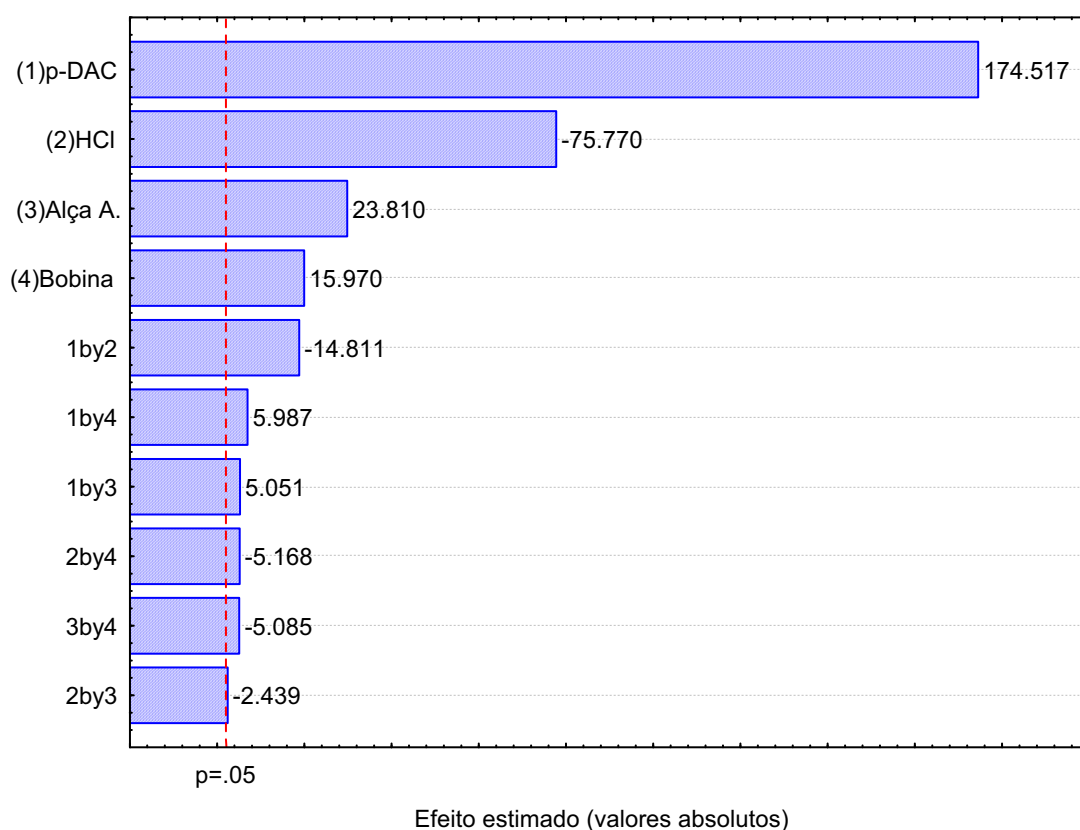


Figura 13 – Gráfico de interação e principais efeitos estimados dos fatores estudados no planejamento fatorial completo 2^4 .

III.3.2. Metodologia de Superfície de Resposta

Para se chegar às condições tidas como ideais (ponto ótimo) para a realização das análises foi adotada a metodologia de superfície de resposta, na qual foram investigados os parâmetros: concentração de p-DAC e concentração de HCl. A matriz experimental com os níveis destas variáveis estudadas e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Matriz experimental adotada na metodologia de superfície de resposta, com as variáveis estudadas e os resultados experimentais obtidos.

