

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

RODRIGO GONÇALVES FRANCO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE
DIPIRONA EM MEDICAMENTOS USANDO A ANÁLISE POR INJEÇÃO EM
BATELADA (BIA) E COMPARAÇÃO COM MÉTODOS RECOMENDADOS POR
FARMACOPÉIAS**

UBERLÂNDIA

2019

RODRIGO GONÇALVES FRANCO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE
DIPIRONA EM MEDICAMENTOS USANDO A ANÁLISE POR INJEÇÃO EM
BATELADA (BIA) E COMPARAÇÃO COM MÉTODOS RECOMENDADOS POR
FARMACOPÉIAS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Graduação do Instituto de
Química da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial para a
obtenção do título de bacharel em Química
Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro
Abarza Muñoz

Co-orientadora: Doutoranda Ana Paula
de Lima

UBERLÂNDIA

2019

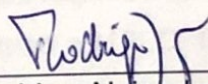
RODRIGO GONÇALVES FRANCO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE
DIPIRONA EM MEDICAMENTOS USANDO A ANÁLISE POR INJEÇÃO EM
BATELADA (BIA) E COMPARAÇÃO COM MÉTODOS RECOMENDADOS POR
FARMACOPEIAS**

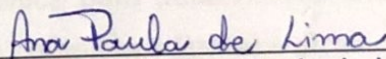
Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Graduação do Instituto de
Química da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial para a
obtenção do título de bacharel em Química
Industrial.

Uberlândia, 04 de julho de 2019.

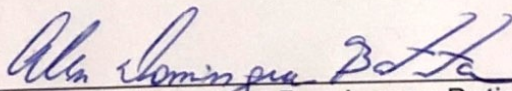
Banca examinadora:



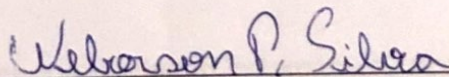
Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz
(Orientador)



Doutoranda Ana Paula de Lima
(Co-orientadora)



Prof. Dr. Alex Domingues Batista
(Examinador)



Doutorando Weberson Pereira da Silva
(Examinador)

RESUMO

A dipirona, também conhecida como metamizol ou novalgina (nome comercial), é um medicamento antipirético, considerado uma pró-droga a qual pode ser injetada ou ingerida via oral em gotas ou por meio de comprimidos. O fármaco em questão possui como principal princípio ativo o 4-metil aminoantipirina (4-MAA), o qual inibe a síntese de prostaglandinas que são produzidas pelas ciclooxygenases (COXs), interferindo na produção de citocinas pró-inflamatórias. Pesquisas mostraram que se usada durante um bom tempo o fármaco pode causar agranulocitose, porém não há uma confirmação exata quanto às causas desta doença relacionada ao consumo de dipirona. Dessa forma, o controle de qualidade de fármacos contendo dipirona é de extrema importância devido aos efeitos tóxicos quando administrado em excesso ou pela falta dele quando abaixo do valor rotulado. Este trabalho apresenta a aplicação da análise por injeção em batelada (BIA, *Batch-Injection Analysis*) com detecção amperométrica em eletrodo de carbono vítreo para determinação de dipirona em formulações farmacêuticas. Para comparação, métodos recomendados por diferentes Farmacopeias, incluindo titulação iodométrica, espectrofotometria na região do UV e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*), foram empregados na análise das cinco amostras comerciais. Os resultados obtidos pelo método BIA apresentaram-se concordantes estatisticamente com os métodos espectrofotométrico e HPLC. De maneira geral, pode-se destacar o método BIA pelo baixo consumo de reagentes, facilidade na operação, rapidez de análise e mínimo erro associado (alta precisão), características que conduzem a futuros estudos utilizando essa técnica para desenvolver uma nova forma na determinação de analitos em formulações comerciais farmacêuticas.

Palavras-Chave: Dipirona, titulação iodométrica, Análise por Injeção em Batelada, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Amperometria.

ABSTRACT

Dipyrone, also known as metamizol or novalgine (commercial name), is an antipyretic drug, considered a prodrug which can be injected or ingested orally in drops or by tablets. The analyte in question has 4-methyl aminoantipyrine as main active principle, which inhibits the synthesis of prostaglandins that are produced by the cyclooxygenase (COXs), interfering in the production of pro-inflammatory cytokines. Researches has shown that if used for a long time the drug may cause agranulocytosis, but there is no exact confirmation about the causes of this disease related to the use of dipyrone. Therefore, the quality control of medicines containing dipyrone is extremely important due to the toxic effects when administered in excess or at a lower concentration below the labeled value. This work presents the application of batch-injection analysis (BIA) with amperometric detection on glassy-carbon electrode for the determination of dipyrone in pharmaceutical formulations. For comparison, recommended methods by different Pharmacopeia, including iodometric titration, spectrophotometry in the UV region, and high-performance liquid chromatography (HPLC), were employed for the analysis of five commercial samples. The results obtained by the proposed BIA method agreed statistically with the values obtained by spectrophotometry and HPLC. In summary, we can highlight the BIA method due to low reagent expense, ease of operation, rapid analysis and minimum associated error (high precision), characteristics that lead to future studies using this technique to develop a new way in the determination of analytes in commercial pharmaceutical formulations.

Keywords: Dipyrone, iodometric titration, Batch Injection Analysis, High Performance Liquid Chromatography, amperometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fórmula estrutural da dipirona sódica.	10
Figura 2 Esquema de equipamento para análises em UV-VIS.....	12
Figura 3 Esquema de um equipamento de HPLC	14
Figura 4 Esquema de uma célula BIA com configuração “wall jet”.....	16
Figura 5 Esquema de uma célula de BIA “wall jet” semelhante à utilizada neste trabalho.	23
Figura 6 Curva de calibração utilizando soluções padrões de dipirona nas concentrações de 10, 15, 25, 30, 50, 60 e 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$, preparadas em água.....	28
Figura 7 Curva analítica de calibração para o HPLC utilizando soluções padrões de Dipirona nas concentrações de 50, 150, 200, 300 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, preparadas em água e metanol (70: 30 v/v).....	30
Figura 8 Voltamogramas cíclicos referentes ao estudo do eletrólito realizado para as análises com o GCE limpo.	32
Figura 9 Voltamograma hidrodinâmico obtidos através das representações gráficas dos valores médios de corrente de pico de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dipirona em função dos potenciais aplicados para GCE limpo. Eletrólito: 0,1 mol L^{-1} HClO_4 , volume de injeção de 100 μL , velocidade de injeção de 153 $\mu\text{L s}^{-1}$	33
Figura 10 Estudo do volume injetado no sistema BIA utilizando GCE limpo. Injeções de 10, 20, 30, 50, 100 e 200 μL de solução de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dipirona em solução de 0,1 mol L^{-1} HClO_4 , potencial de trabalho de 1,3 V, velocidade de injeção igual a 153 $\mu\text{L s}^{-1}$	34
Figura 11 Estudo da velocidade de injeção no sistema BIA com GCE limpo, para injeções em triplicata da solução padrão de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Dipirona em solução de 0,1 mol L^{-1} HClO_4 , com potencial de trabalho: 1,3 V, volume de injeção de 100 μL	35
Figura 12 Respostas amperométricas obtidas em sistema BIA com GCE limpo para 15 injeções sucessivas de solução padrão de Dipirona 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 0,1 mol L^{-1} HClO_4 . Potencial: 1,3 V, volume de injeção: 100 μL ; velocidade de injeção igual a 153 $\mu\text{L s}^{-1}$	36
Figura 13 Respostas amperométricas obtidas no sistema BIA com GCE limpo para injeções em triplicata de soluções padrão de dipirona em 0,5; 2,0; 10; 25; 50; 100; 250; 500; 750 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, seguida das injeções em triplicata das cinco amostras.....	37
Figura 14 Curva de calibração obtida através dos dados obtidos utilizando GCE limpo.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes utilizados no decorrer do trabalho.....	19
Tabela 2. Medicamentos utilizados nas análises e informações adicionais.....	20
Tabela 3. Dados das titulações das amostras sólidas.	25
Tabela 4. Dados das titulações das amostras líquidas.	25
Tabela 5. Resultados obtidos da titulação iodométrica para as amostras de medicamentos.....	26
Tabela 6. Resultados obtidos para as amostras analisadas no UV-vis.....	29
Tabela 7. Resultados obtidos para as amostras analisadas no HPLC.....	31
Tabela 8. Resultados para as amostras puras e dopadas (para estudo de recuperação) analisadas em BIA utilizando GCE limpo.	39
Tabela 9. Resultados obtidos em mg de dipirona para cada amostra analisada pelos métodos de volumetria, UV-vis, HPLC e BIA... ..	41
Tabela 10. Resultados dos testes t em relação à comparação entre os valores obtidos pelo método BIA frente aos outros métodos recomendados pelas farmacopeias na determinação de dipirona em fármacos.*	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-MAA – 4-metil aminoantipirina

AA – ácido aradônico

AINEs – anti-inflamatórios não esteroidais

AMP – amperometria

BIA – do inglês, *batch injection analysis* – Análise por injeção em batelada

CE – do inglês, *counter electrode* – Eletrodo auxiliar (EA)

COX – ciclooxigenase

COX 3 – ciclooxigenase central 3

CV – do inglês, “*Cyclic Voltammetry*” – Voltametria cíclica

DPR – desvio padrão relativo

DSM – dipirona sódica monoidratada

EA – eletrodo auxiliar

FA – frequência analítica

GCE – do inglês, *glassy carbon electrode* – Eletrodo de carbono vítreo

HPLC – do inglês, *high performance liquid chromatography* – Cromatografia líquida de alta eficiência

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

RE – do inglês, *reference electrode* – Eletrodo de referência (ER)

UV-vis – ultravioleta visível

WE – do inglês, *working electrode* – Eletrodo de trabalho (ET)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Análises por volumetria.....	11
1.2 Análises por espectrofotometria UV-VIS.....	12
1.3 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência.....	13
1.4 Análises por injeção em batelada.....	15
2 OBJETIVOS GERAIS.....	18
2.1 Objetivos específicos.....	18
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	19
3.1 Reagentes e soluções.....	19
3.1.1 Análises por volumetria.....	20
3.1.2 Análises por espectrofotometria UV-VIS.....	21
3.1.3 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência.....	21
3.1.4 Análises por injeção em batelada.....	21
3.2 Instrumentação e vidrarias.....	22
3.2.1 Análises por volumetria.....	22
3.2.2 Análises por espectrofotometria UV-VIS.....	22
3.2.3 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência.....	22
3.2.4 Análise por injeção em batelada.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Análises por volumetria.....	25
4.2 Análises por espectrofotometria UV-VIS.....	28
4.3 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência.....	30
4.4 Análises por injeção em batelada.....	32
5 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS.....	41
6 CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

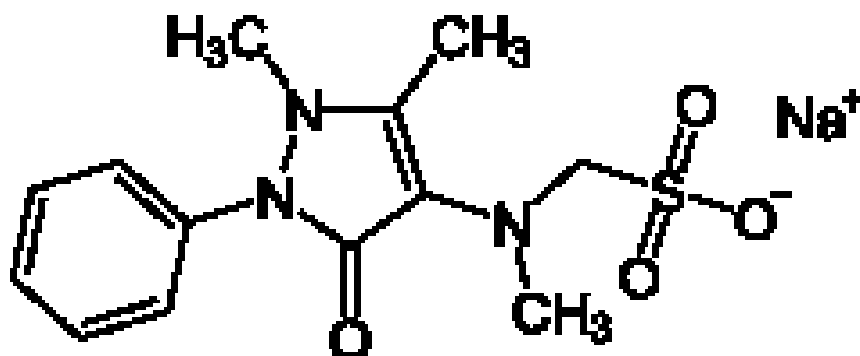
A Dipirona sódica tem como nome oficial 1-fenil-2,3-dimetil-5-pirazolona-4-metilaminometano sulfonato de sódio, possui a fórmula molecular $C_{13}H_{16}N_3O_4SNa$ e sua estrutura é mostrada na Figura 1. Em 1920 foi sintetizada pela primeira vez a Dipirona pela empresa Hoechst AG a qual começou a produzir em larga escala em 1922 com o nome comercial de Novalgina. A dipirona pode também ser conhecida como metamizol sódico e trata-se de um medicamento antipirético, considerado uma pró-droga a qual pode ser injetada ou ingerida via oral em gotas ou por meio de comprimidos. ^[1]

A dor pode ser tratada com compostos analgésicos que podem ser divididos em dois grupos: opióides e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Um composto opióide é qualquer composto natural, semi-sintético ou sintético que se ligue especificamente aos receptores opióides e possua propriedades similares às dos opióides endógenos, como por exemplo a morfina e codeína. Já os AINEs são compostos que consistem de um ou mais anéis aromáticos ligados a um grupo ácido funcional, os quais agem através da inibição das cicloxigenases (COXs) reduzindo a conversão do ácido aracdônico (AA) em prostaglandinas. Exemplos de AINEs são o naproxeno, ibuprofeno e nimesulida. ^[2]

A classificação correta para a dipirona é de um fármaco analgésico não-opinóide, embora durante anos tenha sido considerado pertencer aos AINEs. Com base nos conhecimentos vigentes, a última classificação parece errônea porque, em contraste com os AINEs, o mecanismo pelo qual o metamizol atua baseia-se na inibição de uma COX específica, a cicloxigenase central 3 (COX-3). Dessa forma o metamizol é um analgésico não-opinóide, sendo considerado um dos mais fortes usados tanto na medicina humana como veterinária. ^[3]

O fármaco em questão possui como princípio ativo o 4-metil aminoantipirina (4-MAA) o qual é gerado a partir de uma hidrólise e absorvido e bio-formado por reações enzimáticas. O 4-MAA age no organismo inibindo a síntese de prostaglandinas que são produzidas pelas COX-3, interferindo na produção de citocinas pró-inflamatórias. Seu uso resulta em efeitos colaterais leves quando comparados a outros medicamentos opióides e AINEs. ^[4]

Figura 1 - Fórmula estrutural da dipirona sódica.



