



UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia
Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento Analítico



IQB

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL EM FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS EMPREGANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO
EM FLUXO E DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA**

Arlan de Assis Gonsalves

Maceió - Alagoas

Abril de 2008



UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia



IQB

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL EM FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS EMPREGANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO
EM FLUXO E DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA**

Arlan de Assis Gonsalves

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química e
Biotecnologia da Universidade Federal de
Alagoas para obtenção do Título de Mestre
em Química Analítica e Ambiental.

Orientador: *Prof. Dr. Paulo César
Costa de Oliveira*

Maceió - Alagoas

Abril de 2008

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

G639d Gonsalves, Arlan de Assis.

Desenvolvimento de procedimento analítico para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas empregando análise por injeção em fluxo e detecção espectrofotométrica / Arlan de Assis Gonsalves. – Maceió, 2008.

xv, 75 f. : il. tabs., graf.

Orientador: Paulo César Costa de Oliveira.

Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de

Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2008.

Bibliografia: f. [70]-75.

1. Paracetamol – Análise. 2. Espectrofotometria. 3. Medicamentos – Formas farmacêuticas. 4. Análise por injeção de fluxo. I. Título.

CDU: 615.212.3

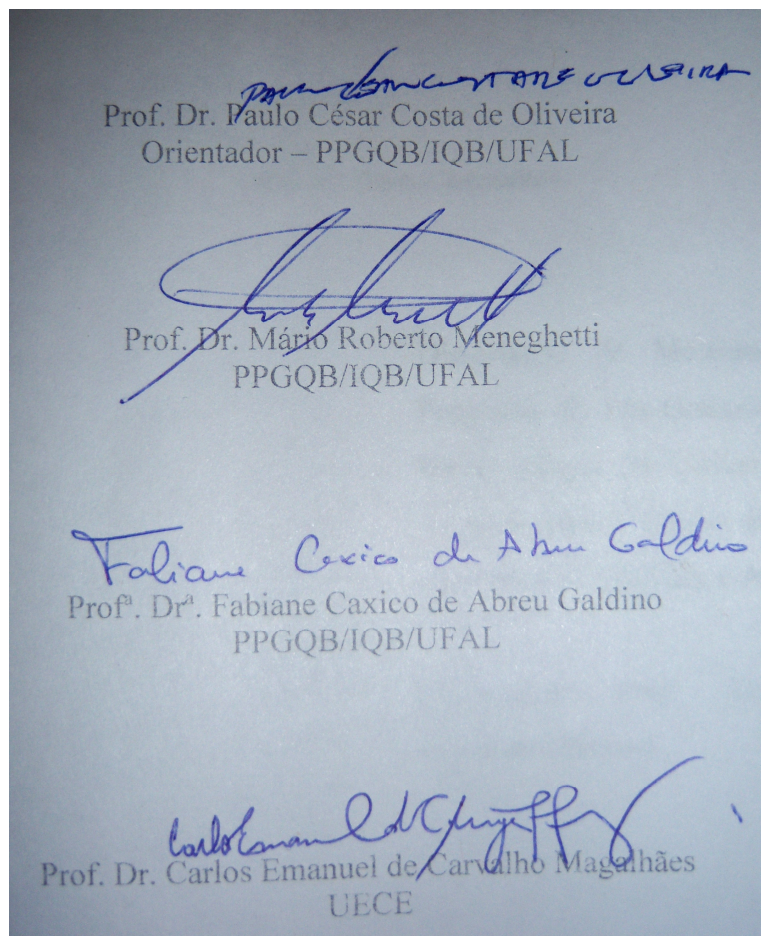


**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**
Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.qui.ufal.br

Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970
Maceió-AL
Brasil

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Arlan de Assis Gonsalves intitulada: **“Desenvolvimento de Procedimento Analítico para Determinação de Paracetamol em Formulações Farmacêuticas Empregando Análise por Injeção em Fluxo e Detecção Espectrofotométrica”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 18 de abril de 2008, às 14 hs na sala de Reuniões do IQB da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA



*“... AS PESSOAS SE CONVENCEM
DE QUE A SORTE ME AJUDOU,
MAS PLANTEI CADA SEMENTE
QUE MEU CORAÇÃO DESEJOU...”*

(Coração Pirata - Roupa Nova)

DEDICO ESTE TRABALHO A MEUS PAIS:

“Amarílio Gonsalves & Deusdete Ferreira de Assis”

BEM COMO À MINHA ESPOSA:

“Cleônia Roberta Melo Araújo”

PELOS EXEMPLOS DE VIDA E POR

TUDO APOIO CONCEDIDO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sempre está ao meu lado em todos os momentos, dando-me força, coragem, serenidade e proteção.

Ao Santo Expedito que sempre me ajuda na superação das dificuldades as quais me defronto.

A minha esposa Cleônia Roberta Melo Araújo, pelo apoio, auxílio e compreensão.

A minha mãe, pai, irmãos, tios, tias, primos, primas e amigos, pelo apoio em todas as horas.

A meu orientador Prof. Dr. Paulo César Costa de Oliveira, pela dedicação em transmitir seus conhecimentos, pelo espaço concedido em seu laboratório para o desenvolvimento de minha dissertação, por acreditar em minha capacidade e sempre me auxiliar em momentos oportunos.

Aos amigos do Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento Analítico – LINDA: Diógenes Meneses, Sônia Maria, Camila Calado e José Carlos pelos conhecimentos transmitidos entre o grupo, favores concedidos e também pelos momentos de descontração.

A Prof.^a Dra. Cristiane Xavier Galhardo, pela orientação e dedicação na transmissão de seus conhecimentos durante minha Iniciação Científica.

Ao Prof. Dr. Dennis de Oliveira Imbroisi, pelo espaço concedido em seu laboratório para a realização de alguns experimentos de minha dissertação.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química e Biotecnologia que fizeram parte do meu crescimento intelectual.

Aos amigos e colegas da pós-graduação.

Aos funcionários da secretaria do IQB e do PPGQB.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida durante toda a execução da dissertação.

Ao CNPq, CAPES e FAPEAL pelos auxílios concedidos.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Definições	xiv
Resumo	01
Abstract	02

1. Introdução

1.1 Aspectos Gerais	04
1.2 Paracetamol	06
1.2.1 Aspectos Químicos	06
1.2.2 Indicações Clínicas	08
1.2.3 Toxicidade	08
1.2.4 Controle de Qualidade	10
1.2.5 Métodos Oficiais para Quantificação de Paracetamol	10
1.2.5.1 Farmacopéia Brasileira (1977)	10
1.2.5.2 Farmacopéia Americana (USP XXI, 1985)	11
1.2.5.3 Método Oficial de Análise (AOAC, 1984)	13
1.2.6 Publicações para Determinação de Paracetamol	14
1.3 Análise por Injeção em Fluxo (FIA)	18
1.3.1 Origem da Técnica	18
1.3.2 Princípios da Técnica	20
1.3.3 Vantagens da Técnica	21
1.3.4 Componentes Fundamentais	21
1.3.5 Módulos de Análise por Injeção em Fluxo	25

2. Objetivos

2.1 Geral	27
2.2 Específicos	27

3. Experimental

3.1 Procedimento Proposto	29
3.2 Configuração do Módulo de Análise	30
3.3 Equipamentos e Vidrarias	31
3.4 Reagentes e Soluções	32
3.4.1 Preparo das Soluções	33
3.5 Amostras Seleccionadas	34
3.5.1 Preparo das Amostras	34

4. Resultados e Discussões

4.1 Estudos Espectroscópicos	37
4.1.1 Espectro de Absorção Molecular do Produto Cromogênico	37
4.1.2 Influência do pH na Formação do Produto Cromogênico	39
4.1.3 Tentativas de Extração, Isolamento e Identificação do Diazocomposto	42
4.2 Otimização dos Parâmetros Experimentais	44
4.2.1 Influência do Volume de Amostra/Padrão	44
4.2.2 Influência do Comprimento da Bobina de Mistura	46
4.2.3 Influência da Vazão Sobre o Sinal Analítico	48
4.2.4 Influência da Concentração de Ácido Clorídrico e Hidróxido de Sódio	49
4.2.5 Avaliação do Uso de Tampões Alcalinos em Substituição ao Hidróxido de Sódio	51
4.2.6 Influência da Temperatura do Banho Termostático	53
4.2.7 Influência da Concentração de Ácido Sulfanílico e Nitrito de Sódio	54
4.2.8 Avaliação do Uso de Sulfanilamida em Substituição ao Ácido Sulfanílico	56

4.2.9	Resumo das Condições Experimentais Otimizadas	57
4.3	Curva de Analítica de Referência para Determinação de Paracetamol	57
4.4	Análise das Amostras Reais pelo Método Proposto e Oficial	59
4.5	Testes de Recuperação de Padrão (Spike)	63
4.6	Avaliação de Espécies Interferentes	65
4.7	Exatidão e Precisão do Procedimento Proposto	65
4.8	Reprodutibilidade do Procedimento Proposto	66
4.9	Frequência de Amostragem e Consumo de Reagentes	67
5.	Conclusão	68
6.	Perspectivas de Continuidade	70
7.	Referências Bibliográficas	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Série de compostos derivados do para-aminofenol.	07
Figura 2. Metabolismo hepático do paracetamol em humanos.	09
Figura 3. Configuração clássica de um módulo de análise empregando fluxo segmentado e demonstração do processo de mistura por convecção.	19
Figura 4. Configuração clássica de um módulo de análise empregando injeção em fluxo e demonstração do processo de mistura por dispersão.	19
Figura 5. Bomba peristáltica de 4 canais, cassetes, tubos de propulsão e ilustração demonstrando a relação entre os mesmos.	22
Figura 6. Funcionamento de um injetor-comutador de 6 vias.	23
Figura 7. Injetor-comutador manual de 6 vias e ilustração demonstrando a relação entre o mesmo com tubos de extensão e alça de amostragem.	23
Figura 8. Acessórios utilizados no trabalho.	24
Figura 9. Espectrofotômetro e celas de fluxo utilizadas no presente trabalho.	25

Figura 10. Seqüência de reações sugerida para a formação do produto cromogênico.	29
Figura 11. Configuração do sistema de injeção em fluxo proposto para a determinação de paracetamol.	30
Figura 12. Espectros de absorção molecular das soluções de estudo.	38
Figura 13. Reação de formação do produto cromogênico monitorado por Suarez <i>et al.</i> 2005 e Knochen <i>et al.</i> 2003.	38
Figura 14. Influência do pH na formação do produto cromogênico.	40
Figura 15. Reação lateral interferente na formação do produto cromogênico.	41
Figura 16. Variação de coloração das soluções de estudo do produto cromogênico em função do pH.	42
Figura 17. Natureza anfótera do diazocomposto sugerido.	43
Figura 18. Influência do volume de amostra\padrão.	45
Figura 19. Influência do comprimento da bobina de mistura.	47

Figura 20. Influência da vazão sobre o sinal analítico.	48
Figura 21. Influência da concentração de ácido clorídrico e hidróxido de sódio.	50
Figura 22. Avaliação do uso do tampão $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{NaOH}$ em substituição à solução de hidróxido de sódio.	52
Figura 23. Influência da temperatura do banho termostaticado.	53
Figura 24. Influência da concentração de ácido sulfanílico e nitrito de sódio.	55
Figura 25. Reagentes comumente empregados para reações de diazoacoplamento.	56
Figura 26. Curva analítica de referência para determinação de paracetamol.	58
Figura 27. Correlação entre os resultados das análises pelo método oficial e proposto.	62
Figura 28. Comparação de curvas analíticas construídas em dias diferentes.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do paracetamol.	07
Tabela 2. Levantamento de alguns trabalhos empregando análise em fluxo com detecção óptica para a determinação de paracetamol.	15
Tabela 3. Figuras de mérito de publicações para determinação de paracetamol empregando FIA e espectrofotometria.	17
Tabela 4. Diferenças fundamentais entre análise por injeção em fluxo e em fluxo segmentado.	20
Tabela 5. Concentrações finais dos componentes presentes em cada solução de estudo.	37
Tabela 6. Relação entre o volume de hidróxido de sódio adicionado e o pH das soluções de estudo.	39
Tabela 7. Tampões avaliados em substituição à solução de hidróxido de sódio.	49
Tabela 8. Resumo das condições experimentais otimizadas.	55
Tabela 9. Comparação dos resultados obtidos nas determinações de paracetamol.	59
Tabela 10. Teste de recuperação de padrão de paracetamol em medicamentos.	62
Tabela 11. Coeficientes angulares das equações da reta das curvas analíticas plotadas.	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E DEFINIÇÕES

A	Amostra;
A _{AR}	Absorbância da solução de amostra real;
AOAC	Do inglês, <i>Association of Official Analytical Chemists</i> , Associação Oficial de Químicos Analíticos;
A _{PR}	Absorbância da solução do padrão de referência;
AS	Solução de estudo de ácido sulfanílico;
B	Solução de estudo do branco;
BM	Bobina de mistura;
BP	Bomba peristáltica;
C	Concentração da solução padrão (em mg L ⁻¹);
C _{A+P}	Concentração do analito na amostra (em mg L ⁻¹);
C ₁	Primeira confluência;
C ₂	Segunda confluência;
C1	Curva analítica do dia 27/02/07;
C2	Curva analítica do dia 23/03/07;
C3	Curva analítica do dia 29/03/07;
C4	Curva analítica do dia 13/04/07;
CYP450	Enzimas do citocromo P450;
CV	Coefficiente de variação;
DB	Desborbulhador;
DC	Descarte;
DP	Desvio padrão;
DET	Detector;
det.	Determinações;
EAM	Espectrofotometria de Absorção Molecular
Eq.	Equação;
ER	Erro relativo;
FIA	Do inglês, <i>Flow Injection Analysis</i> , Análise por Injeção em Fluxo;
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier;
GSH	Grupos sulfidril da glutatona;
INJ	Injetor;

LD	Limite de detecção;
LQ	Limite de Quantificação;
Mt	Massa do tablete (em g);
Ma	Massa da amostra (em g);
NADPH ₂	Fosfato dinucleotídico de adenina e nicotinamida reduzido;
NF	Do inglês, <i>National Formulary</i> , Formulário Nacional;
P	Solução de estudo de paracetamol;
P.A.	Pureza Analítica;
PC	Solução de estudo do produto cromogênico;
pH	Potencial hidrogeniônico;
pKa	Potencial da constante de ionização do ácido;
r	Coefficiente de correlação;
R	Reagente;
R1	Hidróxido de sódio;
R2	Nitrito de sódio;
R3	Ácido sulfanílico (C ₆ H ₇ NO ₃ S);
RSD	Do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i> , Desvio Padrão Relativo;
SFA	Do inglês, <i>Segmented Flow Analysis</i> , Análise em Fluxo Segmentado;
ST	Solução Transportadora;
USP	Do inglês, <i>United States Pharmacopeia</i> , Farmacopéia dos Estados Unidos;
UV	Ultravioleta;
V	Volume tomado (em mL) de amostra real;
Vis	Visível;

RESUMO

A quantificação de princípios ativos é uma etapa indispensável do controle de qualidade de medicamentos, e em virtude disto, o número de metodologias desenvolvidas destinadas às aplicações farmacêuticas vem crescendo constantemente, visto que, diante de grandes demandas de análises, o desenvolvimento de procedimentos rápidos, pouco dispendiosos e automatizados é de grande valia. Desta forma, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de procedimento analítico para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas empregando Análise por Injeção em Fluxo (FIA) associada à detecção espectrofotométrica. O interesse por este analito reside no fato deste fármaco ser um dos analgésicos/antipiréticos mais utilizados no Brasil. O procedimento proposto baseia-se na reação de diazoacoplamento entre ácido sulfanílico e paracetamol em meio alcalino com formação de um diazocomposto laranja-avermelhado que absorve intensamente em 500 nm. Foram realizados estudos de otimização dos parâmetros experimentais e construída uma curva de referência para determinação de paracetamol. A faixa linear de trabalho compreendem concentrações entre 4,00 e 16,00 mg L⁻¹ de paracetamol, com um coeficiente de correlação de 0,9991. O limite de detecção para a faixa de trabalho considerada mostrou-se igual a 0,30 mg L⁻¹. O desvio padrão relativo para 10 replicatas da solução padrão contendo 8,00 mg L⁻¹ de paracetamol foi 1,28 %. As análises das amostras reais pelo procedimento proposto e pelo método oficial demonstraram resultados comparáveis. Os teores nominais de paracetamol declarados pelos fabricantes nos rótulos de todas as formulações farmacêuticas analisadas mostraram conformidades com as especificações oficiais. Estudos de recuperação em amostras reais revelaram uma taxa média de 97,1 % do padrão de paracetamol adicionado, garantindo desta forma a confiabilidade do procedimento proposto. Os resultados alcançados neste trabalho evidenciaram a viabilidade do emprego do procedimento proposto para a determinação de paracetamol, uma vez que este método adotou um sistema mecanizado simples, prático e quando aplicado para a quantificação de paracetamol em amostras comerciais produziu resultados que não diferiram significativamente do método oficial. Outras vantagens relacionadas a este procedimento são o uso de reagentes pouco tóxicos e de baixo custo, boa precisão (repetibilidade) e reprodutibilidade, geração de produto cromogênico altamente estável e com sensibilidade adequada para propósitos de controle de qualidade.

ABSTRACT

The quantification of active principles is an indispensable stage of medicines quality control. For that reason a number of methodologies intended for pharmaceutical applications is constantly growing up. Thus, in view of great analysis demands, the development of low-cost, fast and automatized procedures is very useful. In this way, the present work proposes an analytical procedure for determination of paracetamol in pharmaceutical formulations employing Flow Injection Analysis (FIA) coupled to spectrophotometric detection. Interests for paracetamol is due to its large use as analgesic/antipyretic in Brazil. The proposed procedure is based on diazo-coupling reaction between sulfanilic acid and paracetamol in alkaline medium which forms an orange-reddish diazocompound that absorbs intensively at 500 nm. Optimization studies were carried out with experimental parameters and plotting a reference curve for determination of paracetamol. The linear work range including concentrations between 4.00 and 16.00 mg L⁻¹ of paracetamol, with a correlation coefficient of 0.9991. The limit of detection for the considered work range shown be equal to 0.30 mg L⁻¹. The relative standard deviation to 10 replicates of the standard solution containing 8.00 mg L⁻¹ of paracetamol was 1.28 %. The real sample analysis by the proposed procedure and by the official method demonstrated comparables results. The nominal amounts of paracetamol declared by the fabricants on the label of all analyzed pharmaceuticals formulations showed good agreement with the official specifications. Recovery studies in real samples revealed a mean rate of 97.1 % of the paracetamol standard added, assuring in such way the confidence of the proposed procedure. Studies realized in this work makes evident the viability of the use of the proposed procedure for determination of paracetamol, since this method has adopted an simple mechanized system, practice and produce results that do not differ significantly from the official method. Other advantages related at this procedure are the use of low toxic reagents and of low cost, good precision (repeatability) and reproducibility, generation of cromogenic product highly stable and suitable sensibility for quality control purposes.

1. Introdução



1.1 ASPECTOS GERAIS

A quantificação de princípios ativos é uma etapa fundamental do processo de controle de qualidade de medicamentos, que consiste em um conjunto de operações com o objetivo de verificar se o produto está em conformidade com as especificações farmacopêicas. A confirmação de quaisquer irregularidades nos medicamentos pode representar uma série de atribuições para a empresa produtora dos mesmos, dentre as quais estão os prejuízos decorrentes da re-fabricação, a perda de credibilidade e até a cassação da licença de funcionamento e do registro do produto. Em contrapartida, para os usuários de medicamentos, a falta de qualidade dos mesmos pode ocasionar uma série de transtornos e até o comprometimento de sua saúde (Peixoto *et al.*, 2005).

Nos laboratórios de controle de qualidade das industriais farmacêuticas, o doseamento é a etapa mais trabalhosa, dispendiosa e a que exige um tempo maior de concretização, visto que, para a determinação das substâncias ativas nos medicamentos, os métodos oficiais de análise normalmente consistem de um conjunto de procedimentos que demandam tempo e consomem muita mão-de-obra e reagentes químicos. Em razão disto, o número de metodologias desenvolvidas destinadas às aplicações farmacêuticas vem crescendo constantemente, tornando-se inclusive uma área de pesquisa bastante atraente para os químicos analíticos, visto que, diante de grandes demandas de análises, o desenvolvimento de procedimentos rápidos, pouco dispendiosos e automatizados é de grande valia. Desta forma, métodos inovadores sejam para a determinação do teor das substâncias ativas nas formulações farmacêuticas ou ainda para o suporte em estudos farmacocinéticos em fluidos biológicos, são de fundamental importância (Trojanowicz, 2000).

O paracetamol é um fármaco analgésico e antipirético largamente utilizado no Brasil, estando presente em várias formulações farmacêuticas comercialmente disponíveis no país (Barreiro *et al.*, 2001) e incluído na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (Ministério da Saúde, 2007). Atualmente, o paracetamol vem sofrendo exaustiva utilização no Brasil, devido principalmente à sua consolidação como substituto preferencial dos salicilatos (Silva, 2002). As constantes epidemias de dengue que atualmente acometem diversas regiões do país também estão contribuindo de forma bastante significativa para a utilização deste medicamento, visto que, durante estes surtos epidêmicos, deve-se evitar o uso de analgésicos-antipiréticos a base de salicilatos (ácido acetil salicílico, salicilato de sódio e salicilamida), já que estes fármacos podem favorecer o aparecimento de manifestações hemorrágicas (Brunton *et al.*, 2006).