Ordem	[p-DAC] (%m/v)	[HCl] (mol L ⁻¹ x 10 ⁻¹)	Variáveis codificadas		A _{530nm}	
			p-DAC	HCl		
1	0,15	0,72	0	0	0,854	0,854
2	0,15	0,88	0	+1,41	0,780	0,782
3	0,15	0,72	0	0	0,850	0,851
4	0,15	0,72	0	0	0,849	0,848
5	0,17	0,60	+1	-1	1,002	1,001
6	0,17	0,83	+1	+1	0,852	0,853
7	0,12	0,72	-1,41	0	0,698	0,700
8	0,18	0,72	+1,41	0	0,868	0,870
9	0,15	0,55	0	-1,41	0,900	0,895
10	0,13	0,60	-1	-1	0,869	0,871
11	0,13	0,83	-1	+1	0,709	0,708
12	0,15	0,72	0	0	0,840	0,840

Obs: concentração de paracetamol $1,72 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Os resultados obtidos a partir desta metodologia foram ajustados a um modelo matemático quadrático descrito pela Equação 4, utilizando o programa Statistica 6.0. A superfície de resposta correspondente a este modelo matemático está ilustrada na Figura 14.

$$z = 0,1033 + 16,0765x - 46,4648x^2 - 0,1419y + 0,0050y^2 + 0,1283xy \quad \text{Eq. 4}$$

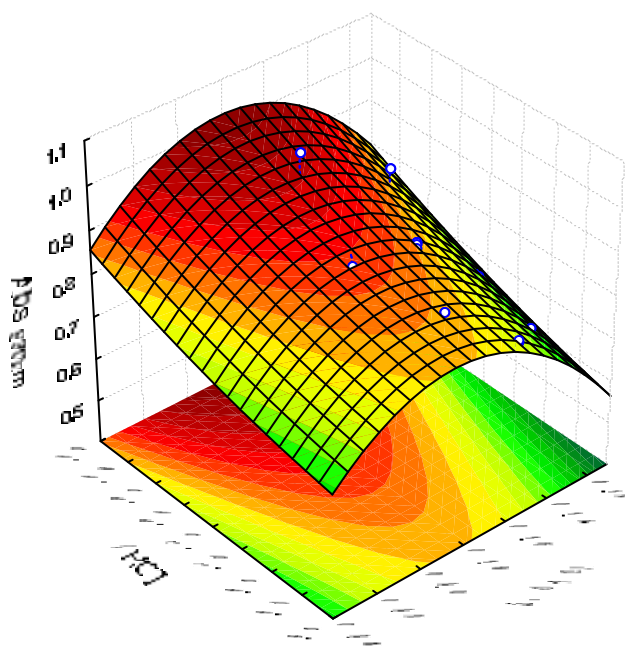


Figura 14 – Superfície de resposta obtida em função das variáveis concentrações de p-DAC (% m/v) e HCl (mol L^{-1}). A concentração final de PCT foi fixada em $1,72 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Podemos notar, pela Figura 14, que a imagem se trata de um plano inclinado obliquamente em relação aos eixos e com sentido ascendente da direita para a esquerda. Assim, para obtenção de melhores resultados, a região experimental deveria ser deslocada para menores valores de concentração de HCl. Mas, neste caso, a concentração já está em seu nível crítico, ou seja, abaixo desta concentração, não ocorre a solubilização do reagente p-DAC. Embora a melhor condição experimental não tenha sido obtida em seu ponto ótimo, há uma tendência em direção aos melhores resultados e, por este motivo, a concentração de HCl foi fixada em $0,06 \text{ mol L}^{-1}$. Já a concentração de p-DAC foi fixada em 0,18% m/v (esta tida como ideal pelo modelo matemático adotado).

III.3.4. Curva analítica

Após a otimização das condições experimentais foi construída a curva analítica (Figura 15), a partir dos valores de absorbância obtidos em 530 nm (Tabela 12) versus a concentração de paracetamol.

Tabela 12 – Valores de absorvância obtidos para a construção da curva analítica para o procedimento em fluxo para determinação de paracetamol.

