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

Desenvolvimento de métodos analíticos ambientalmente mais amigáveis para a quantificação de bumetanida em medicamentos e urina

FERNANDA POLLO

Dissertação de Mestrado
2007

FERNANDA POLLO

Desenvolvimento de métodos analíticos ambientalmente mais amigáveis para a quantificação de bumetanida em medicamentos e urina

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-orientador: Profª. Drª. Helena Redigolo Pezza

Araraquara
2007

DADOS CURRICULARES

Fernanda Pollo

1. Dados pessoais

1.1 Nascimento: 27/04/1982
1.2 Nacionalidade: Brasileira
1.3 Naturalidade: Santo André
1.4 Estado Civil: Solteira
1.5 Filiação – Pai: Marco Pollo
Mãe: Maria da Penha Amorim Pollo
1.6 Profissão: Química
1.7 Documento de Identidade: 30.403.018-1
1.8 Cadastro de Pessoa Física: 308.904.788-80
1.9 Endereço: Rua das Cerejeiras, 140, Bairro Jardim, CEP 09090-070, Santo André, SP.
1.10 Endereço Profissional: Rua Professor Francisco Degni, s/nº, Quitandinha, Instituto de Química de Araraquara – UNESP, Departamento de Química Analítica, CEP 14800-900, Araraquara, SP.

2. Formação Acadêmica

2.1 Bacharel em Química: Curso de bacharelado em Química, concluído em 15/01/2005, Universidade Estadual Paulista – UNESP.
2.2 Mestrado em Química: Curso de pós-graduação em Química, concluído em 03/2007, no Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

3. Participações em eventos

3.1 Congresso de Iniciação Científica da UNESP – CIC, trabalho intitulado: Determinação de Cu em álcool etílico hidratado combustível utilizando o sistema TS-FF-AAS. Ilha Solteira – SP. 2004.
3.2 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – trabalho intitulado: Determinação de bumetanida em medicamentos utilizando espectroscopia de reflectância difusa. Águas de Lindóia – SP. 2006.
3.3 I WORKSHOP ´´Pós-Graduação em Química: Formação de Recursos Humanos e Transferência de Tecnologia``.Pós-Graduação em Química: Formação de Recursos Humanos e Transferência de Tecnologia. Araraquara – SP. 2006.

Dedicatória

Aos meus pais, Penha e Marco
essenciais em minha vida,
por todo o esforço a mim dedicado
durante esses anos todos.

Ao meu namorado, Diego, pelo
carinho, atenção e paciência.

Agradeço...

À Deus, por ter saúde e oportunidades,

Aos meus pais, por tudo, não tenho palavras para expressar... Amo vocês, vocês são tudo pra mim!

Ao Prof. Dr. Leonardo Pezza, pela orientação e amizade,

À Profª.Drª. Helena Redigolo Pezza pela co-orientação e ajuda neste trabalho, e também pela amizade,

Aos meus amigos de laboratório: Liliane, Fabrícia, Mara, Sahra, Keithy, Sandra, Zé Rufino, Fritz, Thiago (Tanabi), Marcão, Joel (Quarta-feira) e em especial à Patrícia, grande amiga, praticamente uma co-orientadora! Todos vocês me proporcionaram grandes momentos de alegria... Adoro vocês, do fundo do meu coração!

Ao Dieguinho, pelo amor, amizade e companheirismo durante esses anos... Ah, e por revisar meu abstract!

Às minhas companheiras de república nesta fase da minha vida: Fantinha, Ana Lia, Katiana, Fabi, Aline e Laninha... Mais que amigas vocês são as irmãs que eu não tive.

Ao Mont amigo muito especial, sempre com muita paciência e sábios conselhos!

Aos meus outros amigos do Instituto de Química: Naíse e Flávio (Fera).

Aos amigos do Grupo LATIG: Prof. Massao, Claudião, Adriano, Emanuel, Gilbert e Elias, pelas brincadeiras, conversas e piadinhas no laboratório!

A todos os funcionários do Instituto de Química, depois de seis anos juntos...

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

A TODOS, MUITO OBRIGADO!

Existem apenas duas maneiras de ver a vida.

Uma é pensar que não existem milagres e

a outra é pensar que tudo é um milagre.

(Albert Einstein)

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos três métodos ambientalmente amigáveis para quantificar bumetanida. O primeiro método desenvolvido foi o de espectroscopia de reflectância difusa utilizando *spot test*. O método é baseado na reação entre bumetanida e o reagente cromogênico *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC - 3,4 x 10^{-2} mol L^{-1}) em meio ácido (HCl - 2,1 x 10^{-1} mol L^{-1}) sobre a superfície de um papel de filtro, produzindo um complexo colorido ($\lambda_{máx}$ = 525 nm) estável. Para a reação apenas 20 μL de cada solução foi utilizada, sendo um procedimento limpo, pois gera pouco resíduo ao meio ambiente. A faixa de trabalho estudada variou entre 1,37 x 10^{-4} a 1,37 x 10^{-3} mol L^{-1} (50-500 ppm). Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) calculados foram 3,98 x 10^{-5} e 1,33 x 10^{-4} mol L^{-1} respectivamente. O segundo método foi o de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica utilizando o sistema de adição de reagente por confluência. O método também se baseia na reação entre bumetanida e *p*-DAC supracitada, com o diferencial de usar de meio micelar (Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)), o que acarretou um aumento na sensibilidade de cerca de 4,75 vezes. O reagente (*p*-DAC 5,6 x 10^{-3} mol L^{-1} preparado em HCl 6,2 x 10^{-2} mol L^{-1}) é adicionado no percurso analítico através de uma confluência, onde reage com 918 μL de solução contendo o analito em uma bobina reacionária de 163 cm . Ambas as soluções foram transportadas por uma solução de SDS 8,0 x 10^{-3} mol L^{-1}. A faixa de trabalho foi de 1,37 x 10^{-6} a 2,77 x 10^{-5} mol L^{-1} (0,5-10 ppm). Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) calculados foram 3,07 x 10^{-7} e 1,03 x 10^{-6} mol L^{-1} respectivamente. A freqüência analítica obtida foi de 69 análises por hora. O terceiro e último método desenvolvido foi o de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica empregando um injetor comutador. Neste caso o reagente não é mais adicionado continuamente, tendo um volume fixo na reação. Neste sistema, 460 μL de solução contendo o analito reage com 402 μL de solução de reagente (*p*-DAC 7,0 x 10^{-3} mol L^{-1} em HCl 8,4 x 10^{-2} mol L^{-1}), transportadas por uma solução carregadora de SDS 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1}. A faixa de trabalho estudada foi de 1,37 x 10^{-6} a 2,77 x 10^{-5} mol L^{-1} (0,5-10 ppm). Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) calculados foram 1,09 x 10^{-7} e 3,65 x 10^{-7} mol L^{-1}, com uma freqüência analítica de 72 análises por

hora. Em todos os métodos desenvolvidos o planejamento de experimentos foi aplicado, visando uma economia de tempo e reagentes e a obtenção das melhores condições experimentais para cada parâmetro analisado. Foram feitas as análises de cinco amostras comerciais em todos eles e seus resultados comparados com o método oficial descrito na Farmacopéia Americana através dos testes estatísticos t e F. Nos métodos de análise por injeção em fluxo também foi realizada a análise de amostras fortificadas de urina, após extração em fase sólida utilizando cartucho de C_{18}.

Palavras-chave: bumetanida, espectroscopia de reflectância difusa, análise por injeção em fluxo.

ABSTRACT

In this work were developed three environmentally friendly analytical methods for quantification of bumetanide. The first method developed was diffuse reflectance spectroscopy using spot test analysis. The method is based on the reaction between bumetanide and colored reagent *p*-dimethylaminocinnamaldeyde (*p*-DAC – 3.4 x 10^{-2} mol L^{-1}) in acid medium (HCl – 2.1 x 10^{-1} mol L^{-1}) on the surface of filter paper, yielding a stable colored product (λ = 525 nm). For the reaction only 20 μL of reagent was applied, it's a clear procedure, yielding a little quantity of residues. The linear range was 1.37 x 10^{-4} to 1.37 x 10^{-3} mol L^{-1} (50 - 500 μg mL^{-1}). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) estimated were 3.98 x 10^{-5} and 1.33 x 10^{-4} mol L^{-1} respectively. The second method was flow injection analysis using spectrophotometric determination using the system with continuous reagent addition. The method is based on the reaction between bumetanide and *p*-DAC above mentionated, but using a micellar medium (Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)), allowing up to 4.75 fold increase in sensitivity. The reagent (*p*-DAC 5.6 x 10^{-3} mol L^{-1} in HCl 6.2 x 10^{-2} mol L^{-1}) is added on the analytical course using a confluence, where it reacts with 918 μL of sample solution in reaction coil of 163 cm. The solutions were carried by a SDS solution 8.0 x 10^{-3} mol L^{-1} The linear range was 1.37 x 10^{-6} to 2.77 x 10^{-5} mol L^{-1} (0.5 -10 μg mL^{-1}). The limits of detection LOD) and quantification (LOQ) estimated were 3.07 x 10^{-7} e 1.03 x 10^{-6} mol L^{-1} respectively. The average sample rate of 69 determinations per hour. The last method developed was flow injection analysis exploiting merging zones. In this case the reagent isn't added continously it has fixed volume on the reaction. In this system, 460 μL of sample solution reacts with 402 μL of reagent solution (*p*-DAC 7.0 x 10^{-4} mol L^{-1} in HCl 8.4 x 10^{-2} mol L^{-1}) carried by a SDS solution 1.0 x 10^{-2} mol L^{-1}. The linear range was 1.37 x 10^{-6} to 2.77 x 10^{-5} mol L^{-1} (0.5 - 10 μg L^{-1}). The limits of detection LOD) and quantification (LOQ) estimated were 1.09 x 10^{-7} and 3.65 x 10^{-7} mol L^{-1} respectively. The average sample rate of 72 determinations per hour. In all methods developed the experimental design was applied to save time and reagent and to obtain the best conditions for each parameter studied. Five commercial brands were analyzed with all developed methods and the results obtained compared with those the official method in

United States Pharmacopeia applying the statistical tests t and F. In the methods of flow system spiked samples of urine were analyzed too, after its solid-phase extraction with C_{18} column.

Keywords: bumetanide, diffuse reflectance spectroscopy, flow injection analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química da bumetanida 24

Figura 2. Distribuição dos trabalhos para determinação de bumetanida de acordo com a década. 25

Figura 3. Número de publicações de acordo com a técnica analítica empregada. 26

Figura 4. Espectros de reflectância obtidos a partir do produto da reação de *spot test* entre bumetanida e *p*-dimetilaminocinameldeído, em meio ácido. As análises foram realizadas utilizando um acessório de reflectância Labsphere, modelo DRA-CA-3300. Concentração de butemanida = 1,37 x 10^{-3} mol L^{-1}. **Figura 4a.** Espectro de reflectância obtido a partir dos valores de %R. **Figura 4b**. Espectro de reflectância obtido a partir dos valores de $\log(1/R)$. **Figura 4c**. Espectro de reflectância obtido a partir dos valores de $f(R)$. 38

Figura 5. Distribuição das publicações encontradas envolvendo o uso da espectroscopia de reflectância difusa com medidas na região visível do espectro, de acordo com a década. 39

Figura 6. Distribuição das publicações encontradas envolvendo o uso de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica, de acordo com a década. 42

Figura 7. Suporte utilizado na realização dos *spot tests* (Baseado em: TUBINO et al). 49

Figura 8. Foto do sistema de análise modular ASIA, Ismatec (Zurique, Suíça). Módulo 1: Bomba peristática de rotação variável; Módulo 2: Bomba peristáltica de rotação fixa; Módulo 3: Válvula de 6 caminhos, Rheodyne 5011; Módulo 4: Válvula de injeção Rheodyne 5041. 50

Figura 9. Foto do injetor comutador utilizado para injeção de reagente e amostra. 51

Figura 10. Espectro de reflectância da reação de spot test no papel de fi entre *p*-DAC, ácido clorídrico e bumetanida. O valor máximo de A_R foi obtido 525 nm. Concentração de bumetanida = 1,37 x 10^{-3} mol L^{-1}. 62

Esquema 1. Mecanismo sugerido para a reação entre bumetanida e *p*-DAC em meio ácido. 64

Figura 11. Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas. 67

Figura 12. Superfície de resposta otimizada com sua respectiva curva de níve para a medida de reflectância em 525 nm em função das variáveis:concentração de *p*-DAC (mol L^{-1}) e concentração de ácido clorídrico (mol L^{-1}).
Foi feita a adição de 20µL de bumetanida = 2,74 x 10^{-3} mol L^{-1}. 70

Figura 13. Estudo da estabilidade óptica do produto formado entre *p*-DAC e bumetanida em meio ácido. Condições: 20µL de *p*-DAC 3,4 x 10^{-2} mol L^{-1}; 20µL de ácido clorídrico 2,1 x 10^{-1} mol L^{-1} e 20µL de solução de bumetanida = 2,74 x 10^{-3} mol L^{-1}. 73

Figura 14. Curva analítica com sua respectiva regressão linear obtida após o tratamento matemático dos resultados apresentados na Tabela 2. 76

Figura 15. Estudo da estabilidade e comparação do uso de SDS. a: sem adição de SDS, b: com adição de SDS. 83

Figura 16. Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas. 86

Figura 17. Superfície de resposta otimizada com sua respectiva curva de nível para medida de absorbância em 520 nm em função das variáveis: volume da alça de amostragem (µL) e tamanho da bobina reacionária (cm). Concentração de bumetanida utilizada = 1,37 x 10^{-5} mol L^{-1}. 88

Figura 18. Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas. 91

Figura 19. Superfície de resposta otimizada com sua respectiva curva de nível para a medida de absorbância em 520 nm em função das variáveis:concentração de HCl e concentração de SDS(mol L^{-1}). Concentração de bumetanida utilizada =1,37 x 10^{-5} mol L^{-1}. 93

Figura 20. Diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo para determinação espectrofotométrica de bumetanida. **T** solução transportadora (SDS 8,0 x 10^{-3} mol L^{-1}) com vazão de 2,88 mL min^{-1}; **A** soluções padrão ou amostra (alça de amostragem 918 µL); **R** solução reagente de *p*-DAC 5,6 x 10^{-3} mol L^{-1} preparada em HCl 6,2 x 10^{-2} mol L^{-1} com vazão de 1,28 mL min^{-1}; **x** ponto de confluência; **B** bobina reacional (163 cm); **E** espectrofotômetro (520 nm); **D** descarte. 95

Figura 21. Sinais transientes para a reação entre *p*-DAC 5,6 x 10^{-3} mol L^{-1}, ácido clorídrico 6,2 x 10^{-2} mol L^{-1} e bumetanida na concentração de 1,37 x 10^{-6} a 2,74 x 10^{-5} mol L^{-1}. Solução carregadora de SDS 8,0 x10^{-3} mol L^{-1}. 96

Figura 22. Curva analítica obtida após o tratamento matemático dos resultados apresentados na Tabela 14. 98

Figura 23 Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas. 109

Figura 24. Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas. 112

Figura 25. Superfície de resposta otimizada com sua respectiva curva de nível para a medida de absorbância em 520 nm em função das variáveis: concentração de *p*-DAC (mol L^{-1}) e volume da alça da amostragem (μL). Concentração de bumetanida utilizada = 2,74x 10^{-5} mol L^{-1}. 114

Figura 26. Diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo para determinação espectrofotométrica de bumetanida. **C** solução carregadora (SDS 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1}) com vazão de 1,9 mL min^{-1}; **A** soluções padrão ou amostra (alça de amostragem 460 μL), com vazão de 0,8 mL min^{-1} ; **R** solução reagente de *p*-DAC 7,0 x 10^{-3} mol L^{-1} preparada em HCl 8,4 x 10^{-2} mol L^{-1} com vazão de 0,8 mL min^{-1}; **x** ponto de confluência; **B** bobina reacional (120 cm); **E** espectrofotômetro (520 nm); **D** descarte. 116

Figura 27. Sinais transientes para a reação entre *p*-DAC 7,0 x 10^{-3} mol L^{-1}, ácido clorídrico 8,4 x 10^{-2} mol L^{-1} e bumetanida na concentração de 1,37 x10^{-6} a 2,74 x 10^{-5} mol L^{-1}. Solução carregadora de SDS 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1}. 117

Figura 28. Curva analítica obtida após o tratamento matemático dos resultados apresentados na Tabela 25. 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos medicamentos analisados quantitativamente pelos métodos propostos neste trabalho. 53

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial completo para triagem das variáveis com os respectivos valores de A_R. Concentração de bumetanida = 2,74 x 10^{-3} mol L^{-1}. 66

Tabela 3. Matriz do planejamento composto central e os respectivos valores de A_R Concentração de bumetanida = 2,74 x 10^{-3} mol L^{-1}. 68

Tabela 4. Valores de reflectância para a reação entre *p*-DAC (3,4 x 10^{-2} mol L^{-1}), HCl (2,1 x 10^{-1} mol L^{-1}) e bumetanida (2,74 x 10^{-3} mol L^{-1}). 72

Tabela 5. Valores de reflectância obtidos na construção da curva analítica para determinação de bumetanida através da reação com *p*-DAC (3,4 x 10^{-2} mol L^{-1}) e HCl (2,1 x 10^{-1} mol L^{-1}) em suporte sólido (papel de filtro). 75

Tabela 6. Resumo e características do método desenvolvido. 77

Tabela 7. Determinação de bumetanida em formulações farmacêuticas comerciais. 79

Tabela 8. Resultados de recuperação de bumetanida adicionada nas formulações farmacêuticas. 80

Tabela 9. Verificação do efeito da presença de SDS sobre a reação colorimétrica proposta. 82

Tabela 10. Matriz do planejamento fatorial completo para triagem das variáveis com os respectivos valores de A. Concentração de bumetanida = 1,37 x 10^{-5} mol L^{-1}. 85

Tabela 11. Matriz experimental do planejamento composto central. Concentração de bumetanida = 1,37 x 10^{-5} mol L^{-1}. 87

Tabela 12. Matriz do planejamento fatorial completo para triagem das variáveis com os respectivos valores de A. Concentração de bumetanida = 2,74 x 10^{-5} mol L^{-1}. 90

Tabela 13. Matriz experimental do planejamento composto central. Concentração de bumetanida = 1,37 x 10^{-5} mol L^{-1}. 92

Tabela 14. Valores de absorbância obtidos na construção da curva analítica para determinação de bumetanida através da reação com *p*-DAC 5,6 x 10^{-3} mol L^{-1} em meio de HCl 6,2 x 10^{-2} mol L^{-1} tendo SDS 8,0 x 10^{-3} mol L^{-1} como solução carregadora. 97

Tabela 15. Resumo e características do método desenvolvido. 99

Tabela 16. Determinação de bumetanida em amostras comerciais. 101

Tabela 17. Resultados de recuperação de bumetanida adicionada nas formulações farmacêuticas. 102

Tabela 18. Resultados de adição e recuperação na amostra de urina. 104

Tabela 19. Resultados de adição e recuperação na amostra de urina. 105

Tabela 20. Variáveis estudadas e seus respectivos níveis. 107

Tabela 21. Matriz do planejamento fracionário para triagem das variáveis com os respectivos valores de A. Concentração de bumetanida = 2,74 x 10^{-5} mol L^{-1}. 108

Tabela 22. Variáveis estudadas e seus respectivos níveis. 110

Tabela 23. Matriz do planejamento fatorial completo para triagem das variáveis com os respectivos valores de A. 112

Tabela 24. Matriz experimental do planejamento composto central. Em todos os ensaios foi concentração de bumetanida foi 2,74 x 10^{-5} mol L^{-1}. 113

Tabela 25. Valores de absorbância obtidos na construção da curva analítica para determinação de bumetanida através da reação com *p*-DAC 7,0 x 10^{-3} mol L^{-1} em meio de HCl 8,4 x 10^{-2} mol L^{-1} tendo SDS 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} como solução carregadora. 118

Tabela 26. Resumo e características do método desenvolvido. 120

Tabela 27. Determinação de bumetanida em formulações farmacêuticas comerciais. 122

Tabela 28. Resultados de recuperação de bumetanida adicionada nas formulações farmacêuticas. 123

Tabela 29. Resultados de adição e recuperação na amostra de urina. 124

Tabela 30. Métodos para determinação de bumetanida em amostras de urina. 125

Tabela 31. Limites de detecção obtidos neste trabalho. 125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CG Cromatografia Gasosa

C_{18} Octadecilsilano

FIA análise por injeção em fluxo

p-DAC *p*-dimetilaminocinamaldeído

ppb partes por bilhão

ppm partes por milhão

SDS Dodecil Sulfato de Sódio

LDR light detector resistor

LOD limite de detecção

LOQ limite de quantificação

UV Ultravioleta

Vis Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

nm nanometros

mV milivolts

A absorbância

A_R densidade óptica para medida de reflectância

b caminho óptico

C concentração

I intensidade da radiação refletida

I_0 intensidade da radiação incidente

r coeficiente de correlação linear

R reflectância ou poder de reflexão

s coeficiente de dispersão

ε absortividade molar

k coeficiente de absorção molar

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

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO 22
I.1 Diuréticos 22
I.2 Bumetanida 23
I.3 Revisão Bibliográfica 24
I.3.1 Métodos analíticos para determinação de bumetanida 24
I.3.1.1 Métodos de separação 26
I.3.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência 26
I.3.1.3 Cromatografia Gasosa 28
I.3.1.4 Eletroforese Capilar 29
I.3.1.5 Métodos Eletroquímicos 30
I.3.1.6 Métodos Espectrofotométricos 31
I.3.1.7 Outros Métodos 31
I.4 Spot tests 33
I.5 Espectroscopia de Reflectância Difusa 35
I.5.1 Aplicações da espectroscopia de reflectância difusa empregando *spot test* em análises quantitativas 39
I.6 Análise Química por Injeção em Fluxo 41
I.6.1 Configurações dos sistemas 43
I.6.1.1 Sistema em linha única 43
I.6.1.2 Sistema em confluência 44
I.6.1.3 Sistema com Zonas Coalescentes 44
I.6.2 Análise por Injeção em Fluxo com detecção Espectrofotométrica 45
I.7 Objetivos do presente trabalho 47
II. PARTE EXPERIMENTAL 48
II.1. Materiais e equipamentos 48
II.1.1. Instrumentação básica 48
II.1.3 Medidas utilizando análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica 49
II.1.3.1 Sistema em confluência 49
II.1.3.2 Sistema com zonas coalescentes 51
II.1.4 Medidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) – Método de referência[50] 52
II.2 Reagentes e soluções 52
II.3 Determinação de bumetanida utilizando espectroscopia de reflectância difusa 53
II.3.1 Preparo das soluções utilizadas 53
II.3.2 Procedimento para preparo das amostras 54
II.3.2.1 Comprimidos 54
II.3.2.2 Cápsulas 55
II.4 Análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica 55
II.4.1 Preparo das soluções utilizadas 55
II.4.1.1 Sistema em confluência 56

II.4.1.2 Sistema com zonas coalescentes 56
II.4.2 Procedimento para preparo das amostras 57
II.4.2.1 Comprimidos 57
II.4.2.2 Cápsulas 58
II.4.3 Procedimento para análise de bumetanida em urina 58
II.4.3.1 Procedimento empregando extração líquido-líquido[53] 59
II.4.3.2 Procedimento empregando extração em fase sólida[54] 59
II.5 Análise das amostras de medicamentos pelo método de referência[50] 60
II.5.1 Soluções utilizadas 60
II.5.1.1 Preparo da fase móvel 60
II.5.1.2 Solução estoque de bumetanida 61
II.5.1.3 Preparo das amostras 61
III. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO. 62
III.1 Espectroscopia de reflectância difusa 62
III.1.1 Estudo e otimização das condições experimentais 62
III.1.2 Otimização dos fatores envolvidos na reação de spot test 65
III.1.2.1 Triagem das variáveis 65
III.1.2.2 Metodologia de superfície de resposta 67
III.1.2 Estudo da estabilidade óptica da reação 71
III.1.3 Construção da curva analítica 73
III.1.4 Resumo dos resultados 76
III.1.5 Estudo dos interferentes 77
III.1.6 Análise das amostras comerciais 78
III.1.7 Conclusões 81
III.2. Análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica 81
III.2.1. Verificação do efeito do SDS sobre a reação proposta 81
III.3. Análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica – sistema em confluência 84
III.3.1 Estudo e otimização das condições experimentais 84
III.3.1.1 Otimização das variáveis no sistema de FIA 84
III.3.1.1.1 Triagem das variáveis 84
III.3.1.1.2 Metodologia de superfície de resposta 86
III.3.1.2 Variáveis Químicas 89
III.3.1.2.1 Triagem das variáveis 89
III.3.1.2.2 Metodologia de superfície de resposta 91
III.3.2 Construção da curva analítica 94
III.3.3. Resumo dos resultados 99
III.3.4. Estudo dos interferentes 99
III.3.5. Análise das amostras comerciais 100
III.3.6. Determinação de bumetanida em urina 103
III.3.6.1 Extração líquido-líquido 103
III.3.6.2 Extração em fase sólida 104
III.3.7 Conclusões 106
III.4. Análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica – sistema com zonas coalescentes 106
III.4.1 Estudo e otimização das condições experimentais 106
III.4.1.1. Triagem das variáveis 107

III.4.1.1.1 Planejamento Fatorial Fracionário 107
III.4.1.1.2 Planejamento Fatorial Completo 110
III.4.1.2. Metodologia de superfície de resposta 112
III.4.2 Construção da curva analítica 115
III.4.3. Resumo dos resultados 119
III.4.4. Estudo dos interferentes 120
III.4.5. Análise das amostras comerciais 121
III.4.6. Determinação de bumetanida em urina 123
III.4.6.1. Procedimento para análise de urina 124
III.4.7 Conclusões 125
IV. CONCLUSÕES GERAIS 126
V. REFERÊNCIAS 128

I. INTRODUÇÃO

I.1 Diuréticos

Diuréticos são drogas que aumentam a excreção de sódio e de água do corpo através de uma ação sobre os rins. Seu efeito primário consiste em diminuir a reabsorção de sódio e cloreto do filtrado, sendo o aumento da perda de água secundário à excreção aumentada de sal. Os principais diuréticos são os de alça e as tiazidas[1].

Os diuréticos de alça são os mais poderosos de todos os diuréticos, capazes de provocar a excreção de 15-25% do sódio existente no filtrado. Neste grupo encontram-se a furosemida, bumetanida, piretanida, torasemida e o ácido etacrínico[1]. O ácido etacrínico, a furosemida e a bumetanida apresentam em comum um grupo carboxílico e é possível que uma maior potência seja decorrente desta propriedade ácida[2].

No esporte é proibido o uso de diuréticos, pois há atletas que fazem uso dessas substâncias para perderem peso antes de competições ou para esconderem que fizeram uso de outras substâncias dopantes, alterando sua concentração na urina. A proibição é devido aos diferentes mecanismos de ação envolvidos: eles aumentam o fluxo e o volume da urina. Como conseqüência, quando há o uso de outras substâncias suas concentrações podem ser drasticamente reduzidas abaixo do limite de detecção da metodologia usada, levando a um falso negativo da amostra analisada[3]. O uso abusivo dos diuréticos pode levar a redução do volume total do sangue tendo o risco de hipotensão ou o aumento da viscosidade do mesmo causando uma eventual trombose[4].

I.2 Bumetanida

A bumetanida é um medicamento utilizado no tratamento de edema associado a falhas no coração e problemas renais e hepáticos e também como diurético[5], estando inclusa no grupo dos diuréticos de alça (bumetanida, furosemida, indapamida, piritanida e xipamida), os quais são medicamentos mais potentes (aqueles que agem na alça de Henle) sendo necessários em casos de hipertensão grave, quando são então usadas múltiplas drogas com propriedades redutoras de sódio; na insuficiência renal e em casos de cirrose, onde a retenção de sódio é acentuada[6]. Portanto a bumetanida é um diurético potente, pois se apresenta na forma de comprimidos contendo apenas 1 mg do princípio ativo.