Diante de sua extensa fabricação, utilização e importância clínica, diferentes procedimentos analíticos já foram descritos para a determinação de paracetamol, tanto em formulações farmacêuticas quanto em fluidos biológicos, tais como: espectrofotometria de absorção molecular na região do visível (Aniceto *et al.*, 2002; Knochen *et al.*, 2003; Suarez *et al.*, 2005; Filik *et al.*, 2006), espectrofluorimetria (Olivac *et al.*, 2005), espectroscopia no infra-vermelho próximo (Dou *et al.*, 2005), espectroscopia Raman (Junior, 2002), espectrofotometria derivativa (Dinç *et al.*, 2001), voltametria em pulso diferencial (Wang *et al.*, 2001; Santos, 2003), espectroeletroquímica (Fang *et al.*, 1997) e cromatografia (Perez *et al.*, 1999).

A técnica de Análise por Injeção em Fluxo (FIA), proposta em 1975 pelo Dr. Jaromir Ruzicka vem, desde essa década, sofrendo ampla utilização em diversas áreas da Química Analítica, fato comprovado pela publicação de artigos científicos por pesquisadores de mais de 40 países. A referida técnica tornou-se bastante difundida, pois pode ser implementada com instrumentação de baixo custo, além de possuir elevada versatilidade, repetibilidade, reprodutibilidade e desempenho, favorecendo análises rápidas com mínimo consumo de reagentes e amostras e reduzida geração de resíduos químicos, tornando-a muito atraente em laboratórios de análise química de rotina (Reis, 1996).

Devido à grande importância da quantificação do paracetamol e à versatilidade da FIA, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de procedimento analítico alternativo para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas empregando Análise por Injeção em Fluxo (FIA) associada à detecção espectrofotométrica de absorção molecular (EAM) na região do visível.

Além do enfoque de toda a parte experimental realizada durante o desenvolvimento do procedimento analítico proposto, esta dissertação também realiza uma breve revisão literária sobre o paracetamol, analito de interesse na dissertação, e sobre Análise por Injeção em Fluxo (FIA), técnica empregada no método desenvolvido.

1.2 PARACETAMOL

O paracetamol, também denominado acetaminofeno, foi sintetizado em 1878 por Morse, e primeiramente utilizado na clínica médica por von Mering em 1887 (Bertolini et al., 2006). Somente em 1949, o paracetamol foi oficialmente introduzido como agente terapêutico, uma vez que foi reconhecido que essa substância era o principal metabólito ativo da fenacetina e acetanilida, fármacos analgésicos e antipiréticos que o precederam terapêuticamente desde o século XVIII (Silva, 2002).

Farmacologicamente o paracetamol é classificado como um analgésico não-narcótico, antipirético e antiinflamatório não-esteróidal, apesar de possuir esta última atividade pouco significativa. (Brunton et al., 2006)

No Brasil, o paracetamol é um fármaco largamente utilizado, fazendo parte inclusive da RENAME-2007 (Relação Nacional de Medicamentos Essenciais) (Ministério da Saúde, 2007). Atualmente, este princípio ativo vem se tornando o mais empregado dentre os demais pertencentes à sua classe terapêutica, devido principalmente à sua consolidação como substituto preferencial dos salicilatos (Silva, 2002). Esta afirmação deve-se à sua elevada eficácia farmacológica no combater à dor e à febre, aos reduzidos efeitos colaterais gastrintestinais, a não interferência no processo normal de coagulação sangüínea e a ausência de indução da Síndrome de Reye em crianças (Brunton et al., 2006).

Os contínuos surtos epidêmicos da dengue que atualmente acometem diversas regiões do Brasil, também estão contribuindo de forma bastante expressiva para o crescimento da utilização de paracetamol no país, pois, durante esses períodos críticos, deve-se evitar o uso de analgésicos-antipiréticos a base de salicilatos, principalmente quando o indivíduo apresentar sintomas característicos de gripes ou viroses (dor muscular, cefaléia, coriza, constipação nasal etc.), uma vez que estes fármacos podem favorecer o aparecimento de quadros hemorrágicos caso o diagnóstico da dengue seja confirmado.

1.2.1 ASPECTOS QUÍMICOS

O paracetamol, acetaminofeno, *N*-acetil-*p*-aminofenol ou 4-acetamidofenol, é um ácido orgânico fraco ($pK_a = 9,50$), pertencente à classe dos derivados do *para*-aminofenol

(Figura 1) e o último fármaco ainda utilizado na clínica médica representante dos “analgésicos anilínicos”: acetanilida, fenacetina e paracetamol (Bertolini *et al.*, 2006).

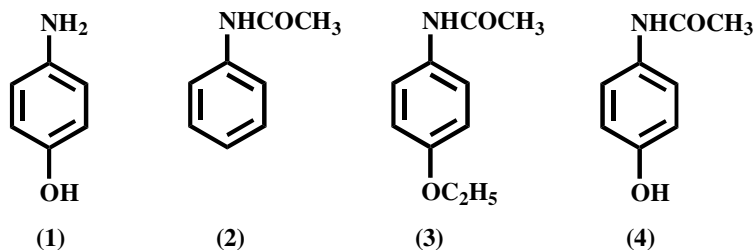


Figura 1. Série de compostos derivados do *para*-aminofenol. *Legenda:* (1) *para*-aminofenol, (2) acetanilida, (3) fenacetina e (4) paracetamol. (Adaptada de: Silva, 2002)

Algumas importantes características químicas do paracetamol encontram-se resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades químicas do paracetamol.

Fórmula Estrutural	Fórmula Molecular	Massa Molar	Descrição	Solubilidade	Conservação
	C ₈ H ₉ NO ₂	151,16 g mol ⁻¹	Pó cristalino, branco, inodoro, de leve sabor amargo.	Solúvel em água fervente, hidróxido de sódio e álcool.	Em recipientes herméticos e opacos

(Extraído de: *Farmacopéia Brasileira*, 1977)

1.2.2 INDICAÇÕES CLÍNICAS

O paracetamol é o substituto mais indicado do ácido acetilsalicílico no combate à dor e à febre, principalmente quando o paciente encontra-se em situações nas quais é contraindicada a administração deste medicamento, tais como: pessoas hipersensíveis à substância, indivíduos com úlcera péptica ou gastrite, crianças em estados febris e adultos com suspeitas de dengue (Brunton *et al.*, 2006).

1.2.3 TOXICIDADE

Devido ao uso demasiado e incorreto, o número de envenenamentos acidentais ou deliberados com paracetamol vem crescendo continuamente. Nas primeiras 24 horas de um quadro de intoxicação aguda (overdose) por paracetamol, podem ocorrer náuseas, vômitos, anorexia e dores abdominais, e dentro de 36 horas pode haver evidências clínicas de lesão hepática. Condições mais complicadas e perigosas são alcançadas a partir do terceiro dia de evolução, onde quadros clínicos de insuficiência renal, devido à necrose tubular aguda e insuficiência hepática fulminante associada à necrose tecidual levam, na maioria dos casos, o paciente à morte (Silva, 2002).

No homem, a ocorrência de danos hepáticos após a absorção de doses abaixo de 125 mg kg^{-1} é pouco comum, mas podem ocorrer. Essa taxa pode ser alcançada após a ingestão de uma única dose de 10 a 15 g do medicamento. Após doses de 250 mg kg^{-1} , lesões hepáticas graves ocorrem em 50 % dos indivíduos, isso equivale à administração única de 15 a 20 g de paracetamol. Com doses iguais ou superiores a 350 mg kg^{-1} , o comprometimento hepático é clinicamente evidente em 100 % dos indivíduos, podendo levá-los à morte, caso não haja um tratamento emergencial dos intoxicados. Esta taxa é atingida após o consumo de 20 a 25 g do analgésico em dose única. (Brunton *et al.*, 2006).

O mecanismo no qual uma overdose de paracetamol acarreta lesão ou necrose hepatocelular envolve sua conversão ao metabólito altamente reativo e tóxico, o *N*-acetil-*p*-benzoquinonaimina, após as vias metabólicas principais, conjugação com ácido glicurônico e sulfúrico tornarem-se saturadas devido à intensa atividade de metabolização hepática do fármaco. O metabólito tóxico que não sofrer conjugação com grupos sulfidril da glutathione (GSH) liga-se de forma covalente a macromoléculas celulares, acarretando disfunções dos

sistemas enzimáticos e desarranjo estrutural e metabólico do fígado (Figura 2) (Brunton *et al.*, 2006).

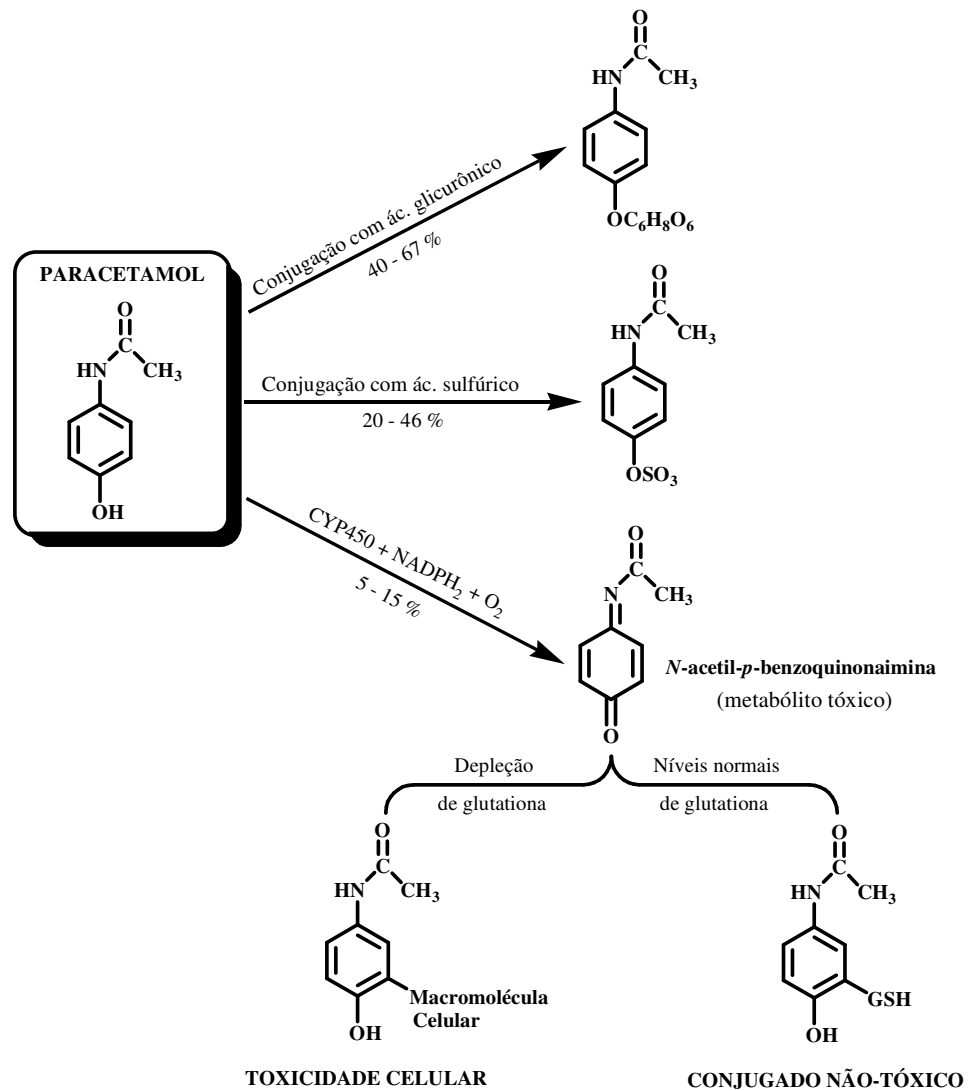


Figura 2. Metabolismo hepático do paracetamol em humanos. (Adaptada de: Bertolini *et al.*, 2006)

1.2.4 CONTROLE DE QUALIDADE

Para garantir que os medicamentos estejam adequados para administração e assegurar que seu emprego não venha acarretar riscos à saúde humana, diversos ensaios de qualidade descritos em compêndios oficiais e baseados em medidas físicas, químicas e microbiológicas são recomendados, devendo ser realizados pelas empresas produtoras antes de sua liberação ao consumidor.

Com relação ao paracetamol e dentre os ensaios de qualidade usualmente realizados, faixa de fusão, pH, teor de água, resíduos de metais pesados, de subprodutos ou ainda de substâncias facilmente carbonizáveis, a quantificação do princípio ativo no produto final é um dos mais importantes, uma vez que é fator primário na garantia da administração de doses corretas. Desta forma, a quantificação visa contornar episódios decorrentes da não-conformidade dos teores da substância com o indicado nominalmente nos rótulos dos medicamentos tais como: ineficácia terapêutica devido à administração de subdoses, ou ainda, quadros de intoxicação associados a doses acima das recomendadas.

1.2.5 MÉTODOS OFICIAIS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PARACETAMOL

1.2.5.1 FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1977)

A Farmacopéia Brasileira (3^a Ed., 1977) preconiza, para o doseamento de paracetamol em amostras sólidas (comprimidos e tabletes orais), a espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta. O procedimento detalhado para amostras líquidas (soluções orais) a farmacopéia não descreve.

Procedimento para amostras sólidas: pesar cuidadosamente 0,1200 g ($\pm 0,0001$) da amostra real, dissolver em 10,00 mL de metanol e diluir com água destilada ao volume final de 500,00 mL. Transferir 5,00 mL desta solução a um balão volumétrico de 100,00 mL, completando novamente com água destilada ao volume correspondente. Preparar um padrão de referência de paracetamol numa concentração de 12,00 mg L⁻¹ no mesmo meio e da mesma forma da amostra real e determinar as absorbâncias empregando cubetas de quartzo de 1,00 cm de percurso óptico em 244 nm, usando água destilada como branco. A quantidade do analito (em mg) na massa pesada de amostra real é então obtida por meio da Equação 1.

$$M_{\text{analito (mg)}} = 10 C (A_{\text{AR}} / A_{\text{PR}})$$

Eq. 1

Onde C é a concentração da solução padrão (em mg L⁻¹) e A_{AR} e A_{PR} as absorvâncias das soluções de amostra real e padrão de referência, respectivamente.

1.2.5.2 FARMACOPÉIA AMERICANA (USP XXI, 1985)

A Farmacopéia dos Estados Unidos e seu Formulário Nacional (*The United States Pharmacopeia – USP XXI; The National Formulary – NF XVI, 1985*) recomenda, para o doseamento de paracetamol em amostras líquidas (soluções orais), a espectrofotometria de absorção molecular na região do visível. Ao passo que, para a determinação de paracetamol em amostras sólidas (tabletes orais), a cromatografia líquida com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta é o método preconizado.

Procedimento para amostras líquidas: Transferir um volume precisamente medido da solução oral, previamente agitada e que contenha o equivalente a 100 mg de paracetamol para um erlenmeyer de 100,0 mL. Adicionar 60,00 mL de água destilada e deixar sob agitação mecânica durante 30 minutos. Transferir a solução para um balão volumétrico de 100,00 mL e completar até o menisco. Preparar um padrão de referência de paracetamol numa concentração de 100,00 mg L⁻¹. Transferir separadamente 10,00 mL de cada solução (amostra e padrão) para balões volumétricos de 50,00 mL, adicionando em cada um deles os seguintes reagentes: 2,00 mL de ácido clorídrico 6,00 mol L⁻¹ e 5,00 mL de nitrito de sódio 10,00 % (m/v), misturar e aguardar 15 minutos. Adicionar 5,00 mL de sulfamato de amônio 15,00 % (m/v), agitar suavemente e deixar esfriar à temperatura ambiente. Adicionar 15,00 mL de hidróxido de sódio 2,50 mol L⁻¹, agitar, deixar esfriar à temperatura ambiente e completar com água destilada ao volume final. Determinar concomitantemente as absorvâncias de ambas as soluções (padrão e amostra) em cubetas de vidro de 1,00 cm de percurso óptico em 430 nm adotando água destilada como branco. Calcular a concentração (em mg mL⁻¹) de paracetamol na amostra real por meio da Equação 2.

$$C_{\text{analito}} (\text{mgmL}^{-1}) = (C / V) (A_{\text{AR}} / A_{\text{PR}})$$

Eq. 2

Onde C é a concentração da solução padrão (em mg L⁻¹), V é o volume tomado (em mL) da amostra real e A_{AR} e A_{PR} as absorvâncias das soluções de amostra real e padrão de referência, respectivamente.

Procedimento para amostras sólidas: a) *Preparação da coluna cromatográfica:* Inserir com um bastão uma compressa de lã de vidro na base de um tubo cromatográfico (25 mm x 25 cm fundido a tubo de 7 mm x 5 cm de comprimento). Transferir a um béquer de 100,0 mL e sob agitação mecânica, 2,00 g de sílica e 2,00 mL de uma solução contendo bicarbonato de sódio 1,00 % (m/v) e carbonato de sódio 4,50 % (m/v) até gerar uma mistura macia. Transferir a mistura à coluna empacotando delicadamente o material até obter uma massa uniforme. b) *Preparação do padrão e amostra:* Preparar um padrão de referência de paracetamol de 8,00 mg L⁻¹ em ácido clorídrico 1,00 x 10⁻³ mol L⁻¹, utilizando metanol como solvente. Na preparação da amostra real, macerar no mínimo 20 tabletes e pesar cuidadosamente uma massa de pó equivalente a 250 mg de paracetamol. Transferir cuidadosamente a massa pesada a um balão volumétrico de 250,00 mL e adicionar 2,00 mL de hidróxido de sódio 1,00 mol L⁻¹, agitar, completar com água destilada ao volume final e filtrar, descartando os primeiros 20,00 mL do filtrado. c) *Cromatografia líquida:* Transferir 2,00 mL do filtrado contendo a amostra para um béquer de 100,0 mL; adicionar uma gota de ácido clorídrico concentrado e 3,00 g de sílica agitando continuamente. Transferir a mistura para a coluna cromatográfica, lavando o béquer com uma segunda mistura contendo 1,00 g de sílica e duas gotas de água destilada, também transferindo o lavado para a coluna. Empacotar delicadamente a coluna e inserir com auxílio de um bastão uma compressa de lã de vidro no topo da mesma. Lavar a coluna com 100,00 mL de clorofórmio, descartando o eluato. Eluir a amostra utilizando éter e coletar o eluato em um béquer de 500,0 mL. Evaporar o éter em rota-vapor e secar com auxílio de uma bomba de vácuo. Dissolver o resíduo em 30,00 mL de uma solução composta pela mistura de 1,00 mL de ácido clorídrico 1,00 % (v/v) e 99,00 mL de metanol. Transferir o volume para um balão volumétrico de 50,00 mL e completar ao volume final com metanol. Transferir 10,00 mL desta solução a outro balão de 50,00 mL ajustando novamente ao volume final com o mesmo solvente. d) *Doseamento:*

Concomitantemente determinar as absorvâncias da solução padrão e solução final da amostra em cubetas de quartzo de 1,00 cm de percurso óptico em 249 nm, adotando como branco uma solução contendo ácido clorídrico $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em metanol. Calcular a quantidade (em mg) de paracetamol na massa pesada de amostra real por meio da Equação 3.

$$C_{\text{analito (mg)}} = 31,25 C (A_{\text{AR}} / A_{\text{PR}})$$

Eq. 3

Onde C é a concentração da solução padrão (em mg L^{-1}) e A_{AR} e A_{PR} as absorvâncias das soluções de amostra real e padrão de referência, respectivamente.

1.2.5.3 MÉTODO OFICIAL DE ANÁLISE (AOAC, 1984)

O método oficial recomendado pela Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (Association of Official Analytical Chemists – AOAC, 1984), emprega para o doseamento de paracetamol em tabletes orais, a espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta. O procedimento assemelha-se bastante com o método empregado pela Farmacopéia Americana, diferenciando-se apenas em alguns pontos.

Procedimento: a) *Preparação da coluna cromatográfica:* Inserir uma compressa de lã de vidro na base de um tubo cromatográfico (25 mm x 25 cm). Transferir a um béquer de 100,0 mL e sob agitação, 3,00 g de terra de diatomáceas e 2,00 mL de uma solução tampão (pH \cong 10,10) composta de bicarbonato de sódio 1,00 % (m/v) e carbonato de sódio 4,50 % (m/v) até formar uma massa sólida de aparência mole. Transferir a mistura à coluna empacotando delicadamente o material até obter uma massa uniforme. b) *Preparação do padrão e amostra:* Preparar um padrão de referência de paracetamol de $8,00 \text{ mg L}^{-1}$ contendo ácido clorídrico $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e utilizando metanol como solvente. Na preparação da amostra real, pesar cuidadosamente uma massa de pó contendo o equivalente a 240 mg de paracetamol. Transferir a massa pesada a um balão volumétrico de 250,00 mL e adicionar 2,00 mL de hidróxido de sódio $1,00 \text{ mol L}^{-1}$, agitar e completar com água destilada ao volume final. c) *Cromatografia líquida:* Transferir 2,00 mL da solução de amostra a um béquer de 100,0 mL; adicionar uma gota de ácido clorídrico concentrado e 3,00 g de terra de diatomáceas agitando continuamente. Transferir a mistura para a coluna cromatográfica,

lavando o béquer com uma segunda mistura contendo 1,00 g de terra de diatomáceas e duas gotas de água destilada. Empacotar delicadamente a coluna e inserir uma compressa de lã de vidro no topo da mesma. Lavar a coluna com 100,00 mL de clorofórmio, descartando o eluato. Eluir a amostra utilizando 150,00 mL de éter, coletando o eluato em um béquer de 500,0 mL. Evaporar o solvente em rota-vapor e secar com auxílio de uma bomba de vácuo. Dissolver o resíduo em 30,00 mL de solução composta de 1,00 mL de ácido clorídrico 1,00 % (v/v) e 99,00 mL de metanol. Transferir o volume para um balão volumétrico de 50,00 mL e completar ao volume final com o mesmo solvente. Transferir 10,00 mL desta solução a outro balão de 50,00 mL ajustando novamente ao volume final com o mesmo solvente. *d) Doseamento:* Concomitantemente determinar as absorbâncias da solução padrão e solução final da amostra em cubetas de quartzo de 1,00 cm de percurso óptico em 249 nm, adotando como branco uma solução contendo ácido clorídrico $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em metanol. Calcular a quantidade (em mg) de paracetamol na massa de amostra real por meio da Equação 3 (seção 1.2.5.2; p. 13).