[PCT] (mol L ⁻¹)	A _{530nm} ± SD ^a
5,37 x 10 ⁻⁶	0,033 ± 0,001
1,07 x 10 ⁻⁵	0,063 ± 0,002
1,61 x 10 ⁻⁵	0,094 ± 0,002
2,15 x 10 ⁻⁵	0,125 ± 0,004
3,22 x 10 ⁻⁵	0,190 ± 0,002
4,30 x 10 ⁻⁵	0,256 ± 0,003
6,45 x 10 ⁻⁵	0,375 ± 0,001
8,60 x 10 ⁻⁵	0,502 ± 0,002
1,07 x 10 ⁻⁴	0,615 ± 0,002
1,29 x 10 ⁻⁴	0,732 ± 0,005

^a Média ± Desvio Padrão de 3 medidas.

Uma relação linear foi observada na faixa de concentração de paracetamol de 5,37 x 10⁻⁶ a 1,29 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ (0,8 – 19,5 µg mL⁻¹). Os valores de absorvância correspondentes a estas concentrações, medidos em 530 nm, foram ajustados pela equação da reta: $A_{530nm} = 0,0035 (\pm 0,002) + 5,743 \times 10^3 (\pm 36) \times C$, onde C é a concentração de paracetamol em mol L⁻¹. O coeficiente de correlação linear foi 0,9998, indicando a excelente linearidade do sistema.

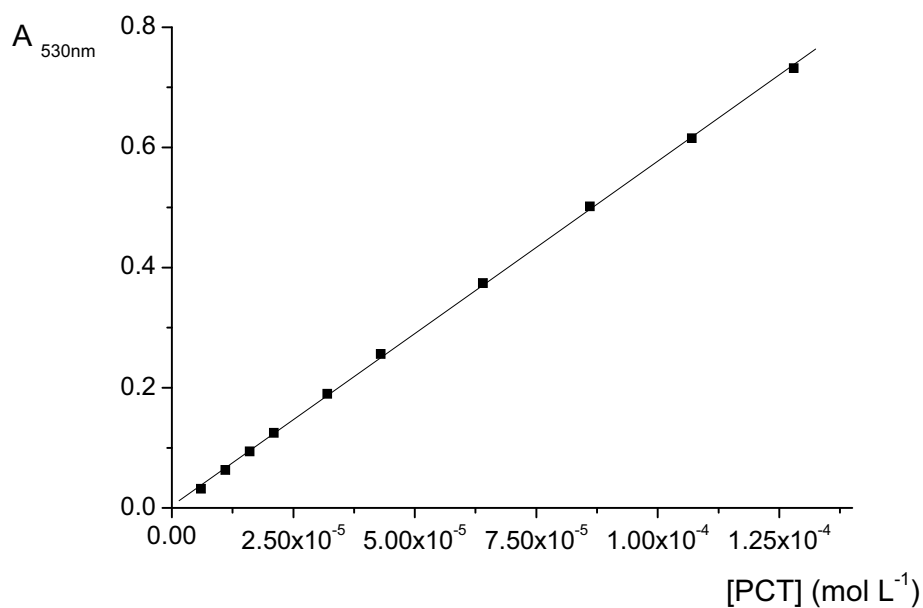


Figura 15 – Curva analítica obtida para o sistema FIA. A concentração de PCT variou entre $5,37 \times 10^{-6}$ a $1,29 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Na Figura 16 estão disponíveis os sinais transientes, relacionados à construção da curva analítica. Esses foram obtidos em triplicata para cada uma das respectivas concentrações de paracetamol.