A bumetanida é cerca de 40 vezes mais potente que a furosemida, tendo um tempo de meia-vida de 0,3 a 1,5 hora, sendo eliminada do organismo 65% por via renal e 35% via metabolismo[7].

A bumetanida (ácido 3-aminosulfonil-5-butilamino-4-fenóxibenzóico), com fórmula molecular $C_{17}H_{20}N_2O_5S$ e massa molar de 364,45 g mol^{-1}. É apresentada como um pó branco, sendo pouco solúvel em água, clorofórmio e éter, tendo maior solubilidade em acetona, álcool e soluções alcalinas. Sua estrutura está representada na Figura 1.

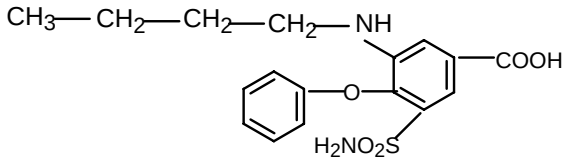


Figura 1. Estrutura química da bumetanida

No Brasil este fármaco é comercializado com o nome de Burinax®, sendo também manipulado em farmácias de manipulação. É também comercializado na Europa e América do Norte com o nome de Burinex®, Fordiuran®, Fontego®, Butinat®, Farmadiuril® e Bumex®, na forma de comprimidos e injetáveis5.

I.3 Revisão Bibliográfica

I.3.1 Métodos analíticos para determinação de bumetanida

Um cuidadoso levantamento bibliográfico realizado em pesquisa nas principais fontes de consulta eletrônica (*Web of Scienc e Scifinder Scholar)* utilizando as palavras chaves: bumetanide and (determination or analysis) foram encontradas 75 publicações sobre métodos analíticos para a determinação de bumetanida no período compreendido de 1973 a 2006. Na Figura 2 tem se a distribuição dessas publicações.

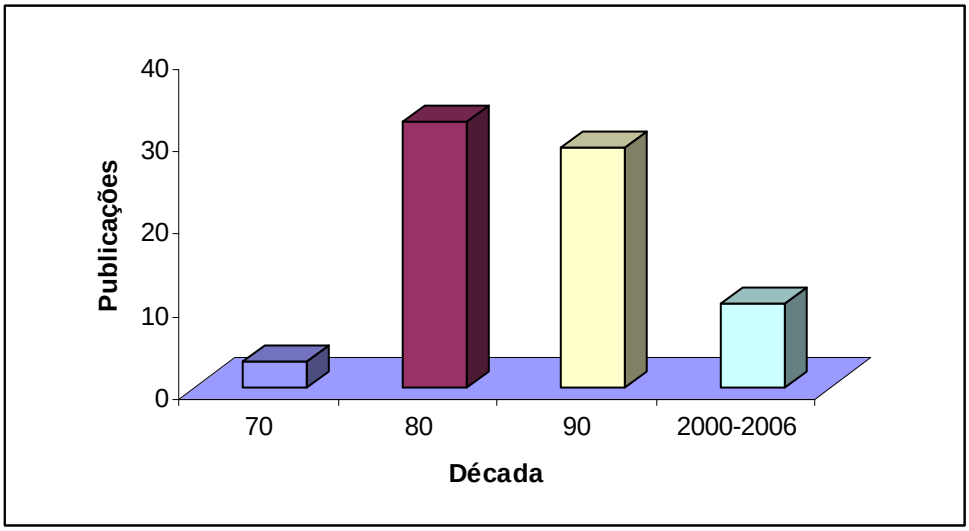


Figura 2. Distribuição dos trabalhos para determinação de bumetanida de acordo com a década.

De um modo geral, a maioria dos trabalhos citados na literatura destina-se à análise de bumetanida em fluidos biológicos como sangue e urina.

Classificando-se os trabalhos encontrados na literatura de acordo com a técnica analítica empregada para a análise de bumetanida, constatou-se a técnica analítica mais empregada é a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, como mostra a Figura 3.

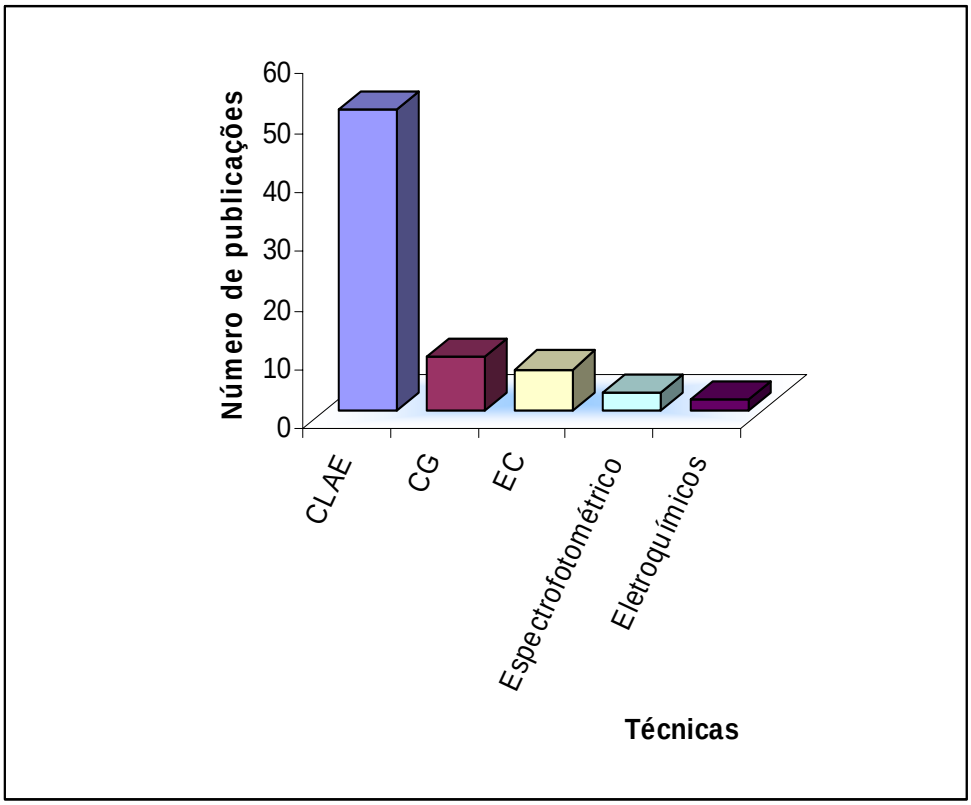


Figura 3. Número de publicações de acordo com a técnica analítica empregada.

I.3.1.1 Métodos de separação

I.3.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação devido à sua sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo sua ampla aplicabilidade[9]. Porém a técnica apresenta certas limitações como o alto custo dos equipamentos, o emprego de grandes quantidades de solventes, além da necessidade de um operador especializado.

Dentre todas as técnicas analíticas pesquisadas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica analítica mais empregada na determinação de bumetanida em matrizes biológicas [10, 11,15] e fármacos [12,13].

WELLS, HENDRY e KEARNS[10] desenvolveram um método para análise de bumetanida em sangue e urina utilizando um método de cromatografia em fase reversa com detecção por fluorescência. A fase móvel consistia de metanol, água, ácido acético glacial (66:34:1) em fluxo de 1,2 mL min^{-1}. A amostra é extraída em coluna C_{18} com acetonitrila após etapa prévia de precipitação das proteínas. O método apresentou baixas taxas de recuperação; para as amostras de sangue a recuperação variou de 90-100%, já para as amostras de urina as porcentagens de recuperação variaram de 80-90%.

CAMPÍNS - FALCÓ, HERRRÁEZ-HERNÁNDEZ e SEVILLANO-CABEZA[11] relataram um método para quantificação de 12 diuréticos em urina utilizando CLAE com detecção ultravioleta em 230 nm. Acetonitrila e tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} foram utilizados como fase móvel em modo de eluição em gradiente e fluxo de 1,0 mL min^{-1}.

LEGORBURU et al[12] propuseram um método de quantificação de bumetanida em medicamentos e em urina de pacientes que ingeriram o medicamento, utilizando CLAE com detecção amperométrica em +1350 mV com eletrodo de carbono vítreo. A faixa de trabalho foi de 50 a 499 ppb, com limite de detecção de 0,25 ppb.

RUIZ-ANGEL, TORRES-LAPASIÓ e GARCÍA-ALVAREZ-COQUE[13] fizeram um estudo sobre o efeito do pH e a presença de micelas na separação de 18 diuréticos utilizando a técnica de cromatografia líquida em fase reversa. Neste estudo foram analisados os efeitos do pH, a variação da assimetria do pico com a concentração de SDS (dodecil sulfato de sódio) e acetonitrila em uma fase móvel de acetonitrila-água,

eficiência, seletividade, resolução e tempo de análise. Ao final do estudo foi concluído que nem a fase orgânico-aquosa nem a fase orgânico-micelar podem resolver completamente a mistura dos 18 diuréticos, já que nesta mistura tinham-se diuréticos básicos, neutros, ácidos e fortemente ácidos.

CARDA-BROCH, ESTEVE-ROMERO e GARCÍA-ALVAREZ-COQUE[14] também desenvolveram um método para determinação de sete diuréticos em amostras de urina. Para tanto, utilizaram uma fase móvel contendo o surfactante (SDS), propanol e tampão fosfato em pH 3 e detecção por fluorescência. As amostras foram analisadas sem nenhum pré-tratamento. As melhores condições foram obtidas com a fase móvel contendo 5,50 x 10^{-2} mol L^{-1} SDS - 8% propanol, com o tempo de retenção para a bumetanida de aproximadamente 10 minutos. O limite de detecção encontrado foi 1,4 ppb.

PARK, GWAK e CHUN[15] desenvolveram um método para determinar bumetanida em sangue com detecção por fluorescência, a fase móvel utilizada foi metanol, água, ácido acético glacial (65:35:1). O limite de detecção encontrado foi 5 ppb. O método foi aplicado em amostras fortificadas com o medicamento e em amostras de pacientes que ingeriram o medicamento.

I.3.1.3 Cromatografia Gasosa

A técnica de cromatografia gasosa (CG) não é uma técnica muito empregada para determinação de bumetanida, sendo encontrados na literatura apenas nove artigos, a maioria deles na década de 90.

AMENDOLA et al[4] relataram um método para a determinação de uma mistura de 18 diuréticos por cromatografia gasosa com detector de massas. Foi necessária etapa prévia de derivatização utilizando uma mistura de acetona em iodeto de metila na proporção 1:10 em forno de microondas, o que diminuiu o tempo de incubação de 3 horas para 10 minutos. Após a derivatização as amostras foram eluídas em cartucho de C_{18} com metanol. O solvente foi evaporado em atmosfera de N_2 a 40 ºC. O limite de detecção encontrado foi 50 ppb.

HAGEDORN e SCHULZ[16] relataram um método para determinação de bumetanida, ácido etacrínico e furosemida em urina de cavalo para controle de dopping. A detecção foi feita por cromatografia gasosa com detector de massas. O tempo de eluição foi de 15 minutos e o limite de detecção encontrado foi 40 ppb.

CARRERAS et al[17] fizeram uma comparação entre 3 diferentes procedimentos de screnning utilizando CG-MS para detecção de 20 diuréticos em amostras de urina fortificadas com os padrões dos medicamentos. Para a bumetanida o procedimento que apresentou melhores resultados foi a “metilação flash” que consistia da pirólise do sal de tetraalquilamônio no injetor do cromatógrafo utilizando trimetilanilina como agente derivatizante e previamente uma extração em fase sólida.

I.3.1.4 Eletroforese Capilar

Eletroforese é a migração dos íons presentes em solução sob a influência de um campo elétrico. Solutos diferentes possuem mobilidades diferentes e, portanto, migram pelo capilar em velocidades diferentes. Os cátions são atraídos pelo terminal negativo (o catodo) os ânions são atraídos para o terminal positivo (o anodo)[18]. A eletroforese capilar é também um método de separação utilizado para a análise de diuréticos.

GONZÁLEZ, BECERRA e LASERNA[19] propuseram um método onde 4 diuréticos considerados dopantes foram analisados simultaneamente por eletroforese capilar com detector de fluorescência em amostras de urina. A separação completa se deu em menos de 8 minutos em pH 8, com λ de excitação em 350 nm e λ de emissão em 428 nm. O limite de detecção encontrado foi 21,6 x 10^{-15} mol L^{-1} (fento-mol).

I.3.1.5 Métodos Eletroquímicos

Em toda a revisão bibliográfica apenas um método voltamétrico[20] foi encontrado para a determinação de bumetanida em medicamentos e urina. O método consiste na determinação de bumetanida com eletrodo de pasta de carbono em meio de KNO_3. Também foram feitos testes com KCl, porém com nitrato de potássio houve a formação de um pico voltamétrico de maior sensibilidade do que com KCl. As medidas foram feitas em pH 2,5, ajustado com tampão fosfato. O limite de detecção encontrado foi 0,16 ppm. Para a determinação em amostras fortificadas de urina, o método de extração para os interferentes ácido ascórbico e ácido úrico foi a extração líquido-líquido, segundo o autor, um método tedioso. A porcentagem de recuperação foi 71%.

NIKOLIC e VELASEVIC[21] descreveram uma titulação coulométrica para determinação de bumetanida e furosemida através da geração de cloreto tendo como indicador o alaranjado de metila. A determinação foi feita em medicamentos.

I.3.1.6 Métodos Espectrofotométricos

Na revisão bibliográfica foram encontrados três artigos[22-24] que descrevem a determinação de bumetanida por espectrofotometria.

SASTRY et al[22] propuseram um método espectrofotométrico para a análise de 8 diuréticos, dentre os quais, a bumetanida. O método proposto é baseado na reação entre bumetanida e 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona na presença de cloreto de ferro (III). O tempo para a reação ocorrer é de 10 minutos, e o produto apresentou-se estável por aproximadamente 2 horas. O espectro mostrou absorção máxima em 660 nm. A faixa de trabalho utilizada foi de 1 a 10 ppm.

ZIVANOVIC et al[23] descreveram um método onde a bumetanida reagiu com cloreto de ferro (III) na presença de tiocianato de amônio em pH entre 1,83 e 1,92, formando um complexo violeta solúvel em clorofórmio

I.3.1.7 Outros Métodos

SOLICH et al[25] descreveram um método em FIA baseado na fluorescência da bumetanida em meio alcalino para análise de medicamentos. Parâmetros como: concentração do carregador, pH do tampão (variáveis químicas), volume injetado de amostra, tamanho da bobina de reação, fluxo e comprimento de onda (variáveis instrumentais) foram otimizadas através de um planejamento univariado. As melhores condições foram: fluxo de 1,3 mL min^{-1}, bobina de 50 cm, volume injetado de amostra de 110 μL, concentração do tampão aminoacetato 0,1 mol L^{-1}, concentração do

carregador 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} e pH 11,5. A faixa de trabalho estudada foi de 0,5 a 10 ppm, com limite de detecção de 0,01 ppm e freqüência analítica de 60 análises $hora^{-1}$.

Diante do exposto, verifica-se que na literatura são descritos alguns métodos para a quantificação de bumetanida em medicamentos e matrizes biológicas. Entretanto, a grande maioria dos métodos reportados envolve a utilização de equipamentos e/ou acessórios sofisticados. Além do alto custo destes equipamentos alguns empregam quantidades razoáveis de solventes de alta toxicidade oferecendo riscos ao operador, não sendo indicados para o emprego de análises de rotina.

A tendência atual é o desenvolvimento de procedimentos analíticos que usem ou gerem a menor quantidade de resíduo. A “Química Verde” tem a preocupação de desenvolver tecnologias e processos que gerem a menor quantidade de resíduo possível.

O primeiro desafio é a conscientização para o desenvolvimento de tecnologias limpas no lugar das atuais. As iniciativas da química verde englobam todas as áreas da ciência, sempre considerando os princípios fundamentais de sustentabilidade[26]. A química verde tem 12 princípios e como exemplos temos: “é melhor prevenir que tratar ou limpar resíduos de processos químicos depois de formados”, “os produtos químicos devem ser projetados de forma a ter maior eficiência no cumprimento de seus objetivos, com menor toxidez” e “métodos analíticos devem ser desenvolvidos para monitorar o processo e o tempo real controlando, *a priori*, a formação de substâncias perigosas” [27].

Pesquisas nessa área têm focado principalmente o desenvolvimento de novas rotas sintéticas para substituir ou minimizar o uso de solventes orgânicos. Há uma evidente demanda para o desenvolvimento de procedimentos analíticos “verdes” e

confiáveis já que muitos métodos atuais empregam alta quantidade de reagentes tóxicos, resultando em um impacto ambiental negativo [28].

DA SILVA, DE LACERDA e JONES[27] concluíram que a Química Verde é na realidade uma filosofia. Há tempos atrás um desafio sintético consistia em chegar à molécula alvo. Quando se aplica a idéia de Química Verde, um desafio sintético trata-se de chegar à molécula alvo com uma metodologia que agrida o mínimo o meio ambiente. E que cada vez que conseguimos cumprir alguns dos princípios da Química Verde, estamos caminhando para uma utilização mais consciente de nossos recursos naturais e para a manutenção da vida no planeta. Esta não é uma única estratégia a ser seguida, mas é importante considerá-la.

Os métodos propostos neste trabalho visam o desenvolvimento de metodologias “mais limpas”, isto é, que usem baixa quantidade de solvente e que gere pouca quantidade de resíduo.

I.4 Spot tests

Os *spot tests* tem sido utilizado nas últimas quatro décadas para análises clínicas, testes de controle de qualidade do ar, análises de água e alimentos, análises criminais e prospecções geoquímicas. A análise por *spot test* é muito simples, constituída basicamente pela mistura de algumas gotas de uma solução contendo o analito e de uma solução contendo reagente, formando um produto colorido. A reação pode ser feita sobre uma superfície porosa ou não-porosa, como papel de filtro, vidro ou porcelana.

A reação de *spot test* mais antiga é a de Runge em 1922, que realizou um estudo sobre o poder de branqueamento de soluções alvejantes avaliando a quantidade de cloreto nas soluções; para tanto, um papel de filtro foi impregnado com amido e iodeto de potássio. Quando gotas de alvejante foram adicionadas à superfície do papel de filtro houve o aparecimento de uma mancha azul devido à reação de iodo e sua reação com o amido. Esta provavelmente é a reação mais antiga de *spot test*, antecedendo em 25 anos o teste de Schiff para determinação de ácido úrico em urina através da reação com carbonato de prata [29].

Os *spot tests* podem ser usados para análises qualitativas e quantitativas, já que o mesmo leva à formação de um produto colorido. Para análises quantitativas, o produto da reação é proporcional à concentração do analito, a comparação da intensidade da cor formada pode ser feita com padrões analíticos utilizando, por exemplo, instrumentos para medir a luz refletida como a espectroscopia de reflectância difusa. A cor da mancha formada deve ser uniforme para que haja uma boa precisão das medidas. Para este fim, são parâmetros importantes: volume da solução adicionada, velocidade, ordem de adição dos reagentes e a altura com que essas soluções são adicionadas[30].

Os *spot tests* são procedimentos rápidos, simples e que envolvem um baixo consumo de reagentes e conseqüentemente, geram uma baixa quantidade de resíduo, sendo atrativos do ponto de vista da Química Verde.

A espectroscopia de reflectância difusa combinada com *spot tests* quantitativos tem sido empregada em análises quantitativas[30-35].

I.5 Espectroscopia de Reflectância Difusa

A percepção óptica de espécies químicas é baseada em sua interação com a luz. As três técnicas ópticas empregadas para essas medidas são absorção, emissão e reflexão[30].

Durante muitos anos, o uso da espectroscopia de reflectância difusa foi limitado às áreas têxteis, de papel, de cerâmica, tintas e pigmentos. Como técnica analítica de controle de qualidade para avaliar cor, brancura e brilho de superfícies brancas ou coloridas.

KEALEY[37] menciona que a precisão das medidas realizadas em suporte inerte (*spot test*) apresentava uma variação de 10 a 20%. Porém com o avanço tecnológico, isto é, o desenvolvimento de fibras ópticas e esferas de reflectância, a situação foi mudada e melhores resultados puderam ser obtidos [31,35].

Segundo WENDLANDT e HECTH[37] a reflexão da radiação sobre uma superfície pode ser de dois tipos: especular (tipo espelho) ou difusa. A primeira ocorre em superfícies lisas ou polidas, sendo definida pela lei de reflexão de Fresnel, onde os ângulos de incidência e de reflexão são idênticos.

A reflexão difusa ocorre em superfícies foscas ou opacas, ocorre por reflexões múltiplas a partir de superfícies das partículas que constituem o meio. A reflexão difusa é um processo que ocorre quando a radiação penetra em um substrato sólido, parte desta radiação retorna à superfície, ocorrendo dispersão múltipla e absorção parcial pelas partículas ou fibras que constituem o substrato sólido[37].

A reflectância ou poder de reflexão é dado por:

$$R = I / I_0 \qquad \text{(Equação 1)}$$

onde:

R é o sinal que representa a radiação refletida

I é a intensidade da radiação refletida

I_0 é a intensidade da radiação incidente

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

$$R = I / I_0 \ x\ 100 \qquad \text{(Equação 2)}$$

R é considerado igual a 1 quando a radiação refletida é igual a radiação incidente, isto ocorre quando há o uso de um padrão de reflectância máxima, como pastilhas de MgO, MgO_3 e $BaSO_4$.

O sinal de reflectância também pode ser convertido em densidade óptica para medida de reflectância (A_R), dado por:

$$A_R = \log (1/R) \qquad \text{(Equação 3)}$$

A teoria de Kubelka-Munk é o modelo mais aceito onde a concentração da amostra é relacionada com a reflectância Esta teoria descreve a relação entre coeficiente de absorção molar, coeficiente de dispersão e poder de reflectância em um meio semi-infinito (infinitamente fino) de acordo com a seguinte equação:

$$f(R) = (1-R)^2 / 2R = k / s, \text{ onde:} \qquad \text{(Equação 4)}$$

$k =$ coeficiente de absorção molar

$s =$ coeficiente de dispersão

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

$$k = 2{,}303\varepsilon.C \qquad \text{(Equação 5)}$$

Para a aplicação adequada da equação de Kubelka-Munk é necessária a determinação da reflectância absoluta do material usado como referência[38].

Os instrumentos para medir a reflectância podem ser acessórios acoplados a um espectrofotômetro ou podem ser equipamentos portáteis. Em geral, os instrumentos para medidas de reflectância contêm os seguintes componentes: fonte de luz, suporte para amostra e para padrão branco usado como referência, esfera de integração, espelhos, detector e registrador.

Os espectros para representação das medidas de reflectância podem ser apresentados de diversas maneiras, são comumente obtidos a partir de R(%), *f* (R), A_R ou log (1/R) em função do comprimento de onda (nm).

A Figura 4 apresenta três espectros obtidos a partir de um mesmo equipamento para medidas de reflectância (acessório Labsphere, modelo DRA-CA-3300) e de um mesmo papel de filtro colorido, sobre o qual ocorreu a reação entre bumetanida e *p*-dimetilaminocinamaldeído, em meio ácido. A Figura 4a representa o espectro obtido a partir de $R(\%)$, a Figura 4b o espectro de log (1/R) (A_R) e a Figura 4c o espectro de $f(R)$ versus comprimento de onda (nm).

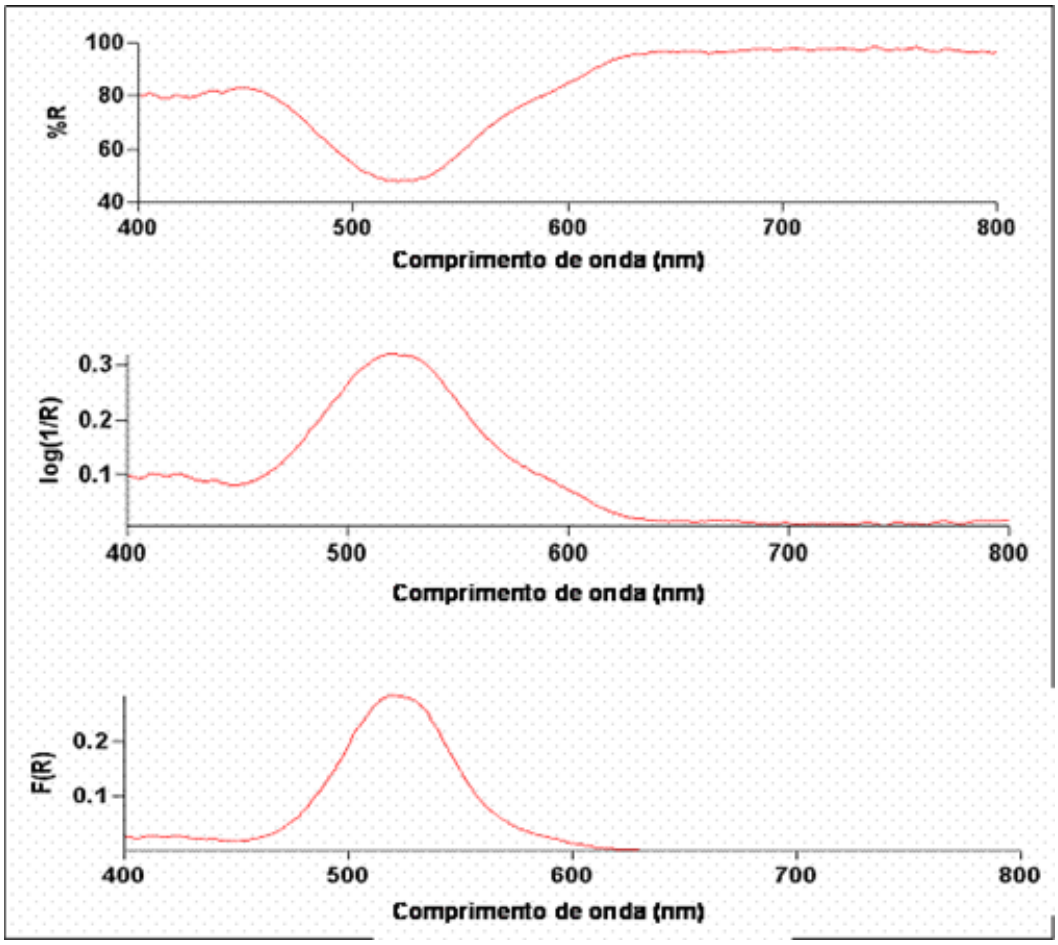


Figura 4. Espectros de reflectância obtidos a partir do produto da reação de *spot test* entre bumetanida e *p*-dimetilaminocinameldeído, em meio ácido. As análises foram realizadas utilizando um acessório de reflectância Labsphere, modelo DRA-CA-3300. Concentração de butemanida = 1,37 x 10^{-3} mol L^{-1}. **Figura 4a.** Espectro de reflectância obtido a partir dos valores de %R. **Figura 4b**. Espectro de reflectância obtido a partir dos valores de $\log(1/R)$. **Figura 4c**. Espectro de reflectância obtido a partir dos valores de $f(R)$.

I.5.1 Aplicações da espectroscopia de reflectância difusa empregando *spot test* em análises quantitativas

Foi feito um levantamento nas principais bases de dados sobre métodos que empregaram a espectroscopia de reflectância difusa para análises quantitativas. Pode ser constatado um aumento no número de trabalhos publicados, utilizando a técnica para fins quantitativos com medidas na região visível do espectro, a partir da década de 90, como mostra a Figura 5.