1.2.6 PUBLICAÇÕES PARA DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL

Como resultado da busca por técnicas analíticas mais eficientes e destinadas ao controle de qualidade de um dos medicamentos mais utilizados no mundo (Bosch *et al.*, 2006), diversas metodologias foram e continuam sendo desenvolvidas para auxiliar na determinação de paracetamol, esteja este em sua forma pura (matéria-prima), em fluidos biológicos, em formulações farmacêuticas ou em associações com outras substâncias. A Tabela 2 traz alguns procedimentos analíticos desenvolvidos empregando Análise por Injeção em Fluxo (FIA) associada a diferentes técnicas de detecção para a determinação de paracetamol.

Tabela 2. Levantamento de alguns trabalhos empregando análise por injeção em fluxo com detecção óptica para determinação de paracetamol.

Detecção	Técnica(s) Associada(s)	Reagentes Cromogênicos Empregados	Matriz	Referência
Espectrofotometria no Vis*	FIA e Multicomutação	Hipoclorito de Sódio e Salicilato de Sódio	Formulações Farmacêuticas	Lavorante <i>et al.</i> , 2006
Quimiluminescência	FIA	Tris(2,2'-bipiridil)rutênio(II) e Permanganato de Potássio	Formulações Farmacêuticas	Ruengsitagoon <i>et al.</i> , 2006
Espectrofotometria no Vis*	FIA	Ácido Nitroso	Produtos Farmacêuticos	Suarez <i>et al.</i> , 2005
Espectrofotometria no Vis*	FIA	Nitrito de Sódio	Tabletes e Soluções Oraís	Knochen <i>et al.</i> , 2003
Espectrofotometria no Vis*	FIA	Hipoclorito de Sódio e Salicilato de Sódio	Formulações Farmacêuticas	Aniceto <i>et al.</i> , 2002
Espectrofotometria no Vis*	FIA e Hidrólise por Microondas	<i>o</i> -cresol	Formulações Farmacêuticas	Criado <i>et al.</i> , 2000
Espectrofotometria no UV*	FIA e Pré-concentração	Nenhum (Suporte Sólido: Sephadex QAE A-25)	Formulações Farmacêuticas	Cañada <i>et al.</i> , 2000
Espectrofotometria no UV*	FIA e Pré-concentração	Nenhum (Suporte Sólido: Sephadex QAE A-25)	Preparações Farmacêuticas	Medina <i>et al.</i> , 1999
Espectrometria por FTIR*	FIA	Ferricianeto de Potássio	Tabletes Oraís	Ramos <i>et al.</i> , 1998
Espectrofluorimetria	FIA e “ <i>Stopped-flow</i> ”	Hexacianoferrato de Potássio	Preparações farmacêuticas	Pulgarín <i>et al.</i> , 1996
Espectrofotometria no Vis*	FIA e Hidrólise por Microondas	8-Hidroxiquinolina e Periodato de Potássio	Formulações Farmacêuticas	Bouhsain <i>et al.</i> , 1996
Espectrofotometria no Vis*	FIA	2-Iodilbenzoato	Formulações de Drogas	Verma <i>et al.</i> , 1992
Espectrofluorimetria	FIA e Reação em Fase Sólida	Hexacianoferrato de Potássio	Formulações Farmacêuticas	Calatayud <i>et al.</i> , 1990

Espectrofotometria no Vis*	FIA e Reação em Fase Sólida	Hexacianoferrato de Potássio e Fenol	Formulações Farmacêuticas	Calatayud <i>et al.</i> , 1989
Espectrofotometria no Vis*	FIA	Hexacianoferrato de Potássio e Fenol	Formulações Farmacêuticas	Calatayud <i>et al.</i> , 1986

*Vis (Visível); UV (Ultravioleta) e FTIR (Infravermelho com Transformada de Fourier).

Dentre os trabalhos citados na Tabela 2, alguns deles envolvendo FIA e detecções espectrofotométricas na região do visível foram comparados em função de suas figuras de mérito (parâmetros analíticos). Este levantamento bibliográfico (Tabela 3) é de grande utilidade, pois, além de ser uma revisão literária interessante, também servirá como forma de avaliar os parâmetros analíticos alcançados com o procedimento proposto no presente trabalho.

Tabela 3. Figuras de mérito de publicações para determinação de paracetamol empregando FIA e espectrofotometria.

Procedimento Proposto	λ Publicações (nm)	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	RSD (%)	Coefficiente de Correlação	Limite de Deteção (mg L ⁻¹)	Volume de Amostra (μ L)	Frequência Analítica (det. h ⁻¹)
Procedimento Proposto	500	4,00 – 16,00	< 1,3 (n = 10)	r = 0,9991	0,30	150,7	45
Lavorante <i>et al.</i> , 2006	640	5,00 – 125,00	1,5 (n = 11)	r = 0,9992	0,40	256,0	60
Suarez <i>et al.</i> , 2005	430	14,70 – 937,20	< 2,0 (n = 10)	r ² = 0,99989	3,80	375,0	60
Knochen <i>et al.</i> , 2003	430	180,00 – 300,00	< 1,0 (n = 10)	r ² = 0,99993	NC	50,0	120
Aniceto <i>et al.</i> , 2002	640	1,00 – 100,00	< 1,0 (n = 10)	r = 0,9998	0,50	250,0	80
Criado <i>et al.</i> , 2000	620	0,60 – 20,00	1,8 (n = 11)	r = 0,9960	0,20	100,0	20
Bouhsain <i>et al.</i> , 1996	608	0,00 – 23,90	4,0 (n = 3)	r = 0,9996	0,20	400,0	70
Verma <i>et al.</i> , 1992	445	0,80 – 100,00	2,0 (NC)	r = 0,9999	0,80	50,0	360
Calatayud <i>et al.</i> , 1986	630	0,20 – 30,00	0,4 (n = 40)	r = 0,9998	NC	150,0	26

*NC = não consta.

1.3 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)

A técnica de Análise por Injeção em Fluxo, conhecida internacionalmente por FIA, sigla oriunda da expressão inglesa “Flow Injection Analysis”, foi originada a partir de modificações da técnica de Análise em Fluxo Segmentado (SFA) desenvolvida por Skeggs em 1950, a qual, nas décadas de 1970 e 1960, destinava-se principalmente à determinação automatizada de diversos constituintes químicos em amostras de sangue e urina com fins de diagnóstico clínico (Skoog, 2002).

Visando contornar a baixa reprodutibilidade associada aos sistemas em fluxo segmentado, novos estudos, que terminariam por resultar no surgimento da Análise por Injeção em Fluxo, foram iniciados. Parte desses estudos foi realizada no Brasil em 1975 pelo Dr. Jaromir Ruzicka, natural da República Checa, juntamente com alguns colaboradores brasileiros no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) (Reis, 1996). Na mesma década nos Estados Unidos, Stewart e colaboradores também descreviam os princípios iniciais que norteariam a referida técnica (Skoog, 2002).

Após sua criação, a FIA difundiu-se amplamente e pesquisadores de mais de 40 países tem publicado artigos empregando este processo e envolvendo várias áreas da química analítica (Reis, 1996), fato que pode ser comprovado pelo crescimento exponencial do número de artigos publicados envolvendo a referida técnica, principalmente nas áreas de controle ambiental e de qualidade e nas análises clínicas (Trojanowicz, 2000).

1.3.1 ORIGEM DA TÉCNICA

Como relatado anteriormente, a Análise por Injeção em Fluxo (FIA) é uma técnica proveniente do aprimoramento de sistemas de Análise em Fluxo Segmentado (SFA), nos quais alíquotas de amostras percorrem o sistema em direção ao detector, espaçadas proximamente por bolhas de ar. Os propósitos destas bolhas são prevenir a dispersão excessiva das amostras, promover a mistura destas com os reagentes por convecção e arrastar traços de reagentes e amostras que permaneceram aderidas às paredes dos tubos de extensão, evitando desta forma a intercontaminação entre amostras sucessivas (Figura 3) (Skoog, 2002).

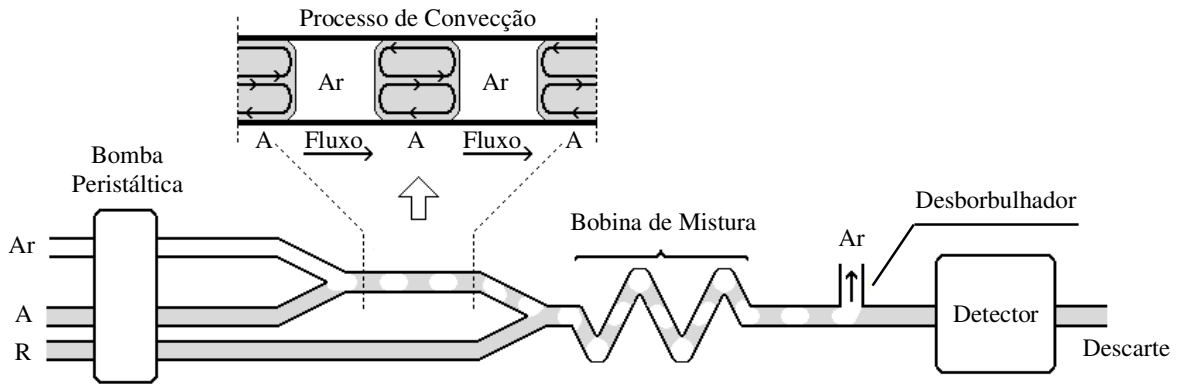


Figura 3. Configuração clássica de um módulo de análise empregando fluxo segmentado e demonstração do processo de mistura por convecção. *Legenda: A (amostra ou padrão); R (reagente)* (Adaptada de: Karlberg e Pacey, 1989).

Pesquisadores observaram que a dispersão e a intercontaminação das amostras poderiam ser praticamente controladas sem o auxílio das bolhas de ar, desde que um sistema fosse adequadamente projetado (Skoog, 2002). Assim surgiu a FIA, onde alíquotas reproduzíveis de amostras são inseridas no fluxo de uma solução transportadora e um processo de dispersão controlada, decorrente da geração de gradientes de concentração, torna-se o fator responsável pela mistura entre reagentes e amostras (Figura 4).

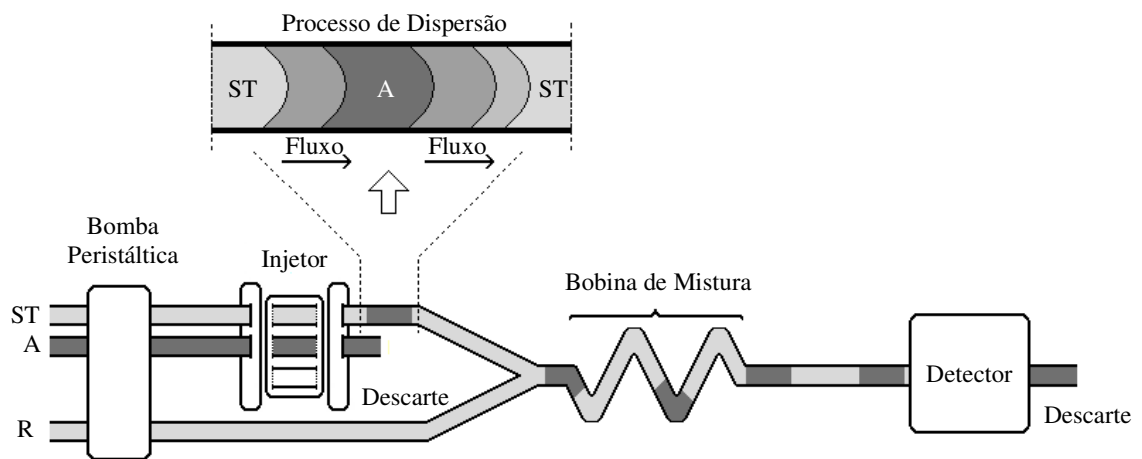


Figura 4. Configuração clássica de um módulo de análise empregando injeção em fluxo e demonstração do processo de mistura por dispersão. *Legenda: ST (solução transportadora); A (amostra ou padrão); R (reagente)*.

Segundo Ruzicka e Hansen, o termo dispersão controlada deve ser entendido como um processo reprodutível de diluição e mistura física que a amostra sofre durante todo o percurso analítico (espaço compreendido desde o local de injeção da amostra até a saída da mesma do detector) (Karlberg e Pacey, 1989). O controle da dispersão, fenômeno também chamado de diluição da zona de amostra, dá-se pela otimização de vários fatores, tais como: volume injetado de amostra, vazões do fluido transportador e dos reagentes, diâmetro interno das tubulações, comprimento das bobinas de mistura e do percurso analítico (Arruda e Collins, 2005).

De maneira geral, as diferenças fundamentais entre as duas técnicas de análise em fluxo, FIA e SFA, encontram-se resumidas na Tabela 4.

Tabela 4. Diferenças fundamentais entre análise por injeção em fluxo e em fluxo segmentado.

Parâmetros	FIA	SFA
Introdução de amostra	Injeção	Aspiração
Volume de amostra	Microlitros (μL)	Mililitros (mL)
Tipo de Fluxo	Não Segmentado	Segmentado
Processo de mistura	Dispersão	Convecção
Separador de Fases (Desborbulhador)	*Não Obrigatório	Obrigatório

* Salvo nos casos em que a reação ocorrida no sistema promova a formação de gás.

1.3.2 PRINCÍPIOS DA TÉCNICA

Em síntese, a Análise por Injeção em Fluxo é uma técnica bastante prática de introdução de amostras em um detector, que se faz perante o transporte das mesmas por meio de um fluido transportador que se dirige em direção ao dispositivo de leitura.

Os princípios básicos da FIA, inicialmente definidos por Ruzicka e Hansen compreendem: reprodutibilidade no tempo dos eventos que ocorrem no percurso analítico, inserção da amostra num fluxo de uma solução transportadora e dispersão controlada da amostra injetada (Karlberg e Pacey, 1989).

1.3.3 VANTAGENS DA TÉCNICA

A inserção da amostra num sistema de fluxo não-segmentado trouxe várias vantagens, dentre as quais estão:

- a) Aumento da frequência analítica em virtude da redução do tempo de análise;
- b) Redução na manipulação de reagentes e amostras, contribuindo com a diminuição dos riscos à saúde dos analistas, os erros associados aos procedimentos manuais e à redução dos custos com mão-de-obra;
- c) Alta versatilidade, pois alguns procedimentos adicionais podem ser realizados em linha, tais como: diluição, pré-concentração, diálise, extração por difusão gasosa e mascaramento de interferentes;
- d) Elevada reprodutibilidade e repetibilidade da técnica;
- e) Aumento na seletividade, sensibilidade, precisão e exatidão das análises;
- f) Possibilidade de trabalhar com produtos de detecção metaestáveis, uma vez que para as determinações serem realizadas não é necessário que o meio reacional atinja o estado de equilíbrio.

Tais conveniências associadas à Análise por Injeção em Fluxo terminaram por superar os sistemas de Análise em Fluxo Segmentado e os tradicionais métodos de análise em batelada (Karlberg e Pacey, 1989).

1.3.4 COMPONENTES FUNDAMENTAIS

Para a montagem de um sistema FIA, alguns componentes principais e característicos da técnica são indispensáveis: unidade de propulsão de fluidos, tubos de propulsão, extensão e conexão, injetor e cela de fluxo adaptada ao detector. Além destes, alguns acessórios também são utilizados: alças de amostragem, bobinas de mistura e confluências. A depender do tipo e finalidade das análises, outros dispositivos podem se tornar necessários: desborbulhadores, celas de difusão gasosa, extratores líquido-líquido, celas de diálise, colunas de pré-concentração e banhos termostáticos.

A presente seção se deterá especificamente na descrição dos componentes principais empregados na elaboração do sistema FIA do referido trabalho, salientado que grande parte destes dispositivos também é utilizada em vários trabalhos publicados envolvendo Análise por Injeção em Fluxo.

a) *Unidade de propulsão de fluidos:*

Em sistemas FIA diferentes mecanismos podem ser utilizados para propelir, sob vazão constante e controlada, a solução transportadora e os reagentes. Desta forma, bombas peristálticas, de seringa, de pistão, microbombas, eletrososse e até o auxílio da gravidade são alternativas na indução do fluxo nesses sistemas (Skoog *et al.*, 2006).

Neste trabalho, empregou-se uma bomba peristáltica de 4 canais, na qual cassetes e tubos de propulsão são devidamente encaixados para gerar a pressão necessária para propelir as soluções empregadas (Figura 5).

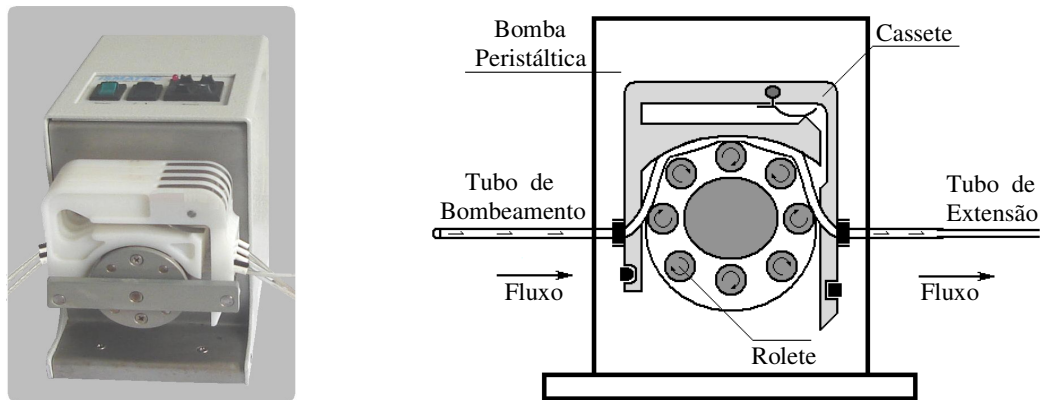


Figura 5. Bomba peristáltica de 4 canais, cassetes, tubos de propulsão e ilustração demonstrando a relação entre os mesmos.

b) *Injetor:*

Para garantir uma elevada repetibilidade de sinal é importante inserir rápida e reprodutivelmente um volume fixo de amostra no fluxo da solução transportadora, evitando-se ao máximo sua perturbação (Skoog *et al.*, 2006). Nos experimentos iniciais do processo de análise por injeção fluxo, a inserção da amostra era realizada por meio de uma seringa hipodérmica, fato que deu origem ao nome da técnica, porém, com a evolução tecnológica, outros mecanismos para a injeção da amostra na solução transportadora foram desenvolvidos: injetor-comutador, injetor proporcional, válvula rotativa e válvulas de 6 e 8 vias (Reis, 1996).

Dentre todos os dispositivos de introdução de amostra citados, o injetor-comutador é o mais empregado, funcionando da seguinte forma: o fluxo da amostra preenche a alça de amostragem, que possui um comprimento correspondente ao volume injetado no fluxo da solução transportadora. Somente após o manuseio da alavanca do injetor é que o volume de amostra contido na alça será inserido no fluxo da solução transportadora, que por fim, segue em direção ao detector (Figura 6).

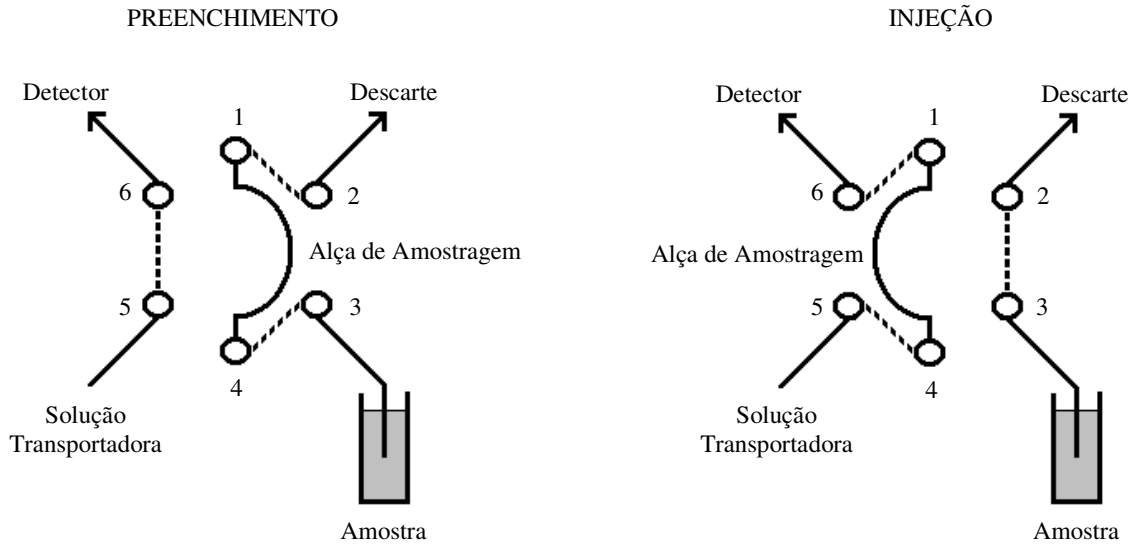


Figura 6. Funcionamento de um injetor-comutador de 6 vias. (Adaptada de: Karlberg e Pacey, 1989)

Neste trabalho, empregou-se um injetor-comutador manual de 6 vias (construído em acrílico) para a inserção da amostra no fluxo da solução transportadora (Figura 7).