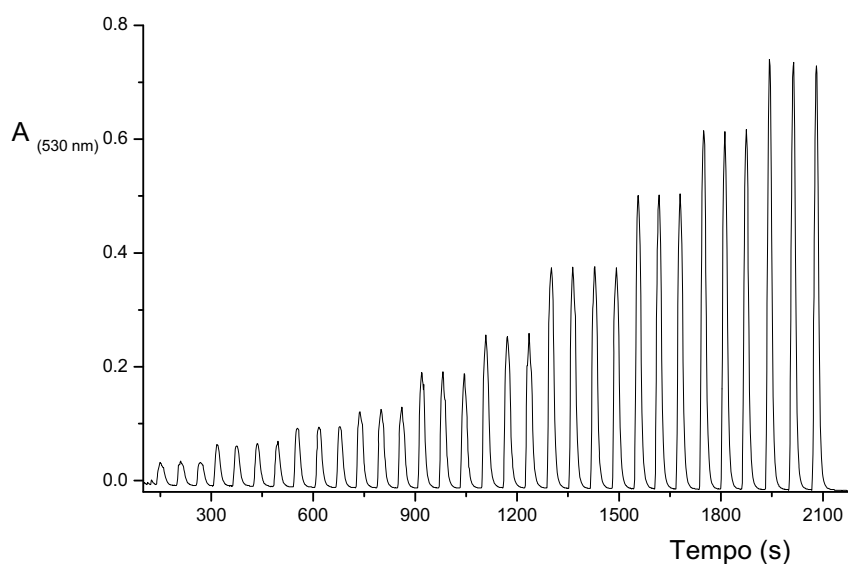


Figura 16 – Gráfico dos sinais transientes obtidos para a curva analítica através da interface com o espectrofotômetro. Cada ponto da curva foi analisado em triplicata (n=3).

III.3.5. Aplicação analítica

O método desenvolvido foi aplicado na quantificação de paracetamol presente em amostras de medicamentos amplamente consumidos no país. Os resultados obtidos pela aplicação da metodologia desenvolvida, assim como os resultados obtidos pelo método comparativo estão disponíveis na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados obtidos da análise de medicamentos pelo método proposto e pelo método oficial.

Amostras	Valor nominal ^a	Método proposto ^b	Método oficial ^b	t (2,78) ^c	F (19,0) ^c
A	500	502,0±3,6	501,0±2,4	0,26	2,2
B	750	749,7±2,5	749,8±2,6	0,05	1,1
C	500	506,3±3,1	507,0±2,5	0,29	1,5
D	500	504,0±3,0	500,3±2,8	1,54	1,1
E	200 [*]	198,7±2,1	202,2±1,6	2,35	1,7
F	200 [*]	199,0±1,7	199,6±1,3	0,66	1,7

^a mg PCT/comprimido ou mg PCT/ml de solução oral ou gotas.

^b Média ± desvio padrão das medidas; n=3.

^c Valores teóricos tabelados para os testes t e F em um nível de confiança de 95%.

III.3.6. Estudo de adição e recuperação

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a possibilidade de ocorrência de efeito da matriz nas análises. Os resultados obtidos estão disponíveis na Tabela 14. Observou-se que, dentre todas as amostras, os valores obtidos estão entre 96,6 – 103,4%, evidenciando a exatidão do método desenvolvido e a inexistência de efeitos da matriz na realização das análises.

Tabela 14 – Resultados do estudo de recuperação realizado para o procedimento FIA desenvolvido. Concentração inicial de paracetamol no medicamento de $3,25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Amostra	Padrão adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
A	---	3,25	
	1,62	4,89	101,2
	3,25	6,39	96,6
	6,50	9,69	99,1
			$\mu^a = 99,0 \pm 2,3$
B	---	3,33	
	1,62	4,95	100,0
	3,25	6,58	103,4
	6,50	9,82	99,8
			$\mu^a = 101,0 \pm 2,0$
C	---	3,25	
	1,62	4,86	99,4
	3,25	6,54	101,2
	6,50	9,72	99,5
			$\mu^a = 100,0 \pm 1,0$
D	---	3,27	
	1,62	4,94	103,1
	3,25	6,55	100,9
	6,50	9,74	99,5
			$\mu^a = 101,2 \pm 1,8$
E	---	3,24	
	1,62	4,83	98,1
	3,25	6,57	102,5
	6,50	9,69	99,2
			$\mu = 99,9 \pm 2,3$
F	---	3,25	
	1,62	4,87	100,0
	3,25	6,55	101,5
	6,50	9,74	99,8
			$\mu^a = 100,4 \pm 0,9$

^a Média $\pm$ desvio padrão.