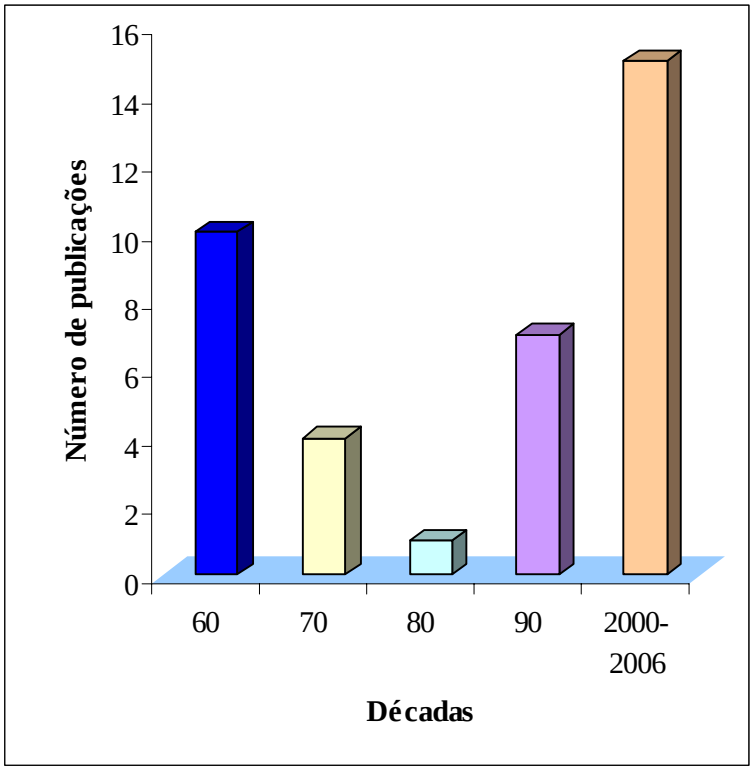


Figura 5. Distribuição das publicações encontradas envolvendo o uso da espectroscopia de reflectância difusa com medidas na região visível do espectro, de acordo com a década.

TUBINO, ROSSI e MAGALHÃES[35] propuseram um método para quantificar Fe (III), Cr (VI) e Ni(II) por espectroscopia de reflectância difusa empregando *spot test* em

uma superfície de papel de filtro, neste trabalho foi desenvolvido um suporte para fixar a micropipeta, assim obteve-se uma melhora na precisão das manchas. GAUCH et al[31] também descreveram um método semelhante para quantificar amônio, fosfato e Cu (II).

MATIAS, DE OLIVEIRA e MOSCHIM[39] desenvolveram um sensor de fibra óptica portátil para analisar diesel em veículos. O diesel particulado fica retido sobre uma fita marcada, assim a medida de reflectância é feita e a concentração proporcional à quantidade de material particulado da fita.

ZANJANCHI, NOEI e MOGHIMI[40] relataram um método para determinar baixas quantidades de alumínio em amostras de água mineral. Foram testadas três técnicas de pré-concentração e dois reagentes cromogênicos. Os três adsorventes testados foram: C_{18}, cloreto naftaleno metiltrioctilamonio e MCM-41 (material mesoporoso), sendo o último utilizado para a reação de *spot test.* Os dois reagentes cromogênicos utilizados foram: ciano eriocromo R e quinalizarina. A faixa de trabalho estudada foi entre 0,01 – 15 ppm e o limite de detecção de 0,01 ppm.

Há na literatura alguns métodos para a determinação de fármacos em medicamentos utilizando espectroscopia de reflectância difusa e *spot test* [32-34].

MATIAS, SILVA e TUBINO[34] descreveram um método para determinação de ácido acetilsalicílico (AAS) em formulações farmacêuticas. O método é baseado na hidrólise alcalina entre AAS e íons de Fe (III), formando um complexo de cor roxa sobre a superfície do papel de filtro.

GOTARDO et al[32] propuseram um método para determinação de furosemida após sua reação com *p*-dimetilaminocinameldeído em meio ácido sobre a superfície de papel de filtro. Para que a reação ocorresse foi necessário aquecimento do papel de filtro a 80 °C por 8 minutos. O método foi aplicado em seis amostras comerciais.

TUBINO e DE SOUZA[41] relataram um método para determinar diclofenaco de sódio e diclofenaco de potássio em comprimidos e ampolas. Houve a formação de um complexo suspenso em solução aquosa entre as soluções de diclofenaco e a solução de acetato de cobre (II) em meio tamponado. A detecção foi realizada por um LDR (*light detector resistor*) e a medida da resistência por um multímetro, a qual foi relacionada com a reflectância.

I.6 Análise Química por Injeção em Fluxo

A crescente necessidade de automação de procedimentos analíticos se deve ao aumento significativo do número de amostras laboratoriais a serem analisadas, por exemplo, nas áreas clínicas e ambientais. A demanda por técnicas rápidas e confiáveis operando 24 horas por dia é grande, principalmente para controle de processos industriais[42].

A partir da metade da década de setenta iniciou-se o uso de sistemas em fluxo, com dimensões e vazões adequadas, simplificando o sistema analítico e aumentando o número de amostras analisadas por unidade de tempo (freqüência de amostragem). Esta abordagem passou a ser conhecida como Análise por Injeção em Fluxo (FIA)[42]. Em levantamento bibliográfico realizado na base de dados Scifinder, pode ser constatado um grande aumento do número de trabalhos publicados utilizando a análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para determinação de fármacos, a partir da década de 90, como mostra a Figura 6.

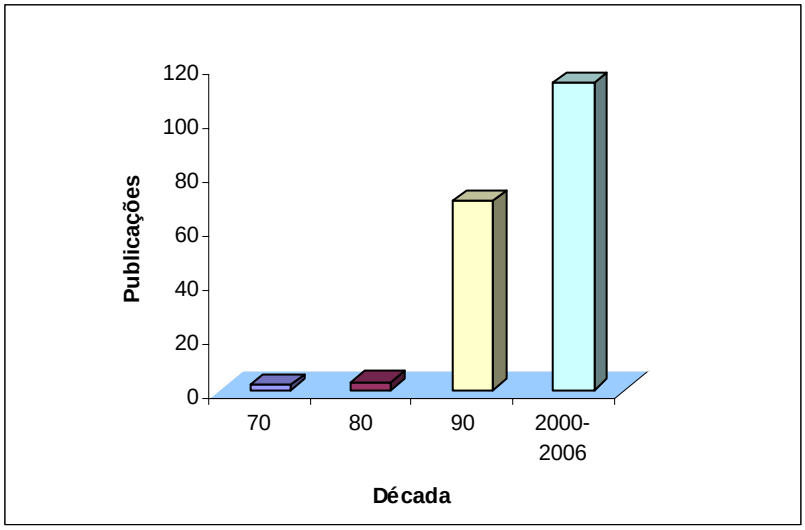


Figura 6. Distribuição das publicações encontradas envolvendo o uso de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica, de acordo com a década.

Empregando esses sistemas é possível a implementação de praticamente todas as etapas envolvidas no processo da análise química (amostragem, separações, diluições, pré-concentrações e adição de reagentes)[43].

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

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

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

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

A reação ocorre dentro do percurso analítico. Para escolher o dimensionamento do mesmo deve se levar em conta o tempo de residência da amostra[44]. O tempo de residência está ligado ao fenômeno da dispersão, este processo é dependente das características físico-químicas das soluções (por exemplo, viscosidade), bem como das dimensões dos componentes do sistema (volume da alça da amostragem, material, diâmetro e comprimento dos tubos que constituem o percurso analítico). Usualmente as medidas são efetuadas com esses parâmetros mantidos constantes, permitindo a obtenção de resultados caracterizados por alta repetibilidade. As vazões, volumes do percurso analítico e da amostra devem ser definidas considerando-se a dispersão e o tempo de residência necessário para a ocorrência das reações químicas[43].

O detector para um sistema da análise em fluxo deve ser estável, utilizar um baixo volume morto, ter uma resposta rápida e os canais de fluxo não devem criar turbulência no sistema[45].

Os detectores empregados são praticamente todos usuais em química analítica: espectrofotômetros de UV-Vis, espectrômetros de absorção atômica e de emissão em plasma, potenciômetros e condutivímetros[44].

I.6.1 Configurações dos sistemas

I.6.1.1 Sistema em linha única

Este sistema é o mais elementar. A amostra é inserida no caminho do fluido carregador e este transporta a amostra em direção ao detector. Durante o transporte a

amostra se dispersa continuamente no fluido carregador gerando um gradiente de concentração no percurso analítico. Em sistemas de linha única a homogeneização entre reagente e amostra ocorre somente por dispersão assim, a concentração do reagente na região de distribuição da amostra deve ser suficiente para satisfazer a estequiometria da reação[44].

I.6.1.2 Sistema em confluência

As limitações do sistema em linha única foram resolvidas adotando-se a adição do reagente por confluência. Desta forma o reagente é adicionado logo após o injetor, permitindo que cada fração da amostra receba a mesma quantidade de reagente. A partir da confluência somam-se as vazões do carregador e do reagente, assim a amostra é distribuída em um espaço maior que o ocupado anteriormente, o que corresponde a uma diluição. Neste caso é importante ajustar a intensidade do fluxo para que a dispersão da amostra seja minimizada[44].

I.6.1.3 Sistema com Zonas Coalescentes

Para resolver o problema do desperdício dos reagentes que ocorre no sistema por confluência (onde o reagente é bombeado continuamente) foi desenvolvido o processo de zonas coalescentes ou “merging zones”.

Neste processo são coletadas ao mesmo tempo alíquotas de amostra e de reagente. Quando o injetor é comutado para a posição de injeção, ambas as alíquotas são deslocadas pelos respectivos carregadores e coalescem na confluência. A

quantidade de reagente consumida por determinação é definida pelo comprimento da alça de amostragem do reagente, apresentando uma boa economia do mesmo[44].

Há também outros sistemas como sistema com reamostragem, sistema monosegmentado, concentração e separação com resina de troca iônica e outros.

I.6.2 Análise por Injeção em Fluxo com detecção Espectrofotométrica

A espectrofotometria UV-Vis é a técnica analítica mais empregada nos laboratórios de rotina em função de seu baixo custo relativo, facilidade de operação e a sensibilidade atingida.

O acoplamento desta técnica a sistemas de injeção em fluxo (FIA) tem se mostrado versátil em função da seletividade e sensibilidade atingidas, da facilidade de operar etapas de separação e/ou pré-concentração em condições altamente repetitivas e do gerenciamento de soluções não equilibradas: a detecção, etapas de separação, dispersão, tempos de residência da amostra, adição de reagentes[46].

OLIVEIRA et al[46] desenvolveram um método para monitorar peróxido de hidrogênio em processo de degradação Foto-Fenton. O método proposto é baseado na reação entre o íon vanadato e peróxido de hidrogênio em meio ácido levando a uma coloração vermelha devido à formação do cátion peroxovanádio.

O sistema de fotodegradação consistiu de uma lâmpada de blacklight como fonte de radiação inserida em um tubo de vidro. A amostra foi injetada manualmente através de um injetor comutador, o regente adicionado através de uma confluência e a detecção espectrofotométrica.

ANICETO et al[47] relataram um método para quantificar vitamina B_2 em complexos multivitamínicos e fármacos através de um procedimento em FIA com detecção espectrofotométrica. A riboflavina (vitamina B_2 reage com íons Ag^+ produzindo um complexo vermelho no intervalo de pH entre 6,5 e 7,1. O sistema de injeção utilizado foi de zonas coalescentes, tendo $AgNO_3$ como reagente e KNO_3 como carregador em fluxo de 4,4 mL min^{-1}.

CANAES e FATIBELLO-FILHO[48] desenvolveram um sistema da análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes para a determinação turbidimétrica de metilbrometo de homatropina em formulações farmacêuticas. O reagente utilizado foi $AgNO_3$ e o carregador água desionizada. Estudaram-se separadamente os efeitos: concentração de $AgNO_3$, volume da alça de amostragem, volume da alça do reagente, comprimento do reator e vazão do transportador. Foi também analisado o efeito de possíveis interferentes via método da adição de padrão, indicando a ausência de efeitos de matriz significativos. O método foi aplicado na análise de duas amostras comerciais.

MARTINELLI et al[49] descreveram um método para determinar fosfato, compostos fenólicos, nitrito, sulfeto e ferro total em amostras da água de rios e lagos. As determinações foram feitas utilizando sempre o mesmo módulo de análise. O sistema era composto por um injetor comutador com duas alças de amostragem de 25 e 75μL respectivamente. A sensibilidade foi aumentada em 4,5 vezes e o consumo de reagente reduzido em 12 vezes em comparação com os métodos de injeção em fluxo onde a introdução do reagente é contínua.

A partir das considerações supracitadas, torna-se evidente a necessidade de métodos analíticos simples, rápidos, de baixo custo relativo e ambientalmente mais amigáveis para análise de bumetanida em medicamentos e/ou fluidos biológicos.

Estudos preliminares de laboratório mostraram a formação de um composto colorido (cor rosa) estável, resultante da reação inédita de bumetanida (em solução e sobre a superfície de um papel de filtro) com o reagente cromogênico *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC).

Diante deste contexto o presente trabalho vem propor o desenvolvimento de métodos analíticos simples, rápidos, sensíveis e ambientalmente mais amigáveis para a determinação de bumetanida em medicamentos e fluidos biológicos (urina). Tais métodos empregam as técnicas de *spot test* – espectroscopia de reflectância difusa e análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção espectrofotométrica na região visível do espectro eletromagnético.

I.7 Objetivos do presente trabalho

Desenvolvimento de metodologias analíticas simples, rápidas e sensíveis para determinação de bumetanida utilizando as técnicas de espectroscopia de reflectância difusa e análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica na região visível;

Otimização dos parâmetros experimentais das novas metodologias desenvolvidas através de planejamento de experimentos;

Aplicação das metodologias desenvolvidas para análise de bumetanida em amostras comerciais e em fluidos biológicos (urina).

II. PARTE EXPERIMENTAL

II.1. Materiais e equipamentos

II.1.1. Instrumentação básica

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

II.1.2. Medidas por espectroscopia de reflectância difusa

Para realização dos *spot tests,* as soluções foram adicionadas sobre a superfície de um papel de filtro de área de 2,25 cm^2. Para melhor precisão das adições, o papel foi colocado na parte inferior de um suporte (Figura 7) de acordo com o procedimento descrito por TUBINO et al[35] com o auxílio de uma pinça. As soluções foram adicionadas no centro do papel de filtro utilizando uma micropipeta adaptada ao suporte.

As medidas de reflectância foram realizadas utilizando uma esfera de reflectância Labsphere RSA-HP-8453 (76 mm, 5W, fonte de halogênio) acoplada a um espectrofotômetro de arranjo de diodos Hewlett Packard, modelo HP-8453-A.

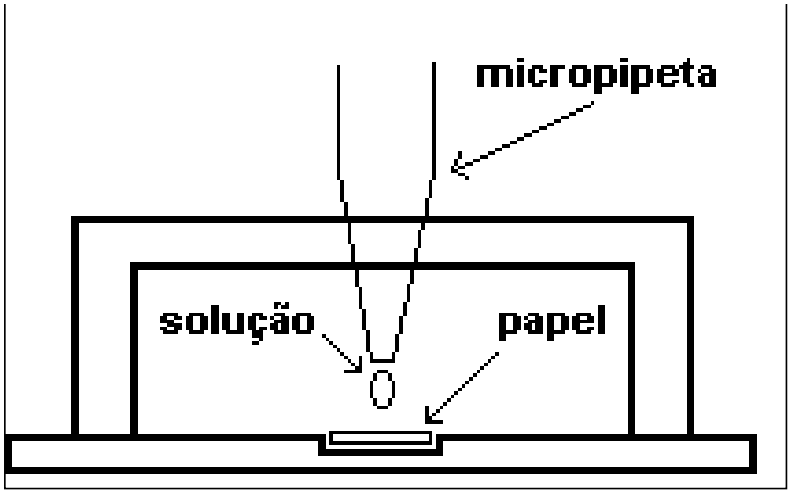


Figura 7. Suporte utilizado na realização dos *spot tests* (Baseado em: TUBINO et al).

II.1.3 Medidas utilizando análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica

II.1.3.1 Sistema em confluência

Para o desenvolvimento deste procedimento de análise por injeção em fluxo foi utilizado o sistema de análise modular ASIA da Ismatec (Zurique, Suíça). Este sistema é constituído por quatro módulos como representado na Figura 8. Para a realização deste trabalho foram utilizados os módulos: bomba peristáltica de quatro canais, Ismatec modelo IS 7610 com rotação variável (1 - 50 rpm) para a propulsão das soluções e a válvula de injeção (IS 7630, Rheodyne 5041, EUA) para a injeção das soluções de bumetanida e amostras. A detecção foi realizada pelo acoplamento, através de uma interface RS 232, de um espectrofotômetro de arranjo de diodos UV-Vis HP 8453A (Hewlett Packard, EUA) equipado com cubeta de fluxo de quartzo com caminho ótico de 1,00 cm e volume interno de 80µl, Hewlett Packard (Hewlett Packard,

EUA). Para a propulsão das soluções foram utilizados tubos de Tygon® de diferentes diâmetros internos. Para a confecção das alças de amostragem, bobinas de reação e linhas de condução das soluções; tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno foram utilizados e uma conexão em acrílico foi empregada para confluência das soluções. Todos os equipamentos encontram-se instalados em salas devidamente equipadas com energia elétrica estabilizada, ar condicionado e desumificador.



Figura 8. Foto do sistema de análise modular ASIA, Ismatec (Zurique, Suíça). Módulo 1: Bomba peristática de rotação variável; Módulo 2: Bomba peristáltica de rotação fixa; Módulo 3: Válvula de 6 caminhos, Rheodyne 5011; Módulo 4: Válvula de injeção Rheodyne 5041.

II.1.3.2 Sistema com zonas coalescentes

Para o desenvolvimento deste procedimento de análise por injeção em fluxo utilizou-se uma bomba peristáltica de quatro canais Ismatec modelo IS 7610 com rotação variável (1-50 rpm) acoplada ao sistema de análise modular ASIA da Ismatec (Zurique, Suíça) equipada com tubos de bombeamento de Tygon ® com diferentes diâmetros internos, e um injetor comutador confeccionado em acrílico, tubos de PTFE de 0,8 mm de diâmetro interno para construção da alça de amostragem, bobina de reação e de homogeneização, linhas de transmissão e confluência em acrílico. A detecção foi realizada pelo acoplamento, através de uma interface RS 232, de um espectrofotômetro de arranjo de diodos UV-Vis HP 8453A (Hewlett Packard, EUA) equipado com cubeta de fluxo de quartzo com caminho óptico de 1,00 cm e volume interno de 80µl, Hewlett Packard (Hewlett Packard, EUA). A Figura 9 mostra a foto do sistema utilizado.

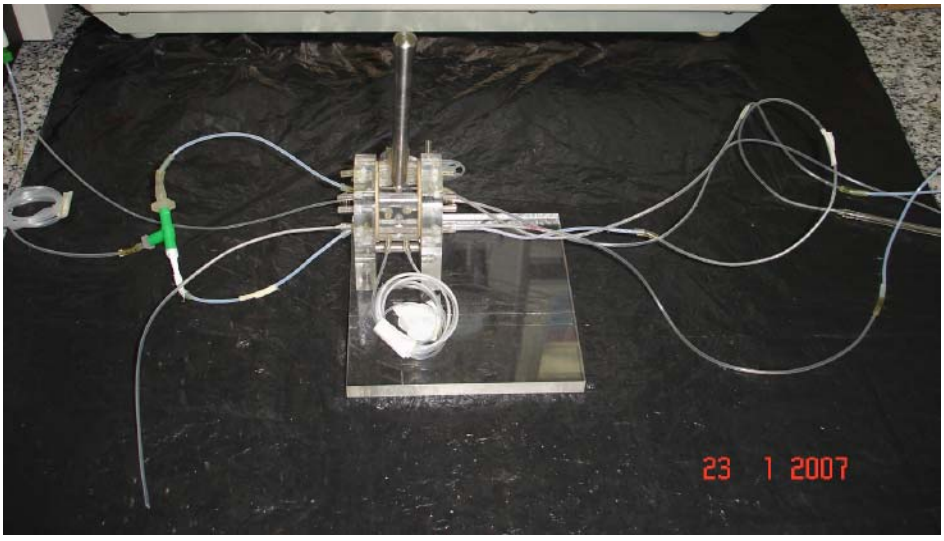


Figura 9. Foto do injetor comutador utilizado para injeção de reagente e amostra.

II.1.4 Medidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) – Método de referência[50]

Efetuou-se a análise das amostras de medicamentos listadas na Tabela 1, pelo método de CLAE recomendado pela Farmacopéia Americana[50]. O sistema de CLAE utilizado consiste de um cromatógrafo líquido Shimadzu SPD-10A, com detector ultravioleta-visível (SDR-10A, Shimadzu), e um injetor automático de 20μL Rheodyne. O comprimento de onda de detecção foi 254 nm.

Utilizou-se uma coluna analítica Microsorb-MV C-18 (250 x 4.6 mm, Varian, USA), com tamanho de partícula de 5μm. A fase móvel foi utilizada em fluxo de 1,00 mL min^{-1}. A área dos picos foi medida em um integrador - registrador Shimadzu C-R6A Chromatopac.

II.2 Reagentes e soluções

Foram utilizados os seguintes reagentes e solventes:

a) Metanol – Mallinckrodt grau CLAE;

b) Ácido clorídrico 12 mol L^{-1} - Mallinckrodt;

c) Bumetanida – Deg (100,72% - CLAE);

d) Etanol – Mallinckrodt – grau CLAE;

e) *p*-dimetilaminocinamaldeído - Aldrich, Milwaukee – 98%.;

f) Dodecil Sulfato de Sódio – Sigma;

g) Ácido acético glacial – Merck – grau p.a.;

h) Tetrahidrofurano - Mallinckrodt – grau CLAE;

i) Amostras de medicamentos adquiridas no comércio local, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos medicamentos analisados quantitativamente pelos métodos propostos neste trabalho.

Amostras [a]	Valor nominal[b]
Burinax (A)	1,0
Manipulada B[c]	1,0
Manipulada C[c]	1,0
Manipulada D[c]	1,0
Manipulada E[c]	1,0

[a] Todas as amostras encontram-se dentro dos prazos de validade
[b] Valor fornecido pelo fabricante, mg/comprimido ou mg/cápsula
[c] Amostras adquiridas em diferentes farmácias de manipulação

II.3 Determinação de bumetanida utilizando espectroscopia de reflectância difusa

II.3.1 Preparo das soluções utilizadas

a) Solução de bumetanida de trabalho: Foi preparada diariamente uma solução 2,74 x 10^{-3} mol L^{-1} pela dissolução de 10,0 mg de bumetanida (100,72% - CLAE) em 5 mL de metanol e transferida quantitativamente para balão volumétrico de 10,00 mL, tendo seu volume completado com metanol.

b) Solução de *p*-dimetilaminocinamaldeído: Foi preparada uma solução 3,4 x 10^{-2} mol L^{-1} pela dissolução de 61,4 mg do sólido em 5 mL de metanol com agitação em banho de ultrasson durante 5 minutos. Esta solução foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 10,00 mL e seu volume completado com metanol. Esta solução foi mantida em refrigerador por no máximo uma semana [32].

c) Solução de Ácido Clorídrico: A partir de HCl concentrado (12 mol L^{-1}) foi preparada uma solução estoque 1,15 mol L^{-1} através da diluição de 1,00 mL de $HCl_{(conc)}$ em metanol em balão volumétrico de 10,00 mL. A partir dessa solução foi feita a diluição apropriada para que a concentração final fosse de 2,1 x 10^{-1} mol L^{-1}.

II.3.2 Procedimento para preparo das amostras

As amostras de medicamento analisadas listadas na Tabela 1, contendo bumetanida, foram adquiridas no comércio local sob a forma de comprimidos e cápsulas e analisadas de acordo com a descrição abaixo.

II.3.2.1 Comprimidos

Vinte comprimidos de um mesmo lote da amostra comercial (amostra A) foram pesados em balança analítica. Determinou-se o valor da massa média dos comprimidos com variação menor que 5% na massa dos comprimidos[51]. Os comprimidos foram então pulverizados em gral de ágata até a obtenção de um pó fino. Foi pesado 0,1484 g da amostra (porção equivalente a 1,5 mg de bumetanida) e submetida à agitação com 3,0 mL de metanol em agitador magnético por 5 minutos. A solução foi filtrada em uma seringa comum contendo quantidades adequadas de algodão comum (massa $_{média}$=1,0286 g); esse método é baseado em TININIS et al[52]. O filtrado foi recolhido, transferido a um balão volumétrico de 5,00 mL e o volume completado com metanol.

II.3.2.2 Cápsulas

Foram pesadas individualmente vinte cápsulas de cada amostra (amostras B, C, D e E). Pesou-se cada cápsula inicialmente cheia e depois de esvaziada de seu conteúdo. O peso médio do conteúdo foi determinado pela diferença dos valores individuais obtidos pelas cápsulas cheias e vazias. Foram pesados 0,1684 g; 0,1015 g ; 0,1519 g e 0,1721 g das amostras B, C, D e E respectivamente (porção equivalente a 1,5 mg de bumetanida) e cada porção submetida à agitação com 3,0 mL de metanol em agitador magnético por 5 minutos. A solução foi filtrada em uma seringa comum contendo uma bola de algodão comum (massa $_{média}$=1,0286 g), esse método é baseado em TININIS et al[52]. O filtrado foi recolhido, transferido a um balão volumétrico de 5,00 mL e o volume completado com metanol.

II.4 Análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica

II.4.1 Preparo das soluções utilizadas

a) Solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1,00 x 10^{-1} mol L^{-1}: foi preparada semanalmente através da dissolução de 7,1210 g de SDS em aproximadamente 100 mL de água desionizada. Esta solução foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 250,00 mL e o volume completado até o menisco com água desionizada. Soluções de trabalho foram convenientemente preparadas através de diluição com água desionizada.

b) Solução estoque de Ácido Clorídrico: a partir de HCl concentrado (11,49 mol L^{-1}) foi preparada uma solução estoque 9,77 x 10^{-1} mol L^{-1} através da conveniente diluição de 8,5 mL de $HCl_{(conc)}$ em água desionizada em balão volumétrico de 100,00 mL. Esta solução foi padronizada com quantidades conhecidas de carbonato de sódio seco por duas horas em estufa a 150ºC. Soluções de trabalho foram preparadas por diluição com água desionizada.

II.4.1.1 Sistema em confluência

a) Solução de bumetanida de trabalho: Foi preparada diariamente uma solução estoque de 2,74 x 10^{-4} mol L^{-1}, pela dissolução de 5,0 mg de bumetanida em uma mistura de etanol e SDS 8,0 x 10^{-3} mol L^{-1} (1:1) em balão volumétrico de 50,00 mL. Foram preparadas soluções-padrão a partir de diluições adequadas da solução estoque de bumetanida em solução de SDS 8,0 x 10^{-3} mol L^{-1}.

b) Solução de *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC): Foi preparada uma solução 5,6 x 10^{-3} mol L^{-1} pela dissolução de 250,0 mg do sólido em 15,0 mL de solução de ácido clorídrico 9,8 x 10^{-1} mol L^{-1}, com agitação em banho de ultrassom durante 5 minutos. Esta solução foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 250,00 mL e seu volume completado com água desionizada.

II.4.1.2 Sistema com zonas coalescentes

a) Solução de bumetanida de trabalho: Foi preparada diariamente uma solução estoque de 2,74 x 10^{-4}mol L^{-1}, pela dissolução de 5,0 mg de bumetanida em uma mistura de etanol e SDS 1,00 x 10^{-2} mol L^{-1} (1:1) em balão volumétrico de 50,00

mL. Foram preparadas soluções-padrão a partir de diluições adequadas da solução estoque de bumetanida em uma solução de SDS 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1}.

b) Solução de *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC): Foi preparada uma solução 7,0 x 10^{-3} mol L^{-1} pela dissolução de 240,0 mg do sólido em 16,5 mL de solução de ácido clorídrico 9,8 x 10^{-1} mol L^{-1}, com agitação em banho de ultrassom durante 5 minutos. Esta solução foi quantitativamente transferida para balão volumétrico de 200,00 mL e seu volume completado com água desionizada.