Fonte: FERREIRA 2013. [1]

Na década de 1970 o fármaco foi proibido nos EUA e em boa parte da Europa sob suspeitas de causar agranulocitose adquirida, doença caracterizada pela diminuição ou desaparecimento dos leucócitos polimorfonucleares (frequência menor que 500 granulócitos por mm^3) e que se manifesta por ulcerações nos intestinos ou em outras mucosas, na garganta e na pele. Porém, há muitos estudos que divergem sobre a relação dessa doença e o consumo de dipirona. Na contramão dos países desenvolvidos, no Brasil é o analgésico mais consumido, sendo responsável por cerca de 30% do mercado nacional. Sendo assim, técnicas de análise do teor de dipirona em medicamentos ganham grande importância como forma de fiscalizar as empresas fornecedoras dos fármacos. [5]

Alguns medicamentos utilizam de outros componentes em suas formulações a fim de potencializar seus efeitos (sinergismo). No caso da dipirona, utiliza-se da cafeína como combinação em alguns fármacos comercializados. Isso se dá porque a cafeína auxilia no controle da vasodilatação provocada pela dor e na absorção de analgésicos. Esses componentes adicionais devem ser levados em conta durante a realização de análises quantitativas do analito de interesse em medicamentos que contenham em sua formulação a combinação sinérgica em questão. [6]

Há um grande interesse no desenvolvimento de métodos analíticos que forneçam parâmetros apropriados para as determinações e análises quantitativas de fármacos de forma eficiente, reprodutiva e rápida, uma vez que esses métodos são amplamente utilizados nas análises de rotina durante a produção de formulações farmacêuticas, no controle de qualidade e no desenvolvimento de novos fármacos.

Os métodos recomendados para determinação de dipirona são descritos em Farmacopeias de diferentes países, sendo eles a volumetria (titulação iodométrica) ^[1,7], espectrofotometria na região do UV ^[1,8], e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).^[9] Alguns destes métodos são demorados, requerem uso de solventes orgânicos e por consequência geram muitos resíduos e outros podem ser mais susceptíveis a erros sistemáticos durante sua execução.

Em contrapartida, análises eletroquímicas oferecem vantagens frente a outros sistemas de detecção, podendo fornecer determinações simples, rápidas e sensíveis e frequentemente não requerem etapas de tratamento e preparo das amostras. ^[10] A seguir, todos os métodos apresentados no interím deste trabalho são descritas separadamente.

1.1 Análises por volumetria

A volumetria é uma técnica baseada na titulação direta ou indireta do analito de interesse. Na determinação de dipirona por volumetria, o titulante é convertido a um íon, o qual é consumido pelo analito. No primeiro indício de excesso desse íon convertido, o indicador presente na solução acusa que o ponto de equivalência foi atingido e a solução muda de cor. É o que ocorre na titulação de oxi-redução com iodo, na qual o titulante (KIO_3) é convertido a íon iodeto (I_3^-) e este pode ser consumido, por exemplo, pelo radical metanossulfônico da dipirona, formando um sulfato. Devido a isso, a iodometria é um dos principais métodos mencionados nas farmacopeias para a determinação de dipirona, em meio ácido e em baixa temperatura, utilizando suspensão de amido para indicação do ponto final, podendo haver variação nas condições utilizadas nas análises por titulação entre uma edição e outra das farmacopeias. ^[7]

A Farmacopeia Japonesa ^[11] preconiza a utilização de ácido clorídrico 1:20 v/v, temperatura entre 5 °C e 10 °C e ponto final indicado pela cor azul persistente por 1 minuto após agitação vigorosa. As condições descritas na Farmacopeia Britânica ^[12] são: ácido clorídrico 0,01 mol. L⁻¹, temperatura abaixo de 10 °C e ponto final indicado pela cor azul persistente por 2 minutos após agitação vigorosa. Esse método é semelhante ao descrito na Farmacopeia Brasileira, 3ª edição ^[13]. A Farmacopeia Brasileira, 4ª edição ^[14] também preconiza iodometria para a determinação quantitativa de dipirona sódica, tanto na matéria-prima quanto em medicamentos

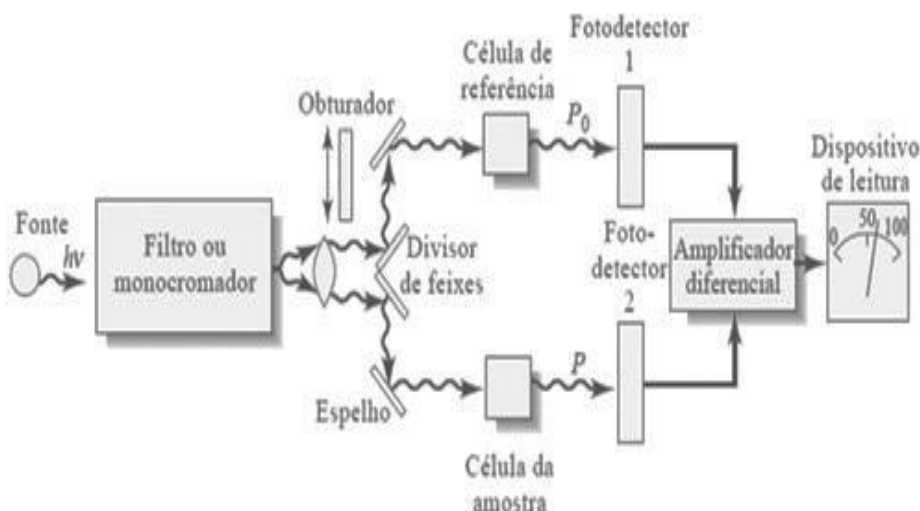
(comprimidos, solução oral e injetável), e recomenda ácido acético 6% para matéria-prima e ácido acético glacial para os medicamentos, temperatura abaixo de 20 °C e não havendo referência quanto ao tempo de permanência da cor azul do indicador. [7]

1.2 Análises por espectrofotometria UV-VIS

A espectrofotometria estuda a interação dos diferentes tipos de radiação com a matéria e poder ser definida como qualquer procedimento que utiliza a luz (radiação eletromagnética) para medir a concentração química de qualquer espécie. Os métodos espectrométricos abrangem um grupo de métodos analíticos baseados na espectroscopia atômica e molecular, ou seja, na medida da quantidade de radiação emitida ou absorvida pelas moléculas ou pelas espécies atômicas de interesse na região UV-VIS do espectro eletromagnético. Na Figura 2 encontra-se um esquema do equipamento utilizado para análises do UV-VIS. [15]

A espectroscopia de absorção molecular é uma das técnicas analíticas mais empregadas e valiosas para a identificação de grupos funcionais na molécula, em função de robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas, além de determinações analíticas em diversas áreas. É aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, na identificação do princípio ativo de fármacos. Porém, não se recomenda o uso desse método para determinação de analitos provindos de formas farmacêuticas que apresentem associação com outro princípio ativo, pois estes absorvem nessa região do espectro eletromagnético. [1]

Figura 2 - Esquema de equipamento para análises em UV-VIS



Fonte: SKOOG, 2002. [15]

Espectros de absorção na região do UV-VIS são obtidos através dos espectrofotômetros, aparelhos que fazem passar um feixe de luz monocromática através de uma solução, e mede a quantidade de luz que foi absorvida por essa solução. Usando um prisma, o aparelho separa a luz em feixes com diferentes comprimentos de onda, podendo-se assim fazer passar através da amostra um feixe de luz monocromática (de um único comprimento de onda).^[15]

O método é baseado na medida de transmitância T ou absorbância A de soluções contidas em células de quartzo ou vidro, tendo um caminho óptico de b em cm. A concentração c de um analito absorvente está relacionada linearmente à absorbância, conforme representado pela Equação 1, a *Lei de Beer*.^[16]

$$A = -\log T = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{Equação 1})$$

Cada espécie molecular é capaz de absorver em seu próprio comprimento de onda característico da radiação eletromagnética. No processo um feixe de luz paralelo de radiação monocromática com potências P_0 incide no bloco perpendicular à sua superfície. Após passar através de b do material, transfere energia para a molécula e resulta em um decréscimo da intensidade da radiação eletromagnética incidente e sua potência decresce por P . A concentração é representada por c e ε representa o coeficiente de absortividade.^[15]

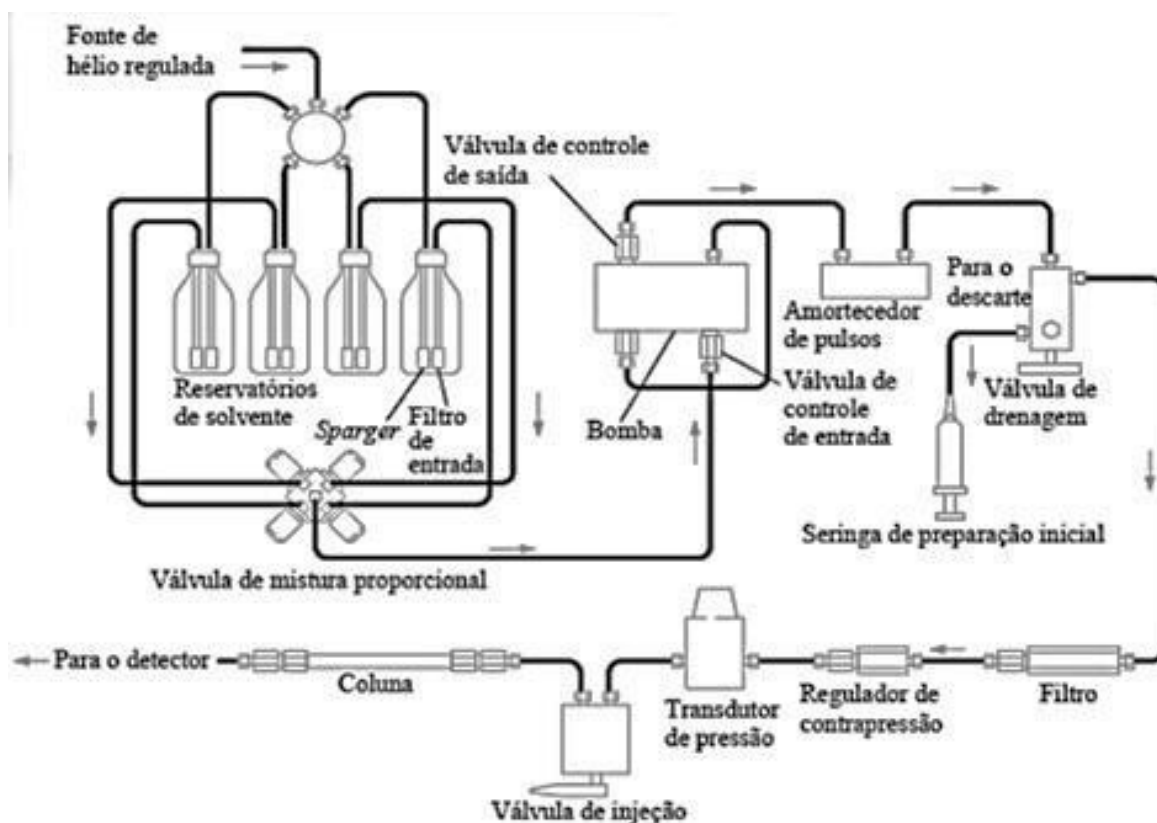
1.3 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, High Performance Liquid Chromatography, HPLC), também conhecida como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), é um método físico-químico de separação, fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido às diferentes interações do analito entre a fase móvel e a fase estacionária, as quais devem ser imiscíveis entre si.

É uma técnica de separação bastante versátil, que permite sua aplicação a diversos tipos de amostras devido a grande variedade de combinações entre as fases móveis e estacionárias, e que pode também ser acoplada a diferentes tipos de detectores. A instrumentação necessária para análise, que pode ser observada na

Figura 3, é extremamente sofisticada e existem equipamentos totalmente computadorizados, com softwares capazes controlar cada etapa do processo de separação de forma isolada, desde a injeção de amostra à detecção do analito, e também detectar problemas de funcionamento no equipamento.