III.3.7. Validação do método proposto

Alguns dos principais parâmetros estudados na validação do método estão disponíveis na Tabela 15. O procedimento adotado para obtenção destes parâmetros foi o mesmo adotado com relação ao método espectrofotométrico anteriormente desenvolvido.

Tabela 15 – Resultados das figuras de mérito obtidos para o método FIA desenvolvido.

Parâmetros	Resultados
λ (nm)	530
Faixa Linear (mol L ⁻¹)	$5,37 \times 10^{-6}$ a $1,29 \times 10^{-4}$
Limite de detecção (mol L ⁻¹)	$1,0 \times 10^{-6}$
Limite de quantificação (mol L ⁻¹)	$3,5 \times 10^{-6}$
Correlação linear (R)	0,9998
Coefficiente linear (a)	0,0035
Coefficiente angular (b)	5743

III.4. Conclusão

A automatização do procedimento analítico aumentou o limite de detecção do método anteriormente desenvolvido, de $1,7 \times 10^{-7}$ para $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Uma das principais características dos sistemas automatizados é o fato de que a reação não precisa ocorrer por completo para chegar ao detector e, esse pode ter sido o real motivo do aumento no limite de detecção. Com essa versatilidade proporcionada pelo sistema FIA foi possível atingir uma frequência analítica de até 58 análises por hora.

O novo método desenvolvido foi comparado com o método oficial da Farmacopéia Britânica e, de acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o sistema em fluxo desenvolvido, com detecção espectrofotométrica apresentou sensibilidade, precisão e exatidão excelentes para a realização de análises de rotina com a finalidade de quantificar paracetamol em formulações farmacêuticas de diferentes marcas comerciais.

CAPÍTULO IV. CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos realizados neste trabalho evidenciaram a importância da aplicação de ferramentas quimiométricas para estabelecer as condições ideais para realização das análises e a conseqüente melhora na sensibilidade do método proporcionada pela aplicação destas ferramentas.

A estratégia de incorporar parte do procedimento analítico em um sistema de análise por injeção em fluxo apresenta como principais vantagens o ganho em simplicidade (diminui a necessidade de manipulação de amostra e reagente) e a possibilidade de se obter maiores frequências analíticas.

Ambos os métodos, quando comparados com o método oficial proposto pela farmacopéia britânica, apresentaram resultados precisos e exatos, com ausência de efeitos significativos provenientes dos excipientes usualmente encontrados nas formulações farmacêuticas que contêm paracetamol.

Pelo acima exposto, podemos dizer que ambos os métodos propostos são excelentes alternativas para realizar a quantificação de paracetamol em formulações farmacêuticas e podem ser aplicados em análises de rotina, pois são fundamentados em procedimentos simples, rápidos e de baixo custo relativo.