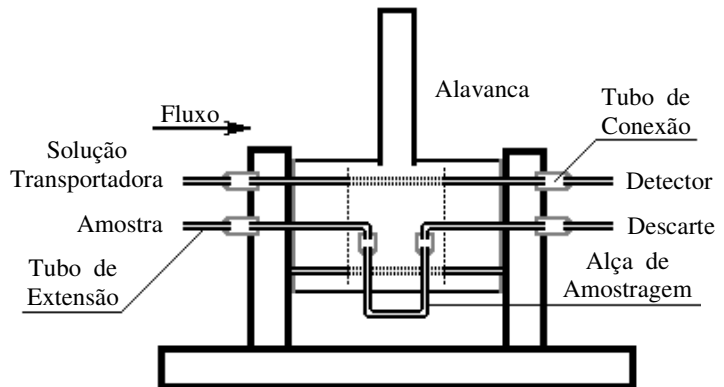
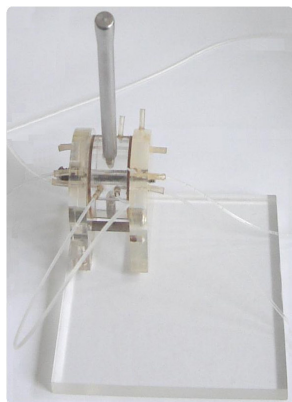


Figura 7. Injetor-comutador manual de 6 vias e ilustração demonstrando a relação entre o mesmo com tubos de extensão e alça de amostragem.

c) Acessórios:

Outros dispositivos utilizados na montagem do sistema de análise em fluxo proposto seguem mostrados na Figura 8.

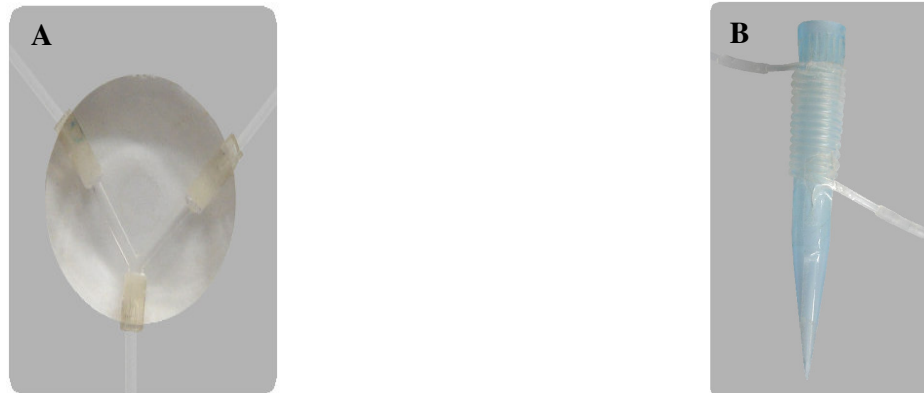


Figura 8. Acessórios utilizados no trabalho. *Legenda: A (confluência de duas vias) e B (bobina de mistura).*

A confluência (A), construída em acrílico e que normalmente possui duas ou três vias, é um mecanismo utilizado para fundir fluxos paralelos de diferentes soluções, transpondo em fluxo único a mistura formada. A bobina de mistura (B), fabricada sobre um suporte e possuindo um comprimento desejado, serve para facilitar a mistura entre reagente e amostra e promover a formação do produto cromogênico que será monitorado pelo espectrofotômetro (Arruda e Collins, 2005).

d) Detector e Celas de Fluxo:

Dentre os sistemas de detecção empregados na Análise por Injeção em Fluxo, espectrofotômetros, fotômetros, fluorímetros, sistemas eletroquímicos, refratômetros, espectrômetros de emissão e absorção atômicas têm sido utilizados (Skoog *et al.*, 2006).

Neste trabalho empregou-se um espectrofotômetro UV/Vis e duas celas de fluxo, uma de vidro, para detecção na região do visível e outra de quartzo, para detecção na região do ultravioleta (Figura 9).

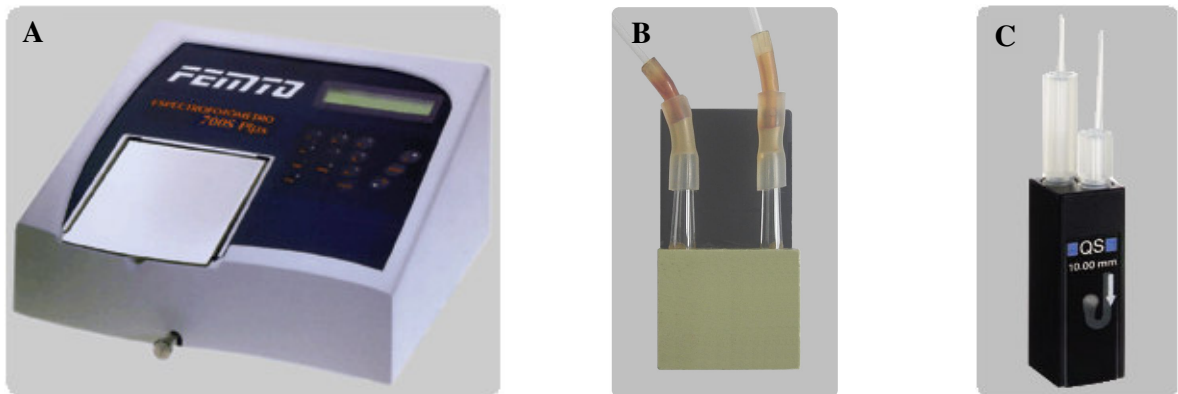


Figura 9. Espectrofotômetro e celas de fluxo utilizadas no presente trabalho. *Legenda:* A (*Espectrofotômetro UV/Vis*); B (*cela de fluxo de vidro*) e C (*cela de fluxo de quartzo*).

1.3.5 MÓDULOS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO

A montagem de um sistema FIA depende principalmente da metodologia empregada, do detector utilizado, de etapas adicionais que em certas circunstâncias o sistema pode exigir (remoção de gás produzido no interior dos tubos e separação de fases imiscíveis) e ainda, de procedimentos adicionais adotados pelo analista para aumentar o desempenho do sistema (pré-concentração e diálise de amostras, aquecimento ou resfriamento da mistura reacional). Em razão destas variáveis, sistemas bastante simples ou extremamente complexos envolvendo Análise por Injeção em Fluxo podem ser desenvolvidos.

2. Objetivos



2.1 GERAL

O presente trabalho teve por objetivo geral o desenvolvimento de procedimento analítico alternativo para determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas, empregando a técnica de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) associada à detecção espectrofotométrica de absorção molecular na região do visível.

2.2 ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos compreenderam:

- Desenvolver um procedimento analítico inédito para a determinação de paracetamol;
- Analisar amostras reais (formulações farmacêuticas) que contenham paracetamol como princípio ativo;
- Assegurar a confiabilidade da técnica desenvolvida comparando os resultados alcançados pelo método proposto com os obtidos através de procedimento oficialmente reconhecido.

3. Experimental



3.1 PROCEDIMENTO PROPOSTO

No presente trabalho, adotou-se a reação de diazoacoplamento (reação de Griess) para a geração de um diazocomposto, classe de substâncias que normalmente apresentam forte coloração. A caracterização do produto cromogênico, alvo da detecção espectrofotométrica, não foi totalmente elucidada, visto que este não faz parte do objetivo do trabalho, contudo, baseando-se em estudos realizados neste trabalho, sugere-se a formação do composto (5) a partir da seqüência de reações mostrada na Figura 10.

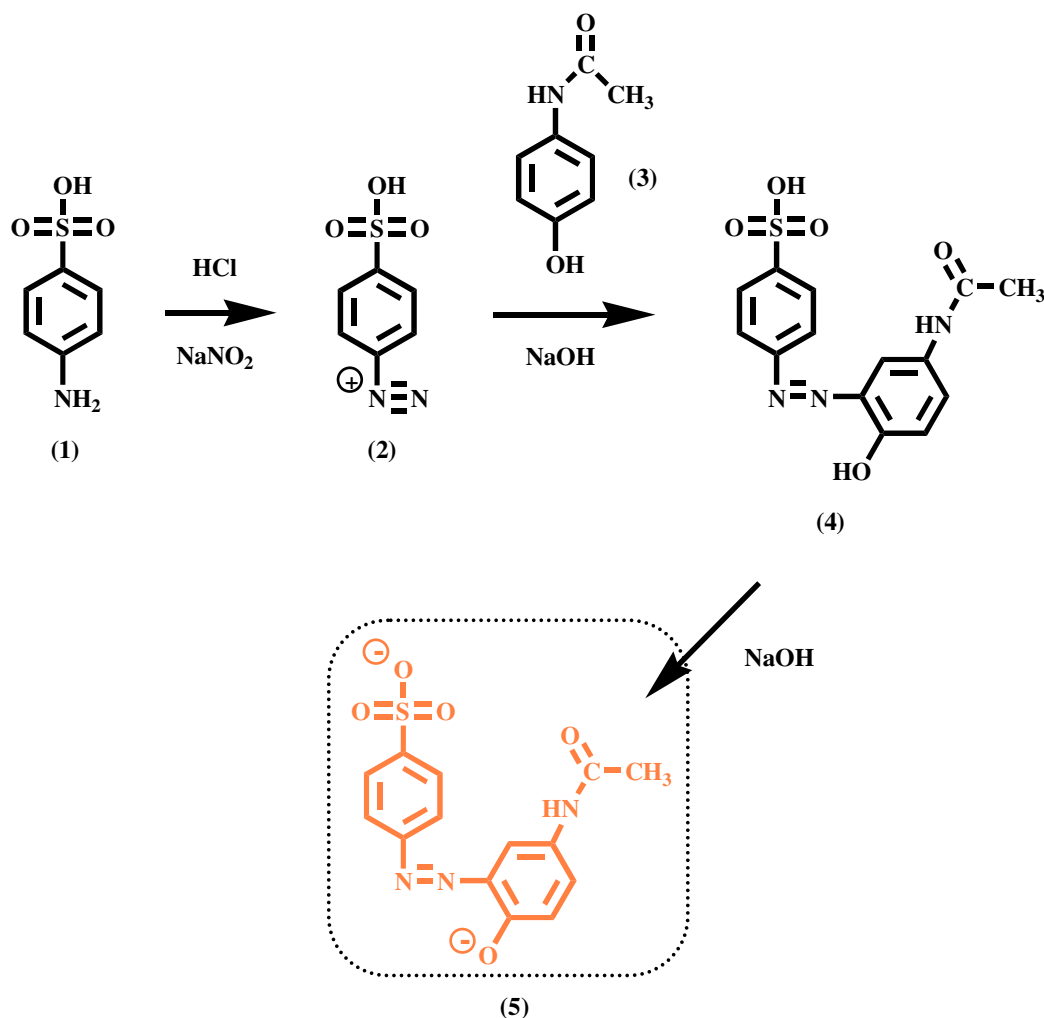


Figura 10. Seqüência de reações sugerida para a formação do produto cromogênico.
Legenda: (1) ácido sulfanílico, (2) cátion de arenodiazônio, (3) paracetamol, (4) diazocomposto e (5) produto cromogênico.

Na seqüência reacional apresentada na Figura 10, o ácido sulfanílico (1) atua como substância base para a geração do cátion de arenodiazônio (2) e o paracetamol (3) como substrato para a reação de acoplamento, a qual é favorecida em meio alcalino. Esta reação resulta na formação de um diazocomposto (4), que em condições mais alcalinas, gera um produto cromogênico laranja-avermelhado (5) altamente estável e que absorve intensamente em 500 nm.

3.2 CONFIGURAÇÃO DO MÓDULO DE ANÁLISE

A configuração do sistema de injeção em fluxo proposto para a determinação de paracetamol é mostrada na Figura 11.

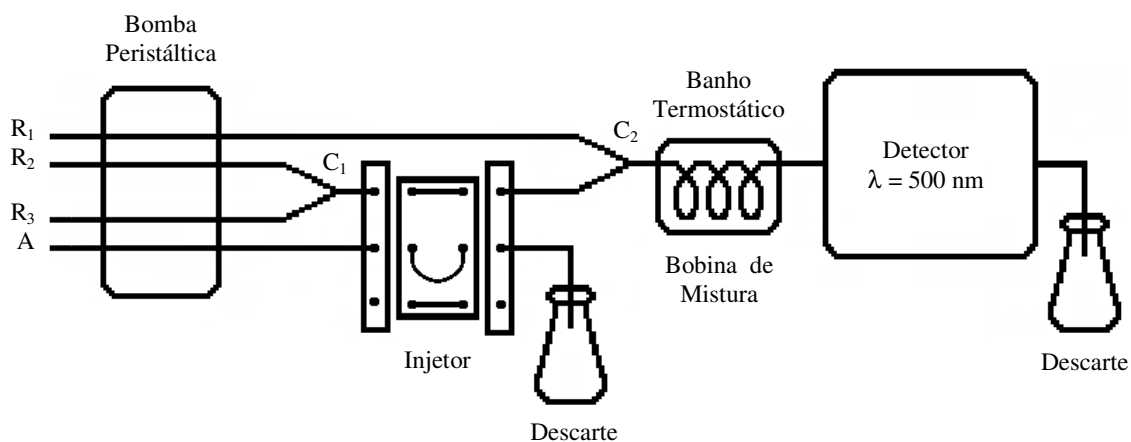


Figura 11. Configuração do sistema de injeção em fluxo proposto para a determinação de paracetamol. *Legenda:* R_1 (NaOH 0,25 M), R_2 (NaNO_2 0,06 M), R_3 ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ 0,07 M em HCl 0,10 M), A (amostra ou padrão), C_1 e C_2 (confluências), vazão do sistema $1,40 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra $150,7 \mu\text{L}$, bobina de mistura 30 cm, banho termostático $45,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

No sistema da Figura 11, a mistura contendo o cátion de arenodiazônio, gerado em C_1 por meio da reação de diazotização em meio clorídrico envolvendo ácido sulfanílico ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$) e nitrito de sódio, atua como solução transportadora da amostra após a mesma sofrer inserção em seu fluxo por meio do injetor. Após a segunda confluência (C_2), na bobina

de mistura e durante todo o percurso em direção ao detector, a alcalinização do meio mediada pelo hidróxido de sódio favorece a reação de acoplamento entre o diazoto e o paracetamol contido na amostra, gerando dessa forma o diazocomposto e subseqüentemente o produto cromogênico sugerido.

3.3 EQUIPAMENTOS E VIDRARIAS

A Análise por Injeção em Fluxo é uma técnica analítica que exige alguns equipamentos e acessórios particulares, dentre estes, os utilizados foram:

- Espectrofotômetro FEMTO® UV/Vis (modelo 700 Plus);
- Espectrofotômetro BIOSPECTRO® Vis (modelo: SP-22);
- Cella de fluxo em “U” com paredes de vidro e 2,00 cm de percurso óptico;
- Cella de fluxo em “J” com paredes de quartzo e 1,00 cm de percurso óptico;
- Bomba peristáltica ISMATEC® de 4 canais (modelo: CP 78017-10);
- Cassetes ISMATEC® com regulação automática;
- Injetor-comutador manual de 6 vias (construído em acrílico);
- Confluências de duas vias (construídas em acrílico);
- Bobinas de mistura (feitas com tubos de polietileno com 0,80 mm de diâmetro interno enrolados em espiral sobre um suporte);
- Alças de amostragem (feitas com tubos de polietileno com 0,80 mm de diâmetro interno);
- Tubos de propulsão TYGON® com 0,76 mm de diâmetro interno;
- Tubos de extensão de polietileno com 0,80 mm de diâmetro interno.

Além dos materiais característicos da técnica, alguns outros comumente encontrados em laboratórios de química também foram utilizados:

- Balança analítica MICRONAL MARK® (modelo: 210 A);
- Agitador magnético com aquecimento IKA® (modelo: RH básico Kt/C);
- Banho termostático (montado sobre o agitador magnético com termostato regulável);
- pHmetro;
- Pipetas automáticas e ponteiras EPPENDORF® (de 200 µL, 1000 µL e 5000 µL);

- Balões volumétricos de 250,00, 200,00, 100,00 e 50,00 mL;
- Bastões e funis de vidro;
- Beckers de vidro de 500,0, 250,0, 100,0 e 25,0 mL e de teflon de 250,0 mL;
- Erlenmeyers de 100,0 mL;
- Pipetas volumétricas de 20,00 e 50,00 mL;
- Provetas de 10,00, 25,00 e 50,00 mL.
- Almofariz e pistilo de porcelana;

3.4 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes químicos empregados na preparação das soluções foram todos de grau analítico, sendo utilizados sem nenhuma purificação adicional. Os mesmos seguem listados a seguir:

- Ácido clorídrico concentrado P.A. SYNTH (36,5 - 38,0 % (m/m), M.M. = 36,46 g mol⁻¹ e d = 1,18 kg L⁻¹);
- Ácido sulfanílico P.A. MERCK (C₆H₇NO₃S, M.M. = 173,19 g mol⁻¹);
- Hidróxido de sódio em pastilhas P.A. MERCK (M.M. = 40,00 g mol⁻¹);
- Nitrito de sódio P.A. VETEC (M.M. = 69,00 g mol⁻¹);
- Hidróxido de amônio concentrado P.A. VETEC (28,0 % (m/m), M.M. = 35,05 g mol⁻¹ e d = 0,91 kg L⁻¹);
- Cloreto de amônio P.A. VETEC (M.M. = 53,49 g mol⁻¹);
- Bicarbonato de sódio P.A. VETEC (M.M. = 84,01 g mol⁻¹);
- Carbonato de sódio P.A. VETEC (M.M. = 105,99 g mol⁻¹);
- Tetraborato de sódio deca-hidratado P.A. MERCK (M.M. = 381,37 g mol⁻¹);
- Éter etílico P.A. VETEC (M.M. = 74,12 g mol⁻¹);
- Sulfato de sódio anidro P.A. VETEC (M.M. = 142,04 g mol⁻¹).

Para o preparo das soluções padrão do analito foi utilizada a substância paracetamol de grau bioquímico GALENA (C₈H₉NO₂, 99,8 % de pureza e M.M. = 151,16 g mol⁻¹).

3.4.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES

A preparação das soluções a seguir consideram as concentrações dos reagentes empregados no trabalho, estabelecidas após todos os estudos de otimização.

a) *Solução estoque de ácido clorídrico 2,00 mol L⁻¹*: preparada por diluição adequada do ácido concentrado ($\cong 12,06 \text{ mol L}^{-1}$) em água destilada.

b) *Solução de ácido sulfanílico 0,07 mol L⁻¹ em ácido clorídrico 0,10 mol L⁻¹*: preparada a partir da dissolução de 2,4247 g ($\pm 0,0001$) do reagente em 150 mL de água destilada seguida de adição de 10,00 mL de ácido clorídrico 2,00 mol L⁻¹. Antes do ajuste do menisco do balão para o volume final de 200,0 mL, a solução permaneceu sob agitação em agitador magnético durante um período de 10 minutos para assegurar a total dissolução da massa pesada. A solução foi armazenada em frasco âmbar ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, sendo utilizada durante três dias, contados a partir do dia de sua preparação.

c) *Solução de hidróxido de sódio 0,25 mol L⁻¹*: preparada pela pesagem de 2,5000 g ($\pm 0,0001$) do reagente em água destilada para o volume final de 250,0 mL.

d) *Solução de nitrito de sódio 0,06 mol L⁻¹*: preparada a partir da dissolução de 0,5520 g ($\pm 0,0001$) do reagente em água destilada com o volume final completado para 200,0 mL. Esta solução foi preparada diariamente e mantida em frasco âmbar com tampa de vidro esmerilhado.

e) *Solução estoque de paracetamol 1000,0 mg L⁻¹*: preparada a partir da dissolução de 0,2004 g ($\pm 0,0001$) do reagente em água destilada para o volume final de 200,0 mL. Para assegurar a dissolução total da substância, a massa pesada ficou sob agitação em agitador magnético durante um período de 10 minutos em erlenmeyer de 250 mL antes do ajuste do menisco do balão. As soluções padrão de paracetamol foram preparadas a partir de diluições adequadas da solução estoque.

3.5 AMOSTRAS SELECIONADAS

O paracetamol foi determinado em formulações farmacêuticas sólidas (tabletes orais) e líquidas (soluções orais em gotas) adquiridas em drogarias de Maceió-AL. Deste modo, foram selecionados medicamentos de referência, genéricos e similares, todos contendo o paracetamol como único princípio ativo. As amostras sólidas, todas contendo de acordo com o laboratório fabricante o teor nominal de 750 mg do princípio ativo, são comercialmente conhecidas como: Tylenol (referência), Paracetamol Genérico Medley (genérico), Paracetamol Genérico EMS (genérico), Tylaflex (similar), Tylidol (similar) e Termol (similar). As amostras líquidas, todas contendo segundo as especificações do laboratório fabricante a concentração nominal de 200 mg mL⁻¹ do princípio ativo, são comercialmente conhecidas como: Tylenol (referência), Paracetamol Genérico Medley (genérico), Paracetamol Genérico EMS (genérico), Tylaflex (similar), Tylidol (similar) e Termol (similar).