II.4.2 Procedimento para preparo das amostras

II.4.2.1 Comprimidos

Vinte comprimidos de um mesmo lote da amostra comercial (amostra A) foram pesados em balança analítica. Determinou-se o valor da massa média dos comprimidos com variação menor que 5% na massa dos comprimidos[51]. Os comprimidos foram então pulverizados em gral de ágata até a obtenção de um pó fino. Foram pesados 0,9890g da amostra (porção equivalente a 1,0 mg de bumetanida), esta massa foi submetida à agitação e com 5,0 mL de uma mistura etanol : SDS 8,0 x 10^{-3} mol L^{-1} (1:1) em agitador magnético por 5 minutos. A solução foi filtrada em uma seringa comum contendo quantidades adequadas de algodão comum (massa $_{média}$=1,0286 g), esse método é baseado em TININIS et al[52]. O filtrado foi recolhido, transferido a um balão volumétrico de 10mL e o volume completado com a mistura etanol e SDS 8,0 x 10^{-3} mol L^{-1} (1:1). Foi tomada uma alíquota de 0,500 mL para que fosse preparada uma solução 5,00 mg L^{-1}.

II.4.2.2 Cápsulas

Foram pesadas individualmente vinte cápsulas de cada amostra (amostras B, C, D e E). Pesou-se cada cápsula inicialmente cheia e depois de esvaziada de seu conteúdo. O peso médio do conteúdo foi determinado pela diferença dos valores individuais obtidos pelas cápsulas cheias e vazias. Foram pesados 0,1125 g; 0,1020 g; 0,1013 g e 0,1148 g das amostras B, C, D e E (porção equivalente a 1,0 mg de bumetanida). Cada porção foi submetida à agitação com 5,0 mL de uma mistura etanol e SDS 8,0 x 10^{-3} mol L^{-1} (1:1) em agitador magnético por 5 minutos. A solução foi filtrada em uma seringa comum contendo quantidades adequadas de algodão comum (massa $_{média}$=1,0286 g), esse método é baseado em TININIS et al[52]. O filtrado foi recolhido, transferido a um balão volumétrico de 10,00 mL e o volume completado com a mistura etanol e SDS 8,00 x 10^{-3} mol L^{-1} (1:1). Foi tomada uma alíquota de 0,500 mL para que fosse preparada uma solução 5,00 mg L^{-1}.

II.4.3 Procedimento para análise de bumetanida em urina

Foi tomada uma amostra de uma pessoa saudável, que não fez uso deste medicamento. A amostra de urina coletada foi fortificada com quantidades conhecidas de padrão e na seqüência submetida a dois tratamentos: extração líquido-líquido e extração em fase sólida em cartucho de C_{18}.

II.4.3.1 Procedimento empregando extração líquido-líquido[53]

Um volume de 20 mL de urina a temperatura ambiente foi centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm na Centrífuga Excelsa Baby, modelo 208 N. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e transferido a um béquer de 20 mL. Uma alíquota de 5 mL foi tomada desta solução e fortificada com 5 mL de solução contendo bumetanida na concentração de 5,49 x 10^{-4} mol L^{-1} em acetato de etila. A amostra foi então extraída com 3 porções de 5 mL de acetato de etila em funil de separação de 125 mL. Em seguida a fase orgânica foi evaporada até a secura em chapa de aquecimento a 35ºC por uma hora. O resíduo contendo bumetanida foi retomado em uma mistura de etanol e SDS (1:1); transferido quantitativamente para um balão de 25,00 mL, sendo a concentração final de bumetanida de 1,10 x 10^{-4} mol L^{-1}. Diluições adequadas foram feitas para o preparo de soluções de concentração de 8,23 x 10^{-6} a 1,65 x 10^{-5} mol L^{-1}.

II.4.3.2 Procedimento empregando extração em fase sólida[54]

Um volume de 20 mL de urina a temperatura ambiente foi centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm na Centrífuga Excelsa Baby, modelo 208 N. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e transferido a um béquer de 20 mL. Uma alíquota de 1 mL foi tomada desta solução e fortificada com 1 mL de solução contendo bumetanida (2,06 x 10^{-4}; 2,74 x 10^{-4}; 3,43 x 10^{-4}; 4,12 x 10^{-4} mol L^{-1} ou 75, 100, 125 e 150 ppm) em mistura de etanol e SDS 1,00 x 10^{-2} mol L^{-1} (1:1). O cartucho de C_{18} (Bond Elut Jr. - Varian) foi previamente condicionado com 1 mL de metanol e 1 mL de água desionizada. Passou-

se a solução contendo amostra e bumetanida no cartucho, após isto foram extraídas 5 porções com 1 mL de água deionizada a fim de lavar e eliminar a matriz biológica. A bumetanida foi eluída com 1 mL de metanol e o resíduo levado à evaporação até a secura em chapa de aquecimento a 35ºC por uma hora. O resíduo contendo bumetanida foi retomado com a mistura de etanol e SDS 1,00 x 10^{-2} mol L^{-1} (1:24); transferido quantitativamente para um balão de 25,00 mL, sendo a concentração final de bumetanida de 8,23 x 10^{-6}; 1,09 x 10^{-5}; 1,37 x 10^{-5} e 1,65 x 10^{-5} mol L^{-1} (3,4,5 e 6 ppm).

II.5 Análise das amostras de medicamentos pelo método de referência[50]

A Farmacopéia Americana (USP)[50] recomenda a cromatografia líquida de alta eficiência para determinação quantitativa de bumetanida em medicamentos, operando em fase reversa com detecção ultravioleta (254 nm).

II.5.1 Soluções utilizadas

II.5.1.1 Preparo da fase móvel

A fase móvel utilizada foi uma solução contendo metanol, água, tetrahidrofurano e ácido acético glacial na proporção 50:45:5:2. Esta fase móvel foi filtrada em membrana de 0,45 µm sob vácuo e degaseificada através de borbulhamento de hélio por 30 minutos em banho de ultrassom.

II.5.1.2 Solução estoque de bumetanida

Inicialmente foi preparada uma solução contendo metanol, tetrahidrofurano e ácido acético glacial na proporção 86:10:4. Foi preparada uma solução 6,86 x 10^{-4} mol L^{-1} de bumetanida através da dissolução de 250,0 mg de bumetanida na solução preparada anteriormente. A solução de trabalho foi utilizada para o preparo das soluções de referência utilizadas para a construção da curva de calibração.

II.5.1.3 Preparo das amostras

Foram preparadas soluções estoque das amostras de forma que a concentração de bumetanida fosse 6,86 x 10^{-4} mol L^{-1}. Dessas soluções foram preparadas através de conveniente diluição, soluções com concentração de bumetanida igual a 1,37 x 10^{-4} mol L^{-1}. Antes das análises as soluções foram filtradas em filtros de 0,45µm (Millex-HV, Millipore). As amostras foram preparadas em triplicatas

III. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO.

III.1 Espectroscopia de reflectância difusa

III.1.1 Estudo e otimização das condições experimentais

Antes do desenvolvimento do trabalho, experimentos preliminares feitos em nosso laboratório com a reação de bumetanida com *p*-dimetilaminocinamaldeído em meio ácido sobre a superfície do papel de filtro demonstraram a formação de um produto colorido (cor de rosa), com valor máximo de A_R (densidade óptica para medida de reflectância) em 525 nm, como mostra a Figura 10.

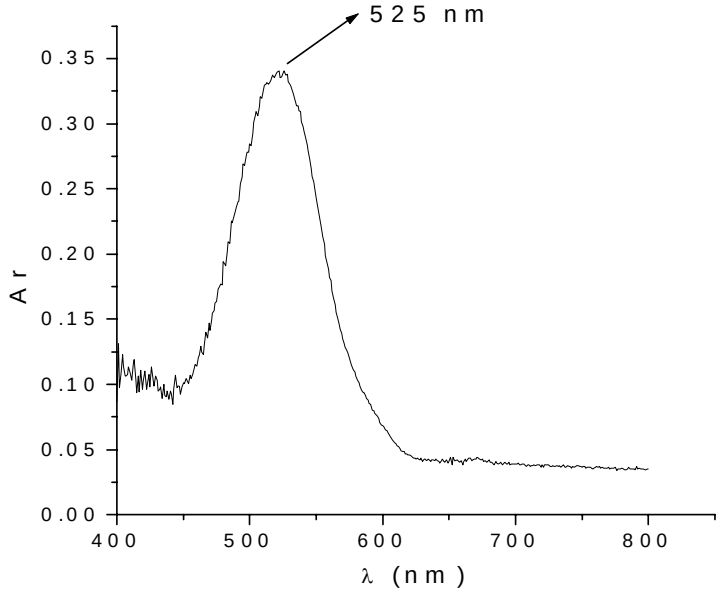
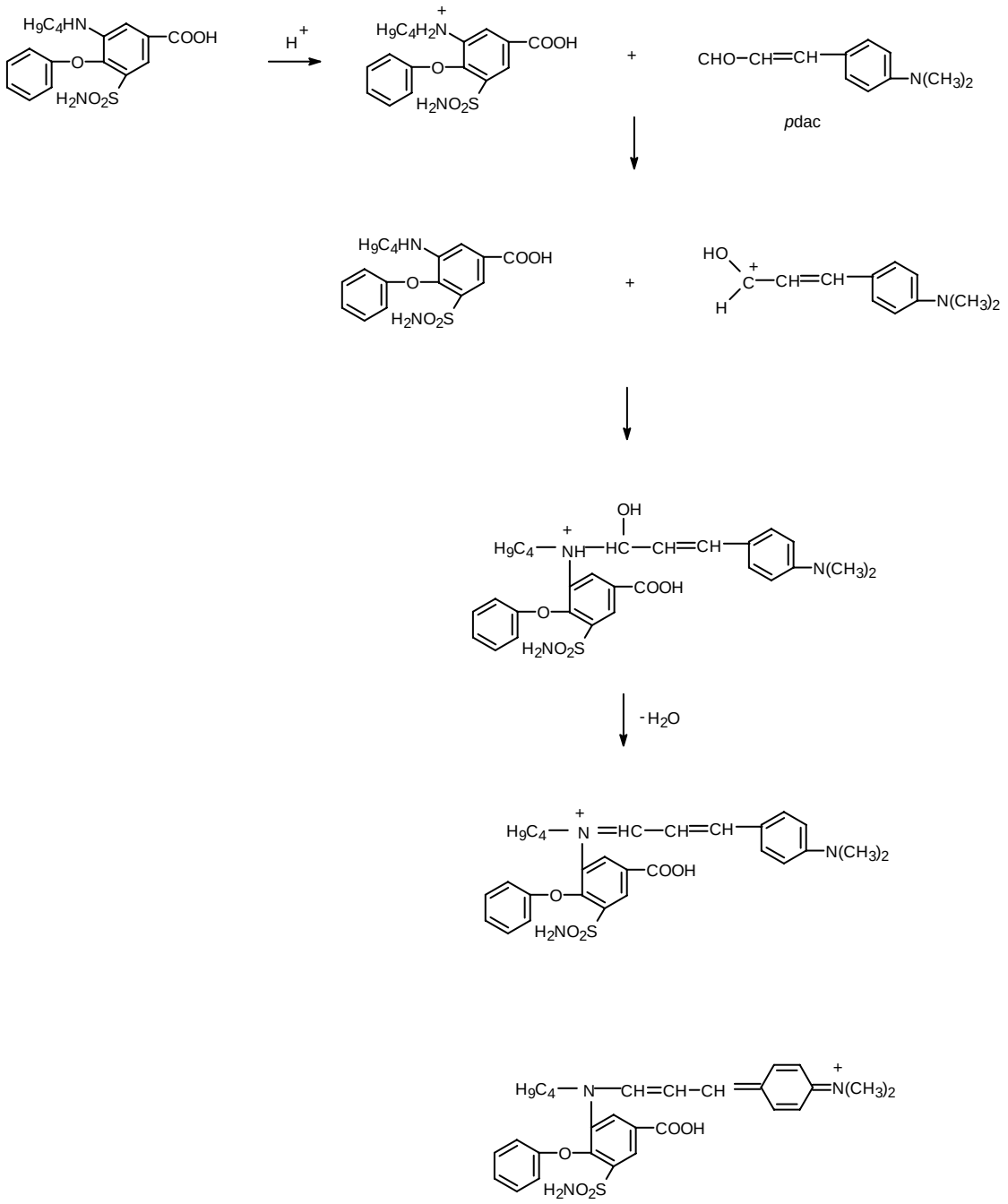


Figura 10. Espectro de reflectância da reação de *spot test* no papel de filtro entre *p*-DAC, ácido clorídrico e bumetanida. O valor máximo de A_R foi obtido em 525 nm. Concentração de bumetanida = 1,37 x 10^{-3} mol L^{-1}.

O *p*-DAC é um reagente analítico utilizado para a determinação espectrofotométrica de aminas aromáticas ou alifáticas, primárias ou secundárias. A reação entre aminas secundárias aromáticas e *p*-DAC ocorre através da condensação do grupo amino secundário protonado com o grupo carbonila do reagente para produzir o sal de imínio[55].

Na literatura há alguns métodos reportados para determinações espectrofotométricas utilizando o *p*-DAC. ZAWILLA et al[56] fazem a descrição de três métodos para determinação de aceclofenaco em medicamentos. Um destes métodos é baseado na reação entre aceclofenaco e *p*-DAC em meio metanólico acidificado, produzindo um complexo colorido estável após aquecimento a 75 ºC por 20 minutos. A faixa de concentração estudada foi de 20 a 100 ppm.

O mecanismo apresentado no Esquema 1 foi baseado em reações entre outras aminas secundárias aromáticas e *p*-DAC descritas na literatura[55, 57].



Esquema 1. Mecanismo sugerido para a reação entre bumetanida e *p*-DAC em meio ácido[55, 57].

III.1.2 Otimização dos fatores envolvidos na reação de spot test

Inicialmente foi feito um planejamento fatorial completo onde se realizou uma triagem das principais variáveis. Feito isto, a metodologia de superfície de resposta foi adotada para avaliar a relação existente entre essas variáveis e a medida de reflectância do produto colorido formado sobre a superfície do papel de filtro. Todos os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa Origin, versão 6.0.

III.1.2.1 Triagem das variáveis

Segundo JUNGREIS[29] a cor do *spot test* deve ser uniforme sobre toda a superfície a fim de assegurar medidas de reflectância repetitíveis. Para tanto, foram considerados fatores importantes: ordem e velocidade de adição dos reagentes, qualidade do papel de filtro utilizado e volume da solução adicionada. Para uma melhor obtenção de um *spot test* com sensibilidade analítica adequada, repetitível e uniforme as principais características que afetam o desenvolvimento da cor foram estudadas através de planejamentos experimentais adequados.

Inicialmente uma triagem das variáveis que afetam a reação de *spot test* foi feita. As variáveis do sistema foram selecionadas com base em conhecimentos prévios adquiridos em testes preliminares feitos em nosso laboratório onde foi constatado que a reação com *p*-DAC ocorre em meio de ácido clorídrico imediatamente após a adição das soluções sobre a superfície do papel de filtro.

Um primeiro planejamento fatorial completo (2^3) foi realizado no qual três variáveis consideradas importantes foram selecionadas e avaliadas em dois níveis

[baixo (-1) e alto (+1)]. O papel de filtro utilizado como suporte sólido foi sempre com a mesma área e qualidade. O volume de cada solução adicionada foi mantido fixo em 20 µL para cada solução. Os resultados obtidos para as medidas feitas em triplicata e as condições utilizadas estão ilustradas na Tabela 2.

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial completo para triagem das variáveis com os respectivos valores de A_R. Concentração de bumetanida = 2,74 x 10^{-3} mol L^{-1}

Número	Variáveis não codificadas			Variáveis codificadas			A_R ± SD[c]
	[Ácido Clorídrico][a]	[*p*-DAC][a]	OA[b]	[Ácido Clorídrico]	[*p*-DAC]	OA	
1	4,0 x 10^{-1}	1,7 x 10^{-2}	X	-	-	-	0,309±0,06
2	8,0 x 10^{-1}	1,7 x 10^{-2}	X	+	-	-	0,242±0,03
3	4,0 x 10^{-1}	3,3 x 10^{-2}	X	-	+	-	0,539±0,03
4	8,0 x 10^{-1}	3,3 x 10^{-2}	X	+	+	-	0,434±0,04
5	4,0 x 10^{-1}	1,7 x 10^{-2}	Y	-	-	+	0,463±0,02
6	8,0 x 10^{-1}	1,7 x 10^{-2}	Y	+	-	+	0,241±0,04
7	4,0 x 10^{-1}	3,3 x 10^{-2}	Y	-	+	+	0,263±0,01
8	8,0 x 10^{-1}	3,3 x 10^{-2}	Y	+	+	+	0,552±0,01

[a] mol L^{-1}
[b] ordem de adição dos reagentes: **X**= bumetanida, H^+, *p*-DAC e **Y**= *p*-DAC, H^+, bumetanida
[c] desvio padrão

A Figura 11 apresenta os efeitos estimados dos fatores investigados e suas interações. De acordo com a Figura 11, a variável mais importante é a ordem de adição dos reagentes, com um efeito de sinal positivo, indicando que uma melhor resposta é obtida quando esta variável está ajustada no nível alto (+1). A partir desses resultados a ordem de adição dos reagentes pôde ser fixada no nível alto (+1) e foi observado que melhores resultados seriam obtidos se a concentração de ácido clorídrico fosse igual ou

inferior a 4,2 x 10^{-1} mol L^{-1}. Para continuar a otimização, passou-se a analisar as concentrações de ácido clorídrico e *p*-DAC a serem utilizadas.

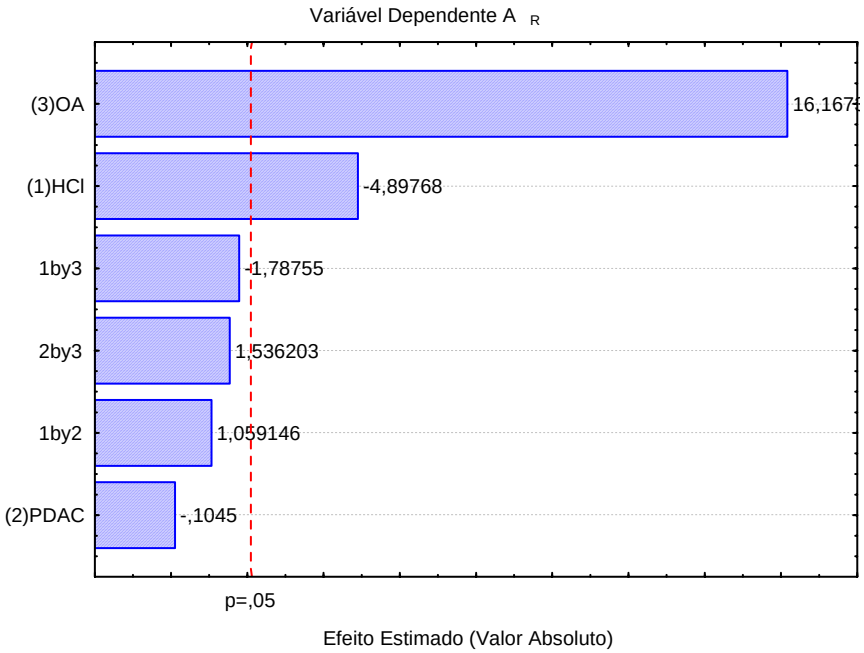


Figura 11. Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas

A partir desses resultados a ordem de adição dos reagentes pôde se fixada no nível alto (+) e observou-se que melhores resultados seriam obtidos se a concentração de ácido clorídrico fosse igual ou inferior a 4,2 x 10^{-1} mol L^{-1}. Para continuar a otimização. Passamos a enfocar o efeito da concentração de ácido clorídrico e a concentração de *p*-DAC a ser utilizada.

III.1.2.2 Metodologia de superfície de resposta

De acordo com os resultados obtidos no estudo para triagem das variáveis construiu-se a superfície de resposta para modelagem e análise da forma com que a

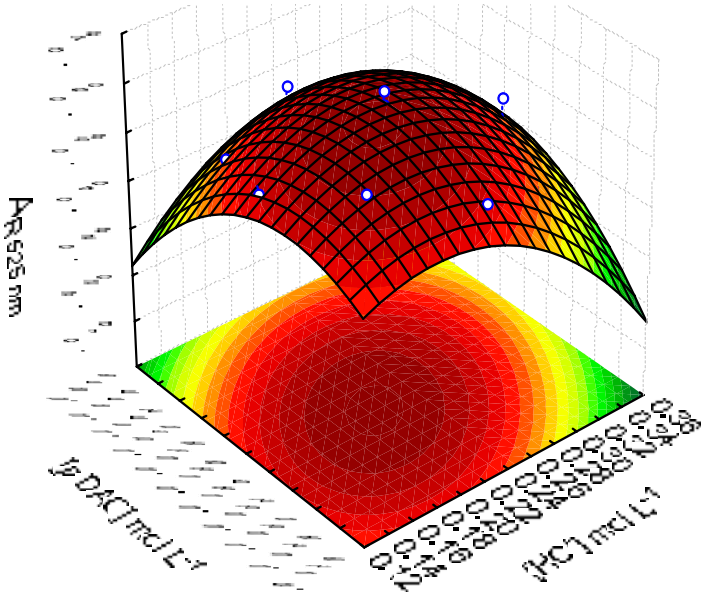
resposta de interesse (medida de reflectância do produto colorido) é simultaneamente influenciada pelas variáveis: concentração de *p*-DAC e concentração de ácido clorídrico através de um planejamento composto central cuja matriz está representada na Tabela 3. Realizados os ensaios do planejamento composto central. Na Tabela 3 está representada a matriz utilizada e seus respectivos valores de reflectância.

Tabela 3. Matriz do planejamento composto central e os respectivos valores de A_R Concentração de bumetanida = 2,74 x 10^{-3} mol L^{-1}

Ensaio	**Variáveis não codificadas**		**Variáveis codificadas**		**$A_{R\ 525\ nm}$**
	[Ácido clorídrico] [a]	**[*p*-DAC] [a]**	**[Ácido clorídrico]**	**[*p*-DAC]**	
1	1,7 x 10^{-1}	3,0 x 10^{-2}	-	-	0,584
2	3,1 x 10^{-1}	3,0 x 10^{-2}	+	-	0,421
3	1,7 x 10^{-1}	4,2 x 10^{-2}	-	+	0,453
4	3,1 x 10^{-1}	4,2 x 10^{-2}	+	+	0,436
5	2,4 x 10^{-1}	3,6 x 10^{-2}	0	0	0,582
6	2,4 x 10^{-1}	3,6 x 10^{-2}	0	0	0,611
7	1,4 x 10^{-1}	3,6 x 10^{-2}	-1,41	0	0,517
8	3,4 x 10^{-1}	3,6 x 10^{-2}	+1,41	0	0,480
9	2,4 x 10^{-1}	2,8 x 10^{-2}	0	-1,41	0,528
10	2,4 x 10^{-1}	4,5 x 10^{-2}	0	+1,41	0,485

[a] mol L^{-1}

Na Figura 12 está relatada a superfície de resposta juntamente com sua respectiva curva de nível, nela a região do valor máximo de reflectância está situada na área mais escura do gráfico, que representa as condições experimentais ótimas para a realização da reação de *spot test*. Nesta região encontra-se também o ponto central do planejamento.



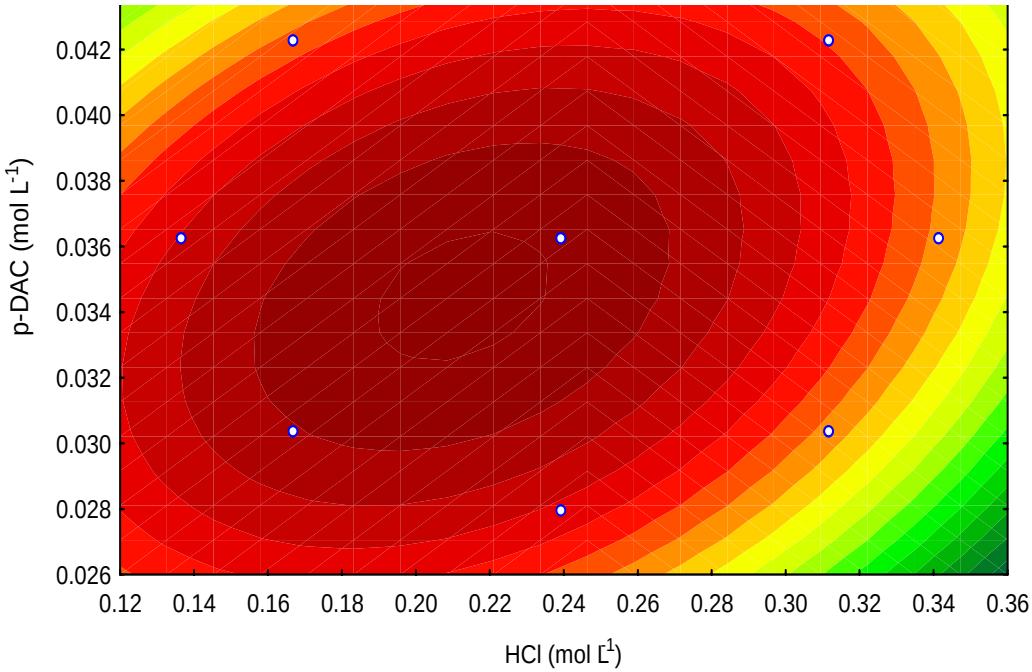


Figura 12. Superfície de resposta otimizada com sua respectiva curva de nível para a medida de reflectância em 525 nm em função das variáveis: concentração de *p*-DAC (mol L^{-1}) e concentração de ácido clorídrico (mol L^{-1}). Foi feita a adição de 20µL de bumetanida = 2,74 x 10^{-3} mol L^{-1}.

Após a realização de toda a análise estatística dos dados e definida a superfície de resposta determinou-se que as melhores condições experimentais seriam: concentração de *p*-DAC de 3,4 x 10^{-2} mol L^{-1} e concentração de ácido clorídrico de 2,1 x 10^{-1} mol L^{-1}.

Foram realizados experimentos em replicata (n=4) nas condições experimentais determinadas pelo modelo matemático para se verificar a concordância entre o resultado obtido com àquele calculado pelo programa. O resultado predito pelo modelo matemático de A_R foi 0,606, o valor encontrado experimentalmente foi 0,578 ± 0,008 (R.S.D. = 1,5%), a um nível de confiança de 95,0%. Feito isso, adotou-se então a concentração de *p*-DAC de 3,4 x 10^{-2} mol L^{-1} e concentração de ácido clorídrico de 2,1 x 10^{-1} mol L^{-1}.

III.1.2 Estudo da estabilidade óptica da reação

Foi realizado um estudo para determinação da estabilidade óptica do produto colorido formado da reação entre *p*-DAC e bumetanida, para tanto, foi feita uma reação de *spot test* sobre a superfície de um papel de filtro e medido o valor da medida de reflectância em 525 nm durante 60 minutos, em intervalos de 5 minutos. Na Tabela 4 estão representados os resultados obtidos neste estudo. Observa-se que não houve diferença significativa nos valores de A_R medidos durante o período de estudo, indicando a estabilidade óptica do produto formado na reação de *spot test* entre *p*-DAC e bumetanida, por pelo menos 60 minutos. A reflectância foi medida após 24 horas e se mostrou estável apresentando um desvio padrão relativo de 1,4%.

A Figura 13 representa os resultados da Tabela 4, de modo a facilitar a visualização do período da estabilidade da reação.