Figura 3 - Esquema de um equipamento de HPLC



Fonte: SKOOG, 2002. [15].

O HPLC é uma das técnicas analíticas recomendadas pelas farmacopeias mais empregadas na determinação de fármacos, entre eles os inibidores das COXs, por exemplo, e em diferentes matrizes. De acordo com trabalhos recentes, percebe-se uma grande variação nas condições de separação empregadas entre as metodologias, com maior ênfase no que se diz respeito à parte de detecção, pH da fase móvel e tipo de coluna cromatográfica utilizada. Os estudos necessários ao se desenvolver uma metodologia válida para a determinação de fármacos se dão, em geral, com corridas mais longas a fim de garantir uma separação eficiente entre o analito de interesse, outros analitos e até mesmo os excipientes que compoñham o medicamento, porém as faixas de trabalho para esses casos acabam sendo limitadas. [17]

Visando o aprimoramento da metodologia empregada desde o preparo das soluções envolvidas até a detecção das mesmas, faz-se o estudo de otimização dos diferentes parâmetros para as análises usando o HPLC, dentre eles estão a eluição das amostras isocrática ou por gradiente, variação da composição das fases estacionárias e móveis (separação por fase normal ou reversa), estudo da composição da fase móvel e suas proporções, o tipo de coluna cromatográfica e também a técnica de detecção que será acoplada ao HPLC. Desse modo, garante-se um método rápido e eficiente, que pode ser aplicado ao objeto de estudo inicial como também à determinação de diversos analitos de mesmo caráter, garantido pela versatilidade do método.

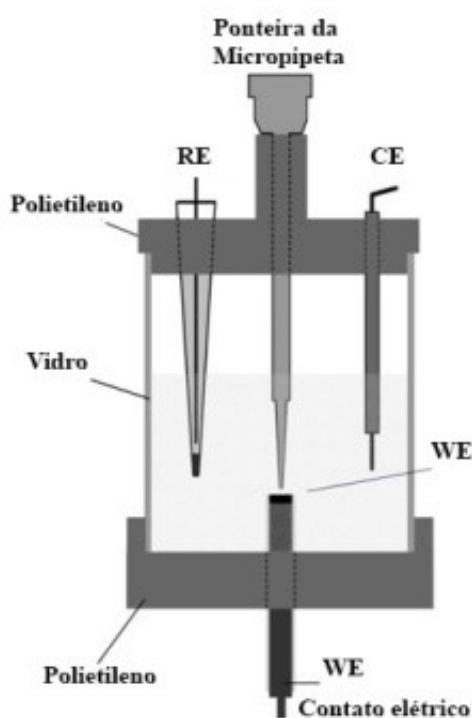
1.4 Análises por injeção em batelada

As técnicas eletroquímicas que podem ser classificadas naquelas que envolvem a passagem de corrente elétrica, como a voltametria, amperometria, coulometria entre outras, e técnicas que não envolvem passagem de corrente (ou a corrente é desprezível), como a potenciometria e condutometria. Dentre estas, muitas são aplicadas ou têm grande potencial de aplicação na determinação de analitos de interesse farmacêutico em formulações farmacêuticas. ^[15]

A amperometria consiste na aquisição rápida (fração de segundos) da corrente ao longo do tempo mantendo um potencial fixo aplicado ao eletrodo de trabalho. Conforme há a presença de um analito que se oxide e reduza no potencial escolhido, verifica-se variação de corrente proporcional à concentração do analito. Devido à resposta rápida, a detecção amperométrica é comumente associada a técnicas de análise em fluxo, como a análise por injeção em batelada (BIA, do inglês *batch-injection analysis*). O BIA foi introduzido por Wang e Taha ^[18] no início da década de 90. Neste sistema, pequenos volumes do analito são injetados, com o auxílio de uma micropipeta, diretamente sobre a superfície de um detector, no caso o eletrodo de trabalho (ET), o qual é posicionado em uma configuração “*wall jet*”, imerso em um grande volume de solução. A passagem do analito sobre a superfície do eletrodo resulta em sinais transientes em forma de picos quando a detecção amperométrica é usada, que é a principal técnica eletroquímica associada ao BIA para aplicação analítica. ^[19,20]

O aparato para as análises em BIA consiste em uma célula com formato de um tubo que possui orifícios na parte superior, os quais devem acomodar os eletrodos de referência (ER) e o eletrodo auxiliar (EA) e que também oferece abertura para a ponta da micropipeta. Na parte inferior insere-se o eletrodo de trabalho, ligado a um contato elétrico. Os eletrodos e a ponta da micropipeta ficam submersos no eletrólito utilizado na análise. Um modelo do aparato descrito encontra-se esquematizado de forma geral na Figura 4, no qual o material que compõe a célula é o vidro.

Figura 4 - Esquema de uma célula BIA com configuração “wall jet”.



Fonte: LIMA, 2014. [21]

Para a realização de uma análise por BIA, o ET é posicionado abaixo e na direção oposta à da micropipeta que realiza a injeção da amostra, diferentemente do que geralmente se observa em outras células eletroquímicas onde a disposição do ET é inversa à mencionada. A distância com que a ponteira da micropipeta é acomodada em relação ao ET deve permanecer constante durante toda a análise, e pode ser regulada movendo o ET para cima ou para baixo, de modo a ajustar a melhor distância entre a superfície do eletrodo e a ponteira da micropipeta. Nos outros dois orifícios localizados na tampa da célula, são fixados o ER e o EA. Por último, é adicionada a solução do eletrólito suporte em volume suficiente para que os três

eletrodos tenham contato elétrico entre si. As injeções de amostra podem ser realizadas utilizando uma micropipeta convencional ou uma micropipeta eletrônica, a qual fornece maior precisão de volume e velocidade de injeção uma vez que estes parâmetros são programados eletronicamente levando a resultados mais reprodutíveis. ^[21].

O sistema BIA tem sido estudado por proporcionar diversas vantagens em relação aos métodos voltamétricos convencionais, tais como, elevada frequência analítica, baixo consumo de amostras e reagentes, reduzida contaminação do eletrodo de trabalho, elevada sensibilidade e repetibilidade adequada no procedimento de injeção com o uso de pipeta eletrônica, possuindo ainda uma instrumentação versátil e portátil, baixo custo dos componentes do sistema, podendo ser facilmente miniaturizadas, pois o perfil hidrodinâmico da injeção “*wall jet*” elimina a necessidade de uma enorme diluição, logo células com menores volumes de trabalho podem ser utilizadas. Além disso, o fenômeno de passivação ou contaminação do eletrodo de trabalho é menor nos sistemas em batelada, devido ao relativo pequeno tempo de contato entre o analito e a superfície do eletrodo. ^[21] Dessa forma, o sistema BIA com detecção amperométrica é bastante promissor para determinação de fármacos em formulações farmacêuticas em análises de rotina.

2 OBJETIVOS GERAIS

O trabalho tem como objetivo geral explorar a oxidação eletroquímica da dipirona visando sua quantificação por meio da detecção amperométrica empregando o sistema BIA como proposta de método, fazendo o uso do eletrodo de carbono vítreo para tal. Os resultados deverão ser submetidos à comparação aos obtidos na reprodução dos métodos certificados por diferentes farmacopéias para determinação do analito.

2.1 Objetivos específicos

- Realizar o estudo das otimizações do sistema BIA a fim de obter as condições ótimas para a realização da determinação de dipirona;
- Determinar a quantidade de dipirona presente em cinco amostras diferentes de fármacos comerciais, sendo três destas na forma de comprimidos (sólido) e as outras duas em gotas (líquido);
- Comparar a metodologia proposta no sistema BIA com os métodos de volumetria, espectrofotometria UV-VIS e HPLC, certificados pelas Farmacopeias.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Em todas as análises utilizaram-se reagentes com grau analítico e para o preparo das soluções foi utilizado água deionizada do sistema de purificação Milli-Q Plus da Millipore (resistividade > 18 MΩ cm) (Bedford, MA, EUA). Na tabela 1 encontram-se descritos todos os reagentes utilizados nas análises deste trabalho.

Tabela 1. Reagentes utilizados no decorrer do trabalho.

Reagentes	Procedência	% (m/m) / Pureza
Iodato de potássio	Synth	PA
Iodeto de potássio	Synth	PA
Amido	Synth	PA
Metanol	Synth	99,8%
Ácido perclórico	Reagen	70%
Ácido clorídrico	Synth	36 - 38%
Ácido acético glacial	Synth	99,7%
Ácido fosfórico	Reagen	85%
Ácido nítrico	Synth	64%
Ácido sulfúrico	Vetec	95%
Hidróxido de sódio	Dinâmica	PA
Cloreto de potássio	Proquimios	PA
Dipirona	Sigma Aldrich	> 99%

Fonte: O autor.

As amostras utilizadas dos medicamentos foram obtidas em farmácias locais, estando todas dentro do prazo de validade, as quais se encontram listadas na Tabela 2. Para as amostras sólidas foram macerados 10 comprimidos de cada medicamento a fim de se obter um lote de cada amostra, a partir do qual se preparou as soluções utilizadas em cada análise. Esse procedimento é recomendado pela ANVISA para a determinação de analitos em fármacos e visa obter uma maior quantidade de massa de amostra mais homogênea em relação ao analito e os

excipientes presentes nos fármacos, reduzindo os erros associados à pesagem de pequenas quantidades de amostra para o preparo das soluções pouco concentradas. Já para as amostras líquidas, utilizou-se o volume referente à concentração desejada, tomando o devido cuidado de agitar bastante a amostra antes do preparo das soluções.

Tabela 2. Medicamentos utilizados nas análises e informações adicionais.

Amostra	Forma física	Massa de dipirona
A	Comprimido	500 mg por comprimido
B	Comprimido	300 mg por comprimido
C	Comprimido	500 mg por comprimido
D	Líquido	500 mg por mL
E	Líquido	500 mg por mL

Fonte: O autor.

3.1.1 Análises por volumetria

Para a escolha do melhor método a ser adotado neste trabalho utilizou-se como base um artigo ^[7] que propõe um método adaptado de iodometria a partir de análises comparativas entre as metodologias das farmacopeias citadas. No trabalho há toda uma discussão em relação às variações de cada metodologia, principalmente com relação à escolha do ácido utilizado em função de sua origem (orgânica ou mineral), tempo necessário para aferimento do ponto de viragem da titulação e os valores obtidos ao final da execução de cada método. Como conclusão do estudo o método que obteve melhores resultados foi o proposto pelos próprios autores, o qual foi escolhido para ser adotado no desenvolvimento deste trabalho.

Para a análise utilizando titulação iodométrica, foi usado como titulante uma solução de iodato de potássio (KIO_3) $0,01513 \text{ mol L}^{-1}$. Foi utilizada uma solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 10 % (v/v) para acidificar o meio reacional, uma massa de 1 g de iodeto de potássio (KI) e uma suspensão de amido $4,8 \text{ g L}^{-1}$ como indicador, do qual se adicionou 10 gotas próximo ao ponto de equivalência.

As amostras foram preparadas em 50 mL de água deionizada a 10 °C, com o intuito de evitar a degradação do analito, sendo utilizados 0,15 g de cada amostra sólida e 0,263 mL das amostras líquidas.

3.1.2 Análises por espectrofotometria UV-vis

Para a análise no UV-vis, as soluções de dipirona para obtenção da curva de calibração foram preparadas a partir do padrão e em água deionizada nas concentrações de 10, 15, 25, 30, 50, 60, 70 e 75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. As amostras de medicamentos foram preparadas também em água deionizada, todas a uma concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A análise foi realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira, 4ª edição. ^[14]

3.1.3 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência

Para a análise por o HPLC, utilizou-se uma fase móvel composta por dihidrogenofosfato de sódio, com pH igual a 7,5. Foram preparadas soluções padrão de dipirona a partir do padrão nas concentrações de 50, 150, 200, 300 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando a fase móvel da análise como solvente. As amostras foram preparadas na concentração de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ também em fase móvel. A análise foi realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira, 4ª edição ^[14] com adaptações baseadas em um trabalho previamente publicado. ^[24]

3.1.4 Análises por injeção em batelada

Para a análise usando BIA, realizou-se primeiramente o estudo do pH para escolher qual o eletrólito se comportaria melhor frente ao ET usado nas determinações, o GCE limpo.

A solução tampão Britton-Robinson (BR), composta por uma mistura de 0,1 mol L^{-1} de ácido acético glacial, ácido bórico e ácido fosfórico, com valores de pHs ajustados com soluções diluídas de hidróxido de sódio ou ácido nítrico, foi utilizada para o estudo de eletrólito, sendo empregada para os valores de pHs iguais a 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0. O ácido perclórico e o ácido clorídrico foram utilizados a uma concentração de 0,1 mol L^{-1} . O ácido fosfórico foi utilizado a uma concentração de 0,1 mol L^{-1} e

também ajustado a um pH igual a 7,5 com a adição de solução diluída de hidróxido de sódio.