3.5.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras sólidas analisadas foram preparadas de acordo com o procedimento recomendado pela Farmacopéia Brasileira (1977), exceto pelo uso de metanol para auxiliar na dissolução da massa pesada. A opção pela não utilização deste álcool deve-se à sua elevada toxicidade, em adição, o processo de dissolução das amostras sólidas também se apresentou eficaz utilizando-se somente a agitação com auxílio de agitador magnético, dispensando o uso desta substância. Uma vez que a Farmacopéia Brasileira não descreve a preparação de amostras líquidas, este procedimento foi realizado de forma semelhante ao método preconizado pela Farmacopéia Americana (USP XXI, 1985), diferenciando-se apenas nas diluições realizadas.

a) *Amostras sólidas:* Pesou-se o tablete contendo o teor nominal de 750 mg de paracetamol, anotando a massa total verificada. Em seguida efetuou-se a maceração da amostra e após homogeneização, pesou-se 0,1200 g (\pm 0,0001) do pó, dissolvendo a massa pesada em 400 mL de água destilada sob agitação com auxílio de agitador magnético durante um período de 10 minutos em erlenmeyer de 500,0 mL. Todo o volume foi transferido a um balão volumétrico de 500,0 mL e o volume final ajustado com água destilada. A solução de

análise foi obtida diluindo-se 5,00 mL da solução anterior (solução-mãe) para o volume final de 100,0 mL em balão volumétrico.

b) Amostras líquidas: Tomou-se 500 μL da solução oral, previamente agitada e contendo, de acordo com a especificação do fabricante, 200 mg mL^{-1} de paracetamol, diluindo-o em 400 mL de água destilada sob agitação com auxílio de agitador magnético durante um período de 10 minutos em erlenmeyer de 500 mL. Todo o volume foi transferido a um balão volumétrico de 1000,0 mL e o volume final ajustado com água destilada. A solução de análise foi obtida diluindo-se 10,00 mL desta solução (solução-mãe) ao volume final de 100,0 mL em balão volumétrico.

4. Resultados e Discussões



4.1 ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS

4.1.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO MOLECULAR DO PRODUTO CROMOGÊNICO

Para identificar o comprimento de onda no qual se observa absorção máxima do produto cromogênico gerado, construiu-se uma curva de comprimento de onda *versus* sinal analítico obtido. Este estudo foi efetuado variando-se o comprimento de onda na região do espectro eletromagnético compreendida entre 400 e 600 nm (visível), em intervalos de 10 nm entre cada ponto obtido.

Para obtenção dos espectros mostrados na Figura 12 utilizou-se as seguintes soluções: B (branco), AS (ácido sulfanílico), P (paracetamol) e PC (produto cromogênico) (Tabela 5), preparadas por diluições apropriadas de soluções estoque de $C_6H_7NO_3S$ $5,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $NaNO_2$ $5,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, HCl $5,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $NaOH$ $1,50 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e paracetamol $6,62 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (equivalente a uma solução de $1000,0 \text{ mg L}^{-1}$). As respectivas soluções de estudo foram obtidas pela mistura de alíquotas adequadas dos reagentes concentrados com posterior diluição ao volume final de 50,0 mL, visando obter as concentrações dos componentes descritas na Tabela 5. Os espectros de absorção das soluções de ácido sulfanílico (AS) e paracetamol (P) foram obtidos adotando-se a solução B como branco e, para a obtenção do espectro de absorção da solução do produto cromogênico (PC), adotou-se a solução AS como branco.

Tabela 5. Concentrações dos componentes adicionados nas soluções de estudo após diluição.

Reagentes*	Solução B (mol L ⁻¹)	Solução AS (mol L ⁻¹)	Solução P (mol L ⁻¹)	Solução PC (mol L ⁻¹)
$C_6H_7NO_3S$	Não Adicionado	$5,00 \times 10^{-4}$	Não Adicionado	$5,00 \times 10^{-4}$
$NaNO_2$	$3,00 \times 10^{-4}$	$3,00 \times 10^{-4}$	$3,00 \times 10^{-4}$	$3,00 \times 10^{-4}$
HCl	$5,00 \times 10^{-4}$	$5,00 \times 10^{-4}$	$5,00 \times 10^{-4}$	$5,00 \times 10^{-4}$
Paracetamol**	Não Adicionado	Não Adicionado	$3,30 \times 10^{-4}$	$3,30 \times 10^{-4}$
NaOH	$6,00 \times 10^{-4}$	$6,00 \times 10^{-4}$	$6,00 \times 10^{-4}$	$6,00 \times 10^{-4}$

*os reagentes aparecem segundo a ordem de adição para a preparação das soluções de estudo.

Legenda: B (branco); AS (ácido sulfanílico); P (paracetamol) e PC (produto cromogênico);

**concentração de paracetamol equivalente a $50,00 \text{ mg L}^{-1}$.

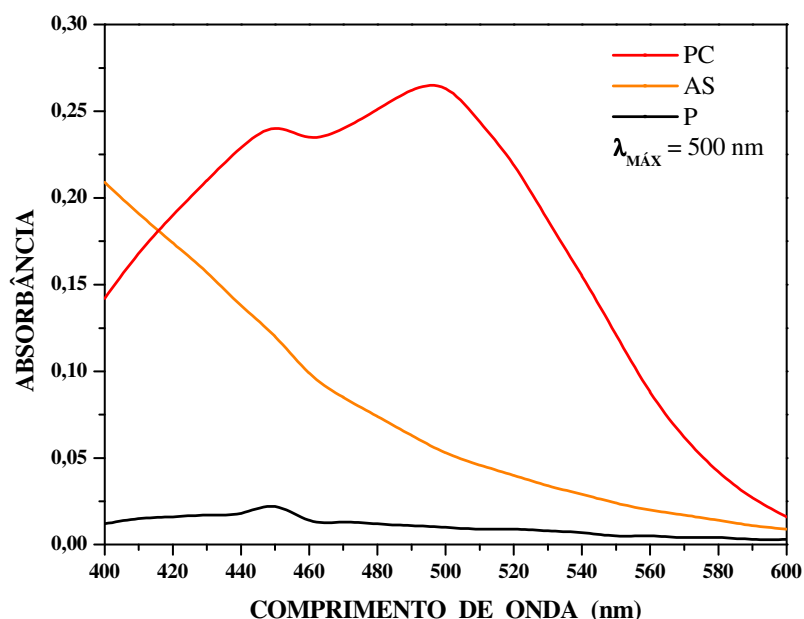


Figura 12. Espectros de absorção molecular das soluções de estudo. *Legenda: PC (produto cromogênico); AS (ácido sulfanílico) e P (paracetamol).*

Segundo os espectros da Figura 12, o produto cromogênico gerado pelo método proposto desenvolve absorção máxima em 500 nm. Bandas de absorção em torno de 450 nm, observadas nos espectros das soluções PC e P indicam a presença da substância ressonante monitorada por Suarez *et al.* 2005 e Knochen *et al.* 2003, uma vez que as reações adotadas nos procedimentos para a determinação de paracetamol desenvolvidos por ambos os pesquisadores (Figura 13) utilizaram exatamente os mesmos reagentes e a mesma seqüência de mistura da solução de paracetamol empregada no presente estudo (solução P, Tabela 5).

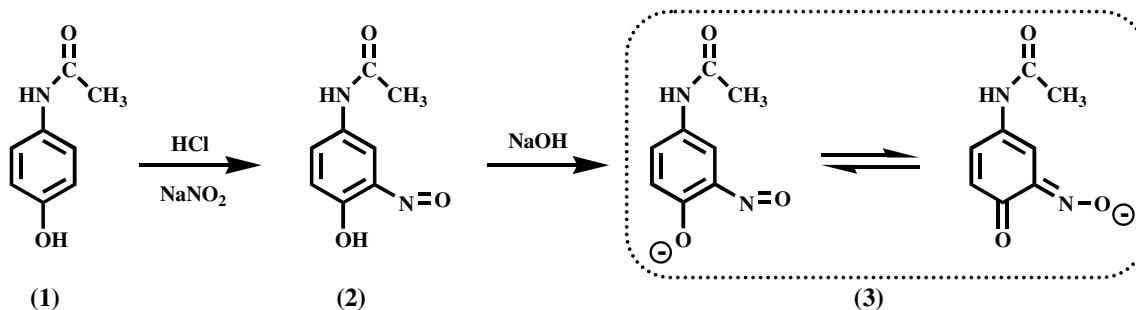


Figura 13. Reação de formação do produto cromogênico monitorado por Suarez *et al.* 2005 e Knochen *et al.* 2003. *Legenda: (1) paracetamol, (2) intermediário e (3) produto cromogênico.*

Logo após os espectros de absorção serem obtidos, o pH das soluções estudadas foi medido e os valores observados foram: 9,40 (B), 8,35 (AS), 9,21 (P) e 9,02 (PC). Desta forma, um novo estudo foi realizado visando avaliar a influência do pH na formação do produto cromogênico.

4.1.2 INFLUÊNCIA DO pH NA FORMAÇÃO DO PRODUTO CROMOGÊNICO

Para identificar a faixa de pH na qual a formação do produto cromogênico é melhor favorecida, foram registrados espectros de absorção molecular de soluções do produto cromogênico (PC) em diferentes valores de pH. As soluções estoque de reagentes empregadas neste estudo foram as mesmas descritas na seção 4.1.1 (p. 37).

O estudo da influência do pH nas soluções utilizadas foi promovida a partir da adição de diferentes volumes de hidróxido de sódio $1,50 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (500 a 4000 μL), uma vez que esta é a última substância adicionada segundo a ordem de mistura dos reagentes. Ambas as soluções, AS e PC, foram preparadas com o mesmo volume de hidróxido de sódio e o pH das respectivas soluções foram medidos com auxílio de um pHmetro devidamente calibrado (Tabela 6). Os espectros de absorção das soluções do produto cromogênico (PC) foram obtidos adotando-se a solução AS como branco. Os resultados revelados neste estudo estão mostrados na Figura 14.

Tabela 6. Relação entre o volume de NaOH adicionado e o pH das soluções de estudo.

Volume de NaOH adicionado $1,50 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$ (μL)	pH medido da solução AS*	pH medido da solução PC
500	3,39	3,42
1000	4,28	4,31
1500	5,79	5,84
2000	7,08	7,10
2500	9,04	9,12
3000	9,61	9,63
3500	9,87	9,92
4000	10,28	10,35

*solução adotada como branco. *Legenda: AS (ácido sulfanílico) e PC (produto cromogênico).*

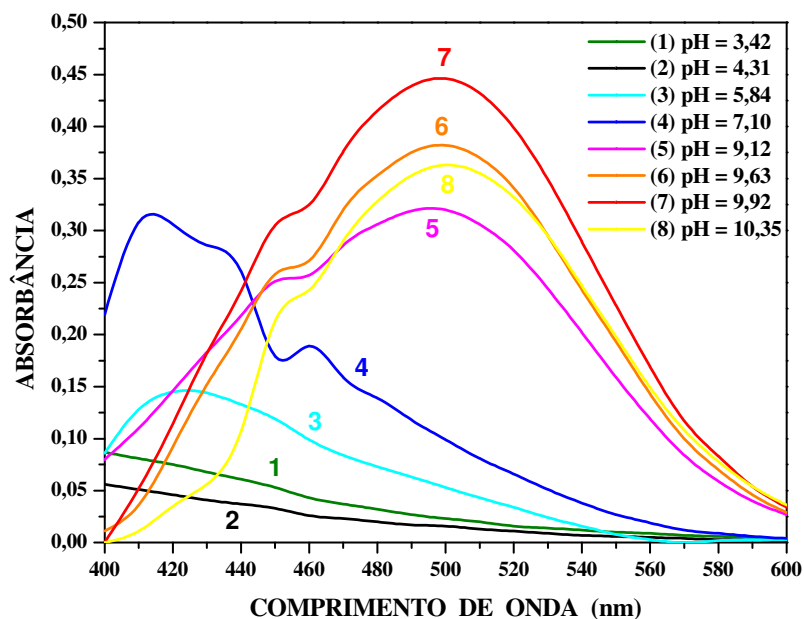


Figura 14. Influência do pH na formação do produto cromogênico.

Analisando os espectros de absorção da Figura 14, observou-se que a faixa de pH que melhor favorece a formação do produto cromogênico está compreendida entre 9,12 e 10,35. A redução de absorbância observada em pH 10,35 pode ser decorrente, segundo Solomons e Fryhle (2002), da reação do cátion de arenodiazônio com íons hidróxidos (OH^-) produzindo inicialmente o diazohidróxido e posteriormente o íon diazotato correspondente, substâncias pouco reativas, e portanto, incapazes de acoplar com o paracetamol (Figura 15).

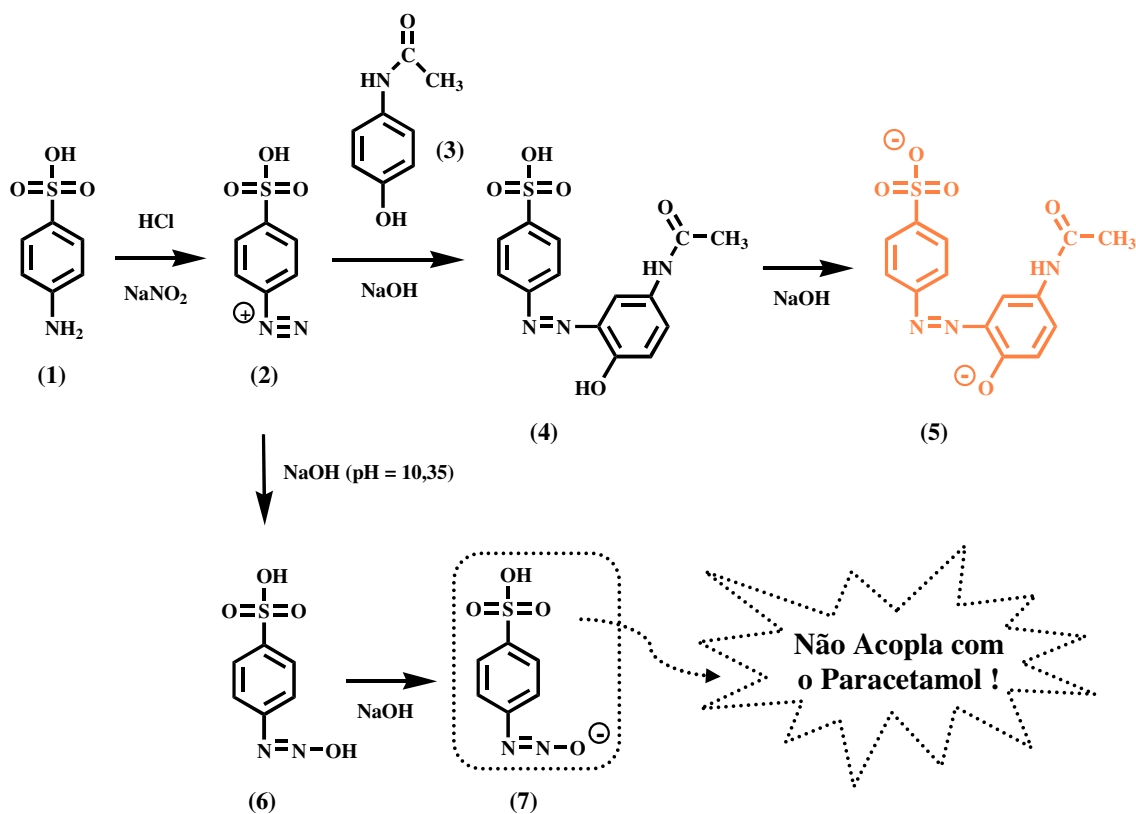


Figura 15. Reação lateral interferente na formação do produto cromogênico. *Legenda:* (1) ácido sulfanílico, (2) cátion de arenodiazônio, (3) paracetamol, (4) diazocomposto, (5) produto cromogênico, (6) diazohidróxido e (7) íon diazotato.

Como a faixa de pH compreendida entre 9,12 e 9,92 favorece a formação do produto cromogênico, pode-se dizer que estas condições de alcalinidade fortalecem o argumento de que o produto cromogênico monitorado neste trabalho trata-se de uma espécie iônica decorrente da desprotonação do diazocomposto previamente formado. A possibilidade desta sugestão ser verdadeira é bastante plausível, uma vez que este fenômeno também é o fator responsável pela geração do produto cromogênico monitorado por Suarez *et al.* 2005 e Knochen *et al.* 2003. Outros motivos que também contribuem efetivamente para o fortalecimento desta proposta é a variação de coloração assumida pela solução PC à medida que o pH da mesma tende a valores mais alcalinos (Figura 16) e o insucesso nas tentativas de extração do diazocomposto, devido à sua natureza anfótera (seção 4.1.3; p. 42).



Figura 16. Variação de coloração das soluções de estudo do produto cromogênico em função do pH. *Legenda: A (pH = 7,10); B (pH = 8,64); C (pH = 9,92) e D (pH = 10,35)*

Esta alteração de coloração pode ser decorrente de um deslocamento batocrômico e efeito hiperacrômico que o diazocomposto gerado apresenta devido a efeito de solvente, neste caso, devido à alcalinidade do meio proporcionada pela adição de quantidades crescentes de hidróxido de sódio às soluções de estudo. O efeito hipocrômico observado em $\text{pH} \geq 10,35$ pode estar relacionado, segundo o que já foi relatado, ao processo de formação do íon diazotato (espécie que não acopla com o paracetamol) em razão das condições mais severas de alcalinidade, fato que conseqüentemente reduz a concentração do produto cromogênico monitorado e diminui a coloração observada.

4.1.3 TENTATIVAS DE EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO DIAZOCOMPOSTO

Para identificar o produto cromogênico monitorado no método desenvolvido foram realizados dois ensaios visando a extração e isolamento do diazocomposto gerado.

Primeiro ensaio: a reação foi realizada em béquer de 100,0 mL e sob agitação com auxílio de agitador magnético. O paracetamol (2,5 mmols; 0,2045 g ($\pm 0,0001$)) foi adicionado a 50,00 mL de uma solução aquosa composta de ácido sulfanílico (2,5 mmols; 0,4335 g ($\pm 0,0001$)), nitrito de sódio (2,5 mmols; 0,1034 g ($\pm 0,0001$)) e ácido clorídrico 0,05 mol L⁻¹. Após completa dissolução e homogeneização, o pH da solução foi monitorado com auxílio de um pHmetro devidamente calibrado. Em seqüência gotejou-se lentamente sob

agitação hidróxido de sódio 2,00 mol L⁻¹ à solução até o pH da mesma assumir um valor constante de 9,90 durante 10 minutos. Em seguida realizou-se a extração do produto reacional da solução usando éter etílico (3 vezes 25,0 mL). As soluções etéreas foram reunidas, lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (3 vezes 25,0 mL) e seca com sulfato de sódio. Filtrou-se a mistura com auxílio de bomba de vácuo e posteriormente o solvente foi evaporado em rota-vapor.

Após a evaporação do solvente não foi observado composto no balão, devido provavelmente ao pH inadequado da solução de extração. O pH ideal é aquele em que as moléculas do composto a ser extraído encontram-se predominantemente em sua forma não-ionizada, e portanto, capazes de transferirem-se para a fase orgânica. Em razão disto, realizou-se um segundo ensaio utilizando uma solução de extração em pH próximo da neutralidade.

Segundo ensaio: todos os procedimentos para reação e extração foram realizados da mesma forma que o primeiro ensaio, porém o pH da solução de extração foi ajustado com hidróxido de sódio até o mesmo assumir um valor constante de 7,04 durante 10 minutos.

Novamente não foi observado formação de composto no balão. O insucesso em ambos os experimentos indica uma natureza anfótera do composto a ser extraído, uma vez que o diazocomposto sugerido (Figura 17) apresenta grupo azo e amida (protonáveis em meio ácido) e grupo sulfônico e fenólico (desprotonáveis em meio alcalino). Assim, as tentativas de extração do diazocomposto e conseqüentemente caracterização do produto cromogênico foram encerradas, visto que, identificar o pH ideal de extração é algo bastante difícil diante de tal situação.

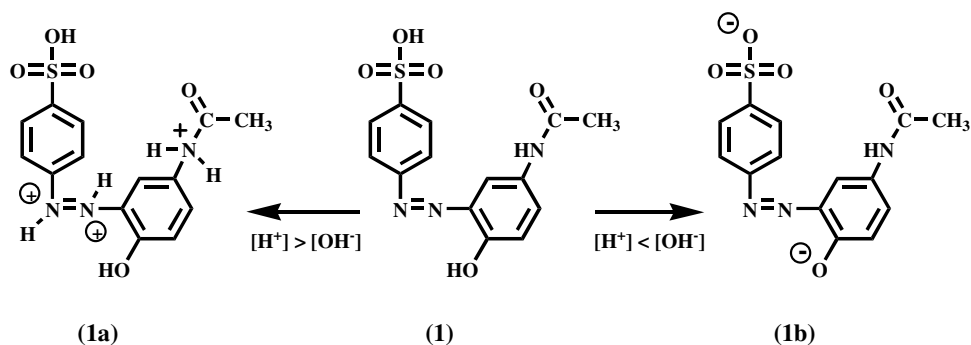


Figura 17. Natureza anfótera do diazocomposto sugerido. *Legenda:* (1) diazocomposto em sua forma não-ionizada; (1a) diazocomposto protonado em meio ácido e (1b) diazocomposto desprotonado em meio básico ou produto cromogênico monitorado em 500 nm.

4.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS

Visando obter maior desempenho do sistema de injeção em fluxo proposto foram avaliados uma série de parâmetros físicos e químicos capazes de exercer influência direta sobre o sinal analítico. A seleção das melhores condições experimentais baseou-se nos seguintes propósitos: melhor sensibilidade, economia de reagentes e amostras e maior rapidez nas análises. Todos os experimentos de otimização foram realizados adotando-se o método de comparação univariado, no qual cada parâmetro experimental é submetido à otimização individualmente à medida que as demais condições permanecem constantes. Os estudos foram realizados tomando-se como base a configuração do sistema de fluxo apresentado na Figura 11 (seção 3.2; p. 30), estando os resultados obtidos descritos nas seções a seguir.