Tabela 4. Valores de reflectância para a reação entre *p*-DAC (3,4 x 10^{-2} mol L^{-1}), HCl (2,1 x 10^{-1} mol L^{-1}) e bumetanida (2,74 x 10^{-3} mol L^{-1}).

Tempo (minutos)	**Ar $_{525\ nm}$**
5	0,582
10	0,608
15	0,603
20	0,591
25	0,600
30	0,599
35	0,591
40	0,589
45	0,574
50	0,576
55	0,577
60	0,574

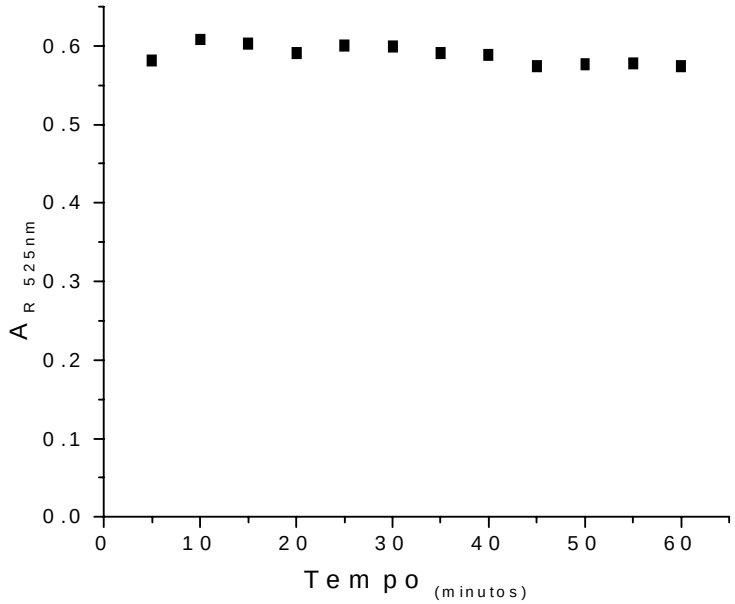


Figura 13. Estudo da estabilidade óptica do produto formado entre *p*-DAC e bumetanida em meio ácido. Condições: 20µL de *p*-DAC 3,4 x 10^{-2} mol L^{-1}; 20µL de ácido clorídrico 2,1 x 10^{-1} mol L^{-1} e 20 µL de solução de bumetanida = 2,74 x 10^{-3} mol L^{-1}.´

III.1.3 Construção da curva analítica

Feita a otimização das condições experimentais, efetuou-se a construção da curva analítica. Para tanto, a partir da solução descrita no item II.3.1-a foram tomadas alíquotas de 0,250; 0,500; 1,00; 1,50; 2,00 e 2,50 mL para balões volumétricos de 5,00 mL e completados com metanol, a fim de se obter concentrações de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mg L^{-1} (1,37 x 10^{-4} a 1,37 x 10^{-3} mol L^{-3}).

A solução de *p*-DAC 3,4 x 10^{-2} mol L^{-1} (reagente cromogênico) e de ácido clorídrico foram preparadas segundo o item II.3.1-b e c. Para a realização do *spot test* foi adicionado 20µL de *p*-DAC 3,4 x 10^{-2} mol L^{-1}, 20µL de HCl 2,1 x 10^{-1} mol L^{-1} e 20µL da solução contendo o analito. Um branco segundo o mesmo procedimento foi

preparado, porém sem o analito de interesse. As medidas de reflectância foram feitas em 525 nm, os resultados estão apresentados na Tabela 5.

A curva analítica, construída em triplicata, está representada na Figura 14, mostrando uma relação linear entre $A_{R\ 525\ nm}$ e a concentração de bumetanida no intervalo de 1,37 x 10^{-4} a 1,37 x 10^{-3} mol L^{-1} com um bom coeficiente de correlação (r=0,999). O mesmo procedimento aplicado para preparar as amostras foi feito para a solução estoque de bumetanida utilizada para a construção da curva analítica, não foi observada diferenças nos valores de reflectância medidos quando se aplicou o procedimento de preparo das amostras, indicando que não há perdas do analito durante o preparo das amostras.

A equação matemática que descreve a relação linear obtida é dada por: A_R = 0,0499 + 289,2 x C, onde C é a concentração de bumetanida em mol L^{-1}.

Para avaliar a precisão do método desenvolvido estudos de repetibilidade foram feitos. Para isto, análises em replicata (n=10) foram realizadas em uma mesma amostra contendo 1,92 x 10^{-4} mol L^{-1} de bumetanida para avaliar a precisão intradia, já para o estudo da precisão interdia a mesma amostra foi analisada durante três dias consecutivos. Os resultados obtidos, em termos de desvio padrão relativo (R.S.D.) foram de 0,4% para o estudo intradia e 1,4% para o estudo interdia.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados segundo as recomendações da IUPAC[58-59]. O limite de detecção pode ser calculado de acordo com a seguinte expressão: LOD = 3 x SD^{branco} /inclinação da curva analítica, já o limite de quantificação pode ser calculado de acordo com a expressão: LOQ = 10 x SD^{branco} /inclinação da curva analítica. Foram realizadas medidas de reflectância do

branco em replicatas (n=10). Os valores encontrados foram 3,98 x 10^{-5} mol L^{-1} para o LOD e 1,33 x 10^{-4} mol L^{-1} para o LOQ.

Tabela 5. Valores de reflectância obtidos na construção da curva analítica para determinação de bumetanida através da reação com *p*-DAC (3,4 x 10^{-2} mol L^{-1}) e HCl (2,1 x 10^{-1} mol L^{-1}) em suporte sólido (papel de filtro).

[bumetanida] 10^{-3} (mol L^{-1})	$A_{R\ 525nm}$
0,137	0,082
0,274	0,129
0,549	0,219
0,823	0,285
1,09	0,366
1,37	0,443

A Figura 14 apresenta o tratamento matemático das medidas de reflectância a fim de verificar a linearidade da curva analítica obtida a partir dos resultados apresentados na Tabela 5.

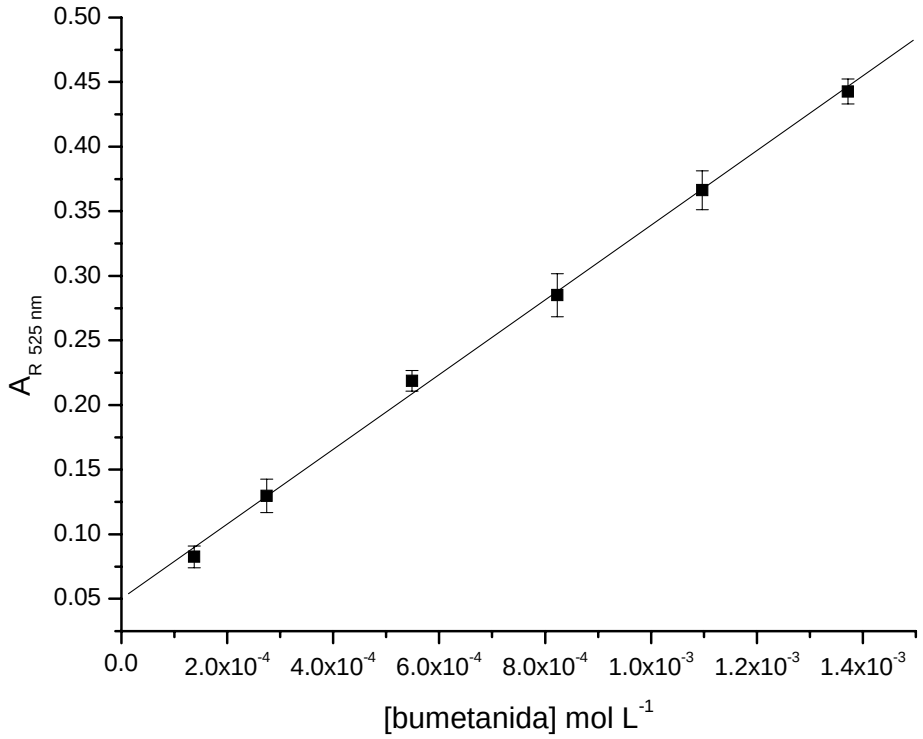


Figura 14. Curva analítica com sua respectiva regressão linear obtida após o tratamento matemático dos resultados apresentados na Tabela 5.

III.1.4 Resumo dos resultados

A Tabela 6 apresenta os principais parâmetros otimizados e características do método desenvolvido.

Tabela 6. Resumo e características do método desenvolvido.

Parâmetro	
Concentração de *p*-DAC [mol L^{-1}]	$3,4 \times 10^{-2}$
Concentração de HCl [mol L^{-1}]	$2,1 \times 10^{-1}$
Intervalo de linearidade (mol L^{-1})	$1,37 \times 10^{-4}$ a $1,37 \times 10^{-3}$
Coeficiente de correlação (r)	0,999
Coeficiente angular	289
Coeficiente linear	0,050
λ máx (nm)	525
Estabilidade óptica do produto formado (min)	Pelo menos 60
Limite de detecção (mol L^{-1})	$3,98 \times 10^{-5}$
Limite de quantificação (mol L^{-1})	$1,33 \times 10^{-4}$

III.1.5 Estudo dos interferentes

O efeito de interferentes em potencial na determinação de bumetanida em medicamentos foi avaliado para excipientes normalmente presentes em amostras comerciais. Nestes experimentos foram utilizadas soluções de referência de bumetanida na concentração de $8,23 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} às quais se adicionou interferente (amido de milho, lactose, dióxido de silício, polivinilpirrolidona, estearato de magnésio e talco) em concentrações igual e 10 vezes superior daquela de bumetanida (em massa). As soluções de *p*-DAC $3,4 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} e HCl $2,1 \times 10^{-1}$ mol L^{-1} foram preparadas conforme descrito no item II.3.1-b e c. As soluções de bumetanida contendo interferente, em que não houve dissolução total do interferente, foram filtradas em uma bola de algodão, antes de ser retirada a alíquota para a reação.

No experimento adicionou-se 20µL de *p*-DAC (3,4 x 10^{-2} mol L^{-1}), 20µL de HCl (2,1 x 10^{-1} mol L^{-1}) e 20µL de solução de bumetanida contendo interferente. Caso o sinal de reflectância sofresse um erro igual ou maior a 5% na determinação do fármaco a presença de interferência seria considerada. A porcentagem de bumetanida encontrada nas soluções adicionadas foi de 96,2 a 104%, com coeficiente de variação menor que 3% para três repetições, constatando que nenhuma interferência significativa foi observada a partir desses excipientes, sob as condições estudadas.

III.1.6 Análise das amostras comerciais

A partir da cada solução contendo amostra preparada segundo os itens II.3.2.1 e II.3.2.2 foi feita a reação em papel de filtro, reagindo 20µL de *p*-DAC (3,4 x 10^{-2} mol L^{-1}), 20µL de HCl (2,1 x 10^{-1} mol L^{-1}) e 20µL da solução contendo amostra. Um branco também foi preparado. A reflectância foi medida em 525nm. Realizaram-se 3 repetições em cada análise.

Os resultados obtidos estão representados na Tabela 7, os quais estão em excelente concordância com os resultados obtidos nas análises das amostras pelo método oficial, recomendado pela USP. O método desenvolvido é exato, preciso podendo ser aplicado na determinação de bumetanaida em medicamentos.

Tabela 7. Determinação de bumetanida em formulações farmacêuticas comerciais.

Amostras[a]	Método Proposto			CLAE [50]
	Encontrado[b]	t-valor (2,78)[c]	F-valor (19,00)[c]	Encontrado[b]
A	0,992±0,008	2,12	1,77	1,000±0,006
B	0,989±0,004	2,00	11,11	1,000±0,007
C	0,998±0,004	0,76	1,90	1,000±0,006
D	0,988±0,009	2,50	12,13	1,010±0,003
E	1,000±0,010	0,50	1,98	1,000±0,007

[a] Valor Declarado: 1 mg bumetanida/comprimido.
[b] Média ± Desvio padrão (DP), n = 3.
[c] Valores teóricos de t e F em nível de confiança de 95%.

A verificação de eventuais efeitos de matriz foi estudada via método adição de padrão, onde quantidades conhecidas de bumetanida pura (padrão analítico) foram adicionadas a três amostras pré-analisadas, foram adicionados os equivalentes a 0, 50, 100 e 150% da quantidade de bumetanida presente. Os resultados encontrados apresentam médias de recuperação entre 98,0 a 102%, indicando a ausência de efeitos de matriz significativos. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos nesse estudo.

Tabela 8. Resultados de recuperação de bumetanida adicionada nas formulações farmacêuticas.

Amostra	**[bumetanida] adicionada mol L^{-1}**	**[bumetanida] encontrada[a] mol L^{-1}**	**R.S.D.[b]**	**% R[c]**
Burinax	----	$1,92 \times 10^{-4}$	----	----
	$9,61 \times 10^{-5}$	$9,55 \times 10^{-5}$	1,82	99,5
	$1,92 \times 10^{-4}$	$1,91 \times 10^{-4}$	0,753	99,7
	$3,84 \times 10^{-4}$	$3,85 \times 10^{-4}$	1,43	100
Manipulada B	----	$1,91 \times 10^{-4}$	----	----
	$9,61 \times 10^{-5}$	$9,56 \times 10^{-5}$	2,65	99,6
	$1,92 \times 10^{-4}$	$1,93 \times 10^{-4}$	1,34	101
	$3,84 \times 10^{-4}$	$3,84 \times 10^{-4}$	0,323	99,9
Manipulada C	----	$1,92 \times 10^{-4}$	----	----
	$9,61 \times 10^{-5}$	$9,41 \times 10^{-5}$	1,02	98,0
	$1,92 \times 10^{-4}$	$1,94 \times 10^{-4}$	0,243	101
	$3,84 \times 10^{-4}$	$3,91 \times 10^{-4}$	1,54	102

[a] média de 3 determinações

[b] R.S.D.: desvio padrão relativo

[c] R: recuperação

III.1.7 Conclusões

Este trabalho demonstrou pela primeira vez, que a espectroscopia de reflectância difusa associada ao emprego de *spot test*s quantitativos pode ser utilizada com sucesso no controle de qualidade de formulações farmacêuticas contendo bumetanida. Para otimização do experimento foram feitos um planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta. Assim pôde-se determinar as condições experimentais ótimas para realização dos experimentos, onde foram estabelecidas condições para obter um valor máximo de reflectância.

Foram observadas uma boa linearidade e ausência de interferência significativa dos excipientes comumente presentes nas formulações farmacêuticas. O método desenvolvido foi aplicado na determinação de bumetanida em formulações farmacêuticas com bons resultados quando comparados ao método da Farmacopéia Americana. O método apresentou também boa sensibilidade analítica, boa repetibilidade e de acordo com os testes estatísticos, boa precisão e exatidão.

III.2. Análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica

III.2.1. Verificação do efeito do SDS sobre a reação proposta

Para melhoria da sensibilidade analítica sistemas envolvendo surfactantes têm sido comumente usados, pois seu uso está relacionado à formação de micelas que são capazes de mudar o equilíbrio, propriedades espectrais e a cinética de reações[60, 61].

Seu efeito catalítico tem sido objeto de estudo em reações de condensação de aldeídos como *p*-DAC com aminas[62].

Antes do desenvolvimento do trabalho, experimentos preliminares foram feitos em nosso laboratório objetivando o estudo da reação entre bumetanida, *p*-DAC em meio de ácido clorídrico e o surfactante Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Para tanto, as soluções de reagentes foram adicionadas em balões volumétricos de 5,00 mL de acordo com a Tabela 9. Os volumes dos balões volumétricos foram completados com água desionizada até o menisco.

Tabela 9. Verificação do efeito da presença de SDS sobre a reação colorimétrica proposta.

Balão	**Bumetanida[a] (mL)**	***p*-DAC/HCl[b] (mL)**	**SDS[c] (mL)**	**A $_{520nm}$[e]**
1a	0,025	1,00	0,500	0,959
1b[d]	-----	1,00	0,500	-----
2[a]	0,025	1,00	----	0,202
2b[d]	-----	1,00	----	-----

[a] bumetanida 2,75 x 10^{-3} mol L^{-1};
[b] p-DAC 3,3 x 10^{-2} mol L^{-1} preparado em HCl 2,2 x 10^{-1} mol L^{-1};
[c] SDS 0,10 mol L^{-1};
[d] Brancos analíticos
[e] Absorbância medida no tempo de 482 segundos (8 minutos)

Segundo os testes, pôde-se verificar que a reação ocorre instantaneamente após a adição do SDS, resultando em um produto de coloração laranja bem intenso, porém para uma mesma concentração de bumetanida (1,37 x 10^{-5} mol L^{-1} após a diluição) a coloração da solução foi visivelmente menos intensa quando o SDS não foi adicionado. Na Figura 15 está representada uma comparação onde também foi realizado um estudo

da estabilidade óptica dos produtos formados. As leituras foram feitas a cada 2 minutos, durante 60 minutos.

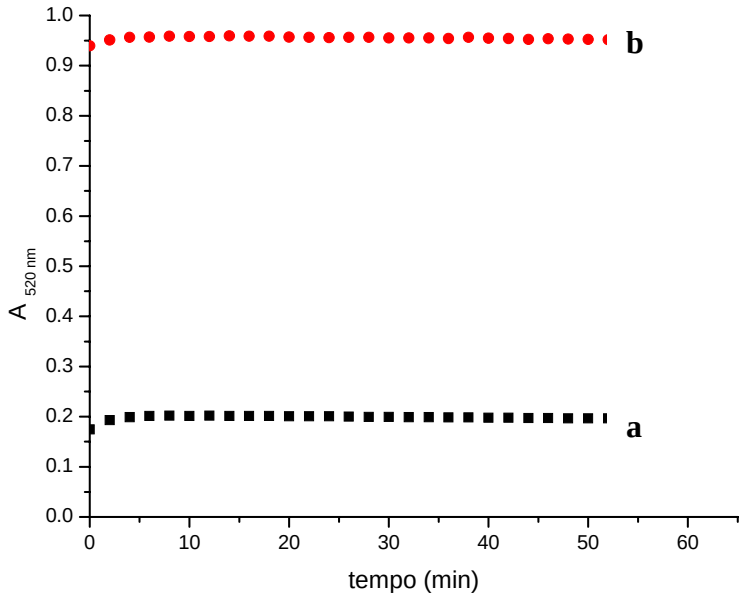


Figura 15. Estudo da estabilidade e comparação do uso de SDS. a: sem adição de SDS, b: com adição de SDS.

A partir da análise da Figura 15 é evidente o aumento significativo na sensibilidade da reação quando foi utilizado meio micelar (SDS). Nesta condição uma absorbância de 0,959 foi obtida em 520 nm, enquanto que uma absorbância de 0,202 foi obtida no meio reacional em que não foi adicionado SDS. Estes valores indicam um aumento de 4,75 vezes na sensibilidade analítica, utilizando-se meio micelar (SDS) para a promoção da reação colorimétrica proposta. A partir desses resultados passou-se a estudar qual seria a concentração ideal de SDS na reação através do planejamento de experimentos.

III.3. Análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica – sistema em confluência

III.3.1 Estudo e otimização das condições experimentais

Para a otimização do procedimento de análise por injeção em fluxo proposto para determinação de bumetanida os parâmetros do sistema em fluxo e as variáveis químicas foram investigados separadamente para facilitar a execução dos experimentos. Desta forma as variáveis do sistema em fluxo (rotação da bomba, volume da alça de amostragem e tamanho da bobina reacional) foram inicialmente otimizadas e na seqüência as variáveis químicas (concentrações de SDS, *p*-DAC e HCl) foram otimizadas. O procedimento de otimização foi realizado utilizando-se dois tipos de planejamento de experimentos: um planejamento fatorial para definição das variáveis mais significativas, e o planejamento composto central para a obtenção da superfície de resposta onde uma condição experimental ótima para a realização dos experimentos pode ser determinada.

III.3.1.1 Otimização das variáveis no sistema de FIA

III.3.1.1.1 Triagem das variáveis

Inicialmente um planejamento fatorial completo com as variáveis: rotação da bomba, volume da alça de amostragem e tamanho da bobina reacional foi feito. Neste estudo as concentrações dos reagentes envolvidos e de bumetanida foram mantidas constantes. As concentrações foram selecionadas de acordos com testes preliminares feitos em nosso laboratório. Os melhores resultados foram obtidos quando a amostra

(bumetanida 1,37 x 10^{-5} mol L^{-1}) foi injetada através da válvula de injeção no fluxo transportador de SDS (1,0 x 10^{-2} mol L^{-1}) então combinada com o fluxo do reagente *p*-DAC 8,4 x 10^{-3} mol L^{-1} preparado em HCl 4,4 x 10^{-2} mol L^{-1} através de uma confluência. A Tabela 10 apresenta as variáveis experimentais selecionadas e os respectivos valores de A para as medidas em triplicata.

Tabela 10. Matriz do planejamento fatorial completo para triagem das variáveis com os respectivos valores de A. Concentração de bumetanida = 1,37 x 10^{-5} mol L^{-1}

Número	Variáveis não codificadas			Variáveis codificadas			A_{520nm}[d]
	Rotação[a]	Alça[b]	Bobina[c]	Rotação	Alça	Bobina	
1	10	250	80	-1	-1	-1	0,321± 4,4x10^{-4}
2	15	250	80	+1	-1	-1	0,263± 3,1x10^{-4}
3	10	500	80	-1	+1	-1	0,457± 2,0x10^{-3}
4	15	500	80	+1	+1	-1	0,359± 1,0x10^{-3}
5	10	250	140	-1	-1	+1	0,387± 8,2x10^{-4}
6	15	250	140	+1	-1	+1	0,352± 4,1x10^{-4}
7	10	500	140	-1	+1	+1	0,500± 5,2x10^{-4}
8	15	500	140	+1	+1	+1	0,436± 7,9x10^{-4}

[a] rpm (rotações por minuto)
[b] μL
[c] cm
[d] média + desvio padrão de três determinações

A Figura 16 apresenta o gráfico dos efeitos estimados e suas interações. De acordo com o Gráfico de Pareto apresentado na figura abaixo, a variável mais importante é o volume da alça de amostragem e o tamanho da bobina reacional, devendo estes ser aumentados. Segundo o planejamento, a rotação da bomba deveria ser diminuída, porém isso acarretaria em um grande tempo de análise, pois desta forma o sistema ficaria muito lento, sendo então a mesma, fixada no nível mais alto (+1) em

15 rpm. Para continuar a otimização passou-se a analisar o volume da alça de amostragem e o tamanho da bobina de reação.

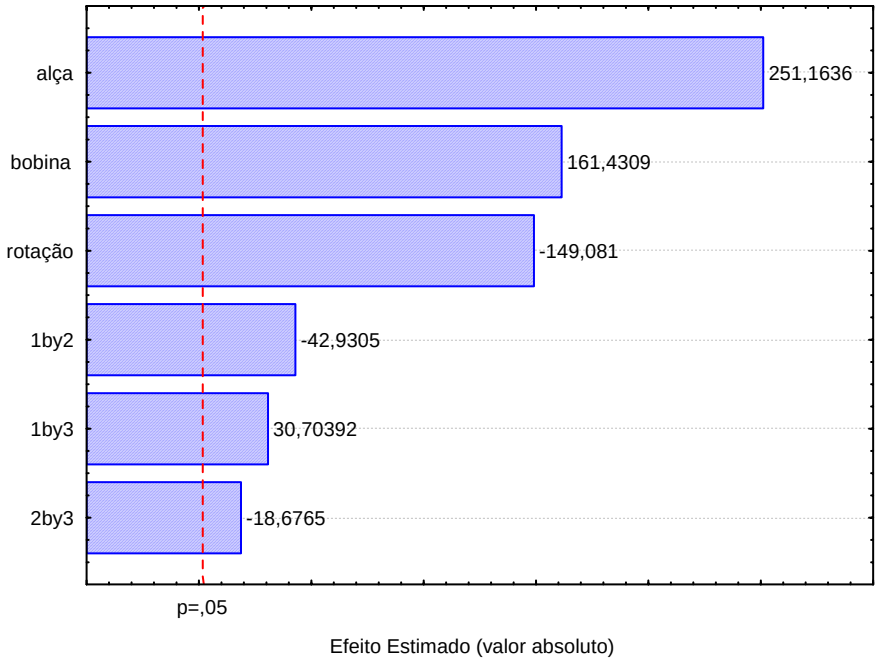


Figura 16. Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas

III.3.1.1.2 Metodologia de superfície de resposta

Para continuar a otimização das condições experimentais, passou-se a analisar o volume da alça de amostragem e o tamanho da bobina de reação simultaneamente e seu efeito sobre a variável resposta (medida de absorbância), para tanto um planejamento composto central foi feito. A matriz está representada na Tabela 11, juntamente com as variáveis estudadas, seus respectivos níveis (codificados e não codificados) e os respectivos valores de A.

Tabela 11. Matriz experimental do planejamento composto central. Concentração de bumetanida = 1,37 x 10^{-5} mol L^{-1}

Ensaio	Variáveis não codificadas		Variáveis codificadas		A 520 nm
	Alça[a]	Bobina[b]	Alça	Bobina	
1	747	127	-1	-1	0,392
2	960	127	+1	-1	0,394
3	747	163	-1	+1	0,404
4	960	163	+1	+1	0,437
5	853	145	0	0	0,424
6	853	145	0	0	0,430
7	853	145	0	0	0,424
8	853	145	0	0	0,432
9	703	145	-1,41	0	0,376
10	1000	145	+1,41	0	0,411
11	853	120	0	-1,41	0,381
12	853	170	0	+1,41	0,425

[a] µL

[b] cm

Na Figura 17 está relatada a superfície de resposta juntamente com sua respectiva curva de nível, nela a região do valor máximo de absorbância está situada na área mais escura do gráfico, que representa as condições experimentais ótimas para a reação. Nesta região encontra-se também o ponto central do planejamento.

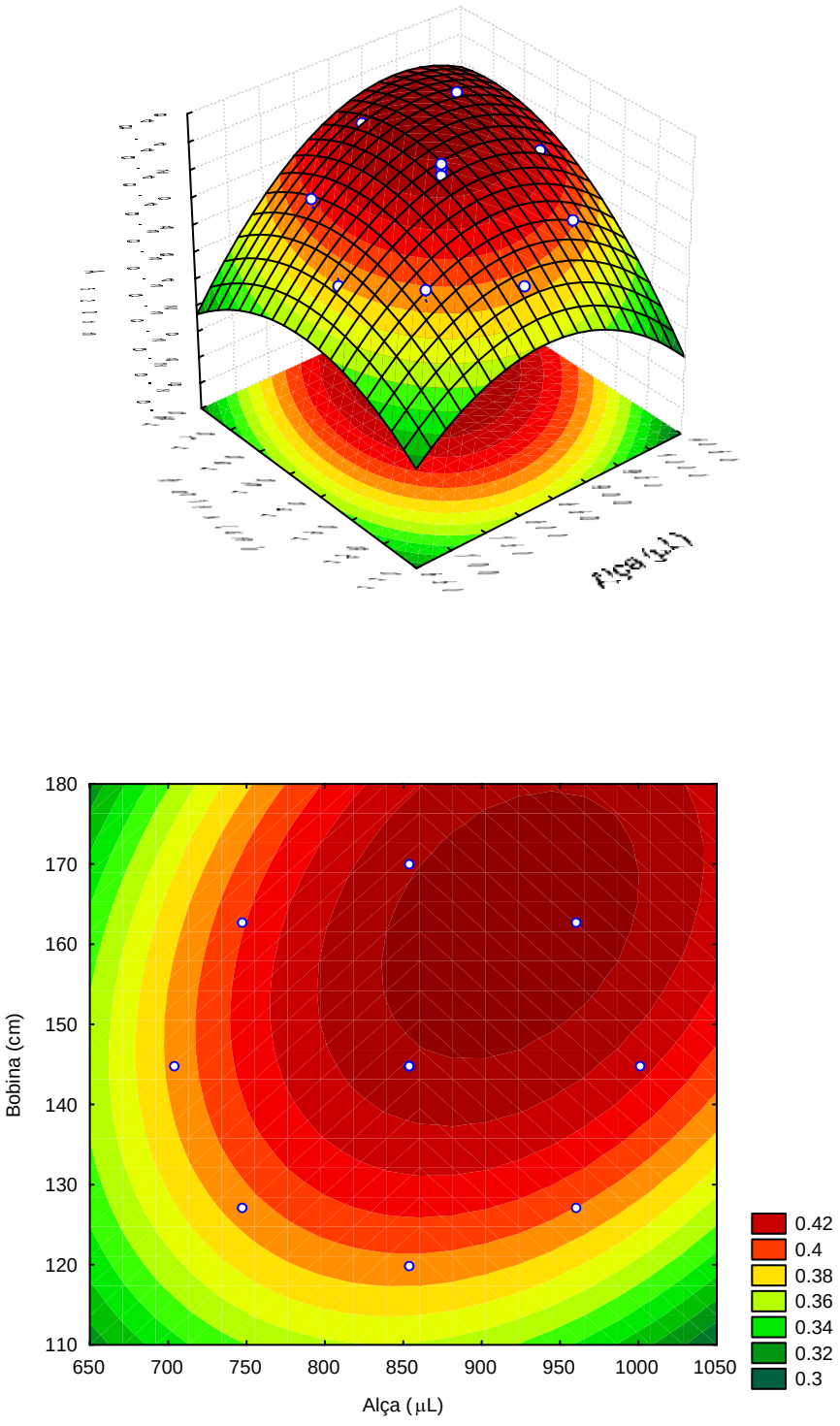


Figura 17. Superfície de resposta otimizada com sua respectiva curva de nível para medida de absorbância em 520 nm em função das variáveis: volume da alça de amostragem (µL) e tamanho da bobina de reação (cm).Concentração de bumetanida utilizada =1,37 x 10^{-5} mol L^{-1}.