CAPÍTULO V - REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AFKHAMI, A.; SARLAK, N.; ZAREI, A. R. Spectrophotometric determination of salicylamide and paracetamol in biological samples and pharmaceutical formulations by a differential kinetic method. **Acta Chimica Slovenica**, v. 53, p. 357-362, 2006.
- AFSHARI, J. T.; LIU, T. Z. Rapid spectrophotometric method for the quantitation of acetaminophen in serum. **Analytica Chimica Acta**, v. 443, p. 165-169, 2001.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Medicamentos falsificados. **Boletim Informativo**, n. 63, p. 6-8, out. 2006.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Risco de intoxicação com analgésicos e antitérmicos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/farmacovigilancia/informes/2002/informe_2.htm>. Acesso em: 24 maio 2007.
- ALAPONT, A. G.; ZAMORA, L. L.; CALATAYUD, J. M. Indirect determination of paracetamol in pharmaceutical formulations by inhibition of the system luminol-H₂O₂-Fe(CN)₆³⁻ chemiluminescence. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 311-317, 1999.
- ANESTESIOLOGIA. **Consumo de analgésicos preocupa**. Disponível em: <<http://www.anestesiologia.com.br/anestesinfo.php?itm=119>>. Acesso em: 15 maio 2007.
- ANICETO, C.; FATIBELLO FILHO, O. Determinação espectrofotométrica por injeção em fluxo de paracetamol (acetaminofenol) em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 25, n. 3, 387-391, maio/jun. 2002.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Ed. UNICAMP, 1995.
- BLACK, S. S.; BABO, J. M.; STEAR, P. A. Applications of microwave digestion in the pharmaceutical industry. In: KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B. **Introduction to microwave sample preparation: theory and practice**. Washington: ACS Professional Reference Book, 1988. Cap. 5.
- BOUHSAIN, Z.; GARRIGUES, S.; MORALES-RUBIO, A.; GUARDIA, M. Flow injection spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals by means of on-line microwave-assisted hydrolysis and reaction with 8-hydroxyquinoline (8-quinolinol). **Analytica Chimica Acta**, v. 330, p. 59-69, 1996.
- BRITISH pharmacopoeia. London: Stationery Office, 2001. p. 2296.
- BRITISH pharmacopoeia. London: Stationery Office, 2007. p. 1576.
- BURGUERA, M.; BURGUERA, J. L. Microwave-assisted sample decomposition in flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, p. 63-80, 1998.

BURTON, K. I.; EVERETT, J. R.; NEWMAN, M. J.; PULLEN, F. S.; RICHARDS, D. S.; SWANSON, A. G. On-line liquid chromatography coupled with high field NMR and mass spectrometry (LC-NMR-MS): a new technique for drug metabolite structure elucidation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.15, p. 1903-1912, 1997.

CALATAYUD, J. M. **Flow injection analysis of pharmaceuticals**. London: Taylor e Francis, 1996.

CARVALHO, E. R. M. Dengue: equívocos no tratamento podem matar. **Jornal de Araraquara**, Araraquara, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.jornaldeararaquara.com.br/home.pas?codmat=37563&pub=2>>. Acesso em: 20 jun. 2008.

CRIADO, A.; CARDENAS, S.; GALLEGU, M.; VALCÁRCEL, M. Continuous flow spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals following continuous microwave assisted alkaline hydrolysis. **Talanta**, v. 53, p. 417-423, 2000.

DI PIETRA, A. M.; GATTI, R.; ANDRISANO, V.; CAVRINI, V. Application of high-performance liquid chromatography with diode-array detection and on-line post-column photochemical derivatization to the determination of analgesics. **Journal of Chromatography A**, v. 729, p. 355-361, 1996.

DORONIN, S. Y.; CHERNOVA, R. K.; GUSAKOVA, N. N. 4-dimethylaminocinnamaldehyde as a photometric reagent for primary aromatic amines. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 335-344, 2004.

DORONIN, S. Y.; CHERNOVA, R. K.; GUSAKOVA, N. N. Condensation of p-dimethylaminocinnamaldehyde with aniline and substituted anilines in micellar media. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 75, n. 2, p. 261-267, 2005.

EASWARAMOORTHY, D.; YU, Y. C.; HUANG, H. J. Chemiluminescence detection of paracetamol by a luminol-permanganate based reaction. **Analytica Chimica Acta**, v. 439, p. 95-100, 2001.

ESTEVE-ROMERO, J. S.; SIMÓ-AFONSO, E. F.; GARCIA-ALVAREZ-COQUE, M. C. RAMIS-RAMOS, G. Micellar enhanced spectrophotometric determination of organic species. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 14, p. 30-37, 1995.

FANG, Y.; LONG, D.; YE, J. Study of acetaminophen by parallel incident spectroelectrochemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 342, p. 13-21, 1996.

FELIX, F. S.; BRETT, C. M. A.; ANGLES, L. Carbon film resistor electrode for amperometric determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1622-1627, 2007.