O eletrólito suporte escolhido foi o ácido perclórico a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, no qual todas as soluções foram preparadas, além de ser utilizado como eletrólito do corpo da célula e demais análises para esse sistema.

Preparou-se uma solução estoque de dipirona em água numa concentração de 10 mmol L^{-1} , a qual foi utilizada para o preparo das outras soluções da análise. As amostras foram preparadas em $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.2 Instrumentação e vidrarias

3.2.1 Análises por volumetria

As soluções foram preparadas em balões de 250 mL. Para as titulações foram utilizadas buretas de 25 mL para o titulante e erlenmeyers de 250 mL para a solução do titulado o qual permaneceu em banho de gelo durante as análises, realizadas em triplicata para cada amostra de maneira convencional e aguardando cerca de 1 minuto depois de observado ponto de viragem para dar por finalizada cada titulação.

3.2.2 Análises por espectrofotometria UV-vis

Para as análises no UV-VIS utilizou-se de um espectrofotômetro UV Spectrophotometer Shimadzu UV-1800, fixado no comprimento de onda de 250 nm. Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente utilizando uma cubeta de quartzo para as leituras em triplicata, e as soluções e amostras preparadas imediatamente antes de serem submetidas à análise.

3.2.3 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência

Para os testes realizados em cromatografia líquida de alta eficiência, utilizou-se de um cromatógrafo Shimadzu LC-10 VP equipado com um detector de UV-Vis (SPD-10AV), numa coluna de LC (Lychrispher A8 100 RP-18-C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 μm), um desgaseificador (DGU -20A5), um injetor manual (20 μL) e uma bomba

(LC-10AD VP-). A fase móvel foi constituída por dihidrogenofosfato de sódio (pH 7,5) com uma vazão de 1 mL min^{-1} . O detector foi fixado em 250 nm.

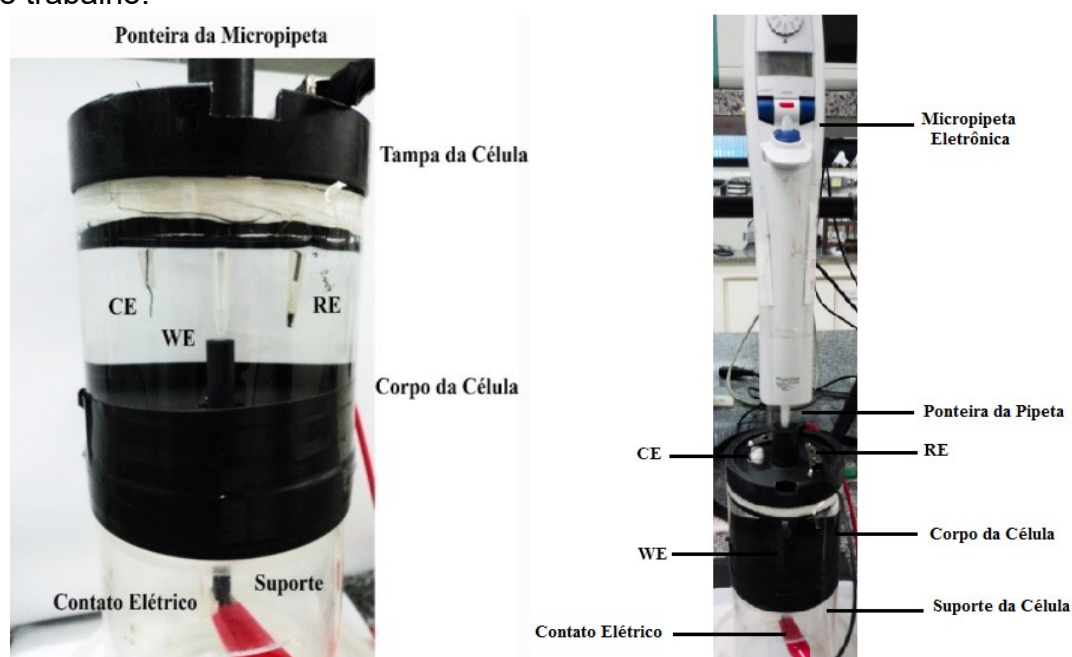
Todas as análises foram realizadas em triplicata e à temperatura ambiente, injetando-se manualmente as amostras com o auxílio de uma seringa.

3.2.4 Análises por injeção em batelada

Para a realização das análises utilizou-se uma célula eletroquímica com três eletrodos distintos para as determinações. A célula consiste em um tubo de vidro de 7,3 cm de diâmetro interno, 7,1 cm de altura e 200 mL de volume total, com quatro orifícios na parte superior feita de polietileno, os quais acomodam os eletrodos de referência e auxiliar, oferece abertura para a ponta da micropipeta e para o agitador, caso seja necessário o uso deste. Na parte inferior, também feita de polietileno, tem-se o eletrodo de trabalho, ligado a um contato elétrico. Os eletrodos e a ponta da micropipeta ficam submersos no eletrólito utilizado na análise. [20]

Parte do aparato utilizado neste trabalho para as determinações eletroanalíticas encontra-se esquematizado na figura 5. Em relação aos eletrodos utilizou-se um fio de platina como eletrodo auxiliar ou contra eletrodo, um eletrodo miniaturizado de Ag/AgCl/KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrodo de referência e um GCE ($\varnothing = 1,5 \text{ mm}$, CH instrument, Austin, TX, USA) como eletrodo de trabalho.

Figura 5 - Esquema de uma célula de BIA “wall jet” semelhante à utilizada neste trabalho.



Fonte: LIMA, 2017. [22]

A limpeza do GCE foi efetivada manualmente esfregando-o sobre a superfície de um feltro de polimento, espécie de uma almofada, e posteriormente submergindo-o em uma solução de água e etanol numa proporção de 1:1 e submetendo-o por 15 minutos no ultrassom.

As injeções das amostras na célula foram feitas com o auxílio de uma micropipeta eletrônica (Eppendorf® Multipipette stream) depois de realizados os estudos de otimizações das condições de volume e velocidade de injeção da mesma, garantindo uma maior precisão analítica frente às análises realizadas com micropipetas convencionais uma vez que tais condições são programadas de forma eletrônica.

Em relação à velocidade de injeção, a micropipeta possui 10 velocidades diferentes correspondentes ao volume de solução por segundo que é injetada na superfície do eletrodo de trabalho. As velocidades correspondentes, em $\mu\text{L s}^{-1}$, a cada nível de velocidade são: $v_1 = 28$; $v_2 = 43$; $v_3 = 57$; $v_4 = 75$; $v_5 = 100$; $v_6 = 113$; $v_7 = 153$; $v_8 = 193$; $v_9 = 257$ e $v_{10} = 345 \mu\text{L s}^{-1}$. Já o volume de injeção vai de 10 a 1000 μL e pode variar de acordo com a ponteira utilizada para as análises. [22]

Foi necessário verificar se a ponteira da micropipeta estava acomodada bem próxima ao ET (cerca de 2 mm) em todas as injeções para garantir a obtenção de resultados reprodutíveis, visando eliminar os efeitos de transporte de massa (dispersão) e garantindo que não houvesse alterações dos resultados durante as análises. Por fim, as medidas eletroquímicas foram obtidas a partir do software NOVA 1.11.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análises por volumetria

Depois de realizadas todas as titulações das amostras em triplicata, foram obtidos os dados que estão dispostos nas Tabelas 3 e 4, em relação às massas de amostras e reagentes utilizados, bem como os volumes gastos de titulante.

Tabela 3. Dados das titulações das amostras sólidas.

Amostras	Massa dos comprimidos(g)	Massa da amostra (g)	Volume gasto de KIO ₃ (mL)
A	0,5296	0,1536	8,65
		0,1500	9,00
		0,1499	8,70
B	0,7533	0,1510	5,40
		0,1512	5,30
		0,1510	5,50
C	0,5720	0,1500	7,95
		0,1505	8,20
		0,1503	8,05

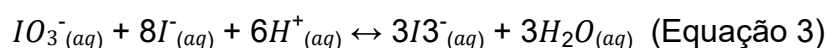
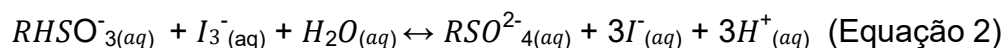
Fonte: O autor.

Tabela 4. Dados das titulações das amostras líquidas.

Amostras	Volume da amostra (mL)	Volume gasto de KIO ₃ (mL)
D	0,265	7,10
	0,265	7,20
	0,265	7,15
E	0,265	8,00
	0,265	8,00
	0,265	7,80

Fonte: O autor.

Com base na reação de oxidação da dipirona com o íon triiodeto (I_3^-), como mostra a Equação 2, foi possível determinar quantitativamente a quantidade de dipirona contida em cada amostra. Esse método utiliza como titulante, o KIO_3 que reage com o excesso de KI em meio ácido formando iodo, íon triiodeto, conforme mostrado na Equação 3. ^[1]



Fazendo os cálculos fundamentados pela estequiometria da dipirona com o íon triiodeto 1:1 conforme a Equação 2, e do iodato e do íon triiodeto 1:3 de acordo com a Equação 3, e relacionando-se também com as massas utilizadas de cada amostra, construiu-se a Tabela 5 que dispõe os resultados encontrados de cada amostra analisada.

Tabela 5. Resultados obtidos da titulação iodométrica para as amostras de medicamentos.

Amostras	Rótulo (mg)	Encontrado (mg)
A	500	483 ± 7
B	300	423 ± 8
C	500	482 ± 7
D	500	424 ± 3
E	500	470 ± 15

Fonte: O autor.

Analisando os resultados obtidos é possível observar que os fármacos A e C foram os que apresentaram uma quantidade de dipirona mais próxima do rotulado, 483 ± 7 e 482 ± 7 mg de dipirona respectivamente. A amostra E apresentou uma massa de analito menor do que o esperado, mas levando em conta o erro obtido para esta, o resultado em mg de dipirona se assemelha com as amostras anteriores.

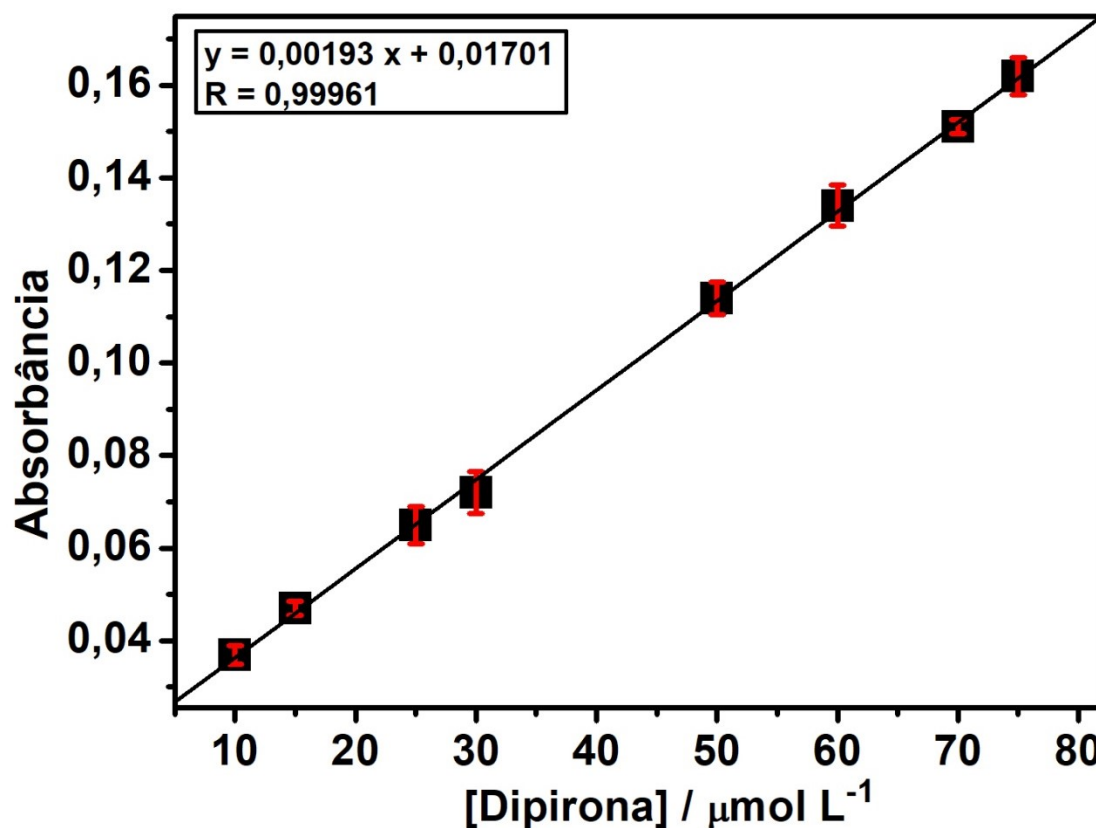
A amostra D foi a que apresentou a menor massa de analito encontrada frente ao especificado no rótulo do fármaco. Já a amostra B foi a única em que se obteve uma quantidade de dipirona que ultrapassou a quantidade indicada no rótulo. Esse resultado pode ser explicado devido à amostra B ter cafeína em sua composição além do analito de interesse, podendo ser a cafeína um interferente visto que ela também pode ter sofrido oxidação frente aos reagentes utilizados na titulação, aumentando assim o resultado encontrado de dipirona.