Após a realização de toda a análise estatística dos dados e definida a superfície de resposta determinou-se que as melhores condições experimentais seriam: volume da alça de amostragem = 918 µL e tamanho da bobina de reação = 163 cm.

Foram realizados experimentos em replicata (n=4) nas condições experimentais determinadas pelo modelo matemático para se verificar a concordância entre o resultado obtido àquele calculado pelo programa. O resultado predito pelo modelo matemático foi 0,438 e o encontrado experimentalmente foi 0,382 ± 1,93 x 10^{-3} (R.S.D. = 0,5%), a um nível de confiança de 95%.

III.3.1.2 Variáveis Químicas

III.3.1.2.1 Triagem das variáveis

As variáveis químicas que afetam a reação entre bumetanida e p-DAC em meio micelar e ácido clorídrico diluído foram inicialmente estudadas fazendo-se um planejamento fatorial completo para as três variáveis em dois níveis [baixo (-1) e alto (+1)]. As variáveis experimentais selecionadas e os respectivos valores de A para as medidas em triplicata estão ilustradas na Tabela 12.

Tabela 12. Matriz do planejamento fatorial completo para triagem das variáveis com os respectivos valores de A. Concentração de bumetanida = 2,74 x 10^{-5} mol L^{-1}

Ensaio	Váriáveis em seus níveis reais			Variáveis codificadas			A_{520nm} ± SD[a]
	[HCl] mol L^{-1}	[*p*-DAC] mol L^{-1}	[SDS] mol L^{-1}	[HC]	[*p*-DAC]	[SDS]	
1	2,4 x 10^{-2}	4,5x10^{-3}	1,0 x 10^{-2}	-1	-1	-1	0,409 ± 0,001
2	4,8 x 10^{-2}	4,5 x10^{-3}	1,0 x 10^{-2}	+1	-1	-1	0,541 ± 0,002
3	2,4 x 10^{-2}	5,6 x10^{-3}	1,0 x 10^{-2}	-1	+1	-1	0,416 ±0,002
4	4,8 x 10^{-2}	5,6 x10^{-3}	1,0 x 10^{-2}	+1	+1	-1	0,568 ± 0,009
5	2,4 x 10^{-2}	4,5 x10^{-3}	2,0 x 10^{-2}	-1	-1	+1	0,251 ± 0,014
6	4,8 x 10^{-2}	4,5 x10^{-3}	2,0 x 10^{-2}	+1	-1	+1	0,350 ± 0,004
7	2,4 x 10^{-2}	5,6 x10^{-3}	2,0 x 10^{-2}	-1	+1	+1	0,267 ± 0,004
8	4,8 x 10^{-2}	5,5 x10^{-3}	2,0 x 10^{-2}	+1	+1	+1	0,392 ± 0,008

[a] média + desvio padrão de três determinações

A Figura 18 apresenta o gráfico dos efeitos estimados e suas interações. De acordo com o gráfico, as variáveis mais importantes são a concentração de SDS e de ácido clorídrico, devendo a concentração de SDS ser diminuída e a de HCl aumentada. A variável menos importante, a concentração de *p*-DAC foi fixada em 5,6 x 10^{-3} mol L^{-1}, isto é, no nível alto (+1).

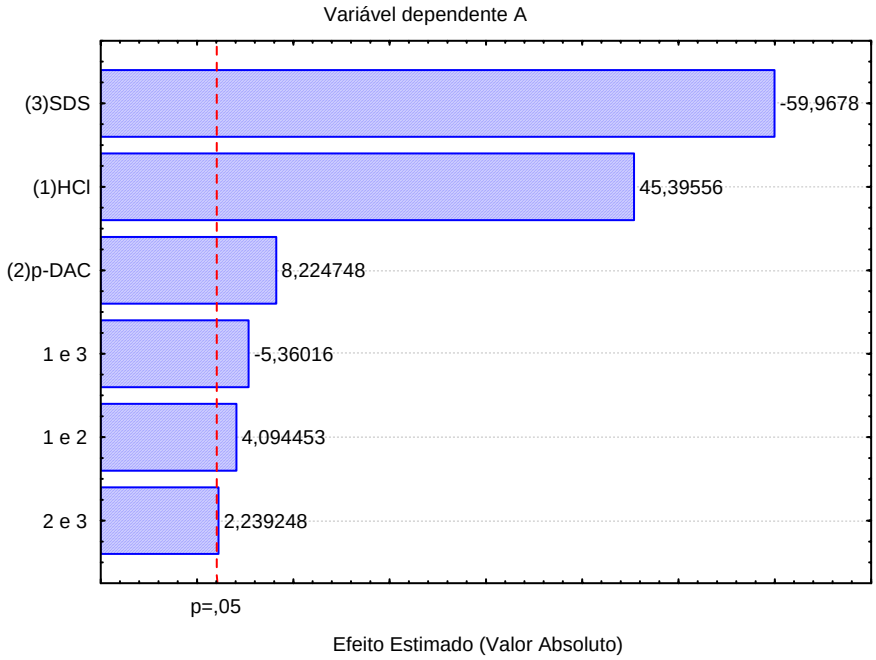


Figura 18. Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas

III.3.1.2.2 Metodologia de superfície de resposta

A partir dos resultados obtidos no estudo para triagem das variáveis partiu-se para um planejamento composto central onde as variáveis estudadas foram: concentração de HCl e SDS. Na Tabela 13 está representada a matriz utilizada no planejamento com as variáveis estudadas, seus respectivos níveis (codificados e não codificados) e os valores de A obtidos.

Tabela 13. Matriz experimental do planejamento composto central. Concentração de bumetanida = 1,37 x 10^{-5} mol L^{-1}

Ensaio	Variáveis não codificadas		Variáveis codificadas		A 520 nm
	[Ácido clorídrico][a]	[SDS][a]	[Ácido clorídrico]	[SDS]	
1	5,2 x 10^{-2}	5,7 x 10^{-3}	-1	-1	0,610
2	6,8 x 10^{-2}	5,7 x 10^{-3}	+1	-1	0,617
3	5,2 x 10^{-2}	9,3 x 10^{-3}	-1	+1	0,586
4	6,8 x 10^{-2}	9,3 x 10^{-3}	+1	+1	0,623
5	6,0 x 10^{-2}	7,5 x 10^{-3}	0	0	0,634
6	6,0 x 10^{-2}	7,5 x 10^{-3}	0	0	0,640
7	6,0 x 10^{-2}	7,5 x 10^{-3}	0	0	0,632
8	6,0 x 10^{-2}	7,5 x 10^{-3}	0	0	0,634
9	4,8 x 10^{-2}	7,5 x 10^{-3}	-1,41	0	0,573
10	7,2 x 10^{-2}	7,5 x 10^{-3}	+1,41	0	0,608
11	6,0 x 10^{-2}	5,0 x 10^{-3}	0	-1,41	0,621
12	6,0 x 10^{-2}	1,0 x 10^{-2}	0	+1,41	0,625

[a] mol L^{-1}

Na Figura 19 está relatada a superfície de resposta juntamente com sua respectiva curva de nível, nela a região do valor máximo de absorbância está situada na área mais escura do gráfico, que representa as condições experimentais ótimas para a reação. Nesta região encontra-se também o ponto central do planejamento.

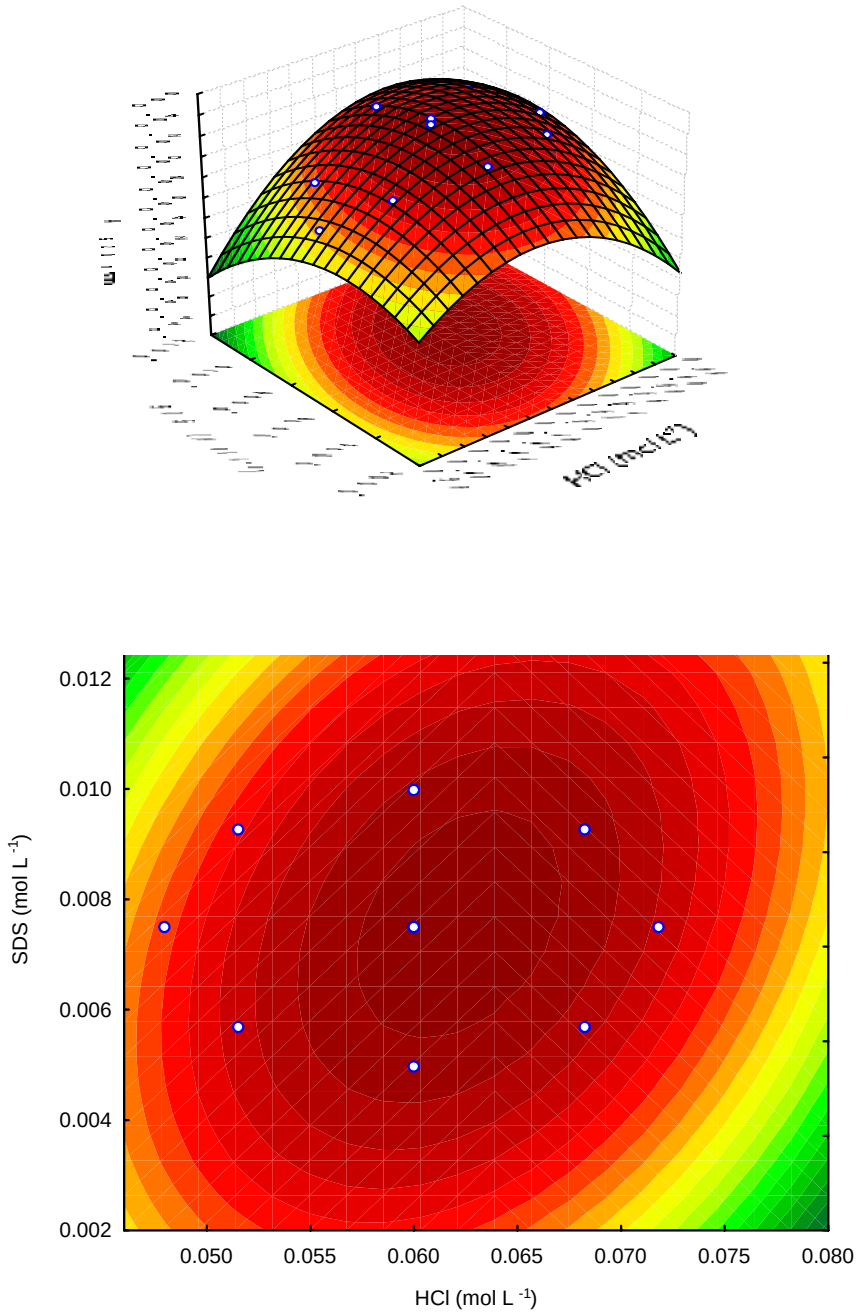


Figura 19. Superfície de resposta otimizada com sua respectiva curva de nível para a medida de absorbância em 520 nm em função das variáveis: concentração de HCl e concentração de SDS (mol L^{-1}).Concentração de bumetanida utilizada =1,37 x 10^{-5} mol L^{-1}.

Após a realização de toda a análise estatística dos dados e definida a superfície de resposta determinou-se que as melhores condições experimentais seriam: concentração de HCl 6,2 x 10^{-2} mol L^{-1} e SDS 8,0 x 10^{-3} mol L^{-1}.

Foram realizados experimentos em replicata (n=4) nas condições experimentais determinadas pelo modelo matemático para se verificar a concordância entre o resultado obtido àquele calculado pelo programa. O resultado predito pelo modelo matemático foi 0,637 e o encontrado experimentalmente foi 0,637 ± 1,41 x 10^{-3} (R.S.D. = 0,2%), a um nível de confiança de 95%.

III.3.2 Construção da curva analítica

O diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo utilizado está representado na Figura 20. Nesse procedimento alíquotas de 918 µL das soluções de referência de bumetanida foram introduzidas no fluxo transportador (SDS 8,0 x 10^{-3} mol L^{-1}) a uma vazão de 2,88 mL min^{-1}as quais confluem em X (ponto de confluência) com a solução reagente (*p*-DAC 5,6 x 10^{-3}mol L^{-1}) preparada em HCl 6,2 x 10^{-2} mol L^{-1} com vazão de 1,28 mL min^{-1}. Após a confluência ocorre a formação do produto colorido vermelho-alaranjado no reator B, o qual foi monitorado espectrofotometricamente em 520 nm. Os sinais transientes foram registrados no computador e transferidos como arquivos ASCII para tratamento no programa Origin 7.0, na Figura 21 é mostrado um exemplo desses sinais.

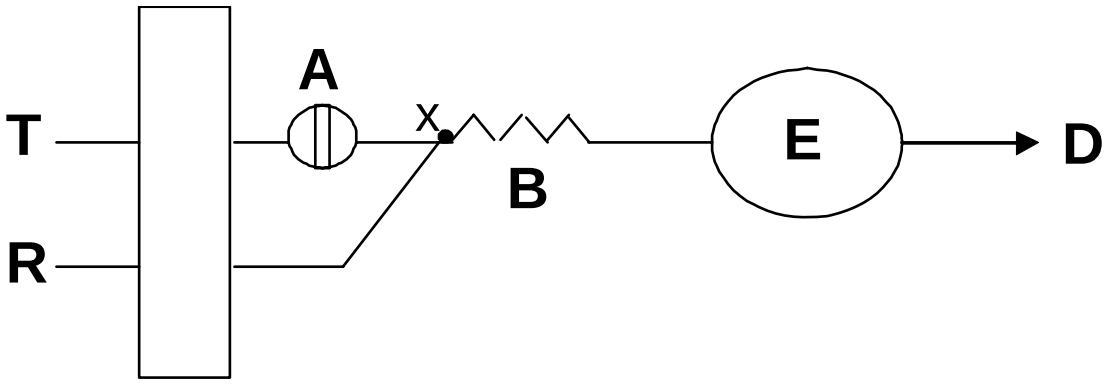


Figura 20. Diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo para determinação espectrofotométrica de bumetanida. **T** solução transportadora (SDS 8,0 x 10^{-3} mol L^{-1}) com vazão de 2,88 mL min^{-1}; **A** soluções padrão ou amostra (alça de amostragem 918 µL); **R** solução reagente de *p*-DAC 5,6 x 10^{-3} mol L^{-1} preparada em HCl 6,2 x 10^{-2} mol L^{-1} com vazão de 1,28 mL min^{-1}; **x** ponto de confluência; **B** bobina reacional (163 cm); **E** espectrofotômetro (520 nm); **D** descarte.

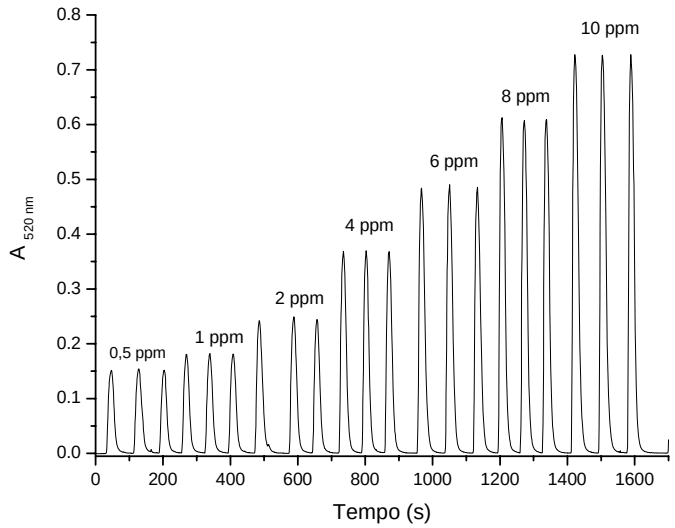


Figura 21. Sinais transientes para a reação entre *p*-DAC 5,6 x 10^{-3} mol L^{-1}, ácido clorídrico 6,2 x 10^{-2} mol L^{-1} e bumetanida na concentração de 0,5 a 10 ppm. Solução carregadora de SDS 8,0 x 10^{-3} mol L^{-1}.

A curva analítica, construída em triplicata, está representada na Figura 22, mostrando uma relação linear entre A e a concentração de bumetanida no intervalo de 1,37 x 10^{-6} a 2,77 x 10^{-5} mol L^{-1} com um bom coeficiente de correlação (r=0,9999). O mesmo procedimento aplicado para preparar as amostras foi feito para prepara a solução estoque de bumetanida utilizada para a construção da curva analítica, não foi observada diferenças nos valores de absorbância medidos quando se aplicou o procedimento de preparo das amostras, indicando que não há perdas do analito durante o preparo das amostras. Na Tabela 14 estão representados os resultados para construção da curva analítica.

A equação matemática que descreve a relação linear obtida é dada por: A = 0,0037+ 21559 x C, onde C é a concentração de bumetanida em mol L^{-1}.

Para avaliar a precisão do método desenvolvido estudos de repetibilidade foram feitos. Para isto, análises em replicata (n=10) foram realizadas em uma mesma amostra contendo 1,37 x 10^{-5} mol L^{-1} de bumetanida para avaliar a precisão intradia, já para o estudo da precisão interdia a mesma amostra foi analisada durante três dias consecutivos. Os resultados obtidos, em termos de desvio padrão relativo (R.S.D.) foram de 1,5% para o estudo intradia e 3,5% para estudo interdia.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) também foram calculados[63]. O limite de detecção pode ser calculado de acordo com a seguinte expressão: LOD = 3 x $SD^{padrão\ mais\ diluído}$ /inclinação da curva analítica, já o limite de quantificação pode ser calculado de acordo com a expressão: LOQ = 10 x $SD^{padrão\ mais\ diluído}$ /inclinação da curva analítica. Foram realizadas medidas de absorbância do padrão mais diluído em replicatas (n=10). Os valores encontrados foram 3,07 x 10^{-7} mol L^{-1} para o LOD e 1,03 x 10^{-6} mol L^{-1} para o LOQ.

Tabela 14. Valores de absorbância obtidos na construção da curva analítica para determinação de bumetanida através da reação com *p*-DAC 5,59 x 10^{-3} mol L^{-1} em meio de HCl 6,22 x 10^{-2} mol L^{-1} tendo SDS 8,00 x 10^{-3} mol L^{-1} como solução carregadora.

[bumetanida]. 10^{-5} mol L^{-1}	A_{520nm}
0,137	0,032
0,274	0,064
0,549	0,122
1,01	0,243
1,65	0,362
2,19	0,475
2,74	0,588

A Figura 22 representa o tratamento matemático das medidas de absorbância a fim de verificar a linearidade da curva analítica obtida a partir dos resultados apresentados na Tabela 14.

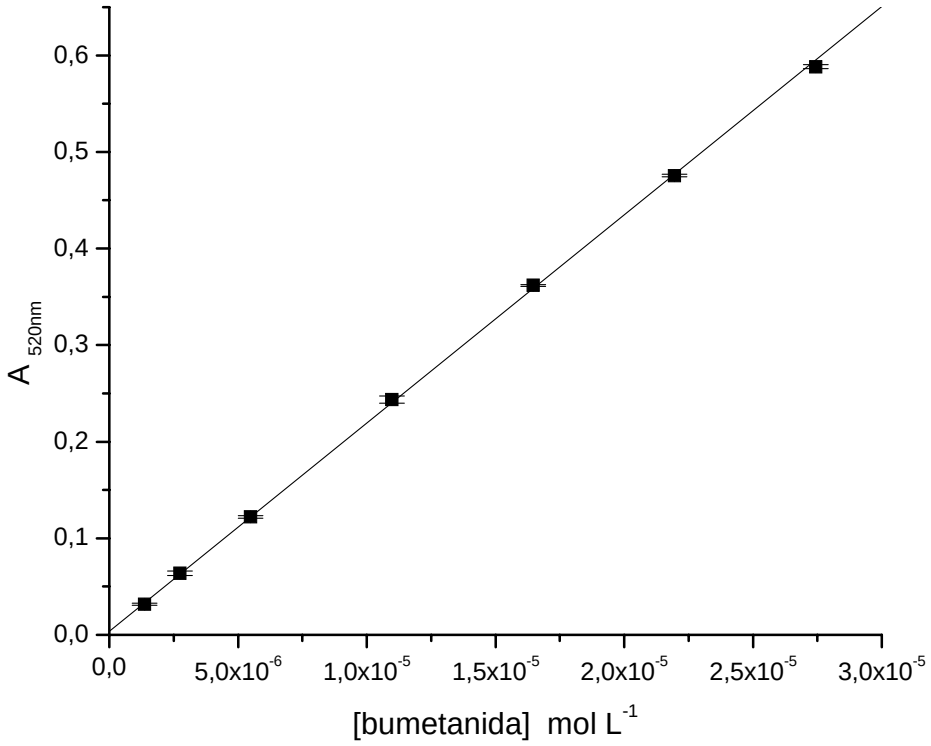


Figura 22. Curva analítica obtida após o tratamento matemático dos resultados apresentados na Tabela 14.

III.3.3. Resumo dos resultados

A Tabela 15 apresenta os principais parâmetros otimizados e características do método desenvolvido.

Tabela 15. Resumo e características do método desenvolvido.

Parâmetro	
Concentração de *p*-DAC [mol L^{-1}]	5,6 x 10^{-3}
Concentração de HCl [mol L^{-1}]	6,2 x 10^{-2}
Concentração de SDS (mol L^{-1})	8,0 x 10^{-3}
Intervalo de linearidade (mol L^{-1})	1,37 x 10^{-6} a 2,77 x 10^{-5}
Coeficiente de correlação (r)	0,9999
Coeficiente angular	21559
Coeficiente linear	0,00371
$\lambda_{máx}$ (nm)	520
Limite de detecção (mol L^{-1})	3,07 x 10^{-7}
Limite de quantificação (mol L^{-1})	1,03 x 10^{-6}
Freqüência Analítica (amostras h^{-1})	69

III.3.4. Estudo dos interferentes

O efeito de interferentes em potencial na determinação de bumetanida em medicamentos foi avaliado para excipientes normalmente presentes em amostras comerciais. Nestes experimentos foram utilizadas soluções de referência de bumetanida na concentração de 1,37 x 10^{-5} mol L^{-1} às quais se adicionou interferente (amido de milho, lactose, dióxido de silício, polivinilpirrolidona, estearato de magnésio e talco) em concentrações igual e 10 vezes superior daquela de bumetanida (em massa). As soluções de bumetanida contendo interferente, em que não houve dissolução total

do interferente, foram filtradas em uma bola de algodão, antes de ser retirada a alíquota para a reação.

Caso o sinal de absorbância sofresse um erro igual ou maior a 5% na determinação do fármaco a presença de interferência seria considerada. A porcentagem de bumetanida encontrada nas soluções adicionadas foi de 98,0 a 102%, com coeficiente de variação menor que 3% para três repetições, constatando que nenhuma interferência foi observada a partir desses excipientes, sob as condições estudadas.

III.3.5. Análise das amostras comerciais

As soluções analisadas foram preparadas segundo os itens II.4.2.1 e II.4.2.2. Os resultados da análise das amostras estão mostrados na Tabela 16, os quais estão em excelente concordância com os resultados obtidos nas análises das amostras pelo método CLAE[50] recomendado pela USP. Os valores calculados de t e F não excederam os valores teóricos tabelados.

Tabela 16. Determinação de bumetanida em amostras comerciais.

Amostras[a]	Método Proposto			CLAE[50]
	Encontrado[b]	t-valor (2,78)[c]	F-valor (19,0)[c]	Encontrado[b]
A	0,996±0,001	1,96	3,38	1,000±0,006
B	0,994±0,004	1,37	9,46	1,000±0,007
C	1,000±0,004	0,43	1,35	1,000±0,006
D	0,972±0,006	1,00	5,34	1,010±0,003
E	1,000±0,005	0,77	3,00	1,000±0,007

[a] Valor Declarado: 1 mg bumetanida/comprimido.
[b] Média ± Desvio padrão (DP), n = 3.
[c] Valores teóricos de t e F em nível de confiança de 95%.

A verificação de eventuais efeitos de matriz foi estudada via método da adição de padrão, onde quantidades conhecidas de bumetanida pura (padrão analítico) foram adicionadas a três amostras pré-analisadas, foram adicionados o equivalente a 0%, 50%, 100% e 150% da quantidade de bumetanida que havia na amostra. Os resultados encontrados apresentaram médias de recuperação entre 97,0 a 103%, indicando a ausência de efeitos de matriz significativos.

Tabela 17. Resultados de recuperação de bumetanida adicionada nas formulações farmacêuticas.

Amostra	**[bumetanida] adicionada mol L^{-1}**	**[bumetanida] encontrada[a] mol L^{-1}**	**R.S.D.[b]**	**% R[c]**
Burinax	-----	$5,52 \times 10^{-6}$	-----	----
	$2,74 \times 10^{-6}$	$2,83 \times 10^{-6}$	2,32	103
	$5,49 \times 10^{-6}$	$5,65 \times 10^{-6}$	1,94	103
	$8,23 \times 10^{-6}$	$8,23 \times 10^{-6}$	1,06	100
Manipulada B	----	$5,52 \times 10^{-6}$	----	----
	$2,74 \times 10^{-6}$	$2,66 \times 10^{-6}$	2,33	97,0
	$5,49 \times 10^{-6}$	$5,38 \times 10^{-6}$	2,52	97,7
	$8,23 \times 10^{-6}$	$7,96 \times 10^{-6}$	0,481	96,6
Manipulada C	----	$5,52 \times 10^{-6}$	----	----
	$2,74 \times 10^{-6}$	$2,69 \times 10^{-6}$	1,02	98,0
	$5,49 \times 10^{-6}$	$5,41 \times 10^{-6}$	0,912	98,5
	$8,23 \times 10^{-6}$	$8,20 \times 10^{-6}$	0,473	99,6

[a] média de 3 determinações

[b] R.S.D.: desvio padrão relativo

[c] R: recuperação

III.3.6. Determinação de bumetanida em urina

Foi verificada a recuperação do fármaco em estudo em uma matriz complexa (urina). Para tanto, quantidades conhecidas do padrão foram adicionadas em uma amostra livre do fármaco.