FILIK, H.; HAYVALI, M.; KILIC, E. Sequential spectrophotometric determination of paracetamol p-aminophenol with 2,2-(1,4-phenylenedivinylene)bis-8-hydroxyquinoline as a novel coupling reagent after microwave assisted hydrolysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 535, p. 177-182, 2005.

FILIK, H.; SENER, I.; CEKIC, S. D.; KILIC, E.; APAK, R. Spectrophotometric determination of paracetamol in urine with Tetrahydroxycalix[4]arene as a coupling reagent and preconcentration with Triton X-114 using Cloud Point Extraction. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 6, p. 891-896, 2006.

FRANETA, J. T.; AGBABA, D.; ERIC, S.; PAVKOV, S.; ALEKSIC, M.; VLADIMIROV, S. HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. **Farmaco**, v. 57, n.9, p. 709-713, 2002.

GASCO-LOPEZ, A. I.; IZQUIERDO-HORNILLOS, R.; JIMINEZ, A. Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of cold relief ingredients in chewing gum. **Journal of Chromatography A**, v. 775, p. 179-185, 1997.

GOYAL, R. N.; SINGH, S. P. Voltammetric determination of paracetamol at C₆₀-modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 3008-3012, 2006.

JENSEN, L. S.; VALENTINE, J.; MILNE, R. W.; EVANS, A. M. The quantification of paracetamol, paracetamol glucuronide and paracetamol sulphate in plasma and urine using a single high performance liquid chromatography assay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 3, p. 585-593, 2004.

KARTAL, M. LC method for the analysis of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 857-864, 2001.

KATZUNG, G. K. **Farmacologia básica e clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986. p. 27, 465-466.

KNOCHEN, M.; GIGLIO, J.; REIS, B. F. Flow-injection spectrophotometric determination of paracetamol in tablets and oral solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 191-197, 2003.

KUNKEL, A.; GÜNTHER, S.; WÄTZIG, H. Quantitation of acetaminophen and salicylic acid in plasma using capillary electrophoresis without sample pretreatment Improvement of precision. **Journal of Chromatography A**, v. 768, p. 125-133, 1997.

LAVORANTE, A. F.; PIRES, C. K.; REIS, B. F. Multicommuted flow system employing pinch solenoid valves and micro-pumps spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p. 423-429, 2006.

LIU, X.; LIU, L.; CHEN, H.; CHEN, X. Separation and determination of four active components in medicinal preparations by flow injection-capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1700-1705, 2007.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712A-724A, 1983.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MOHAMED, F. A.; MOHAMED, A. A.; SHAMMAT, S. M. Selective spectrophotometric determination of p-aminophenol and acetaminophen. **Talanta**, v. 44, p. 61-68, 1997.

MOREIRA, A. B.; OLIVEIRA, H. P. M.; ATVARIS, T. D. Z.; DIAS, I. L. T.; GOMES NETO, O.; ZAGATTO, E. A. G.; KUBOTA, L. T. Direct determination of paracetamol in powdered pharmaceutical samples by fluorescence spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, p. 257-261, 2005.

NAGARAJA, P.; MURTHY, K. C. S.; RANGAPPA, K. S. Spectrophotometric method for the determination of paracetamol and phenacetin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 501-506, 1998.

NI, Y.; LIU, C.; KOKOT, S. Simultaneous kinetic spectrophotometric determination of acetaminophen and Phenobarbital by artificial neural networks and partial least squares. **Analytica Chimica Acta**, v. 419, p. 185-196, 2000.

O'NEIL, M. J. (Ed.). **The Merck index**: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13 th ed. Whitehouse Station: Merck & CO, 2001.

PAROJCIC, J.; KARLJIKOVIC-RAJIC, K.; DURIC, Z.; JONANOVIC, M.; IBRIC, S. Development of the second-order derivative UV spectrophotometric method for direct determination of paracetamol in urine intended for biopharmaceutical characterization of drugs products. **Biopharmaceuticals and Drug Disposition**, v. 24, n. 7, p. 309-314, 2003.