Ao se comparar todos os resultados, com exceção da amostra B, se observa que para todas as amostras obtiveram-se massas de dipirona menores do que o especificado nos respectivos rótulos, independente do estado físico do medicamento, indicando a possibilidade de um erro sistemático advindo do próprio método. De modo geral, a titulação é um método quantitativo menos preciso, devido aos erros associados à técnica, tanto no preparo das amostras quanto na operação. Porém, foram realizadas as análises por volumetria apenas para uma comparação com os outros métodos empregados no trabalho.

4.2 Espectrofotometria UV-vis

Primeiramente foi realizada a curva de calibração, apresentada pela Figura 6, utilizando das soluções de diferentes concentrações preparadas a partir do padrão.

Figura 6 - Curva de calibração utilizando soluções padrões de dipirona nas concentrações de 10, 15, 25, 30, 50, 60 e 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$, preparadas em água destilada.



Fonte: O autor.

A equação extraída da curva bem como o coeficiente de correlação linear foram:

$$Y = 0.00193 x + 0.01701 / R = 0.99961$$

Observa-se uma boa linearidade entre os pontos a partir do valor de R obtido, o que indica bons resultados em relação à quantificação do analito pelo método. Desse modo, prosseguiu-se com as análises das amostras dos fármacos, todas preparadas a uma concentração aproximada de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (levando em consideração o valor do rótulo) e os resultados obtidos para cada amostra tanto em $\mu\text{mol L}^{-1}$ quanto em mg de dipirona estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Resultados obtidos para as amostras analisadas no UV-vis.

Amostras	Conc. Preparada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Conc. Encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Conc. Rótulos (mg)	Conc. Encontrada (mg)
A	50	$50,9 \pm 0,8$	500	510 ± 8
B	50	$60,6 \pm 1,4$	300	364 ± 8
C	50	$52,8 \pm 0,5$	500	528 ± 5
D	50	$51,8 \pm 1,4$	500	518 ± 14
E	50	$50,1 \pm 1,3$	500	501 ± 13

Fonte: O autor.

Analisando os resultados obtidos, pode-se observar que para as amostras de A, D e E foram encontradas concentrações de dipirona em mg condizentes com o descrito nos rótulos das mesmas, considerando a faixa de erro obtida para cada um.

Com relação à amostra B, a quantidade em mg de dipirona encontrada foi bem maior do que o descrito no rótulo do fármaco e essa variação era esperada. Como a amostra em questão possui cafeína em sua formulação, a qual é adicionada com fins sinérgicos, a presença desse analito interfere diretamente nos resultados obtidos a partir do método de UV-vis, uma vez que cafeína contribui para o aumento da absorbância obtida nas análises por ser um analito que também absorve radiação numa faixa de comprimento de onda similar à da dipirona.

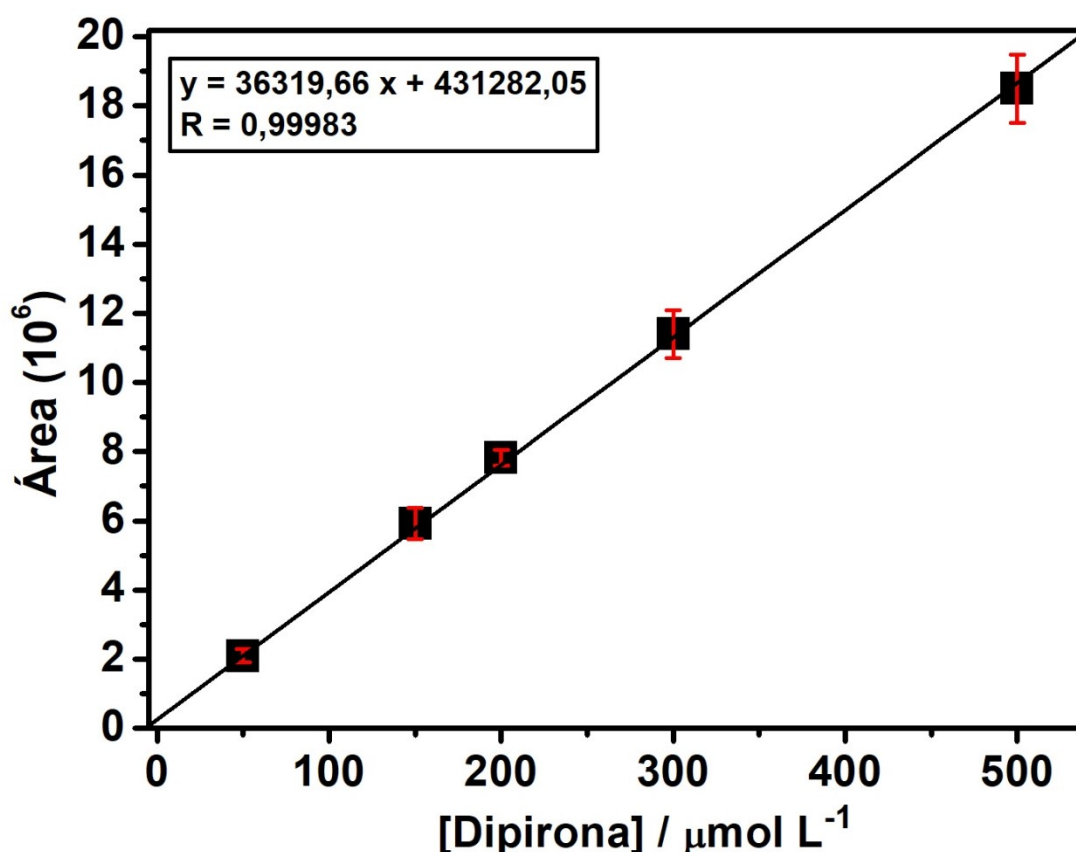
Já no caso da amostra C, encontrou-se uma concentração do analito um pouco acima do esperado, mesmo considerando a faixa de erro associada à amostra. Esse aumento na quantidade encontrada de analito contida na amostra do fármaco, por ter sido uma diferença relativamente pequena tanto em $\mu\text{mol L}^{-1}$ quanto em mg, pode estar associada ao preparo das soluções no qual possivelmente foi pesado uma massa de amostra que não estava totalmente homogênea.

Podem estar associados também em todas as análises os erros analíticos advindos do método utilizado, mesmo que contribuindo muito pouco na distorção dos resultados obtidos estes devem ser levados em consideração.

4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

Inicialmente realizou-se a construção da curva analítica de calibração para o HPLC utilizando as soluções preparadas a partir do padrão de dipirona. O gráfico obtido de concentração de analito em função da área do pico observado está apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Curva analítica de calibração para o HPLC utilizando soluções padrões de Dipirona nas concentrações de 50, 150, 200, 300 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, preparadas em $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,01 mol L^{-1} .



Fonte: O autor.

A equação extraída da curva bem como o coeficiente de correlação linear foi:

$$Y = 36319,66 x + 431282,05 / R = 0.99983$$

Observa-se que a curva obtida possui uma boa linearidade a partir do valor de R relacionado e com todos os pontos passando pela reta, indicando resultados satisfatórios em relação à quantificação do analito pelo método. Sendo assim

iniciaram-se as análises em triplicata das amostras, todas preparadas a uma concentração de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$, e os resultados obtidos em $\mu\text{mol L}^{-1}$ e também em mg de dipirona para cada amostra estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Resultados obtidos para as amostras analisadas no HPLC.

Amostras	Conc. Preparada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Conc. Encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Conc. Rótulos (mg)	Conc. Encontrada (mg)
A	200	$217,4 \pm 7,9$	500	544 ± 20
B	200	$205,9 \pm 7,9$	300	309 ± 12
C	200	$211,7 \pm 4,6$	500	529 ± 12
D	200	$253,7 \pm 4,2$	500	634 ± 11
E	200	$215,1 \pm 3,7$	500	538 ± 9

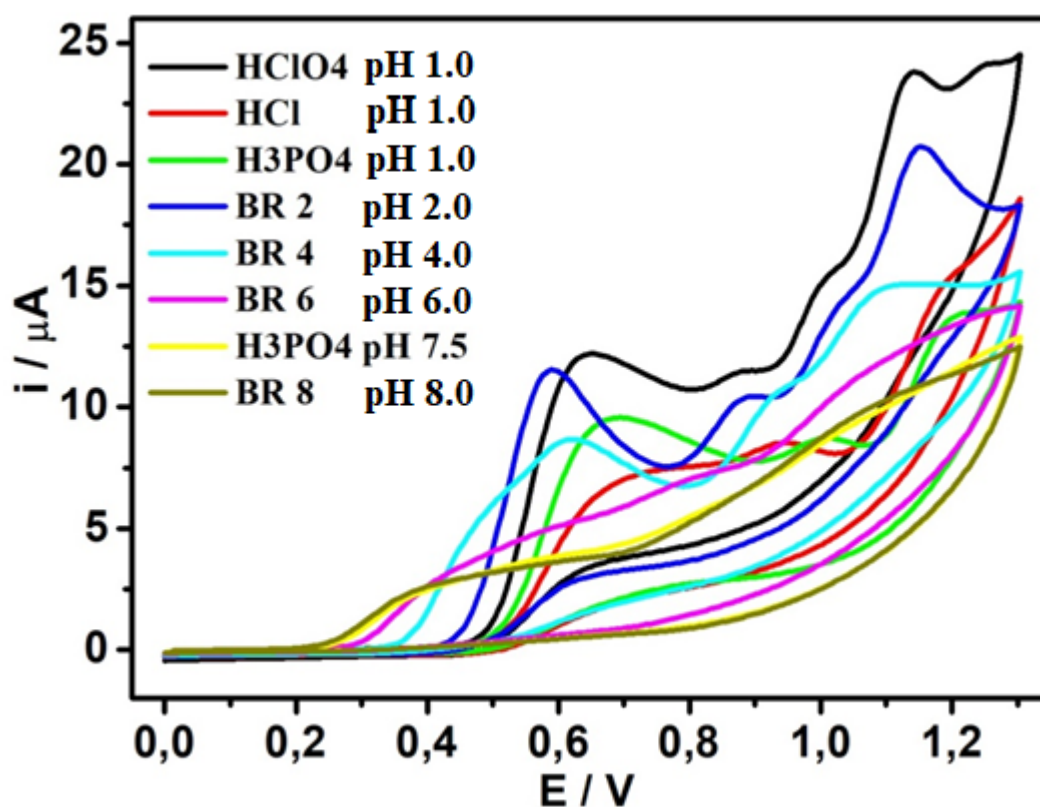
Fonte: O autor.

Como é possível observar, todos os valores encontrados de mg de dipirona foram excedentes ao especificado nos rótulos de cada amostra, com exceção da amostra de B apresentou um valor próximo ao rótulo, levando em conta a faixa de erro correspondente. Vale ressaltar que a amostra B possui cafeína em sua formulação e os resultados obtidos para a amostra por volumetria e por UV-VIS tiveram interferência desse analito, o qual contribuiu para o aumento do valor final de quantificação de dipirona. Porém o que se observa no resultado da análise por HPLC é que a cafeína não interferiu na quantificação do analito de interesse. Isso se deve ao fato de que por HPLC há a separação das duas espécies, tornando possível a quantificação da dipirona isoladamente, o que não ocorre nas outras técnicas citadas. A partir dessa observação reforça-se a justificativa em relação às quantidades divergente de dipirona encontradas para a amostra B pelos métodos de volumetria e UV-VIS.

4.4 Análises por injeção em batelada

Inicialmente fez-se um estudo de pH para avaliar qual seria o melhor eletrólito a ser utilizado nas análises por BIA com o GCE limpo. Para isso, foram selecionados 8 eletrólitos com diferentes valores de pH e pela técnica de voltametria cíclica obteve-se um gráfico de cada um dos eletrólitos frente ao eletrodo de trabalho. O voltamograma cíclico obtido está apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Voltamogramas cíclicos referentes ao estudo do eletrólito realizado para as análises com o GCE limpo.