Foram realizados dois tipos de procedimentos de extração: extração líquido-líquido[53] e extração em fase sólida[54].

III.3.6.1 Extração líquido-líquido

Neste procedimento foi realizada uma extração líquido-líquido com o solvente acetato de etila. Para tanto, uma amostra de urina (5 mL) fortificada com uma quantidade conhecida de bumetanida foi extraída em triplicata com 5 mL de solvente (acetato de etila). A fase orgânica contendo bumetanida foi evaporada até a secura em chapa de aquecimento a 35ºC por uma hora e o resíduo retomado em uma mistura etanol e SDS (1:1), tendo sua concentração final de 1,10 x 10^{-4} mol L^{-1} em balão de 25,00 mL. A partir desta solução foram preparadas soluções de concentração de 8,23 x 10^{-6} a 1,65 x 10^{-5} mol L^{-1}. Na Tabela 18 estão representados os resultados obtidos neste estudo.

Tabela 18. Resultados de adição e recuperação na amostra de urina

Adicionado	Encontrado	% Recuperação	R.S.D. [a]
$8{,}23 \times 10^{-6}$	$6{,}57 \times 10^{-6}$	79,8	5,00
$1{,}11 \times 10^{-5}$	$8{,}61 \times 10^{-6}$	78,5	2,70
$1{,}37 \times 10^{-5}$	$1{,}13 \times 10^{-5}$	82,7	5,50
$1{,}65 \times 10^{-5}$	$1{,}46 \times 10^{-5}$	88,6	1,59

[a] Desvio Padrão Relativo

Como se pode observar na Tabela 18, os resultados com a extração líquido-líquido não foram muito satisfatórios. A técnica apresenta desvantagens como: possível ocorrência de formação de emulsões, necessidade de volumes relativamente grande de amostra e solventes são requeridos, gerando problemas de descarte e a automação é relativamente difícil. Assim sendo, uma nova pesquisa bibliográfica foi realizada, onde se encontrou um procedimento com extração em fase sólida para determinação de bumetanida em urina.

III.3.6.2 Extração em fase sólida

O procedimento foi realizado de acordo com àquele descrito na literatura[54]. Para cada ponto, uma amostra de urina (1 mL) foi fortificada com 1 mL de uma quantidade conhecida de bumetanida ($2{,}06 \times 10^{-4}$; $2{,}74 \times 10^{-4}$; $3{,}43 \times 10^{-4}$; $4{,}12 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} ou 75, 100, 125 e 150 ppm). Foram extraídas 5 porções com 1 mL de água desionizada a fim de lavar e eliminar a matriz biológica (uréia). A bumetanida foi eluída com 1 mL de metanol. O resíduo foi evaporado até a secura em uma chapa de aquecimento a

aproximadamente 35ºC durante 15 minutos para a evaporação de todo o metanol. Em seguida foi retomado com a mistura etanol e SDS 0,01 mol L^{-1} (1:24); transferido quantitativamente para um balão de 25,00 mL, tendo a concentração final de bumetanida de 8,23 x 10^{-6}; 1,09 x 10^{-5}; 1,37 x 10^{-5} e 1,65 x 10^{-5} mol L^{-1} (3, 4, 5 e 6 ppm). Na Tabela 19 estão representados os resultados obtidos neste estudo.

Tabela 19. Resultados de adição e recuperação na amostra de urina.

Adicionado	**Encontrado**	**% Recuperação**	**R.S.D. [a]**
8,23 x 10^{-6}	8,45 x 10^{-6}	102,7	1,21
1,10 x 10^{-5}	1,11 x 10^{-5}	101,5	0,875
1,37 x 10^{-5}	1,36 x 10^{-5}	99,5	1,10
1,65 x 10^{-5}	1,65 x 10^{-5}	100,5	0,526

[a] Desvio Padrão Relativo

A extração em fase sólida quando comparada à extração líquido-líquido apresenta vantagens como: redução da quantidade de solventes e amostra envolvidas em cada extração. De acordo com os resultados apresentados na Tabela acima, pode-se observar que foram bons resultados, com boas porcentagens de recuperação e desvios padrões relativos baixos, para uma amostra relativamente complexa, como a urina.

III.3.7 Conclusões

O método desenvolvido foi aplicado com sucesso para a determinação de bumetanida em medicamentos e em amostras fortificadas de urina, após extração em fase sólida.

Portanto, este trabalho apresenta uma proposta atraente para análise de bumetanida tanto em formulações farmacêuticas como em urina, oferecendo vantagens como: rapidez, simplicidade, baixa geração de resíduos, baixo custo relativo, com uma favorável freqüência analítica (69 análises por hora) e boa repetibilidade, o que confere ao método grande possibilidade de seu uso em análises de rotina.

III.4. Análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica – sistema com zonas coalescentes

III.4.1 Estudo e otimização das condições experimentais

Inicialmente foi feito um planejamento fracionário onde se realizou uma triagem das variáveis principais a fim de eliminar algumas menos significativas. Feito isto, um novo planejamento foi elaborado para fixar outras variáveis assim, restando somente duas variáveis a metodologia de superfície de resposta foi adotada para avaliar a relação existente entre essas variáveis e a medida de absorbância do produto colorido formado. Todos os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa Statistica versão 6.0.

III.4.1.1. Triagem das variáveis

III.4.1.1.1 Planejamento Fatorial Fracionário

O primeiro planejamento feito estudou as seguintes variáveis: concentração de SDS, *p*-DAC, HCl, volume da alça do reagente, volume da alça da amostra, tamanho da bobina reacional e vazão da bomba. Este primeiro planejamento foi composto por sete variáveis, feito da forma fracionária, $2^{7-3} = 2^4$ sendo no total 16 experimentos. A influência do efeito individual de cada variável foi estudada em dois níveis, um alto (+1) e baixo (-1). Na Tabela 20 abaixo está representada cada variável e seu respectivo nível, alto (+1) e baixo (-1).

Tabela 20. Variáveis estudadas e seus respectivos níveis

Variáveis	Nível –1	Nível +1
SDS (mol L^{-1})	$1,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$
p-DAC (mol L^{-1})	$4,5 \times 10^{-3}$	$6,7 \times 10^{-3}$
HCl (mol L^{-1})	$3,6 \times 10^{-2}$	$6,0 \times 10^{-2}$
Alça reagente (μL)	201	402
Alça amostra (μL)	201	402
Bobina (cm)	80	120
Rotação da bomba (rpm)	10	15

Na Tabela 21 estão representadas as variáveis experimentais com seus respectivos níveis e a matriz do planejamento. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram analisados utilizando o programa Statistica, versão 6.0.

Tabela 21. Matriz do planejamento fracionário para triagem das variáveis com os respectivos valores de A. Concentração de bumetanida = 2,74 x 10^{-5} mol L^{-1}.

Ensaio	**Variáveis Codificadas**							**A 525 nm**
	SDS	*p*-DAC	HCl	Alça reagente	Alça amostra	Bobina	Rotação	
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,294
2	+1	+1	-1	-1	-1	-1	1	0,244
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	0,478
4	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	0,262
5	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	0,414
6	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	0,305
7	-1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	0,357
8	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	0,358
9	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	0,335
10	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	0,354
11	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	0,426
12	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	0,292
13	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	0,355
14	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	0,220
15	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	0,496
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0,368
17	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,311
18	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	0,231
19	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	0,467
20	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	0,259
21	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	0,422
22	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	0,332
23	-1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	0,338
24	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	0,356
25	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	0,336
26	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	0,350
27	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	0,413
28	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	0,285
29	-1	1	-1	+1	-1	+1	+1	0,348
30	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	0,237
31	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	0,485
32	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0,383

A Figura 23 apresenta os efeitos dos fatores investigados e suas interações. De acordo com a Figura 23, algumas variáveis foram fixadas e um novo planejamento foi feito.

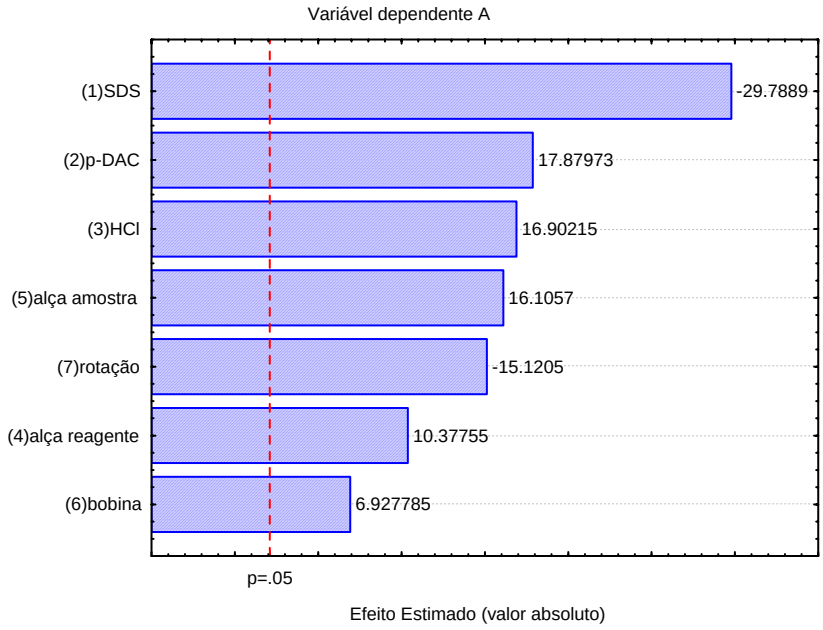


Figura 23. Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas.

A partir desse estudo foram fixadas as seguintes variáveis: vazão no nível -1 (10 rpm), alça do reagente no nível +1 (402 μL) e tamanho da bobina reacionária no nível +1 (120 cm). Segundo os resultados obtidos no gráfico de Pareto (Figura 23) as variáveis de maior efeito significativo foram: concentração de SDS, de *p*-DAC e de ácido clorídrico e volume da alça de amostragem. Para uma melhor resposta, a concentração de SDS deveria ser diminuída, as concentrações de ácido e *p*-DAC deveriam ser aumentadas e o volume da alça de reagente também deveria ser aumentado.

III.4.1.1.2 Planejamento Fatorial Completo

Um segundo planejamento foi feito a fim de fixar mais variáveis para um novo tipo de planejamento. Neste planejamento foram estudadas as seguintes variáveis: concentração de SDS, *p*-DAC e HCl e volume da alça de amostragem. Foi elaborada uma matriz para um planejamento fatorial completo 2^4, com 16 experimentos. A influência do efeito individual de cada variável foi estudada em dois níveis, um alto (+1) e baixo (-1). Na Tabela 22 abaixo está representada cada variável e seu respectivo nível, alto (+1) e baixo (-1).

Tabela 22. Variáveis estudadas e seus respectivos níveis.

Variáveis	**Nível -1**	**Nível +1**
SDS (mol L^{-1})	$8,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-2}$
p-DAC (mol L^{-1})	$6,7 \times 10^{-3}$	$8,4 \times 10^{-3}$
HCl (mol L^{-1})	$6,0 \times 10^{-2}$	$8,4 \times 10^{-2}$
Alça de amostragem (µL)	402	603

Na Tabela 23 estão representadas as variáveis experimentais com seus respectivos níveis e a matriz do planejamento. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram analisados utilizando o programa Statistica, versão 6.0.

Tabela 23. Matriz do planejamento fatorial completo para triagem das variáveis com os respectivos valores de A.

Ensaio	Variáveis Codificadas				$A_{1\ 520nm}$	$A_{2\ 520nm}$
	SDS	*p*-DAC	HCl	Alça amostra		
1	-1	-1	-1	-1	0,562	0,556
2	+1	-1	-1	-1	0,546	0,559
3	-1	+1	-1	-1	0,596	0,593
4	+1	+1	-1	-1	0,602	0,601
5	-1	-1	+1	-1	0,575	0,569
6	+1	-1	+1	-1	0,577	0,593
7	-1	+1	+1	-1	0,604	0,609
8	+1	+1	+1	-1	0,623	0,620
9	-1	-1	-1	+1	0,564	0,563
10	+1	-1	-1	+1	0,597	0,598
11	-1	+1	-1	+1	0,635	0,6179
12	+1	+1	-1	+1	0,635	0,629
13	-1	-1	+1	+1	0,599	0,609
14	+1	-1	+1	+1	0,635	0,641
15	-1	+1	+1	+1	0,632	0,648
16	+1	+1	+1	+1	0,642	0,641

A Figura 24 apresenta o gráfico dos efeitos estimados e suas interações. De acordo com o gráfico, as variáveis mais importantes são a concentração de *p*-DAC e o

volume da alça de amostragem, devendo a concentração de *p*-DAC e o volume da alça de amostragem serem aumentadas. As variáveis menos importantes, a concentração de HCl e SDS foram fixadas em 8,4 x 10^{-2} mol L^{-1} e em 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} respectivamente, isto é, no nível alto (+1).

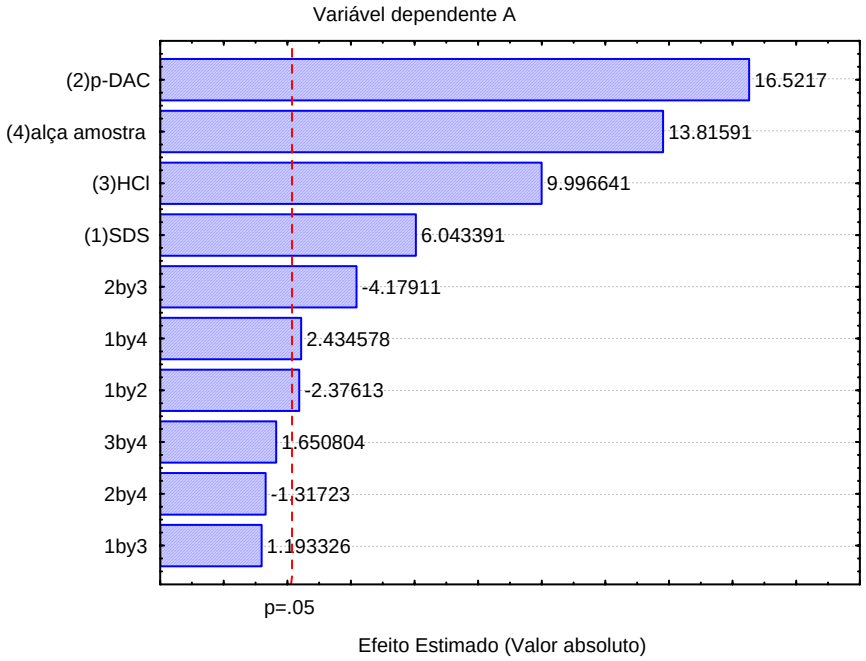


Figura 24. Gráfico dos principais efeitos e de interação estimados para as variáveis estudadas.

III.4.1.2. Metodologia de superfície de resposta

A partir dos resultados obtidos no estudo para triagem das variáveis partiu-se para um planejamento composto central onde as variáveis estudadas foram: concentração de *p*-DAC e volume da alça de amostragem. Na Tabela 24 está representada a matriz utilizada no planejamento com as variáveis estudadas, seus respectivos níveis (codificados e não codificados) e os valores de A obtidos.

Tabela 24. Matriz experimental do planejamento composto central. Em todos os ensaios foi concentração de bumetanida foi 2,74 x 10^{-5} mol L^{-1}.

Ensaio	Variáveis não codificadas		Variáveis codificadas		A 520 nm
	[*p*-DAC][a]	Alça da amostra[b]	[*p*-DAC]	Alça da amostra	
1	5,4 x 10^{-3}	417	-1	-1	0,519
2	6,9 x 10^{-3}	417	+1	-1	0,551
3	5,4 x 10^{-3}	488	-1	+1	0,527
4	6,9 x 10^{-3}	488	+1	+1	0,554
5	6,4 x 10^{-3}	452	0	0	0,577
6	6,4 x 10^{-3}	452	0	0	0,577
7	6,4 x 10^{-3}	452	0	0	0,575
8	6,4 x 10^{-3}	452	0	0	0,570
9	5,2 x 10^{-3}	452	-1,41	0	0,532
10	7,3 x 10^{-3}	452	+1,41	0	0,567
11	6,4 x 10^{-3}	402	0	-1,41	0,541
12	6,4 x 10^{-3}	503	0	+1,41	0,566

[a] mol L^{-1}
[b] µL

Na Figura 25 está relatada a superfície de resposta juntamente com sua respectiva curva de nível, nela a região do valor máximo de absorbância está situada na área mais escura do gráfico, que representa as condições experimentais ótimas para a reação. Nesta região encontra-se também o ponto central do planejamento.

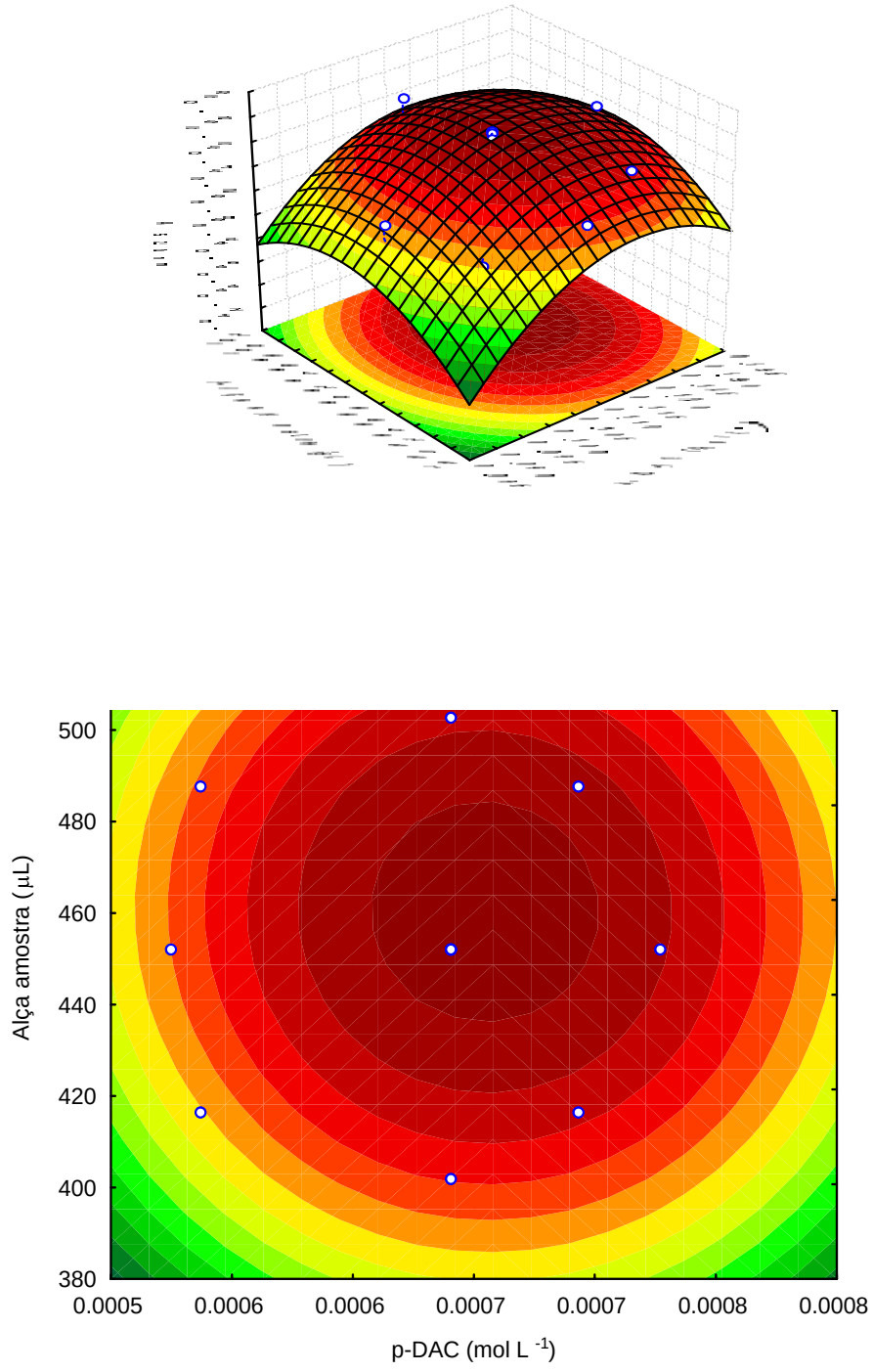


Figura 25. Superfície de resposta otimizada com sua respectiva curva de nível para a medida de absorbância em 520 nm em função das variáveis: concentração de *p*-DAC (mol L^{-1}) e volume da alça da amostragem (µL). Concentração de bumetanida utilizada = 2,74x 10^{-5} mol L^{-1}.

Após a realização de toda a análise estatística dos dados e definida a superfície de resposta determinou-se que as melhores condições experimentais seriam: concentração de *p*-DAC de 7,0 x 10^{-3} mol L^{-1} e volume da alça de amostragem de 460 µL.

Foram realizados experimentos em triplicata nas condições experimentais determinadas pelo modelo matemático para se verificar a concordância entre o resultado obtido com àquele calculado pelo programa. O resultado predito pelo modelo matemático foi 0,576 e o encontrado experimentalmente foi 0,569 ± 5,42 x 10^{-3} (R.S.D. = 0,9%), a um nível de confiança de 95%.

III.4.2 Construção da curva analítica

O diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo utilizado está representado na Figura 26. Nesse procedimento alíquotas de 460 µL das soluções de referência de bumetanida (0,8 mL min^{-1}) foram introduzidas no fluxo transportador (SDS 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1}) a uma vazão de 1,9 mL min^{-1}. Da mesma forma 402 µL de solução contendo reagente (*p*-DAC 7,0 x 10^{-3} mol L^{-1} preparado em HCl 8,4 x 10^{-2} mol L^{-1}, 0,8 mL min^{-1}) foram também introduzidas no fluxo transportador (SDS 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1}) a uma vazão 1,9 mL min^{-1} as quais confluem em X (ponto de confluência). Após a confluência ocorre a formação do produto colorido vermelho-alaranjado no reator B (comprimento de 120 cm) o qual foi monitorado espectrofotometricamente em 520 nm. Os sinais transientes foram registrados no computador e transferidos como arquivos

ASCII para tratamento no programa Origin 7.0, na Figura 27 é mostrado um exemplo desses sinais.

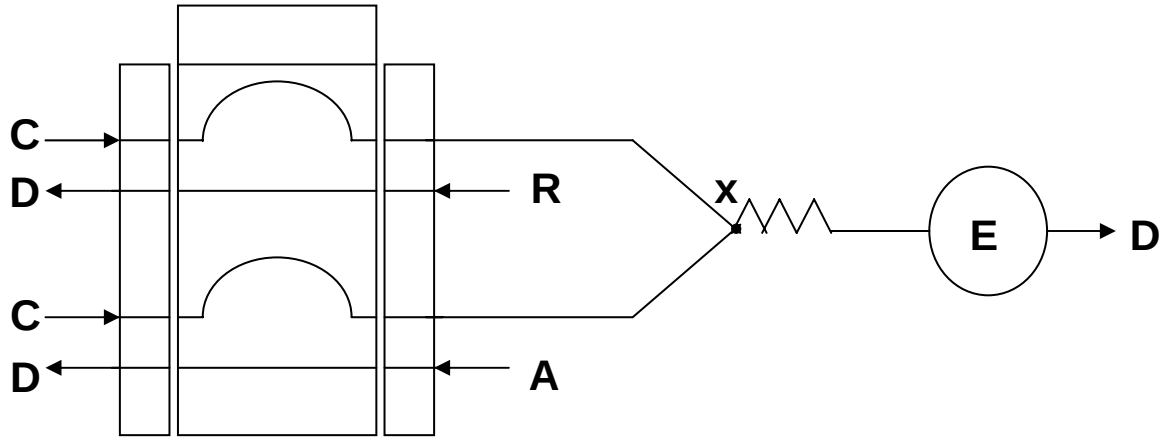


Figura 26. Diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo para determinação espectrofotométrica de bumetanida. **C** solução carregadora (SDS 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1}) com vazão de 1,9 mL min^{-1}; **A** soluções padrão ou amostra (alça de amostragem 460 µL), com vazão de 0,8 mL min^{-1} ; **R** solução reagente de *p*-DAC 7,0 x 10^{-3} mol L^{-1} preparada em HCl 8,4 x 10^{-2} mol L^{-1} com vazão de 0,8 mL min^{-1}; **x** ponto de confluência; **B** bobina reacional (120 cm); **E** espectrofotômetro (520 nm); **D** descarte.

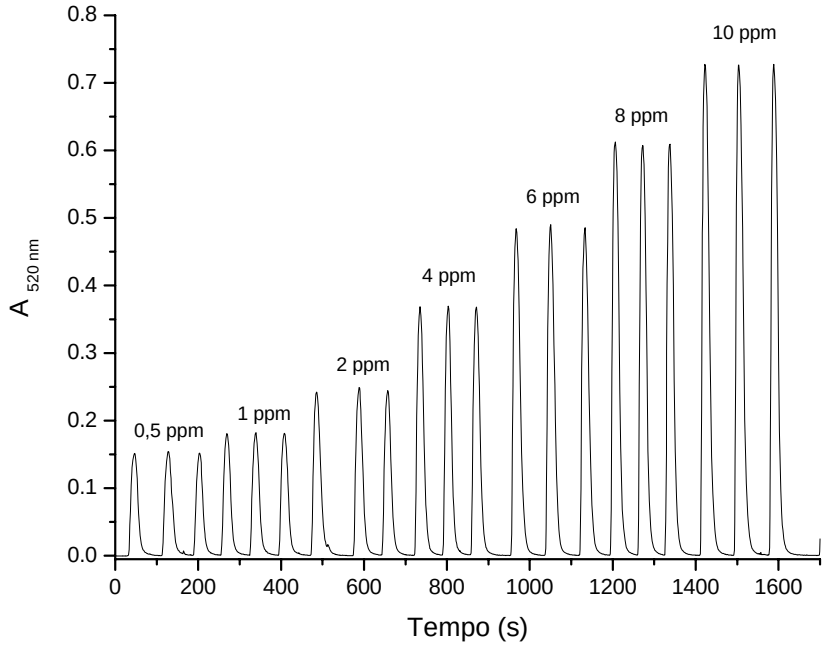


Figura 27. Sinais transientes para a reação entre *p*-DAC 7,0 x 10^{-3} mol L^{-1}, ácido clorídrico 8,4 x 10^{-2} mol L^{-1} e bumetanida na concentração de 1,37 x 10^{-6} a 2,74 x 10^{-5} mol L^{-1}. Solução carregadora de SDS 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1}.

A curva analítica, construída em triplicata, está representada na Figura 28, mostrando uma relação linear entre A e a concentração de bumetanida no intervalo de 1,37 x 10^{-6} a 2,77 x 10^{-5} mol L^{-1} com um bom coeficiente de correlação (r=0,99999). O mesmo procedimento aplicado para preparar as amostras foi feito para preparar a solução estoque de bumetanida utilizada para a construção da curva analítica, não foi observada diferenças nos valores de absorbância medidos quando se aplicou o procedimento de preparo das amostras, indicando que não há perdas do analito durante o preparo das amostras.

A equação matemática que descreve a relação linear obtida é dada por:

A = -0,000131+ 22080,7 x C, onde C é a concentração de bumetanida em mol L^{-1}.