4.2.1 INFLUÊNCIA DO VOLUME DE AMOSTRA/PADRÃO

O estudo do volume de amostra ou padrão injetado no percurso analítico é essencial uma vez que a dispersão sofrida pelas soluções de análise está diretamente relacionada com o sinal transiente verificado no detector e com a quantidade de analito injetado.

O presente estudo foi realizado adotando-se uma solução padrão de paracetamol com $15,00 \text{ mg L}^{-1}$ e alças de amostragem de diferentes comprimentos: 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0 e 50,0 cm, que correspondem, respectivamente, aos seguintes volumes de soluções de análise: 50,2, 75,4, 100,5, 125,6, 150,7, 201,0 e 251,2 μL . As alças de amostragem foram feitas a partir de tubos de extensão de polietileno com 0,80 mm de diâmetro interno. O resultado deste estudo está expresso na Figura 18.

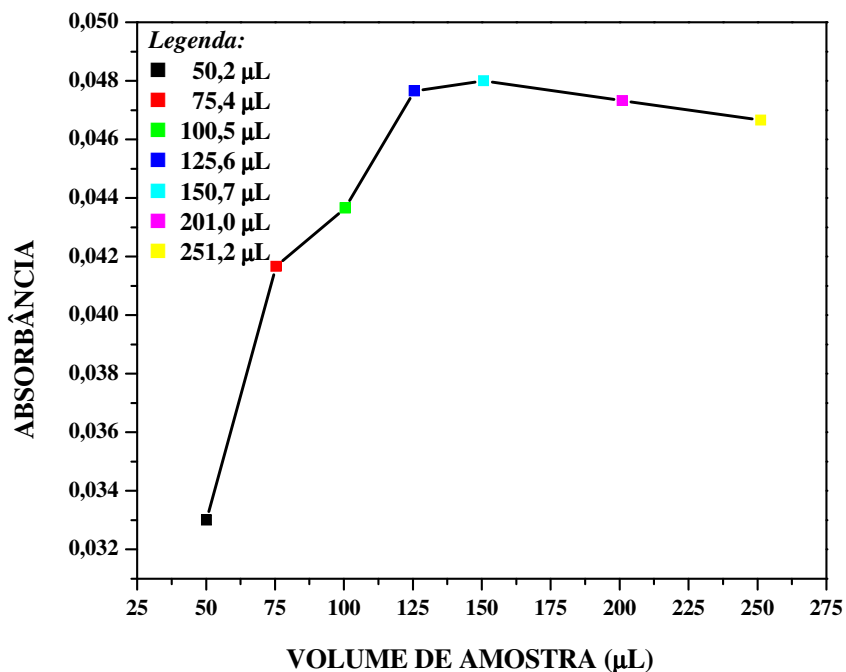


Figura 18. Influência do volume de amostra\padrão. Condições experimentais: $C_6H_7NO_3S$ e $NaNO_2$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $NaOH$ $0,15 \text{ mol L}^{-1}$, paracetamol $15,00 \text{ mg L}^{-1}$, comprimento da bobina de mistura: $30,0 \text{ cm}$, vazão do sistema: $1,40 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do banho termostático: $28,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e λ : 500 nm .

A Figura 18 mostra inicialmente um acréscimo de sensibilidade (sinal) correspondente ao aumento do volume de amostra até $150,7 \text{ }\mu\text{L}$. Para volumes maiores observa-se uma variação de absorbância pouco significativa. Em razão deste evento, adotou-se a alça de $30,0 \text{ cm}$ ($150,7 \text{ }\mu\text{L}$) para os estudos subsequentes, uma vez que esta demonstrou maior sinal espectrofotométrico e corresponde a um volume de amostra bastante satisfatório para as análises, uma vez que o mesmo por não ser tão grande, acarretará conseqüentemente em economia de reagentes e amostras.

4.2.2 INFLUÊNCIA DO COMPRIMENTO DA BOBINA DE MISTURA

Existem basicamente duas funções que a bobina de mistura desenvolve conjuntamente, a primeira delas é auxiliar a interpenetração das zonas de reação e conseqüentemente facilitar a geração do produto cromogênico, e a segunda é reduzir variações no índice de refração das soluções que confluem, uma vez que este evento pode acarretar em ruídos de sinal que prejudicam as análises (efeito Schlieren) (Dias *et al.*, 2006). Contudo, bobinas de mistura com comprimentos muito grandes favorecem o processo de dispersão do produto cromogênico e reduz o sinal analítico, como também aumenta o tempo de residência (tempo decorrido desde a injeção da amostra no sistema, observação do sinal analítico máximo e o retorno à linha de base), acarretando em análises mais demoradas. Diante do que foi comentado, o estudo da bobina de mistura torna-se fundamental.

Para a realização deste estudo foram avaliadas bobinas de mistura de diferentes comprimentos: 20, 30, 40, 50, 70 e 100 cm, todas feitas com tubos de extensão de polietileno (0,80 mm de diâmetro interno) enrolados em espiral sobre um suporte. Além da observação da resposta do aparelho frente a estas bobinas, também foram verificados os sinais obtidos na ausência deste acessório. Para cada bobina avaliada ainda foi cronometrado o tempo decorrido em cada ciclo analítico. A Figura 19 mostra os resultados alcançados com este estudo.

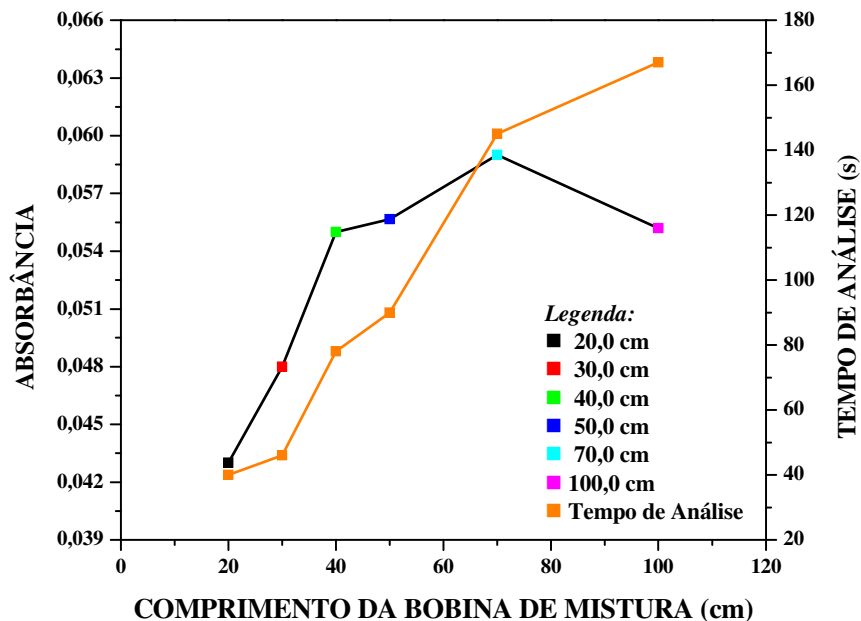


Figura 19. Influência do comprimento da bobina de mistura. *Condições experimentais:* $C_6H_7NO_3S$ e $NaNO_2$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $NaOH$ $0,15 \text{ mol L}^{-1}$, paracetamol $15,00 \text{ mg L}^{-1}$, volume de amostra: $150,7 \mu\text{L}$, vazão do sistema: $1,40 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do banho termostático: $29,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e λ : 500 nm .

Analisando a Figura 19 percebe-se que o resultado do estudo sem o uso da bobina de mistura não foi demonstrado. O motivo desta omissão é que não foi possível realizar as análises nesta condição, uma vez que foram observadas variações significativas na linha de base mesmo após sucessivas calibrações do espectrofotômetro. Este fato pode ser decorrente da ineficaz mistura entre a solução transportadora e a solução de hidróxido de sódio no percurso analítico, acarretando desta forma, em variação expressiva do índice de refração da solução (efeito Schlieren) ou ainda da própria cinética da reação, pois sem a bobina, o tempo de residência da mistura no sistema é insuficiente para formar o produto cromogênico. Neste estudo, a escolha da bobina ideal baseou-se no tempo de análise, no melhor retorno à linha de base e na repetibilidade de sinal, uma vez que não foram verificadas diferenças significativas de sensibilidade empregando os acessórios avaliados. Assim, a bobina de mistura de 40,0 cm foi a que demonstrou melhor desempenho em todos estes requisitos, sendo portanto a adotada para os estudos posteriores.

4.2.3 INFLUÊNCIA DA VAZÃO SOBRE O SINAL ANALÍTICO

A otimização deste parâmetro físico é importante, pois o mesmo está relacionado com a dispersão da zona de amostra ou interpenetração das zonas de reação e com o tempo de residência.

O referido estudo foi realizado adotando-se tubos de bombeamento TYGON de 0,76 mm de diâmetro interno para todos os reagentes. As mudanças de vazão no sistema foram obtidas por meio de ajustes na vazão nominal da bomba peristáltica. Desta forma, a influência da vazão sobre o sinal analítico foi avaliada considerando as seguintes taxas: 0,94, 1,40, 1,87, 2,35 e 2,80 mL min⁻¹. Para cada vazão avaliada também foi cronometrado o tempo decorrido entre a visualização do sinal máximo e o retorno à linha base. A Figura 20 expressa os resultados obtidos com este estudo.

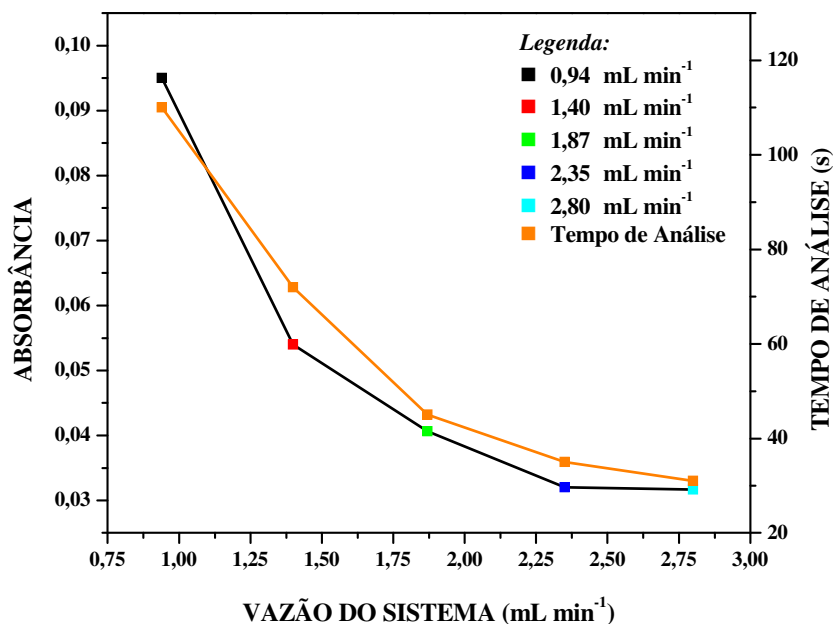


Figura 20. Influência da vazão sobre o sinal analítico. Condições experimentais: $C_6H_7NO_3S$ e $NaNO_2$ 0,05 mol L⁻¹, HCl 0,10 mol L⁻¹, NaOH 0,15 mol L⁻¹, paracetamol 15,00 mg L⁻¹, volume de amostra: 150,7 μ L, comprimento da bobina de mistura: 30,0 cm, temperatura do banho termostático: 29,0 °C e λ : 500 nm.

Observando a Figura 20 verifica-se um decréscimo de absorvância à medida que a vazão sobre o sistema aumenta, isto ocorre pois o tempo de residência diminui, reduzindo desta forma a interação química entre os reagentes e desfavorecendo a formação do produto monitorado. Em função deste estudo, a vazão sobre o sistema que vinha sendo empregada desde o início dos estudos de otimização ($1,40 \text{ mL min}^{-1}$) continuará sendo adotada para os próximos estudos, já que está associada a uma resposta analítica e tempo de análise satisfatórios.

4.2.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO E HIDRÓXIDO DE SÓDIO

As concentrações destes reagentes foram avaliadas pois o pH do meio é fator extremamente importante para a geração do produto cromogênico monitorado. O ácido clorídrico é indispensável para tornar o meio favorável para a reação de diazotação, ao passo que o hidróxido de sódio é fundamental para assegurar as condições alcalinas exigidas pelas reações de acoplamento e desprotonação.

Para realizar o estudo da concentração do ácido, a concentração da base foi mantida em $0,15 \text{ mol L}^{-1}$, e no momento do estudo da concentração desta, a concentração do ácido foi fixada em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Esta concentração de ácido clorídrico foi a adotada desde o início dos estudos de otimização pois assegurava a total dissolução da massa de ácido sulfanílico durante a preparação de sua solução. As concentrações avaliadas de ácido clorídrico e hidróxido de sódio (iguais para ambos) foram as seguintes: $0,10$, $0,15$, $0,25$, $0,40$, $0,65$ e $0,80 \text{ mol L}^{-1}$. Todas as soluções de ácido e base foram preparadas a partir de diluições apropriadas de soluções estoque de ácido clorídrico e hidróxido de sódio $2,00 \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 21 expressa os resultados obtidos com este estudo.

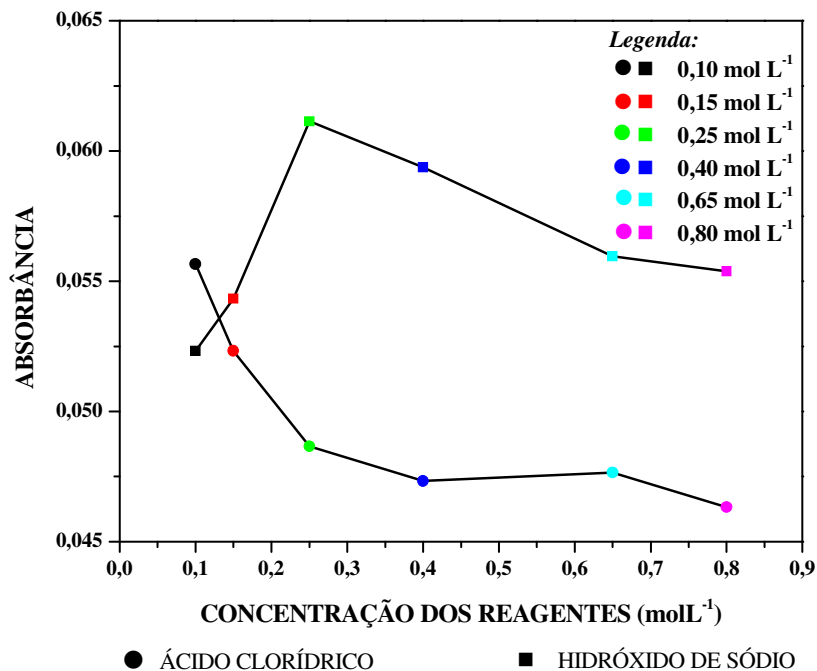


Figura 21. Influência da concentração de ácido clorídrico e hidróxido de sódio. *Condições experimentais:* $C_6H_7NO_3S$ e $NaNO_2$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, paracetamol $15,00 \text{ mg L}^{-1}$, volume de amostra: $150,7 \mu\text{L}$, comprimento da bobina de mistura: $40,0 \text{ cm}$, vazão do sistema: $1,40 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do banho termostático: $28,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e λ : 500 nm .

A Figura 21 mostra que no estudo da concentração do ácido clorídrico, concentrações acima da inicial estão associadas com um decréscimo de absorbância, devido provavelmente à redução das reações de acoplamento e desprotonação em virtude do meio reacional assumir valores de pH abaixo do ideal, fato decorrente de uma reação de neutralização incompleta. No estudo da concentração do hidróxido de sódio, observa-se um ganho de sensibilidade até a concentração de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e um posterior decréscimo após este ponto; este fato deve estar associado às condições alcalinas que o meio reacional apresentou, pois de acordo com estudo realizado na seção 4.1.2 (p. 39) sobre a influência do pH na formação do produto cromogênico, valores de pH acima de 9,92 não são adequados. Assim, a concentração de hidróxido de sódio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ demonstrou ser suficiente para garantir a neutralização do ácido remanescente e elevar o pH do meio até as melhores condições de acoplamento e desprotonação. Desta forma, a concentração de ácido clorídrico foi mantida em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e quanto ao hidróxido de sódio, adotou-se a concentração de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ para os estudos subsequentes.

4.2.5 AVALIAÇÃO DO USO DE TAMPÕES ALCALINOS EM SUBSTITUIÇÃO AO HIDRÓXIDO DE SÓDIO.

No estudo sobre a influência do pH na formação do produto cromogênico (seção 4.1.2; p. 39) verificou-se que dentre todos os valores avaliados, o pH de 9,92 demonstrou ser o mais favorável, assim, visando o ganho de sensibilidade foram testados três tampões alcalinos em substituição à solução de hidróxido de sódio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$.

Este estudo foi realizado fazendo uma comparação de sinais frente aos seguintes padrões de paracetamol: 5,00, 10,00, 15,00 e 20,00 mg L^{-1} . Os tampões utilizados neste estudo estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Tampões avaliados em substituição à solução de hidróxido de sódio.

Tampão	Concentração de Sal (mol L^{-1})	Reagente de Ajuste (mol L^{-1})	pH ajustado
1) $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$	NH_4Cl 0,20	NH_4OH 1,00	9,93
2) $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$	NaHCO_3 0,20	Na_2CO_3 0,10	9,92
3) $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{NaOH}$	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,20	NaOH 0,25	9,90

Dentre os três tampões testados, o tampão $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ e o $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ produziam muitas bolhas no sistema em virtude de sua reação com o ácido clorídrico, resultando desta forma na inviabilidade das análises. Assim, os estudos com estes tampões foram encerrados. O tampão $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{NaOH}$ não demonstrou produção de bolhas e portanto, seu emprego pôde ser avaliado. A Figura 22 mostra uma comparação entre resultados obtidos com o emprego de hidróxido de sódio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e o tampão 3.

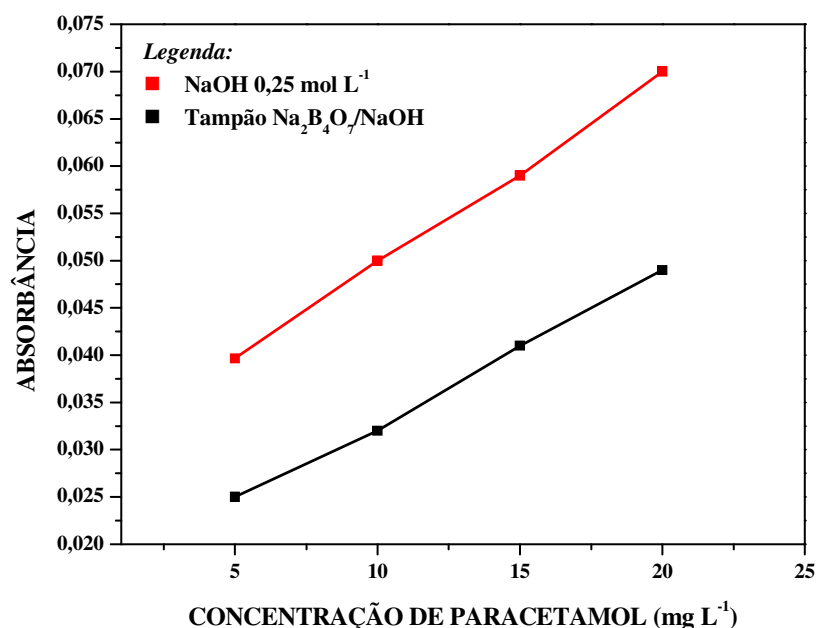


Figura 22. Avaliação do uso do tampão $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{NaOH}$ em substituição à solução de hidróxido de sódio. Condições experimentais: $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ e NaNO_2 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, volume de amostra: $150,7 \mu\text{L}$, comprimento da bobina de mistura: $40,0 \text{ cm}$, vazão do sistema: $1,40 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do banho termostático: $28,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e λ : 500 nm .

De acordo com a Figura 22, o emprego do tampão $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{NaOH}$ provocou perda de sensibilidade quando comparado à solução de hidróxido de sódio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$. Desta forma, o presente estudo foi encerrado uma vez que nenhum dos tampões avaliados demonstraram resultados satisfatórios, e assim, a solução de hidróxido de sódio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, por continuar sendo a que apresentou melhores resultados, permanecerá sendo utilizada nos demais experimentos.

4.2.6 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DO BANHO TERMOSTÁTICO

Como o método empregado neste trabalho envolve uma seqüência de reações em linha, vinculou-se um banho termostático à bobina de mistura visando avaliar a influência da temperatura nas reações.

O banho termostático foi montado sobre um agitador magnético com aquecimento IKA (modelo: RH básico Kt/C com termostato digital) já que este é capaz de manter a temperatura relativamente constante. Assim, a bobina de mistura foi imersa em um béquer contendo água aquecida nas temperaturas selecionadas para estudo, que foram: 40,0, 45,0, 50,0 e 55,0 °C. Este teste foi realizado fazendo uma comparação de sinais frente ao padrão de paracetamol de 15,00 mg L⁻¹. Os resultados deste estudo estão mostrados na Figura 23.