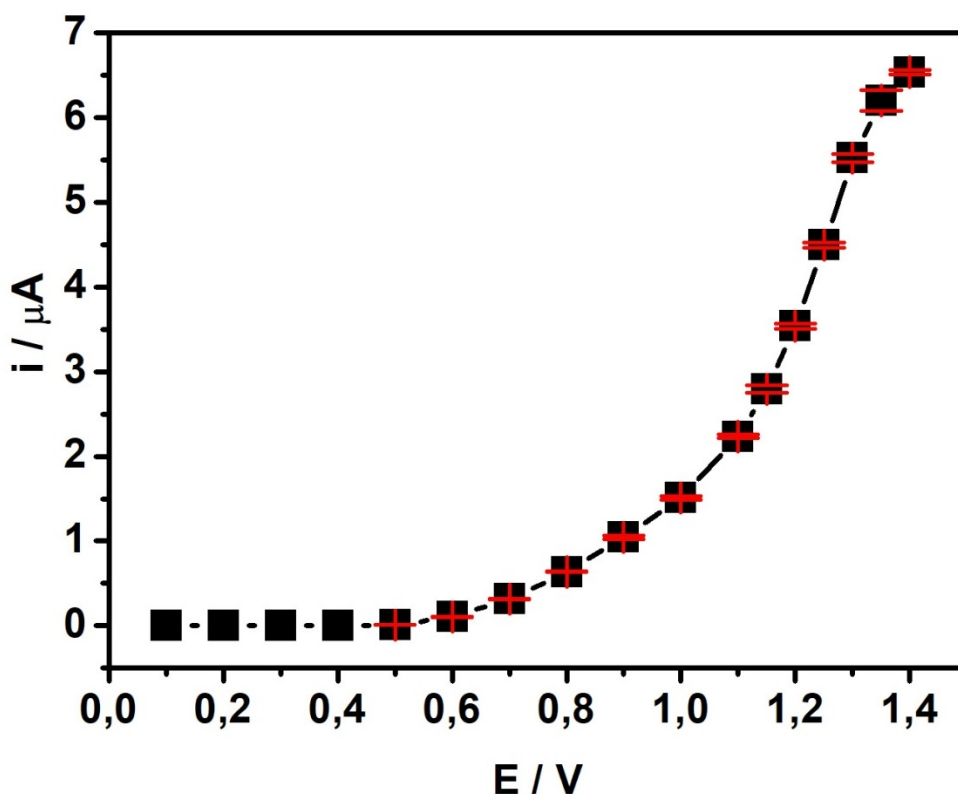
Fonte: O autor

Como pode ser observado, a partir do sinal em μA de cada um dos eletrólitos frente aos potenciais aplicados para o GCE limpo, o que apresentou maiores sinais de corrente foi o HClO_4 , se sobressaindo dentre os demais eletrólitos. Sendo assim, foi escolhido o HClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito para todas as análises.

Definido o eletrólito suporte, foram estudados os parâmetros de potencial aplicado, velocidade e volume de injeção do sistema BIA visando à otimização das análises com o GCE.

Em relação ao potencial aplicado, valores variando de 0,1V à 1,4 V foram avaliados em função da resposta amperométrica para concentrações de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dipirona frente ao eletrodo. O voltamograma hidrodinâmico obtido para o GCE limpo pode ser observado na figura 9.

Figura 9 - Voltamograma hidrodinâmico obtidos através das representações gráficas dos valores médios de corrente de pico de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dipirona em função dos potenciais aplicados para GCE limpo. Eletrólito: $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$, volume de injeção de $100 \mu\text{L}$, velocidade de injeção de $153 \mu\text{L s}^{-1}$.

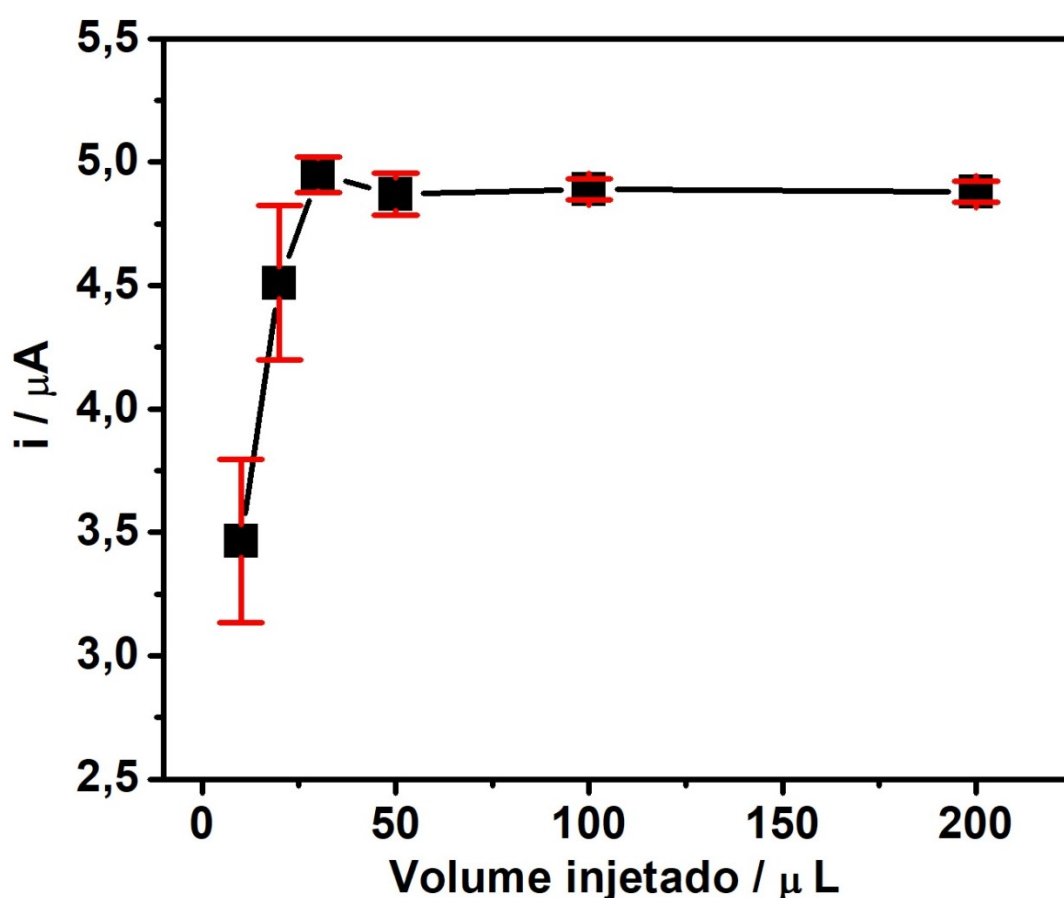


Fonte: O autor.

Como se pode observar, na medida em que se aumenta o valor de potencial aumenta-se também o valor de corrente observada. Considerando que uma corrente de pico alta é um importante critério nas determinações eletroquímicas, observam-se picos com valores de corrente significativo para os potenciais (em V) de 1,1; 1,2; 1,3 e 1,4. Um menor desvio e maior valor de corrente foram observados em 1,3 V de potencial, o qual foi escolhido para ser usado nas análises.

Adotado o potencial de trabalho, realizou-se o estudo em relação ao volume de injeção de amostra, utilizando volumes de 10 μL a 200 μL . Os valores de corrente para cada volume de injeção podem ser observados na Figura 10.

Figura 10 - Estudo do volume injetado no sistema BIA utilizando GCE limpo. Injeções de 10, 20, 30, 50, 100 e 200 μL de solução de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dipirona em solução de 0,1 mol L^{-1} HClO_4 , potencial de trabalho de 1,3 V, velocidade de injeção de 153 $\mu\text{L s}^{-1}$.

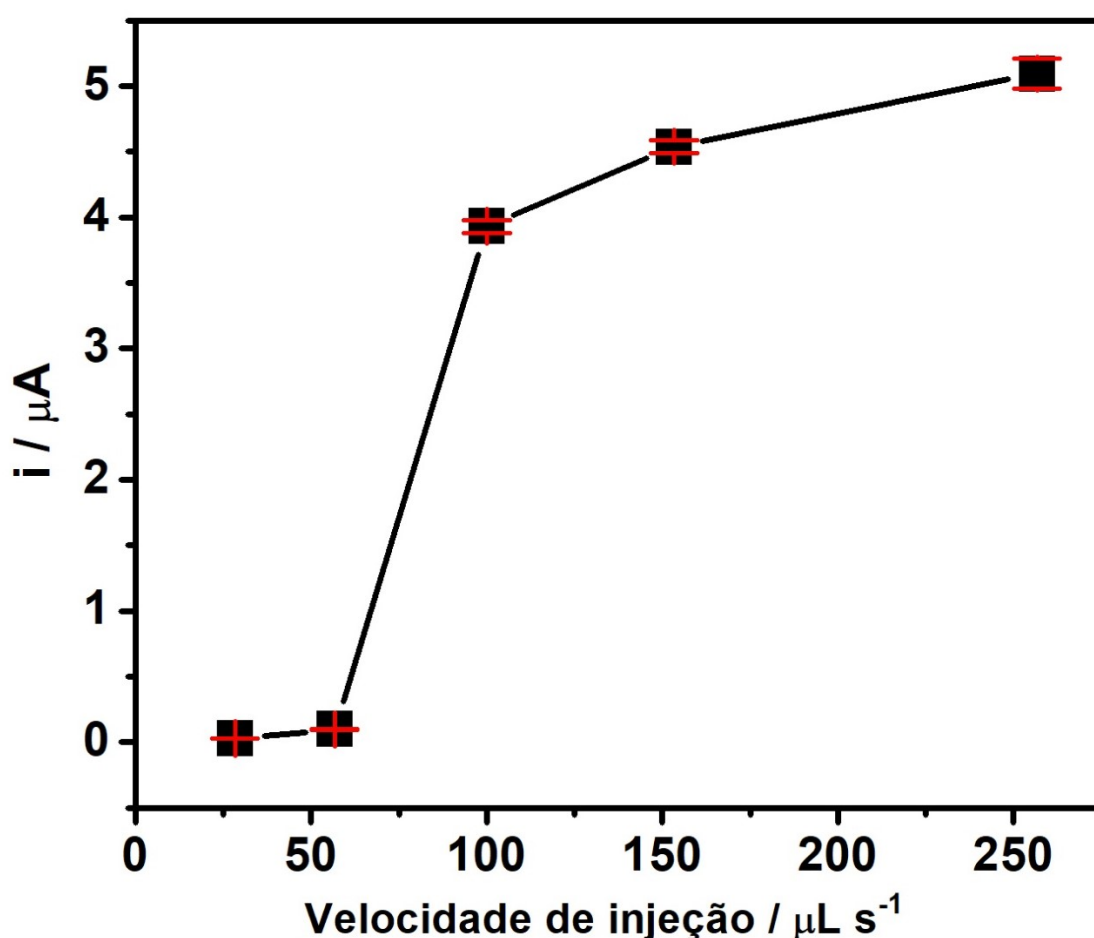


Fonte: O autor.

Conforme indica a figura, alguns volumes de injeção apresentam grandes desvios padrão, o que indica baixa reprodutibilidade dos sinais amperométricos correspondentes. O ponto com maior valor de corrente observado e com menor desvio foi referente ao volume de 100 μL frente ao eletrodo de trabalho. Volumes superiores a este não apresentaram maiores valores de corrente, provavelmente por ocorrer difusão do analito em meio ao eletrólito antes mesmo de entrar em contato com o eletrodo. Sendo assim, foi escolhido um volume de injeção de 100 μL das amostras para as análises com GCE limpo.

Realizou-se também o estudo em relação à velocidade de injeção de amostra no sistema BIA com o auxílio da micropipeta eletrônica. As velocidades analisadas foram 1, 3, 5, 7 e 9 referentes às disponibilizadas pela aparelhagem, as quais correspondem respectivamente 28; 57; 100; 153 e 257 $\mu\text{L s}^{-1}$. Os valores de corrente obtidos para cada velocidade podem ser observados na figura 11.

Figura 11 - Estudo da velocidade de injeção no sistema BIA com GCE limpo, para injeções em triplicata da solução padrão de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Dipirona em solução de 0,1 mol L^{-1} HClO_4 , com potencial de trabalho: 1,3 V, volume de injeção: 100 μL .