PATEL, H. V.; MORTON, D. J. Specificity of a colorimetric paracetamol assay technique for use in cases of overdose. **Journal of Clinical and Pharmaceutical Therapy**, v. 13, p. 233-238, 1988.

PULGARIN, J. A. M.; BERMEJO, L. F. G. Flow-injection stopped flow spectrofluorimetric kinetic determination of paracetamol based on its oxidation reaction by hexacyanoferrate (III). **Analytica Chimica Acta**, v. 333, p. 59-69, 1996.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 195.

REIS, B. F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 19, n. 1, p. 51-58, 1996.

REIS, B. F.; MARTELLI, P. B.; MENEGÁRIO, A. A.; GINÉ, M. F. Sistema de análise química por injeção em fluxo controlado por microcomputador para diluição automática em espectrometria de absorção atômica. **Química Nova**, v. 16, p. 109-112, 1993.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

RUENGSIAGOON, W.; LIAWRUANGRATH, S.; TOWNSHEND, A. Flow injection chemiluminescence determination of paracetamol. **Talanta**, v. 69, p. 976-983, 2006.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. **Flow injection analysis**. 2nd ed. New York: Wiley-Interscience, 1988.

SILVA, M. L. S.; GARCIA, M. B. Q.; LIMA, J. L. F. C.; BARRADO, E. Modified tubular electrode in a multi-commutated flow system determination of acetaminophen in blood serum and pharmaceutical formulations. **Analytica Chimica Acta**, v. 573-574, p. 383-390, 2006.

SILVA, P. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 395-397.

SHOCKCOR, J. P.; UNGER, S. E.; WILSON, I. D.; FOXALL, P. J. D.; NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Combined HPLC, NMR spectroscopy, and Ion-Trap Mass-Spectrometry with application to the detection and characterization of xenobiotic and endogenous metabolites in human urine. **Analytical Chemistry**, v. 68, 4431-4435, 1996.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p. 301.

SUARES, W. T.; VIEIRA, H. J.; FATIBELLO FILHO, O. Determination of paracetamol in pharmaceutical products using a flow injection analysis system with generation of nitrous acid. **Eclética Química**, v. 30, n. 1, p. 21-28, jan./mar. 2005.

THOMAS, M. J. K. **Ultraviolet and visible spectroscopy**. 2nd ed. London: John Wiley & Sons, 1996. Cap. 5.

THE UNITED States pharmacopoeia. 29 th ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2006.

VAN STADEN, J. F.; TSANWANI, M. Determination of paracetamol in pharmaceutical formulations using a sequential injection system. **Talanta**, v. 58, n. 6, p. 1095-1101, 2002.

VILCHEZ, J. L.; BLANC, R.; AVIDAD, R.; NAVALON, A. Spectrofluorimetric determination of paracetamol in pharmaceuticals and biological-fluids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13, n. 9, p. 1119-1125, 1995.

VOGEL, A. I. **Análise inorgânica quantitativa**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1981.

WELCH, R. M.; CONNEY, A. H. A simple method for the quantitative determination of N-acetyl-p-aminophenol (APAP) in urine. **Clinical Chemistry**, v. 11, n. 12, p. 1064-1067, 1965.

XU, C.; LI, B. Spectrophotometric determination of paracetamol with microwave assisted alkaline hydrolysis. **Spectrochimica Acta, Part A**, v. 60, p. 1861-1864, 2004.

YATSIMIRSKY, A. K.; YATSIMIRSKAYA, N. T.; KASHINAT, S. B. Micellar catalysis and product stabilization in hydrazone formation reaction and micellar-modified determination of hydrazine and phenylhydrazine. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 2232-2239, 1994.

ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. Classification and definition of analytical methods based on flowing media. **Química Nova**, v. 22, p. 143-146, 1999.

ZHANG, L.; HU, Q.; CHEN, G.; FANG, Y. Simultaneous determination of active ingredients in composite pseudoephedrine hydrochloride tablets by capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 424, p. 257-262, 2000.