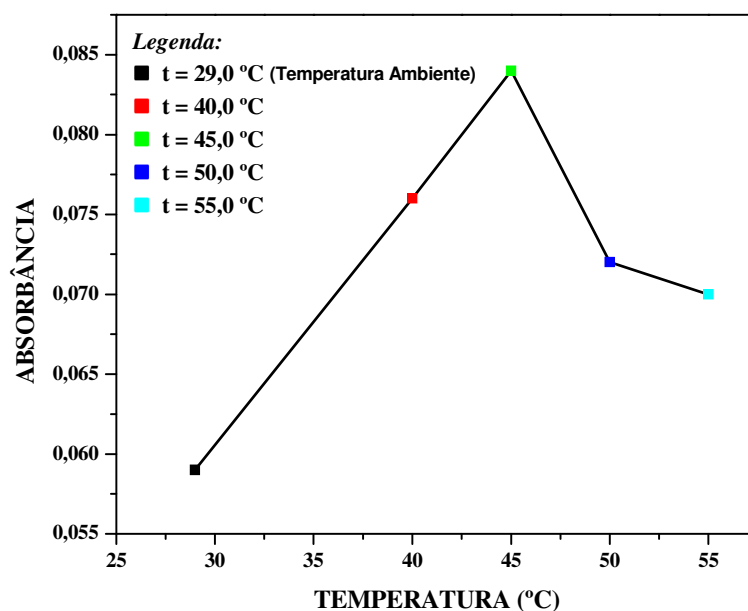


Figura 23. Influência da temperatura do banho termostático. *Condições experimentais:* $C_6H_7NO_3S$ e $NaNO_2$ 0,05 mol L⁻¹, HCl 0,10 mol L⁻¹, $NaOH$ 0,25 mol L⁻¹, volume de amostra: 150,7 µL, comprimento da bobina de mistura: 40,0 cm, vazão do sistema: 1,40 mL min⁻¹ e λ : 500 nm.

Os resultados expressos na Figura 23 mostram um ganho de sensibilidade à medida que a temperatura se eleva, atingindo um máximo em 45,0 °C e decrescendo a partir de 50,0 °C. Em razão do ganho considerável de sensibilidade, o banho termostático foi adotado como parte integrante do sistema de injeção em fluxo desenvolvido, sendo a temperatura de 45,0 °C a adotada para os próximos estudos. Após este teste, o comprimento da bobina de reação não foi novamente estudado, permanecendo desta forma com 40,0 cm.

4.2.7 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO SULFÂNICO E NITRITO DE SÓDIO

A influência da concentração dos reagentes de diazotação (ácido sulfânico e nitrito de sódio) sobre o sinal analítico também foi avaliada. O intuito deste estudo, a exemplo dos demais, é obter acréscimo de sensibilidade, também levando em consideração outros fatores fundamentais como a repetibilidade de sinal e o retorno à linha de base.

Desta forma, foram avaliadas concentrações dos reagentes iguais a 0,04, 0,05, 0,06, 0,07 e 0,08 mol L⁻¹. O estudo da concentração de ácido sulfânico (C₆H₇NO₃S) foi efetuado primeiro e durante sua realização a concentração de nitrito de sódio foi mantida em 0,05 mol L⁻¹. Já durante o estudo da concentração do nitrito de sódio, a concentração de ácido sulfânico fixada (em mol L⁻¹) foi a que apresentou melhor ganho de sensibilidade durante sua avaliação. Os resultados obtidos neste estudo estão mostrados na Figura 24.

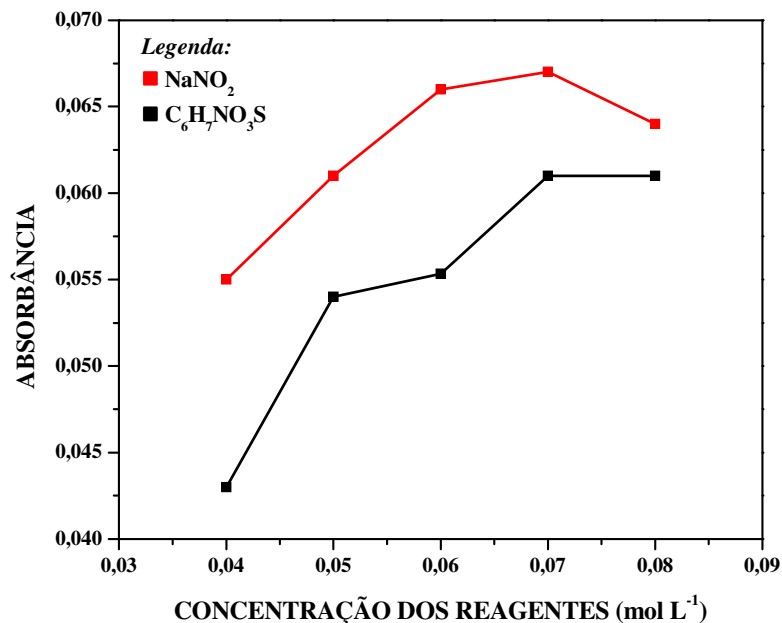


Figura 24. Influência da concentração de ácido sulfanílico e nitrito de sódio. *Condições experimentais: HCl 0,10 mol L⁻¹, NaOH 0,25 mol L⁻¹, paracetamol 10,00 mg L⁻¹, volume de amostra: 150,7 μL, comprimento da bobina de mistura: 40,0 cm, vazão do sistema: 1,40 mL min⁻¹, temperatura do banho termostático: 45,0 °C e λ: 500 nm.*

Analisando os resultados do Figura 24, observa-se que a medida que a concentração de ácido sulfanílico aumenta, a sensibilidade também sofre acréscimo, atingindo maior valor na concentração de 0,07 mol L⁻¹ e permanecendo praticamente constante a partir deste ponto. Desta forma, a concentração de ácido sulfanílico (C₆H₇NO₃S) escolhida foi a de 0,07 mol L⁻¹, sendo a mesma fixada durante o estudo da concentração de nitrito de sódio. Durante o estudo da concentração do nitrito de sódio, o mesmo comportamento foi observado, tendo a sensibilidade sofrido acréscimo significativo até a concentração de 0,06 mol L⁻¹. Assim, esta concentração foi a adotada para os experimentos subseqüentes.

4.2.8 AVALIAÇÃO DO USO DE SULFANILAMIDA EM SUBSTITUIÇÃO AO ÁCIDO SULFANÍLICO.

A sulfanilamida (Figura 25), a exemplo do ácido sulfanílico, é outro reagente bastante utilizado em reações de diazoacoplamento, fazendo parte inclusive da metodologia oficial (método de Griess) para a determinação de íons nitrito (NO_2^-). Desta forma, avaliou-se o emprego desta arilamina no método proposto em substituição ao ácido sulfanílico, visando a possibilidade de empregá-la como reagente alternativo para o procedimento proposto.

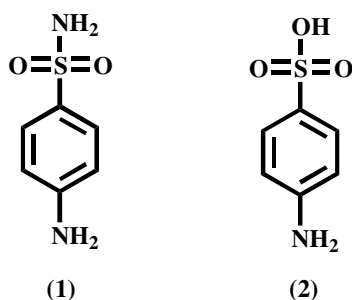


Figura 25. Reagentes comumente empregados para reações de diazoacoplamento. *Legenda:* (1) sulfanilamida e (2) ácido sulfanílico.

Para a realização deste estudo, foi preparada inicialmente uma solução de sulfanilamida $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ em ácido clorídrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ para substituir o ácido sulfanílico no sistema de análise em fluxo desenvolvido. Todos os parâmetros experimentais otimizados nos estudos anteriores foram adotados neste teste.

Durante os ensaios foi observada a formação de um precipitado amarelo-esverdeado no tubo de extensão após a segunda confluência, mesmo antes da reação com o padrão de paracetamol que seria posteriormente injetado no sistema. Este precipitado promovia interferência na linha de base do espectrofotômetro e os sinais adquiridos após 10 injeções consecutivas não apresentaram repetibilidade satisfatória. Concluiu-se que este precipitado poderia ser oriundo da cristalização do excesso de sulfanilamida em virtude da alcalinização do meio promovida pelo hidróxido de sódio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ou ainda de um produto reacional desconhecido. Desta forma, os estudos com a sulfanilamida foram encerrados, decidindo-se inclusive descartar a possibilidade de empregá-la como reagente alternativo no procedimento proposto neste trabalho.

4.2.9 RESUMO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS OTIMIZADAS

A Tabela 8 traz um resumo de todos os parâmetros experimentais otimizados no presente trabalho, bem como as melhores condições de análise consideradas.

Tabela 8. Resumo das condições experimentais otimizadas.

Parâmetros Experimentais Otimizados			
Físicos		Químicos (mol L ⁻¹)	
Vazão do Sistema	1,40 mL min ⁻¹	C ₆ H ₇ NO ₃ S	0,07
Volume de Amostra	150,7 µL	NaNO ₂	0,06
Bobina de Mistura	40,0 cm	HCl	0,10
Banho Termostático	45,0 °C	NaOH	0,25

4.3 CURVA ANALÍTICA DE REFERÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL

Após a otimização dos parâmetros experimentais, iniciaram-se os estudos quantitativos visando avaliar o desempenho analítico do método proposto, o qual foi aplicado na determinação de paracetamol em amostras de medicamentos contendo o referido princípio ativo. Porém, antes das análises das amostras pelo método proposto preparou-se uma curva de referência utilizando o método dos mínimos quadrados.

A curva de referência adotada para a análise das amostras reais (Figura 26) foi construída a partir de sete padrões de paracetamol correspondentes às concentrações de 4,00, 6,00, 8,00, 10,00, 12,00, 14,00 e 16,00 mg L⁻¹, preparados a partir de diluições adequadas de uma solução estoque de contendo 1000,00 mg L⁻¹ do analito de interesse. Cada ponto da curva representa a média da absorbância de cada padrão injetado em triplicata no sistema. A presente faixa de trabalho (4,00 – 16,00 mg L⁻¹) foi a adotada pois foi observado que concentrações com valores abaixo e acima desta provocavam redução da linearidade da curva analítica, com conseqüente diminuição da sensibilidade do método proposto.

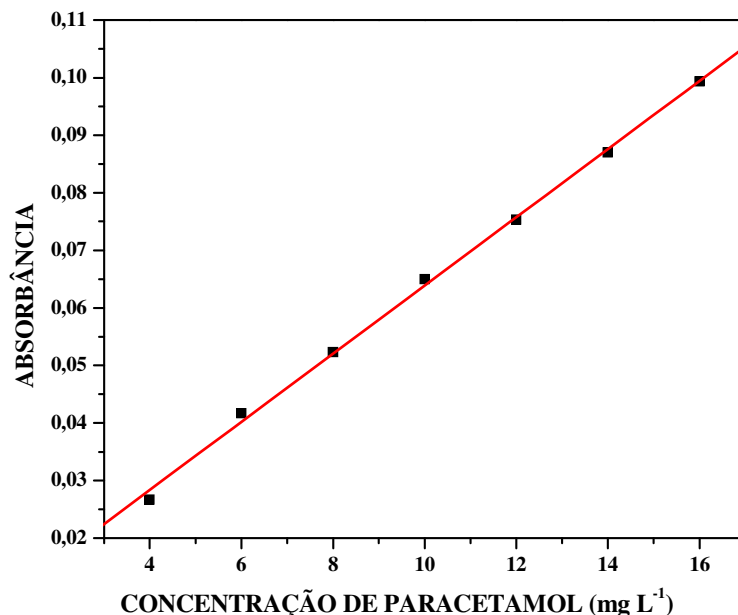


Figura 26. Curva analítica de referência para determinação de paracetamol. *Condições experimentais:* $C_6H_7NO_3S$ $0,07 \text{ mol L}^{-1}$, $NaNO_2$ $0,06 \text{ mol L}^{-1}$, HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $NaOH$ $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, volume de amostra: $150,7 \mu\text{L}$, comprimento da bobina de mistura: $40,0 \text{ cm}$, vazão do sistema: $1,40 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do banho termostático: $45,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e λ : 500 nm .

Os resultados expressos na Figura 26 revelaram a seguinte equação da reta:

$$A = 0,0059 (\pm 0,0003) C + 0,0047 (\pm 0,0051) \quad \text{Eq. 4}$$

Sendo A o sinal em absorbância das soluções de análise e C a concentração de paracetamol presente nas soluções de análise (em mg L^{-1}).

A Figura 26 também revelou um coeficiente de correlação linear (r) muito próximo da unidade (0,9991), comprovando desta forma uma boa correlação linear entre os pontos e o obedecimento à Lei de Beer neste intervalo de concentração. Já os limites de detecção (LD, três vezes o desvio padrão do branco/coeficiente angular da curva analítica) e quantificação (LQ, dez vezes o desvio padrão do branco/coeficiente angular da curva analítica) obtidos em relação à curva de referência e calculados segundo Miller e Miller (1988) foram $0,30 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente.

4.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS REAIS PELO MÉTODO PROPOSTO E OFICIAL

Após a construção da curva de referência, as análises das amostras reais foram iniciadas. Os medicamentos selecionados para as análises já foram descritos na seção 3.5 (p. 34), bem como os procedimentos utilizados na preparação das soluções de análise (seção 3.5.1; p. 34). O método oficial empregado para a determinação de paracetamol nas soluções de análise foi o preconizado pela Farmacopéia Brasileira (1977), descrito detalhadamente na seção 1.2.5.1 (p. 10).

Uma vez que as soluções de análise de todas as amostras selecionadas foram preparadas (em triplicata), deu-se início à determinação de paracetamol empregando-se pequenas alíquotas das mesmas. Todas as soluções foram analisadas inicialmente pelo método oficial e logo em seguida pelo método proposto.

A massa de paracetamol (em mg) nos tabletes orais analisados pelo método oficial foi obtida a partir da Equação 5:

$$M_{\text{analito no Tablete (mg)}} = (M_{\text{t (g)}} \cdot M_{\text{analito na amostra (mg)}}) / M_{\text{a (g)}} \quad \text{Eq. 5}$$

Onde $M_{\text{analito na amostra (mg)}}$ é obtida pela Equação 1 (seção 1.2.5.1; p. 11), M_{t} é a massa do tablete (em g) e M_{a} é a massa da amostra (em g). Na Equação 1, a concentração do padrão de paracetamol empregado na análise das amostras sólidas foi $12,00 \text{ mg L}^{-1}$.

A concentração de paracetamol (em mg mL^{-1}) nas soluções orais analisadas pelo método oficial foi obtida a partir da Equação 6:

$$C_{\text{analito na Solução Oral (mg mL}^{-1}\text{)}} = 10 \cdot C_{\text{analito na amostra (mg mL}^{-1}\text{)}} \quad \text{Eq. 6}$$

Onde $C_{\text{analito na amostra}} \text{ (mg mL}^{-1}\text{)}$ é obtida pela Equação 2 (seção 1.2.5.2; p. 12). Na Equação 2, a concentração do padrão de paracetamol empregado na análise das amostras líquidas foi $10,00 \text{ mg L}^{-1}$.

A massa de paracetamol (em mg) nos tabletes orais analisados pelo método proposto foi obtida a partir da Equação 7:

$$M_{\text{analito no Tablete (mg)}} = (10 \cdot M_{\text{t (g)}} \cdot C_{\text{analito amostra (mg L}^{-1}\text{)}}) / M_{\text{a (g)}} \quad \text{Eq. 7}$$

Onde $C_{\text{analito na amostra}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$ é obtida pela Equação 4 (seção 4.3; p. 58), M_{t} é a massa do tablete (em g) e M_{a} é a massa da amostra (em g).

A concentração de paracetamol (em mg mL^{-1}) nas soluções orais analisadas pelo método proposto foi obtida a partir da Equação 8:

$$C_{\text{analito na Solução Oral (mg mL}^{-1}\text{)}} = 20 \cdot C_{\text{analito amostra (mg L}^{-1}\text{)}} \quad \text{Eq. 8}$$

Onde $C_{\text{analito na amostra}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$ é obtida a partir da Equação 4 (seção 4.3; p. 58).

Os resultados das análises realizadas pelo método oficial e proposto encontram-se dispostos na Tabela 9.

Tabela 9. Comparação dos resultados obtidos nas determinações de paracetamol.

Medicamentos	Massa de Paracetamol*				
	Valor Rotulado	Método Oficial ^a	Método Proposto ^a	ER ₁ (%)	ER ₂ (%)
(1) Tylenol ^s	750	760,9 ± 0,9	764,5 ± 0,3	+ 1,4	+ 0,5
(2) Tylenol ^l	200	204,4 ± 0,5	210,6 ± 0,4	+ 2,2	+ 3,0
(3) Medley ^s	750	783,5 ± 0,8	788,4 ± 0,5	+ 4,5	+ 0,6
(4) Medley ^l	200	205,8 ± 0,3	212,4 ± 0,4	+ 2,9	+ 3,2
(5) EMS ^s	750	772,9 ± 0,8	793,1 ± 0,4	+ 3,0	+ 2,6
(6) EMS ^l	200	206,4 ± 0,2	216,4 ± 0,5	+ 3,0	+ 5,0
(7) Tylaflex ^s	750	788,2 ± 1,1	798,0 ± 0,4	+ 5,1	+ 1,2
(8) Tylaflex ^l	200	201,5 ± 0,5	211,0 ± 0,6	+ 0,7	+ 4,7
(9) Tyloidol ^s	750	763,4 ± 0,6	793,6 ± 0,4	+ 1,8	+ 4,0
(10) Tyloidol ^l	200	202,0 ± 0,3	198,0 ± 0,5	+ 1,0	- 2,0
(11) Termol ^s	750	801,5 ± 1,2	836,5 ± 0,4	+ 6,9	+ 4,4
(12) Termol ^l	200	200,6 ± 0,6	202,2 ± 0,3	+ 0,3	+ 0,8

*amostras sólidas - tabletes orais (mg) e líquidas - soluções orais (mg mL⁻¹); ^amédia de três determinações ± estimativa do desvio padrão; ^samostras sólidas (tabletes); ^lamostras líquidas (soluções orais); ER₁: erro relativo referente ao valor tabelado e o resultado obtido pelo método oficial; ER₂: erro relativo referente aos resultados obtidos entre o método proposto e o método oficial.

A Farmacopéia Americana USP XXI (1985) preconiza que tabletes de medicamentos contendo paracetamol devem conter não menos que 95,0 % e não mais que 105,0 % do valor rotulado do fármaco. Assim, como todas as amostras sólidas analisadas rotulavam um valor igual a 750,0 mg de paracetamol, os resultados segundo esta Farmacopéia não deveriam ser inferiores a 712,5 mg ou superiores a 787,5 mg. Desta forma, as amostras 7 e 11 foram as

únicas que ficaram fora deste intervalo de concentração, estando portanto reprovadas considerando as análises pelo método oficial (Farmacopéia Brasileira) e segundo o preconizado pela Farmacopéia Americana. Se a mesma comparação for realizada considerando os resultados proporcionados pelo método proposto, apenas a amostra 1 estaria aprovada nas análises. Em relação às soluções orais, A Farmacopéia Americana USP XXI (1985) preconiza que estes medicamentos devem conter não menos que 90,0 % e não mais que 110,0 % do valor rotulado de paracetamol, assim, como todas as amostras analisadas rotulavam $200,0 \text{ mg mL}^{-1}$ os resultados segundo esta Farmacopéia não deveriam ser inferiores a $180,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ou superiores a $220,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Desta forma, todas as amostras analisadas tanto pelo método oficial (Farmacopéia Brasileira) quanto pelo método proposto (FIA) estavam de acordo com o preconizado pela Farmacopéia Americana. Comparando-se os resultados obtidos pelo método proposto e pelo método oficial, podemos observar que os erros relativos variaram entre 0,5 e 5,0 % para todas as amostras analisadas, o que demonstra resultados comparáveis entre os dois métodos.

Visando mostrar a correlação entre os dados expressos na Tabela 9, o gráfico da Figura 27 foi plotado a partir dos resultados obtidos nas análises pelo método oficial (eixo das abscissas) e pelo método proposto (eixo das ordenadas).

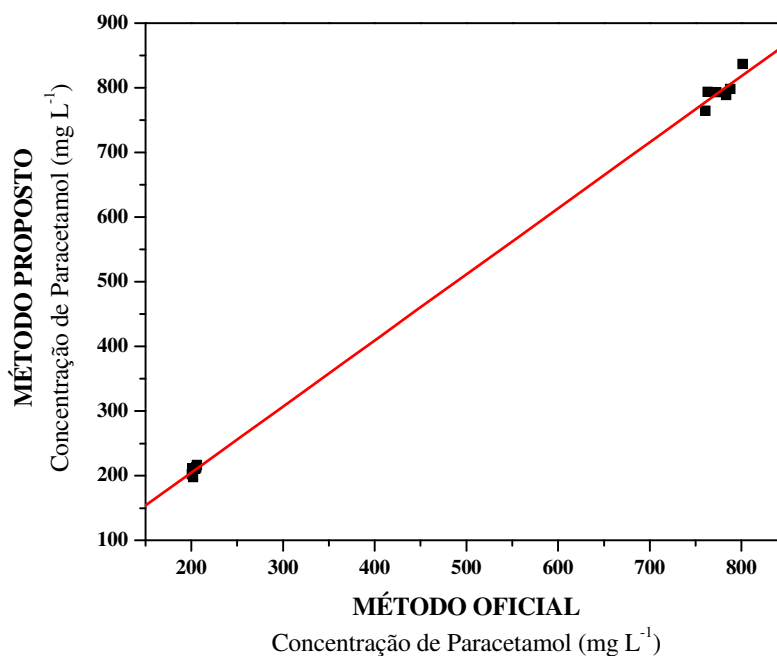


Figura 27. Correlação entre os resultados das análises pelo método oficial e proposto.