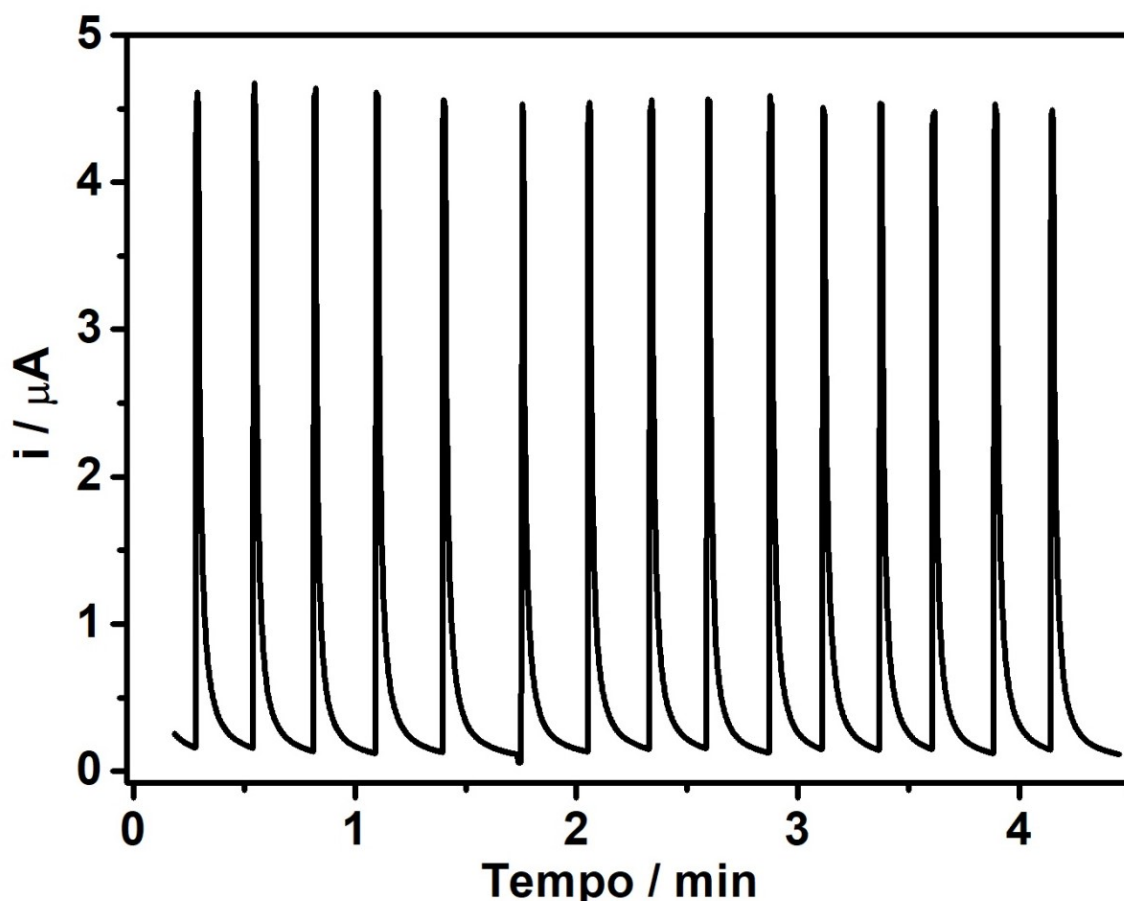
Fonte: O autor.

Neste caso, os dois pontos com melhores resultados em relação à corrente observada foram os de 153 e 257 $\mu\text{L s}^{-1}$, porém a velocidade que apresenta menores desvios para ambos os eletrodos foi a de 153 $\mu\text{L s}^{-1}$. Dessa forma, escolheu-se para as análises a velocidade de 153 $\mu\text{L s}^{-1}$ frente ao GCE.

A partir dos resultados de otimizações dos parâmetros de análise em BIA com GCE limpo, foi feito o estudo da repetibilidade realizando 15 injeções seguidas para

analisar a variação dos sinais obtidos e a frequência analítica com o eletrodo de trabalho. Os resultados obtidos para esse estudo de repetibilidade estão apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Respostas amperométricas obtidas em sistema BIA com GCE limpo para 15 injeções sucessivas de solução padrão de Dipirona $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$. Potencial: $1,3 \text{ V}$, volume de injeção: $100 \mu\text{L}$; velocidade de injeção: $153 \mu\text{L s}^{-1}$.



Fonte: O autor.

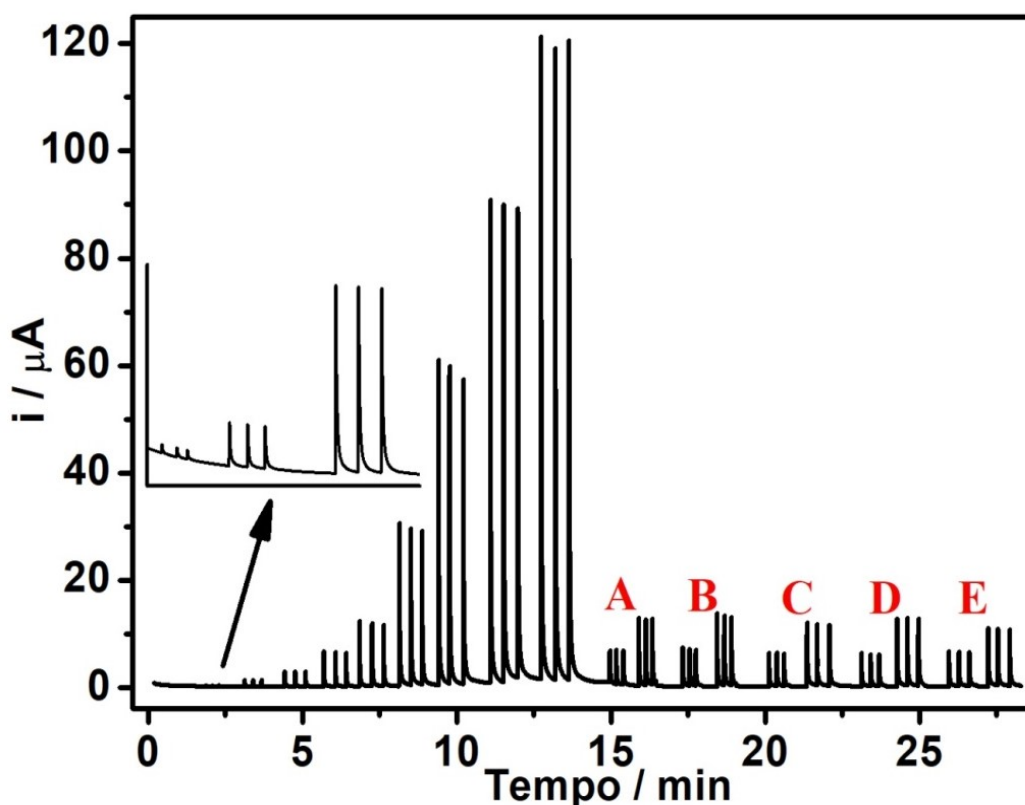
Observaram-se picos bem reprodutíveis usando o GCE limpo, com pouca variação do sinal de corrente entre eles, apresentando um desvio padrão relativo igual a 1,5% e uma Frequência Analítica (FA) de 200 injeções/hora.

Finalmente foram injetadas as soluções padrões de dipirona nas concentrações de 0,5; 2,0; 10; 25; 50; 100; 250; 500; 750 e $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ com o objetivo de construir uma curva analítica de calibração. Juntamente com as injeções dos padrões de dipirona, foram injetadas as amostras analisadas, concentração destas preparadas por diluição no eletrólito (de acordo com o valor rotulado de dipirona presente em

cada medicamento) para $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, foi injetado também soluções das amostras dopadas com um acréscimo de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ da solução padrão de dipirona.

Todas as injeções, dos padrões e das amostras puras e dopadas, foram realizadas em triplicata com um potencial de 1,3 V, volume de injeção de $100 \mu\text{L}$ e velocidade de injeção de $153 \mu\text{L s}^{-1}$, para ambos os eletrodos de trabalho. O amperograma gerado a partir dessas análises com o GCE limpo pode ser observado na Figura 13.

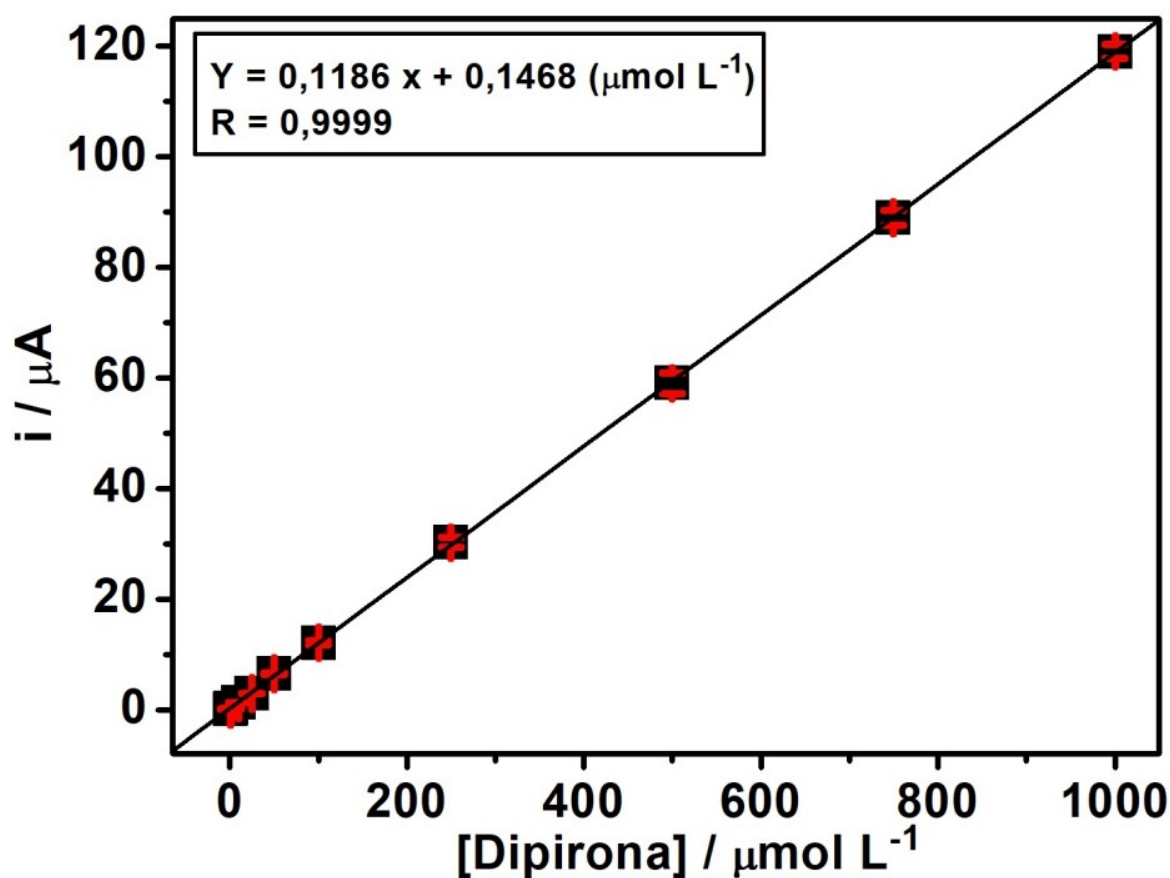
Figura 13. Respostas amperométricas obtidas no sistema BIA com GCE limpo para injeções em triplicata de soluções padrão de dipirona em 0,5; 2,0; 10; 25; 50; 100; 250; 500; 750 e $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$, seguida das injeções em triplicata das cinco amostras de medicamentos puras em $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e dopadas com mais $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dipirona. FA = 140 inj.h^{-1} .



Fonte: O autor.

A curva de calibração construída a partir dos dados obtidos na análise com o GCE limpo está apresentada na Figura 14.

Figura 14. Curva de calibração obtida através dos dados obtidos utilizando GCE limpo.



Fonte: O autor.

A equação da reta foi extraída da curva, bem como o coeficiente de correlação linear, sendo os mesmos:

$$y = 0,1186 x + 0,1468 / R = 0.9999$$

Pelo valor de R, percebe-se uma linearidade da curva de calibração muito boa, evidenciando que os parâmetros para as análises foram otimizados com sucesso e implicando em bons resultados na quantificação final do analito presente em cada amostra. Observa-se que a faixa se mantém linear por todos os pontos, mesmo em concentrações mais altas como 1000 μmol L⁻¹, o que garante a detecção do analito em uma vasta faixa de concentração, apresentando um limite de detecção (LD) igual a 0,23 μmol L⁻¹, obtido a partir da equação 4, e um limite de quantificação (LQ) igual 0,74 μmol L⁻¹, utilizando a equação 5 para o cálculo.

$$LD = \frac{3 \cdot s}{B} \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo s o desvio padrão de 10 picos do branco e B o coeficiente angular da reta obtida da curva de calibração.

$$LQ = 3,33 \cdot LD \quad (\text{Equação 5})$$

A partir dessa curva de calibração, foram feitos os cálculos para determinar a quantidade de dipirona contida em cada comprimido tomando por base a média dos valores de corrente observados para cada amostra e relacionando-os à massa de medicamento utilizada em cada análise. Os resultados obtidos para as amostras e suas respectivas dopagens foram dispostos na Tabela 8, bem como a concentração de dipirona já em mg referente ao estipulado no rótulo de cada medicamento.

Tabela 8. Resultados para as amostras puras e dopadas (para estudo de recuperação) analisadas em BIA utilizando GCE limpo.