Para avaliar a precisão do método desenvolvido estudos de repetibilidade foram feitos. Para isto, análises em replicata (n=10) foram realizadas em uma mesma amostra contendo 1,37 x 10^{-5} mol L^{-1} de bumetanida para avaliar a precisão intradia, já para o estudo da precisão interdia a mesma amostra foi analisada durante três dias consecutivos. Os resultados obtidos, em termos de desvio padrão relativo (R.S.D.) foram de 0,7% para o estudo intradia e 0,8% para estudo interdia.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) também foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC [58,59]. O limite de detecção pode ser calculado de acordo com a seguinte expressão: LOD = 3 x SD^{branco} /inclinação da curva analítica, já o limite de quantificação pode ser calculado de acordo com a expressão: LOQ = 10 x SD^{brnaco} /inclinação da curva analítica. Foram realizadas medidas de absorbância do padrão mais diluído em replicatas (n=10). Os valores encontrados foram 1,09 x 10^{-7} mol L^{-1} para o LOD e 3,65 x 10^{-7} mol L^{-1} para o LOQ.

Tabela 25. Valores de absorbância obtidos na construção da curva analítica para determinação de bumetanida através da reação com *p*-DAC 7,0 x 10^{-3} mol L^{-1} em meio de HCl 8,4 x 10^{-2} mol L^{-1} tendo SDS 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1} como solução carregadora.

[bumetanida] . 10^{-5} mol L^{-1}	A_{520nm}
0,137	0,031
0,274	0,060
0,549	0,123
1,01	0,246
1,65	0,365
2,19	0,488
2,74	0,605

A Figura 28 representa o tratamento matemático das medidas de absorbância a fim de verificar a linearidade da curva analítica obtida a partir dos resultados apresentados na Tabela 25.

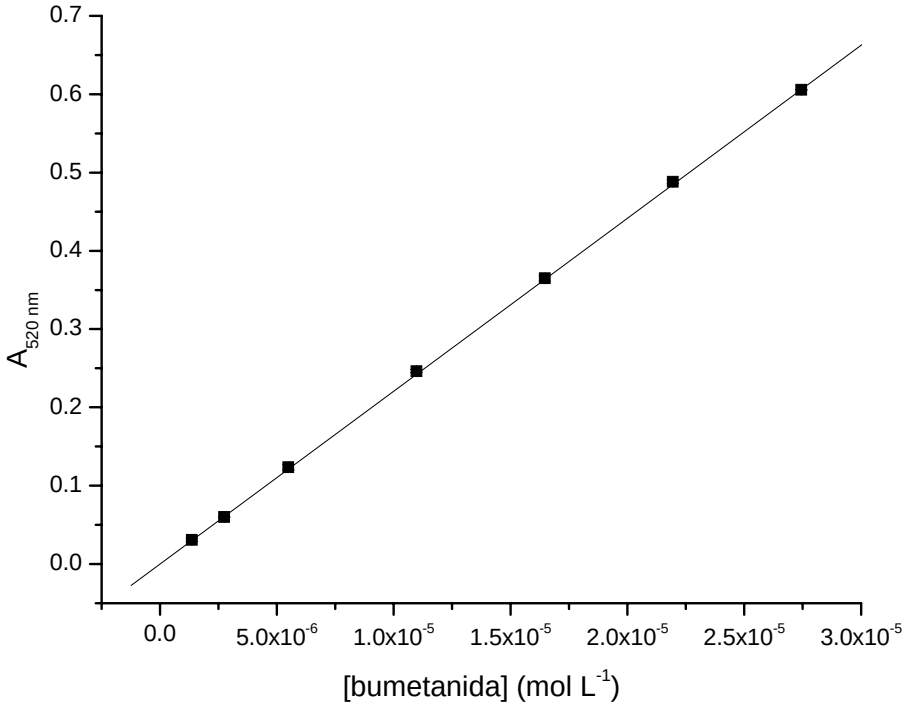


Figura 28. Curva analítica obtida após o tratamento matemático dos resultados apresentados na Tabela 25.

III.4.3. Resumo dos resultados

A Tabela 26 apresenta os principais parâmetros otimizados e características do método desenvolvido.

Tabela 26. Resumo e características do método desenvolvido.

Parâmetro	
Concentração de *p*-DAC [mol L^{-1}]	7,0 x 10^{-3}
Concentração de HCl [mol L^{-1}]	8,4 x 10^{-2}
Concentração de SDS (mol L^{-1})	1,0 x 10^{-2}
Intervalo de linearidade (mol L^{-1})	1,37 x 10^{-6} a 2,77 x 10^{-5}
Coeficiente de correlação (r)	0,99999
Coeficiente angular	22081
Coeficiente linear	-0,00131
$\lambda_{máx}$ (nm)	520
Limite de detecção (mol L^{-1})	1,09 x 10^{-7}
Limite de quantificação (mol L^{-1})	3,65 x 10^{-7}
Freqüência Analítica (amostras h^{-1})	72

III.4.4. Estudo dos interferentes

O efeito de interferentes em potencial na determinação de bumetanida em medicamentos foi avaliado para excipientes normalmente presentes em amostras comerciais. Nestes experimentos foram utilizadas soluções de referência de bumetanida na concentração de 1,37 x 10^{-5} mol L^{-1} às quais adicionou-se interferente (amido de milho, lactose, dióxido de silício, polivinilpirrolidona, estearato de magnésio e talco) em concentrações igual e 10 vezes superior daquela de bumetanida (em massa). As soluções de bumetanida contendo interferente, em que não houve dissolução total do interferente, foram filtradas em uma bola de algodão, antes de ser retirada a alíquota para a reação.

Caso o sinal de absorbância sofresse um erro igual ou maior a 5% na determinação do fármaco a presença de interferência seria considerada. A porcentagem de bumetanida encontrada nas soluções adicionadas foi de 99,3 a 102%, com coeficiente de variação menor que 3% para três repetições, constatando que nenhuma interferência foi observada a partir desses excipientes, sob as condições estudadas.

III.4.5. Análise das amostras comerciais

As soluções contendo amostra foram preparadas segundo os itens II.4.2.1 e II.4.2.2. Os resultados da análise das amostras estão mostrados na Tabela 27, os quais estão em excelente concordância com os resultados obtidos nas análises das amostras pelo método CLAE[50] recomendado pela USP. Os valores calculados de t e F não excederam os valores teóricos tabelados, indicando uma boa precisão e exatidão do método desenvolvido.

Tabela 27. Determinação de bumetanida em formulações farmacêuticas comerciais.

Amostras[a]	**Método Proposto**			**CLAE[50]**
	Encontrado[b]	t-valor (2,78)[c]	F-valor (19,00)[c]	Encontrado[b]
A	0,994±0,004	1,43	1,91	1,000±0,006
B	0,996±0,004	0,885	1,23	1,000±0,007
C	1,000±0,004	0,234	1,77	1,000±0,006
D	0,993±0,005	2,02	3,25	1,010±0,003
E	1,000±0,006	2,61	1,41	1,000±0,007

[a] Valor Declarado: 1 mg bumetanida/comprimido.
[b] Média ± Desvio padrão (DP), n = 3.
[c] Valores teóricos de t e F em nível de confiança de 95%.

A verificação de eventuais efeitos de matriz foi estudada via método da adição de padrão, onde quantidades conhecidas de bumetanida pura (padrão analítico) foram adicionadas a três amostras pré-analisadas, foram adicionados o equivalente a 0%, 50%, 100% e 150% da quantidade de bumetanida que havia na amostra. Os resultados encontrados apresentaram médias de recuperação entre 99 e 102%, indicando a ausência de efeitos de matriz significativos.

Tabela 28. Resultados de recuperação de bumetanida adicionada nas formulações farmacêuticas.

Amostra	[bumetanida] adicionada (mol L^{-1})	[bumetanida] encontrada[a] (mol L^{-1})	R.S.D.[b]	% R[c]
Burinax	----	$5,52 \times 10^{-6}$	----	----
	$2,74 \times 10^{-6}$	$2,80 \times 10^{-6}$	1,53	102
	$5,49 \times 10^{-6}$	$5,43 \times 10^{-6}$	0,992	99,0
	$8,23 \times 10^{-6}$	$8,23 \times 10^{-6}$	1,27	100
Manipulada B	----	$5,52 \times 10^{-6}$	----	----
	$2,74 \times 10^{-6}$	$2,72 \times 10^{-6}$	2,10	99,0
	$5,49 \times 10^{-6}$	$5,52 \times 10^{-6}$	0,503	100
	$8,23 \times 10^{-6}$	$8,20 \times 10^{-6}$	1,03	99,6
Manipulada C	----	$5,52 \times 10^{-6}$	----	----
	$2,74 \times 10^{-6}$	$2,74 \times 10^{-6}$	1,81	100
	$5,49 \times 10^{-6}$	$5,54 \times 10^{-6}$	0,874	101
	$8,23 \times 10^{-6}$	$8,27 \times 10^{-6}$	0,75	101

[a] média de 3 determinações

[b] R.S.D.: desvio padrão relativo

[c] R: recuperação

III.4.6. Determinação de bumetanida em urina

Foi verificada a recuperação do fármaco em estudo em uma matriz complexa (urina). Para tanto, quantidades conhecidas do padrão foram adicionadas em uma amostra de urina livre do fármaco (bumetanida). O procedimento utilizado foi extração em fase sólida.

III.4.6.1. Procedimento para análise de urina

O procedimento foi realizado de acordo com àquele descrito na literatura[54]. Para tanto, uma amostra de urina (1 mL) fortificada com uma quantidade conhecida de bumetanida (2,74 x 10^{-3} mol L^{-1}) Foram extraídas 5 porções com 1 mL de água desionizada a fim de lavar e eliminar a matriz biológica (uréia). A bumetanida foi eluída com 1 mL de metanol. O resíduo foi levado a uma chapa de aquecimento a aproximadamente 35ºC durante 15 minutos para a evaporação de todo o metanol. O resíduo foi solubilizado com a mistura etanol e SDS (1:1); transferido quantitativamente para um balão de 25,00 mL, tendo a concentração final de bumetanida de 1,10 x 10^{-4} mol L^{-1}. Diluições adequadas foram feitas para o preparo de soluções de concentração de 8,23 x 10^{-6} a 1,65 x 10^{-5} mol L^{-1}. Na Tabela 29 estão representados os resultados obtidos neste estudo.

Tabela 29. Resultados de adição e recuperação na amostra de urina.

Adicionado	Encontrado	% Recuperação	R.S.D. [a]
8,23 x 10^{-6}	8,04 x 10^{-6}	97,7	0,521
1,11 x 10^{-5}	1,11 x 10^{-5}	100	0,523
1,37 x 10^{-5}	1,39 x 10^{-5}	101	0,280
1,65 x 10^{-5}	1,68 x 10^{-5}	102	0,326

[a] Desvio Padrão Relativo

Os métodos desenvolvidos neste trabalho foram aplicados na determinação de bumetanida em medicamentos e os dois de análise por injeção em fluxo também foram aplicados para determinação em amostras de urina. Na Tabela 30 está apresentado um

levantamento bibliográfico para determinação de bumetanida em amostras de urina, as técnicas utilizadas e os limites de detecção encontrados.

Tabela 30. Métodos para determinação de bumetanida em amostras de urina.

Técnica	LOD (ppb)
HPLC-UV[11]	6
HPLC-FLU[14]	1,4
HPLC-UV[64]	390
HPLC-UV[65]	32
HPLC-FLU[10]	5
HPLC-AMP	2,5
CG-MS[16]	40
CG-MS[4]	50
Voltametria[20]	160
Elertroforese Capilar-FLU[19]	1310

Na Tabela 31 estão representados os limites de detecção obtidos neste trabalho.

Tabela 31. Limites de detecção obtidos neste trabalho.

Técnica	LOD (ppb)
Espectroscopia de Reflectância Difusa	14000
FIA – Confluência	110
FIA – Zonas Coalescentes	40

III.4.7 Conclusões

O método desenvolvido acima descreve um procedimento simples para análise de bumetanida em medicamentos e amostras fortificadas de urina utilizando análise química por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica tendo um injetor comutador para inserção da solução de analito e regente no sistema.

Foi observada uma excelente linearidade e ausência significativa de possíveis efeitos de matriz comprovada via método de adição de padrão. Os resultados obtidos pelo método desenvolvido foram também comparados com àqueles obtidos pelo método oficial descrito na Farmacopéia Americana.

O método desenvolvido apresenta uma proposta viável para a análise de bumetanida em medicamentos e urina, oferecendo características como: rapidez, simplicidade, baixo custo relativo, com uma favorável freqüência analítica (72 análises $hora^{-1}$) e excelente reprodutibilidade, possibilitando sua aplicação em análises de rotina.

IV. CONCLUSÕES GERAIS

Os métodos desenvolvidos neste trabalho utilizaram a reação inédita entre bumetanida e *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC) em meio ácido para a determinação do fármaco em medicamentos foram aplicados com sucesso na análise em amostras adquiridas no comércio local da cidade de Araraquara.

O método de espectroscopia de reflectância difusa associado ao *spot test* quantitativo foi aplicado com sucesso na análise de amostras comerciais, apresentando resultados satisfatórios e coniventes com àqueles encontrados pelo método oficial descrito na Farmacopéia Americana. O método apresenta vantagens como o baixo consumo de reagentes e solventes tendo como conseqüência uma baixa geração de resíduos, estando em sintonia com os princípios da Química Verde, a qual tem interesse por métodos e técnicas que reduza e elimine o uso e a geração de substâncias prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente.

Neste trabalho teve-se também o desenvolvimento de dois métodos analíticos empregando análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica. Os métodos são rápidos, simples, de baixo custo relativo e sensíveis. Apresentaram boa freqüência analítica, parâmetro imprescindível em análises de rotina. A aplicação em fluidos biológicos (urina) é um fator interessante, pois o fármaco é considerado uma substância dopante.

O primeiro método desenvolvido foi o método de FIA com adição de reagente através de uma confluência. Os resultados obtidos na análise de cinco amostras comerciais foram satisfatórios quando comparados àqueles obtidos pelo método oficial descrito na Farmacopéia Americana. A análise em amostras de urina fortificadas com o fármaco em questão também foi realizada utilizando dois procedimentos de extração: extração líquido-líquido e extração em fase sólida; o último (extração em fase sólida) apresentou melhores resultados de recuperação nas amostras fortificadas.

O segundo método foi o método de FIA com adição de reagente através de um injetor comutador, neste caso, um volume suficiente de reagente para a reação é adicionado, apresentando economia de reagente e menor geração de resíduos ao ambiente. Os valores encontrados nas determinações em amostras comerciais foram comparados com os valores obtidos nas análises segundo o método oficial apresentando excelentes resultados. A análise em amostras fortificadas de urina também foi realizada; o procedimento de extração utilizado foi o de extração em fase sólida e apresentou bons resultados de recuperação e baixas porcentagens de desvio padrão relativo.

V. REFERÊNCIAS

1 RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. O rim. In:_____ *Farmacologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 20, p. 296-299.

2 MULINARI, A. S. Diuréticos. In: ZANINI, A. C.; OGA, S. *Farmacologia aplicada.* 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1989. cap. 16, p. 250-252.

3 MOREIRA, V.; MOREAU, R. L. M. Liquid chromatographic screening test for some diuretics of doping interest in human urine. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.,* v. 28, p. 2753-2768, 2005.

4 AMENDOLA, L.; COLAMONICI, C.; MAZZARINO, M.; BOTRÈ, F. Rapid determination of diuretics in human urine by gas-chromatography-mass spectrometry following microwave assisted derivatization. *Anal. Chim. Acta*, v. 475, n. 1/2, p. 125-136, 2003.

5 REYNOLDS, J. E. F. *Martindale the extra pharmacopoeia*. 31st ed. Londres: London Royal Pharmaceutical Society, 1996. p. 836-837.

6 NEAL, L. B. Drogas cardiovasculares renais. In: KATZUNG, B. G. *Farmacologia básica & clínica.* 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 11, p. 120.

7 GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. *As bases farmacológicas da terapêutica.* 9. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 1996. p. 511.

8 THE MERCK Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, 13th ed. Witehouse Station, NJ: Merck, 2001. p. 1471.

9 SKOOG, D. A. *Princípios de análise instrumental*. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p. 641.

10 WELLS, T. G.; HENDRY, I. R.; KEARNS, G. L. Measurement of bumetanide in plasma and urine by high-performance liquid chromatography and application to bumetanide disposition. J*. Chromatogr.*, v. 570, n. 1, p. 235-42, 1991.

11 CAMPINS-FALCO, P.; HERRAEZ-HERNANDEZ, R.; SEVILLANO-CABEZA, A. Improved detection limits for screening of diuretics by coupled liquid chromatography and ultraviolet-visible spectrophotometry. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.,* v. 612, n. 2, p. 245-251, 1993.

12 LEGORBU, M. J.; ALONSO, R. M.; JIMINEZ, R. M.; ORTIZ, E. Quantitative determination of the loop diuretic bumetanide in urine and pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography with amperometric determination. *J. Chromatogr. Sci.,* v. 39, n. 10, p. 425-430, 2001.

13 RUIZ-ANGEL, M. J.; TORRES-LAPAZIÓ, J. R.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M. C. Effects of pH and the presence of micelles on the resolution of diuretics by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr., A,* v. 1022, n. 1/2, p. 51-65, 2004.

14 CARDA-BROCH, S.; ESTEVE ROMERO, J. S.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M. C. Chromatographic determination of diuretics in urine samples using hybrid micelar mobile phases with fluorimetric detection. *Anal. Chim. Acta*, v. 375, n. 1/2, p. 143-154, 1998.

15 PARK, H.; GWAK, H. I. K. Determination of bumetanide in humam plasma by a validated HPLC method and lts application to single-dose pharmacokinetics. *Korean Soc. Pharmaceut.*, v. 35, n. 1, p. 51-55, 2005.

16 HAGEDORN, H. W.; SCHULZ, R. Detection of diuretics in horse urine by GC/MS. *J. Anal. Toxicol.,* v. 16, n. 3, p. 194-198, 1992.

17 CARRERAS, D.; IMAZ, C.; NAVAJAS, R.; GARCIA, M. A.; RODRIGUEZ, C.; RODRIGUEZ, A. F.; CORTES, R. Comparison of derivatization procedures for the determination of diuretics in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr., A,* v. 683, n. 1, p. 195-202, 1994.

18 HARRIS, D. C. *Análise química quantitativa*. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 862 p.

19 GONZALEZ, E.; BECERRA, A.; LASERNA, J. J. Direct determination of diuretic drugs in urine by capillary zone electrophoresis using fluorescence detection**.** *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.,* v. 687, n. 1, p. 145-150, 1996.

20 LEGOBURU, M. J.; ALONSO, R. M.; JIMENEZ, R. M. Oxidative behavior of the sulfonamidic diuretic bumetanide at carbon paste electrode. *Electroanalysis,* v. 5, n. 4, p. 333-338, 1993.

21 NIKOLIC, K. I.; VELASEVIC, K. Coulometric determination of bumetanide and furosemide. *J. Pharm. Belgique*, v. 44, n. 6, p. 387-390, 1989.

22 SASTRY, C. S. P.; PRASAD, T. N. V.; SASTRY, B. S.; RAO, E. Spectrophotometric methods for the determination of some diuretics using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *Analyst*, v. 2, n. 113, p. 255-258, 1988.

23 ZIVANOVIC, L.; AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; VASILJEVIC, M.; RADULOVIC, D. Investigation of Fe(III) chloride as a colour reagent for the spectrophotometric determination of bumetanide in the pure form and in preparations. *Acta Poloniae Pharm.*, v. 49, n. 4, p. 9-12, 1992.

24 SASTRY, C. S. P.; PRASAD, T. N. V.; RAO, A. R. M.; RAO, E. V. Application of Folin-Ciocalteu reagent in the estimation of some diuretics. *Indian Drugs*, v. 25, n. 5, p. 206-208, 1988.

25 SOLICH, P.; POLYDOROU, C. K.; KOUPPARIS, M. A.; EFSTATHIOU, C. E. Automated flow injection fluorimetric determination and dissolution studies of bumetanide in pharmaceuticals**.** *Anal. Chim. Acta*, v. 438, n. 1/2, p. 131-136, 2001.

26 PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios do novo milênio. *Quim. Nova*, v. 26, n. 5, p. 738-744, 2003.

27 SILVA, F. M.; LACERDA, P. S. B.; JONES, J. J. Desenvolvimento sustentável e química verde. *Quim. Nova*, v. 28, n. 1, p. 103-110, 2005.

28 MELCHERT, W.; ROCHA, F. R. P. A green analytical procedure for flow-injection determination of nitrate in natural waters. *Talanta*, v. 65, n. 2, p. 461-465, 2005.

29 JUNGREIS, E. *Spot test analysis*: clinical, environmental, forensic, and geochemical applications. 2nd ed. New York: Wiley-Interscience, 1997. 377 p.

30 GHAUCH, A.; TURNAR, C.; FACHINGER, C.; RIMA, J.; CHAREF, A.; SUPTIL, J.; MARTIN-BOUYER, M. Use of diffuse reflectance spectrometry in spot test reactions for quantitative determination of cations in water. *Chemosphere*, v. 40, n. 12, p. 1327-1333, 2000.

31 GHAUCH, A.; RIMA, J.; CHAREF, A.; SUPTIL, J.; FACHINGER, C.; MARTIN-BOUYER, M. Quantitative measurements of ammonium, hydrogenophosphate and Cu (II) by diffuse reflectance spectrometry*. Talanta*, v. 48, n. 2, p. 385-392, 1999.

32 GOTARDO, M. A.; GIGANTE, A. C.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determination of furosemide in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. *Talanta*, v. 64, n. 2, p. 361-365, 2004.

33 GOTARDO, M. A.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. *Eclet. Quim.*, v. 30, n. 2, p. 17-24, 2005.

34 MATIAS, F. A. A.; VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M. Quantitative reflectance spot test for the determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical preparations. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 15, n. 2, p. 327-330, 2004.

35 TUBINO, M.; ROSSI, A. V.; MAGALHÃES, M. E. A. Quantitative spot tests of Fe (III), Cr (VI) and Ni (II) by reflectance measurements. *Anal. Lett.*, v. 30, n. 2, p. 271-282, 1997.

36 KEALEY, D. Quantitative reflectometry. 1. Principles and scope. *Talanta,* v. 19, n. 12, p. 1563-1569, 1972.

37 WENDLANDT, W. W.; HECHT, H. G. *Reflectance spectroscopy*. New York: Interscience, 1966. 297 p.

38 REINECKE, D.; JENSEN, A.; FISTER, F.; SCHERNAU, U. Quantitative determination of organic compounds by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectrometry. *Anal. Chem.,* v. 60, n. 11, p. 1221-1224, 1988.

39 MATIAS, F. A. A.; DE OLIVEIRA, W. A.; MOSCHIM, E. Fibre optic for diesel engine smoke measurement. *Sens. Actuators B*, v. 41, n. 1/3, p. 159-162, 1997.

40 ZANJANCHI, M. A.; NOEI, H.; MOGHIMI, M. Rapid determination of aluminum by UV-vis diffuse reflectance spectroscopy with application of suitable adsorbents. *Talanta*, v. 70, n. 5, p. 933-939, 2006.

41 TUBINO, M.; DE SOUZA, R. L. Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations by diffuse reflectance photometry. *Talanta*, v. 68, n. 3, p. 776-780, 2006.

42 ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. Classificação e definição dos métodos de análise em fluxo (Recomendações – IUPAC 1994). *Quim. Nova,* v. 22, n. 1, p. 143-146, 1999.

43 ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B.; DOS REIS, B. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. *Quim. Nova*, v. 23, n. 1, p. 119 - 125, 2000.

44 REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, A. M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. *Quim. Nova*, v. 12, n. 1, p. 82-91, 1989.

45 ROCKS, B.; RILEY, C. Flow-injection analysis: a new approach to quantitative measurements in clinical chemistry. *Clin. Chem.*, v. 28, n. 3, p. 409-421, 1982.

46 OLIVEIRA, M. C.; NOGUEIRA, R. F. P.; GOMES NETO, J. A. Sistema de injeção em fluxo espectrofotométrico para monitorar peróxido de hidrogênio em processo de fotodegradação por reação foto-fenton. *Quim. Nova*, v. 24, n. 2, p. 188-190, 2001.

47 ANICETO, C.; CANAES, L. S.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação espectrofotométrica de vitamina B_2 (ribovlavina) em formulações farmacêuticas empregando sistema da análises por injeção em fluxo. *Quim. Nova,* v. 23, n. 5, p. 637-640, 2000.

48 CANAES, L.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação turbidimétrica de metilbrometo de homatropina em formulações farmacêuticas empregando um sistema de análise por injeção em fluxo. *Quim. Nova*, v. 29, n. 6, p. 1-4, 2006.

49 MARTELLI, P. B.; ROCHA, F. R. P.; GORGA, R. C. P.; REIS, B. F. A flow system for spectrophotometric multidetermination in water exploiting reagent injection. *J. Braz. Chem. Soc.,* v. 13, n. 5, p. 642-646, 2002.

50 UNITED States Pharmacopeia: USP 26 The National Formuraly: USP 26 – NF 21. 26. ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Conventional, 2003.

51 PHARMACOPOEIA of Brazil. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1977.

52 TININIS, A. G.; SANTINI, A. O.; FAGNANI, E.; MELIOS, C.; PEZZA, L.; PEZZA, H.R. Desenvolvimento de metodologia simplificada para análise de hexametilenotetramina (hmt) em medicamentos contendo corantes em sua formulação. *Eclet. Química*, v. 26, p. 175-184, 2001.

53 AMEER, B.; BURLINGAME, M. B. Determination of bumetanide in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with flurescence detection. *Anal. Lett.,* v. 21, n. 9, p. 1589-1601, 1988.

54 CAMPÍNS-FALCÓ, P.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; SEVILLANO-CABEZA, A. Solid-Phase extraction techiniques for assay of diuretics in human urine samples. *J. Liq. Chromatogr***.**, v. 14, n. 19, p. 3575-3590, 1991.

55 EL SHERIF, A. A.; WALASH, M. I.; EL-TARRAS, M. F.; OSMAN, A. O. Colorimetric determination for two nonsteroidal anti-inflammatory drugs using *p*-dimethylaminocinnamaldehyde. *Anal. Lett.,* v. 30, n. 10, p. 1881-1896, 1997.

56 ZAWILLA, N. H.; ABDUL AZIM MOHAMMAD, M.; EL KOUSY, N. M.; EL-MOGHAZY ALY, S. M. Determination of aceclofenac in bulk and pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal*., v. 27, n. 1/2, p. 243-251, 2002.

57 SAEED, A.; HAQUE, S.; QURESHI, S. Z. Resin bead detection and spectrophotometric determination of oxyphenbutazone with *p*-dimethylaminocinnamaldehyde: Application to bulk drug and dosage forms. *Talanta*, v. 40, n. 12, p. 1867-1871, 1993.

58 LONG, G. L.; WINEFORFNER, J. D. Limit of detection – a closer look at the IUPAC definition*. Anal. Chem*., v. 55, n. 7, p. 712A-724A, 1983.

59 LANÇAS, F. M. *Validação de métodos cromatográficos de análise*. São Carlos: RiMa, 2004. 62 p.

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

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

62 DORONIN, S. Y.; CHERNOVA, R. K.; GUSAKOVA, N. N. Condensation of *p*-Dimethylaminocinnamaldehyde with aniline and substituted anilines in micellar media. *Russ. J. Gen. Chem.¸* v. 75, n. 2, p. 261-627, 2003.

63 THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem***.**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

64 BONET-DOMINGO, E.; TORRES-LAPAISÓ, J.R.; MEDINA-HERNÁNDEZ, M.J; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M.C. Chromatographic monitoring of diuretics in urine samples using a sodium dodecyl sulphate-propanol micellar eluent. *Anal.Chim. Acta,* v. 287, n. 3, p. 201-210, 1994.

65 CARDA-BROCH, S.; TORRES-LAPAISÓ, J.R.; ESTEVE-ROMERO, J.S.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M.C. Use of a three-factor interpretive optimization strategy in the development of an isocratic chromatographic procedure for the screening of diuretics in urine samples using micellar mobile phases. *J. Chromatogr., A,* v.893, n. 1/2, p. 321-337, 2000.