A equação da reta gerada após a plotação dos dados em questão foi a seguinte:

$$Y = 1,0217 (\pm 0,0225) X + 0,4779 (\pm 12,8098) \quad \text{Eq. 9}$$

Os resultados gerados a partir da regressão linear (Equação 9) indicam os valores de 1,0217 ($\pm 0,0225$) para o coeficiente angular e 0,4779 ($\pm 12,8098$) para o coeficiente linear, sendo o coeficiente de correlação (r) igual a 0,9995. Como o valor do coeficiente angular inclui 1,0 (um), o valor do coeficiente linear inclui 0,0 (zero) e a reta demonstra boa linearidade, podemos afirmar que os resultados das análises apresentados na Tabela 9 pelos dois métodos não diferem significativamente, e desta forma, o procedimento proposto foi eficiente na determinação de paracetamol nas amostras analisadas.

4.5 TESTES DE RECUPERAÇÃO DE PADRÃO (*SPIKE*)

Visando avaliar a exatidão do método proposto, um estudo de adição e recuperação de padrão em amostras reais (*spike*) foi realizado.

Os procedimentos utilizados na preparação das soluções de análise foram descritos na seção 3.5.1 (p. 34), diferenciando-se apenas na diluição final realizada. Para as amostras sólidas e líquidas, tomou-se 3,00 mL da solução-mãe e efetuou-se a diluição para um volume final de 100,00 mL. Os padrões de paracetamol foram adicionados antes do ajuste do volume final do balão. A recuperação de paracetamol foi avaliada pela diferença entre a concentração do analito na amostra contendo o padrão e a concentração do analito na amostra sem o padrão (Equação 10).

$$\text{Recuperação (\%)} = (C_{A+P} - C_A / C_P) \cdot 100 \quad \text{Eq. 10}$$

Onde C_{A+P} é a concentração do analito na amostra contendo o padrão (em mg L^{-1}) e C_A e C_P as concentrações do analito (em mg L^{-1}) na amostra e padrão respectivamente.

Os resultados dos testes de recuperação expressos na Tabela 10 representam média de três determinações.

Tabela 10. Teste de recuperação de padrão de paracetamol em medicamentos.

Medicamentos	Concentração de Paracetamol (mgL ⁻¹)			
	Na amostra* ^a	Adicionado ^a	Encontrado ^a	Recuperado (%)
(1) Tylenol ^s	7,9	4,0	3,6	90,0
		6,0	5,5	91,7
(2) Tylenol ^l	6,6	4,0	4,1	102,5
		6,0	5,7	95,0
(3) Medley ^s	7,6	4,0	3,9	97,5
		6,0	5,8	96,7
(4) Medley ^l	6,9	4,0	4,0	100,0
		6,0	5,9	98,3
(5) Tylaflex ^s	8,0	4,0	3,9	97,5
		6,0	6,0	100,0
(6) Tylaflex ^l	6,8	4,0	4,0	100,0
		6,0	5,8	96,7

*resultado obtido através de análise da amostra real diluída pelo método proposto; ^amédia de três determinações; ^s amostras sólidas (tabletes orais); ^l amostras líquidas (soluções orais).

As taxas de recuperação na Tabela 10, compreendidas entre 90,0 e 102,5 %, e equivalentes a uma recuperação média de 97,1 % do padrão de paracetamol adicionado, exibem bons resultados, garantindo inclusive, confiabilidade analítica no procedimento proposto. A amostra 1 foi a que apresentou menor taxa de recuperação, fato que pode estar associado a erros de preparação das soluções de análise, ou até a interferência de alguma espécie química presente no excipiente ou veículo do medicamento analisado.

4.6 AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES INTERFERENTES

Neste trabalho, um estudo mais detalhado deste parâmetro não foi realizado, visto que foi observada uma boa concordância de resultados nas análises dos medicamentos pelo método oficial e proposto (Tabela 9) e satisfatórias taxas de recuperação de paracetamol no estudo de adição e recuperação de padrão (Tabela 10), inferindo desta forma, ausência de interferência significativa das espécies químicas presentes nos excipientes e veículos dos medicamentos, considerando as baixas concentrações destas substâncias nas soluções de análise.

4.7 EXATIDÃO E PRECISÃO DO PROCEDIMENTO PROPOSTO

Aplicando-se o teste *t* pareado (comparação de pares de medidas da mesma amostra obtidas empregando-se métodos diferentes) por meio da Equação 11 sobre os resultados obtidos com as análises das amostras reais através dos procedimentos proposto e oficial (Tabela 9), verificou-se que para as amostras sólidas e líquidas obtiveram-se valores de *t* calculado igual a 3,18 e 2,26 respectivamente. Como ambos os valores de *t* calculados são menores que o *t* tabelado (*t* = 4,03), considerando um nível de confiança de 99% e grau de liberdade (*N* - 1 = 5), pode-se afirmar que o método proposto fornece resultados que não diferem significativamente dos obtidos através do método oficial, comprovando-se assim sua exatidão.

$$t \text{ calculado} = \bar{d} / (S_d / \sqrt{N})$$

Eq. 11

Onde \bar{d} é a diferença média igual a $\sum d_i / N$; S_d é o desvio padrão da diferença e *N* é o número de pares de medidas, ou seja, número de amostras sólidas e líquidas analisadas (seis de cada tipo).

A precisão do método proposto (repetibilidade) foi verificada por meio de sucessivas injeções no sistema (*n* = 10) de soluções padrão contendo 8,00, 10,00 e 12,00 mg L⁻¹ de paracetamol. Os desvios padrões relativos obtidos neste teste foram iguais a 1,28, 1,26 e 1,17 % respectivamente.

4.8 REPRODUTIBILIDADE DO PROCEDIMENTO PROPOSTO

A reprodutibilidade do método proposto foi avaliada comparando-se curvas de calibração construídas em dias diferentes e utilizando soluções de reagentes e padrões preparados nos dias em que as curvas eram produzidas. Os padrões de paracetamol utilizados neste estudo compreenderam as concentrações da faixa de trabalho estabelecida no procedimento proposto (4,00 a 16,00 mg L⁻¹). As concentrações dos reagentes empregadas neste estudo, bem como as demais condições experimentais, estão presentes na Tabela 08 (seção 4.2.9; p. 57). As curvas analíticas, quatro no total (C1, C2, C3 e C4), foram plotadas em um único gráfico (Figura 28) para proceder com a comparação.

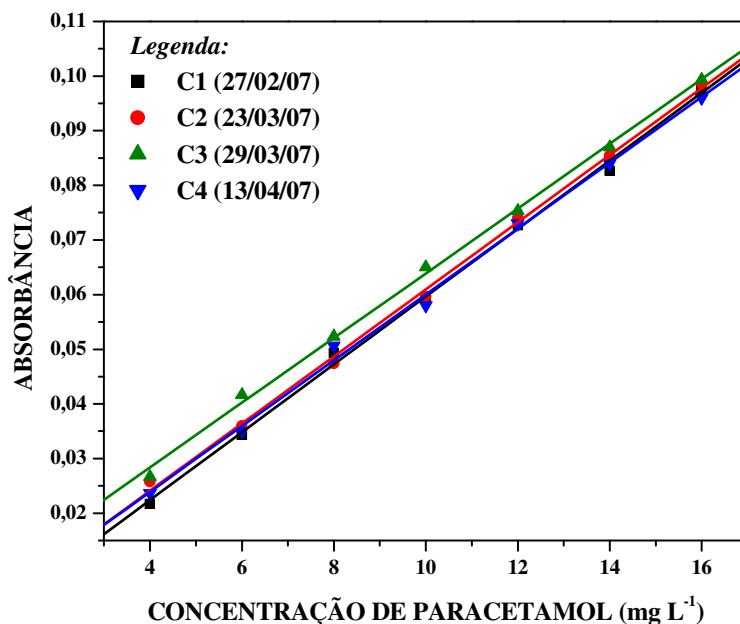


Figura 28. Comparação de curvas analíticas construídas em dias diferentes. *Condições experimentais:* $C_6H_7NO_3S$ 0,07 mol L⁻¹, $NaNO_2$ 0,06 mol L⁻¹, HCl 0,10 mol L⁻¹, $NaOH$ 0,25 mol L⁻¹, volume de amostra: 150,7 μ L, comprimento da bobina de mistura: 40,0 cm, vazão do sistema: 1,40 mL min⁻¹, temperatura do banho termostático: 45,0 °C e λ : 500 nm.

Os coeficientes angulares das equações da reta correspondentes a cada curva analítica seguem descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Coeficientes angulares das equações da reta das curvas analíticas plotadas.

Data do Experimento	Curva Analítica (Y= a X + b)	Coefficiente Angular (a)
27/02/07	C1	0,0062 (\pm 0,0003)
23/03/07	C2	0,0061 (\pm 0,0003)
29/03/07	C3	0,0059 (\pm 0,0003)
13/04/07	C4	0,0060 (\pm 0,0004)

A partir dos dados da Tabela 11, calculou-se o coeficiente de variação (CV) a partir dos coeficientes angulares das curvas plotadas, que revelou um valor igual a 2,13 %. Este baixo valor de coeficiente de variação revela que as inclinações das curvas analíticas não diferem significativamente, mostrando desta forma, que a sensibilidade do método não é afetada mesmo quando se executam análises em dias diferentes e que o procedimento proposto exibe uma reprodutibilidade aceitável.

4.9 FREQUÊNCIA DE AMOSTRAGEM E CONSUMO DE REAGENTES

Cada injeção de amostra no sistema leva em média 80 segundos para completar um ciclo analítico, resultando numa frequência de amostragem de 45 análises por hora. Este dado analítico é comparável a vários procedimentos descritos em literatura para a determinação de paracetamol.

Foi observado que o consumo de reagentes (soluções de ácido sulfanílico, nitrito de sódio e hidróxido de sódio) por hora ininterrupta de fluxo é cerca de 85,0 mL, o que traduz um volume médio de 1,90 mL de solução de cada reagente por análise realizada.

Um orçamento dos materiais necessários para a implantação do sistema em fluxo proposto revelou que os gastos com os reagentes de pureza analítica: ácido clorídrico concentrado (500 mL), ácido sulfanílico (100 g), nitrito de sódio (100 g), hidróxido de sódio (100 g) e Paracetamol (100 g) é em torno de R\$ 450,00 (quatrocentos e cinquenta reais), e os custos com aparelhagem: espectrofotômetro UV-Vis (1 un.), cela de fluxo com paredes de vidro (1 un.), bomba peristáltica (1 un.), tubos de extensão de polietileno de 0,80 mm de diâmetro interno (10 m), tubos de propulsão de 0,76 mm de diâmetro interno (4 un.), injetor-comutador manual de acrílico (1 un.), confluências de duas vias (02 un.) e banho termostático (1 un.) é de aproximadamente R\$ 16.000,00 (dezesesseis mil reais).

5. Conclusões



Os estudos realizados neste trabalho evidenciaram a viabilidade do emprego do procedimento proposto para determinação de paracetamol, uma vez que este método é formado por um sistema mecanizado simples e prático, e quando aplicado para determinação de paracetamol em amostras comerciais foi capaz de produzir resultados que não diferiram significativamente do método oficial.

Os resultados obtidos com as análises das amostras reais mostraram que os teores do princípio ativo (paracetamol) nas formulações farmacêuticas, com exceção das amostras 7 e 11 (Tabela 9, seção 4.4; p. 59), estavam de acordo com as especificações farmacopêicas segundo o método oficial de análise.

Ao conferir-se as figuras de mérito do procedimento analítico desenvolvido com outras descritas em literatura (Tabela 3, seção 1.2.6; p. 17), pode-se observar que os parâmetros analíticos alcançados no presente trabalho são comparáveis com os demais.

De maneira geral, o método proposto não demonstrou interferência de matriz significativa, visto que foi capaz de promover taxas boas e aceitáveis de recuperação de padrão nos testes de *spike* em amostras reais.

Dentre as vantagens observadas com o método proposto estão: o uso de reagentes pouco tóxicos e de baixo custo, boa precisão (repetibilidade), reprodutibilidade, geração de produto cromogênico altamente estável, não exigiu um tratamento prévio das amostras analisadas (apenas um processo de dissolução e diluição), e conferiu uma boa sensibilidade para propósitos de controle de qualidade.

6. Perspectivas de Continuidade



As perspectivas futuras do presente trabalho são:

- Realizar o estudo de espécies interferentes, visando avaliar de forma mais consistente a interferência promovida pelos constituintes químicos presentes nos excipientes e veículos das amostras analisadas, identificando desta forma os componentes e as concentrações dos mesmos capazes de gerar erros significativos nas análises;
- Dar continuidade aos estudos para caracterização do produto cromogênico monitorado neste trabalho;
- Avaliar a seletividade do procedimento proposto frente ao analito de interesse visando desta forma a possibilidade de ampliar o número de amostras que poderão ser analisadas através do procedimento desenvolvido. Este estudo poderá ser realizado analisando associações medicamentosas, formulações farmacêuticas contendo outros princípios ativos além de paracetamol.

7. Referências Bibliográficas



1. ANICETO, C.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação espectrofotométrica por injeção em fluxo de paracetamol (acetaminofeno) em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 387, 2002.
2. ARRUDA, M. A. Z., COLLINS, C. H. Informações essenciais para a caracterização de uma sistema de análise em fluxo. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 739, 2005.
3. **Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.). Official Methods of Analysis.** 14.ed. Arlington, By Williams, S., 1984, 720p.
4. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos.** Porto Alegre, Ed. Artmed, 2001, 46p.
5. BERTOLINI, A.; FERRARI, A.; OTTANI, A.; GUERZONI, S.; TACCHI, R.; LEONE, S. Paracetamol: New Vistas of an Old Drug. **CNS Drug Reviews**. v. 12, n. 3, p. 250, 2006.
6. BOSCH, M. E.; SÁNCHEZ, A. J. R.; ROJAS, F. S.; OJEDA, C. B. Determination of Paracetamol: Historical Evolution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 42, p. 291, 2006.
7. BOUHSAIN, Z.; GARRIGUES, S.; RUBIO, A. M.; GUARDIA, M. Flow Injection Spectrophotometric Determination of Paracetamol in Pharmaceuticals by Means of On-line Microwave-Assisted Hydrolysis and Reaction with 8-Hydroxyquinoline (8-Quinolinol). **Analytica Chimica Acta**, v. 330, p. 59, 1996.
8. BRUNTON, L. L. et al. **Goodman & Gilman as Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 11.ed. Rio de Janeiro, Ed. McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006, 601p.
9. CALATAYUD, J. M. E BENITO, C. G. Flow-injection Spectrofluorimetric Determination of Paracetamol. **Analytica Chimica Acta**, v. 231, p. 259, 1990.
10. CALATAYUD, J. M. E VIVES, S. S. An Oxidative Column for the Flow Injection Analysis - Spectrophotometric Determination of Paracetamol. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 7, n. 10, p. 1165, 1989.

11. CALATAYUD, J. M.; MARTI, M. C. P.; VIVES, S. S. Determination of Paracetamol by a Flow Injection-Spectrophotometric Method. **Analytical Letters**, v. 19, n. 19, p. 2023, 1986.
12. CAÑADA, M. J. A.; REGUERA, M. I. P.; MEDINA, A. R.; CÓRDOVA, M. L. F.; DÍAZ, A. M. Fast Determination of Paracetamol by Using a Very Simple Photometric Flow-through Sensing Device. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, p. 59, 2000.
13. CRIADO, A.; CÁRDENAS, S.; GALLEGO, M.; VALCÁRCEL, M. Continuous Flow Spectrophotometric Determination of Paracetamol in Pharmaceuticals Following Continuous Microwave Assisted Alkaline Hydrolysis. **Talanta**, v. 53, p. 417, 2000.
14. DIAS, A. C. B.; BORGES, E. P.; ZAGATTO, E. A. G.; WORSFOLD, P. J. A Critical Examination of the Components of the Schlieren Effect in Flow Analysis. **Talanta**, v. 68, p. 1076, 2006.
15. DINÇ, E.; KÖKDİL, G.; ONUR, J. F. **Pharmaceuticals and Biomedicals Analysis**, v. 26, n. 5, p. 769, 2001.
16. DOU, Y.; SUN, Y.; REN, Y.; JU, P.; REN, Y. Simultaneous non-destructive determination of two components combined paracetamol and amantadine hydrochloride in tablets and powder by NIR spectroscopy and artificial neural networks. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 543, 2005.
17. FANG, Y.Z.; LONG, D.J.; YE, J. N. Study of acetaminophen by parallel incident spectroelectrochemistry. **Analytical Chimica Acta**, v. 342, n. 1, p. 13, 1997.
18. **Farmacopéia Brasileira**, 3.ed. São Paulo, Organização Andrei Ed. S.A., 1977, 656p.
19. FILIK, H.; SENER, I.; CEKIÇ, S. D.; KILIÇ, E.; APAK, R. Spectrophotometric Determination of Paracetamol in Urine with Tetrahydroxycalix[4]arene as a Coupling Reagent and Preconcentration with Triton X-114 Using Cloud Point Extraction. **Chemical Pharmaceutical Bull.** v. 54, n. 6, p. 891, 2006.

20. JUNIOR, R. V. **Espectroscopia Raman na determinação quantitativa de paracetamol**. São José dos Campos, 2002. 56p. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Vale do Paraíba.
21. KARLBERG, B.; PACEY, G. E. **Flow Injection Analysis. A Practical Guide**. Amsterdam, Elsevier, 1989, 13p.
22. KNOCHEN, M.; GIGLIO, J.; REIS, B. F. Flow-injection spectrophotometric determination paracetamol in tablets and oral solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 191, 2003.
23. KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S. A., 1988, 191p.
24. LAVORANTE, A. F.; PIRES, C. K.; REIS, B. F. Multicommuted Flow System Employing Pinch Solenoid Valves and Micro-pumps. Spectrophotometric Determination of Paracetamol in Pharmaceutical Formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 42, p. 423, 2006.
25. MEDINA, A. R., CÓRDOVA, M. L. F. E DÍAZ, A. M. A Very Simple Resolution of the Mixture Paracetamol and Salicylamide by Flow Injection-Solid Phase Spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 394, p. 149, 1999.
26. MILLER, J. C.; MILLER, J. N. **Statistics for Analytical Chemistry**. Chichester, Ellis Horwood, 1988, 35p.
27. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Renome: Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**. 4.ed. Brasília, Editora MS, 2007, 24p.
28. OLIVAC, M. A.; OLSINA, R. A.; MASI, A. N. Selective spectrofluorimetric method for paracetamol determination through coumarinic compound formation. **Talanta**, v. 66, p. 229, 2005.

29. PEIXOTO, M. M.; JÚNIOR, A. F. S.; SANTOS, C. A. A.; JÚNIOR, E. C. Avaliação da Qualidade de Comprimidos de captopril Dispensados em Feira de Santana – BA. **Infarma**, v. 16, n. 13, p. 69, 2005.
30. PEREZ, J. L.; ANGEL, B. M. Determination of paracetamol in dosage forms by non-suppressed ion chromatography. Talanta, v. 48, n. 5, p. 1199, 1999.
31. PULGARÍN, J. A. M.; BERMEJO, L. F. G. Flow-injection Stopped-flow Spectrofluorimetric Kinetic Determination of Paracetamol Based on its Oxidation Reaction by Hexacyanoferrate (III). **Analytica Chimica Acta**, v. 333, p. 59, 1996.
32. RAMOS, M. L.; TYSON, J. F.; CURRAN, D. J. Determination of Acetaminophen by Flow Injection with On-line Chemical Derivatization: Investigations Using Visible and FTIR Spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 364, p. 107, 1998.
33. RANG, H. P. et. al. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2003, 277p.
34. REIS, B. F. Análise Química por Injeção em Fluxo: Vinte Anos de Desenvolvimento. **Química Nova**, v. 19, n. 1, p. 51, 1996.
35. ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B.; REIS, B. F. Experimentos Didáticos Utilizando Análise por Injeção em Fluxo. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 119, 2000.
36. RUENGSIAGOON, W.; LIAWRUANGRATH, S.; TOWNSHEND, A. Flow Injection Chemiluminescence Determination of Paracetamol. **Talanta**, v. 69, p. 976, 2006.
37. SANTOS, L. O. **Estudo Comparativo entre as técnicas de Voltametria em pulso diferencial, Espectrofotometria no ultravioleta e visível e Cromatografia líquida de alta eficiência como metodologias analíticas no doseamento da substância química Paracetamol**. Rio de Janeiro, 2003. 35p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz.
38. SILVA, P. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002, 48p.

39. SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo, Pioneira Thomson Learning, 2006, 743p.
40. SKOOG, D. A. et al. **Princípios de Análise Instrumental**. 2.ed. Porto Alegre, Bookman, 2002, 430p.
41. SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 7.ed. Rio de Janeiro, Ed. LTC, 2002, 223p., v. 2.
42. SUAREZ, W. T.; VIEIRA, H. J.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos empregando um sistema de análise por injeção em fluxo com geração de ácido nitroso. **Eclética Química**, v. 30, n. 1, p. 21, 2005.
43. **The United States Pharmacopeia (USP XXI). The National Formulary (NF XVI)**. Estados Unidos, 1985, 11p.
44. TROJANOWICZ, M. **Flow Injection Analysis. Instrumentation and Applications**. Singapore, World Scientific, 2000, 394p.
45. VERMA, K. K.; JAIN, A.; STEWART, K. K. Flow-Injection Spectrophotometric Determination of Acetaminophen in Drug Formulations. **Analytica Chimica Acta**, v. 261, n. 1, p. 261, 1992.
46. WANG, C.; HU, X.; LENG, Z.; YANG, G.; JIN, G. Differential pulse voltammetry for determination of paracetamol at a pumice mixed carbon paste electrode. **Analytical Letters**, v. 34, n. 15, p. 2747, 2001.
47. ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C. Classificação e Definição dos Métodos de Análise em Fluxo. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 138, 1999.