Amostras	Conc. Encontrada Am. Pura ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Conc. Adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)*	Recuperação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Conc. Encontrada (mg)
A	51,6 $\pm$ 1,9	50,0	51,9 $\pm$ 4,0	104 $\pm$ 8	516 $\pm$ 20
B	57,6 $\pm$ 2,9	50,0	51,7 $\pm$ 1,4	103 $\pm$ 3	346 $\pm$ 18
C	51,2 $\pm$ 1,5	50,0	45,3 $\pm$ 1,4	91 $\pm$ 3	512 $\pm$ 15
D	50,4 $\pm$ 1,3	50,0	54,8 $\pm$ 0,7	109 $\pm$ 2	504 $\pm$ 13
E	53,4 $\pm$ 0,9	50,0	35,3 $\pm$ 0,8	71 $\pm$ 2	534 $\pm$ 9

*Concentração correspondente à dopagem realizada adicionando-se 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do padrão de Dipirona às amostras preparadas também em 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Fonte: O autor

Com relação aos resultados de recuperação obtidos, percebe-se que o único medicamento que apresentou valores fora da faixa aceitável prescrita pela ANVISA (80 a 120%)^[23] foi a amostra E, com um valor de recuperação de apenas 71 $\pm$ 2 %. Já em relação à massa do analito, os valores de dipirona em mg encontrados para as amostras A, C e D foram satisfatório e coerentes se comparados aos valores

dispostos em suas formulações, e para as outras amostras observou-se uma concentração de dipirona um pouco acima do esperado para cada medicamento.

No caso da amostra B, se observa um valor de analito encontrado em $\mu\text{mol L}^{-1}$ um pouco acima do esperado, enquanto o valor de recuperação obtido foi coerente com a concentração de padrão adicionado. Logo, o aumento da quantidade de analito encontrada em mg para o medicamento pode ser devido à presença da cafeína em sua formulação, uma vez que o valor de recuperação indica que, caso a amostra em questão não tivesse outro analito inserido em sua formulação, a determinação apenas de dipirona seria concordante com a concentração da solução preparada a partir do fármaco ou bem próxima.

Já para amostra E, o que se observa é que a concentração de dipirona em $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a amostra pura (antes da dopagem) foi um pouco acima do esperado, e para o valor obtido na recuperação essa concentração diminuiu bastante. Esse fato observado em relação à diminuição de concentração da recuperação pode ser justificado pela possível degradação da dipirona na solução de dopagem adicionada, como também pela adsorção do analito no eletrodo de trabalho em vista do número de injeções realizados anteriormente à injeção da amostra em questão pois, como mostrado na figura 16, todas as análises foram realizadas de forma sequencial em uma só corrida e a amostra E foi a última a ser analisada.

5. COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS

Analisando os resultados observados em cada método, podemos perceber uma proximidade entre alguns dos resultados obtidos nesse trabalho, e outros nem tanto. Porém, para que essas comparações sejam validadas, realizou-se o cálculo do teste t (GradPad) para os resultados obtidos nas análise do BIA com GCE limpo comparando-os com os outros métodos recomendados pelas farmacopeias para a determinação de dipirona em medicamentos. Para facilitar a visualização de todos os resultados, foram dispostos na Tabela 9 o valores em mg de dipirona encontrados para cada amostra em cada um dos métodos.

Tabela 9. Resultados obtidos em mg de dipirona para cada amostra analisada pelos métodos de volumetria, UV-vis, HPLC e BIA.

Amostras		A	B	C	D	E
BIA com GCE	Conc. Rótulo (mg)	500	300	500	500	500
	Conc. Encontrada (mg)	516 ± 20	346 ± 18	512 ± 15	504 ± 13	534 ± 9
Volumetria	Conc. Rótulo (mg)	500	300	500	500	500
	Conc. Encontrada (mg)	482 ± 7	424 ± 3	423 ± 8	470 ± 15	483 ± 7
UV-vis	Conc. Rótulo (mg)	500	300	500	500	500
	Conc. Encontrada (mg)	510 ± 8	364 ± 8	528 ± 5	518 ± 14	501 ± 13
HPLC	Conc. Rótulo (mg)	500	300	500	500	500
	Conc. Encontrada (mg)	544 ± 20	309 ± 12	530 ± 12	634 ± 11	538 ± 9

Fonte: O autor.

Calculando-se o teste-t (GraphPad), a um nível de 95% de confiança, observou-se que os resultados do BIA foram condizentes com: os resultados obtidos por HPLC para as amostras A, C e E; os resultados obtidos por UV-vis para as amostras de A, B, C e D; indicando que não há diferenças significativas entre os resultados obtidos entre ambos os métodos comparados. Já no caso dos resultados do BIA frente aos resultados de volumetria, para todas as amostras os valores encontrados em cada método não foram condizentes entre si a um nível de 95% de confiança.

Na Tabela 10 está apresentado um resumo dos resultados dos testes t entre o método BIA e os outros métodos, como descrito anteriormente.

Tabela 10. Resultados dos testes t em relação à comparação entre os valores obtidos pelo método BIA frente aos outros métodos recomendados pelas farmacopeias na determinação de dipirona em fármacos.*

Amostras \ BIA	Métodos comparativos		
	Volumetria	UV-VIS	HPLC
A	X	OK	OK
B	XXX	OK	X
C	XXX	OK	OK
D	X	OK	XX
E	X	X	OK

*Foi utilizada uma simbologia para representar se os valores comparados: não possuíram uma diferença estatisticamente significativa (OK); apresentaram pouca divergência entre si (X); apresentaram variação considerável entre si (XX); apresentaram variação extremamente significativa entre si (XXX); todos com um nível de 95% de confiança.

Fonte: O autor.

Como observado, nenhum dos resultados obtidos para a volumetria foram condizentes estatisticamente com os obtidos com BIA. De acordo com a tabela 9, percebe-se que todas as massas de dipirona encontradas nas amostras para a volumetria foram abaixo do esperado, com exceção da amostra B devido ao fato de possuir cafeína em sua composição como já discutido, evidenciando um erro sistemático nas análises advindo da própria metodologia. Isso se deve a maior propagação de erros que a titulação está sujeita, em relação ao preparo de amostras, indicador, titulante e soluções e geral, bem como a interferência do operador durante

a execução dos testes. Além disso, observou-se essa não conformidade para todas as amostras na comparação entre os resultados do BIA apenas a volumetria, logo a divergência entre esses métodos é justificável.

Comparando-se agora os valores obtidos do BIA em relação aos encontrados por UV-VIS e HPLC, observa-se que os valores encontrados para cada amostra foi condizente estatisticamente com os dois ou pelo menos um dos métodos comparativos, e no caso dos valores estatisticamente diferentes observou-se uma variação considerável ou pouca divergência entre si. Ponderando todos os erros possíveis associados a cada um desses métodos, e também a possível variação real de massa do analito nas formulações das amostras, pode-se considerar que os valores em mg de dipirona encontrados nas amostras no método proposto por BIA foram bastante satisfatórios frente a comparação dos resultados obtidos pelos métodos recomendados pelas farmacopeias para determinação em questão.

6. CONCLUSÕES

Diante de todos os resultados obtidos, foi possível determinar a quantidade de dipirona para todas as amostras independente do seu estado físico pelos métodos utilizados no estudo que são recomendados pelas farmacopeias e também pelo método desenvolvido. Com relação ao HPLC, observaram-se ótimos resultados, visto que é o único método capaz de separar o analito dos outros componentes presentes nas formulações das amostras para enfim se quantificar o analito de interesse. O método realizado para o UV-VIS apresentou excelentes resultados em relação às massas de dipirona obtidas se comparado à quantidade indicada nos rótulos de cada amostra e foi o que apresentou resultados mais próximos em relação aos obtidos no método proposto. Já no caso da titulação iodométrica, considerando a quantidade de erros acumulativos como os acarretados no preparo das amostras e erros provenientes do contato direto do operador durante a análise, o método não apresentou resultados satisfatórios na quantificação do analito, mesmo sendo o método certificado pela Farmacopéia Brasileira para a análise em questão.

Comparando o BIA-AMP com o HPLC em especial, temos uma melhor eficiência do BIA-AMP por apresentar vantagens em relação à metodologia de análise, como uso de instrumentação versátil, elevada frequência de amostragem, consumo reduzido de reagentes e amostras, redução na geração de resíduos e menor tempo de análise. As triplicatas de todas as amostras e as curvas de calibração foram feitas em pouco mais de 30 minutos em BIA, enquanto no HPLC levou-se um dia inteiro para preparo da curva de calibração e análise em triplicata de apenas duas amostras.

Em relação às formulações dos fármacos, o único que se mostrou fora da faixa aceitável da taxa de recuperação do analito foi a amostra E (70,50%), de acordo com a análise feita em BIA e o aceitável pela ANVISA^[23] que é de 80% à 120%. Já as outras amostras apresentaram resultados satisfatórios tanto com relação à quantidade encontrada de dipirona em mg quanto aos valores de recuperação.

Por fim, as análises a partir do método desenvolvido por BIA apresentaram uma excelente desenvoltura nesse estudo, visto que resultados quantitativos obtidos foram condizentes estatisticamente com os encontrados na reprodução dos métodos já validados, impulsionando assim novas pesquisas visando o desenvolvimento do método de forma mais eficaz e otimizado para a determinação de dipirona e também de outros analitos em medicamentos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] FERREIRA, N. P. et al. Determinação quantitativa da dipirona sódica pelo método de volumetria e espectroscopia de absorção na região UV–VIS. **Revista Eletrônica Interdisciplinar**, v. 1, n. 9, 2013.

[2] Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica** - Vol. 9 - Nº 2 - Maio de 2008.

[3] TRIVEDI, M., SHAIKH, S., GWINNUTT, C., **Farmacologia dos opióides (parte 1)**. Departamento de Anestesia, Hospital Hope, Salford, UK.

[4] BURKE, A., SMYTH, E., FITGERALD, G. A. - Analgesic-Antipyretic and Antiinflammatory Agents; Pharmacotherapy of Gout, em: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL – **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, McGraw-Hill 11th ed N York, 2005, p 671.

[5] JASIECKA, A.; MAŚLANKA, T.; JAROSZEWSKI, J. J. Pharmacological characteristics of metamizole. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 17, n. 1, p. 207-214, 2014.

[6] MARRA, M. C.. **Aplicação da eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato no controle de qualidade de formulações farmacêuticas contendo aspirina ou dipirona em combinação com outros princípios ativos**. 2014. 125 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

[7] PESTANA, J. L.; PRADO, M. A. F.; CAMPOS, L. M. M. Desenvolvimento de método por iodimetria alternativo para doseamento da dipirona sódica em matéria-prima e medicamentos. **Rev. Bras. Farm.**, [SI], v. 89, n. 1, p. 13-17, 2008.

[8] PEREIRA, A. V. et al. Determinação espectrofotométrica de dipirona em produtos farmacêuticos por injeção em fluxo pela geração de íons triodeto. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 553-557, 2002.

[9] ALTUN, M. L.. HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyrone. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 521-528, 2002.

[10] GALLI, A., SOUZA, D., GARBELLINI, G. S., COUTINHO, C. F. B., MAZO, L. H., AVACA, L. A., MACHADO, S. A. S. Utilização de Técnicas Eletroanalíticas na Determinação de Pesticidas em Alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

[11] The Japanese Pharmacopoeia, JP XIV, 2001. Part I. Acesso em 08 de Abril de 2018. Disponível em jpdb.nihs.go.jp/jp14e/.

[12] British Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office; 2007. Volume I.

[13] Farmacopéia Brasileira, 3ª ed. Andrei Ed: São Paulo, 1977.

[14] Farmacopéia Brasileira, 4ª ed. Atheneu Ed: São Paulo, 2001. Parte II. Fascículo 3.

[15] SKOOG, D. A., HOLLER F. J., NIEMAN, T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5ª Edição. Trad. Ignez Caracelli. Port Alegre: Bookman, 2002.

[16] **Fundamentos da espectrofotometria. Disponível em**
<http://www.ufjf.br/quimica/files/2016/08/Espectrometria-UV-vis.pdf>

[17] RUELA, A. L. M., ARAÚJO, M. B., PEREIRA, G. R. Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas - MG, Brasil. 2009

[18] WANG, J., TAHA, Z. Batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053-1056, 1991.

[19] QUINTINO, M. S. M. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas**. 2003. Dissertação (Doutorado em Química), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

[20] MONTES, R. H. O. **Efeito do tamanho de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em sensores eletroquímicos para moléculas de interesse farmacêutico e ambiental**. Uberlândia, 2015.

[21] LIMA, A. P. **Investigação do comportamento eletroquímico da cloroexidina em eletrodos modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas de diferentes diâmetros e sua determinação amperométrica em produtos comerciais**. Uberlândia, 2014.

[22] LIMA, A. P., NOSSOL, E., MUNOZ, R. A. A. **Caracterização espectroscópica, microscópica e eletroquímica de eletrodos modificados com diferentes nanotubos de carbono para a detecção de catecol e dopamina**. 2017. Dissertação de Mestrado.

[23] Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução – RE N° 899, de 29 de Maio de 2003. Artigo 1º, Tabela 3.

[24] DIOGO, A. N. M. **Dipirona: segurança do uso e monitoramento da qualidade de comprimidos orais**. 2003. Tese de Doutorado. Instituto Nacional De Controle De Qualidade Em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2003.

[25] LYRA, W. da S. et al. Indirect determination of sodium diclofenac, sodium dipyrone and calcium gluconate in injection drugs using digital image-based (webcam) flame emission spectrometric method. **Analytical Methods**, v. 3, n. 9, p. 1975-1980, 2011.

[26] Rao, R. N.; Meena, S.; Rao, A. R.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 39, 349.