



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



1150057293



T/UNICAMP C869r

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

720463229

**“ REAÇÕES LUMINESCENTES E COLORIMÉTRICAS PARA
DETERMINAÇÃO DE HIDROCORTISONA EM FÁRMACOS ”**

Autora: WILMA CRISTINA TAVARES CRIVELENTE

Orientadora: PROF^a. DR^a. ADRIANA VITORINO ROSSI

Agosto / 2003

UNIDADE ICA
 Nº CHAMADA T/UNICAMP
C869r
 V EX
 TOMBO BC/ 54293
 PROC 16/12/04
 C D X
 PREÇO 11,00
 DATA 03/03/04
 Nº CPD

Bd-td 5115 R

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
 UNICAMP**

C869r

Crivelente, Wilma Cristina Tavares.

Reações luminescentes e colorimétricas para
 determinação de hidrocortisona em fármacos /
 Wilma Cristina Tavares Crivelente. -- Campinas,
 SP: [s.n], 2003.

Orientadora: Adriana Vitorino Rossi

Dissertação (Mestrado) – Universidade
 Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Hidrocortisona. 2. Luminescência.
 3. Colorimetria. I. Rossi, Adriana Vitorino.
 II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dr. Adriana Vitorino Rossi pela força, incentivo, pelas palavras de apoio, pela confiança e compreensão em todos os momentos do andamento deste trabalho.

A toda direção, aos funcionários e professores do Instituto de Química da UNICAMP, em especial à Claudia Martelli, pelo suporte técnico e conhecimento transmitido.

Aos amigos do laboratório pela convivência e amizade conquistadas. Sem esta grande ajuda não seria possível o sucesso até então alcançado.

A Carlos Perez Neto pelo amor presente todos os dias, aos meus pais, Antônio Carlos Crivelente e Maria Cristina B. T. Crivelente, e irmãos, que me incentivam a prosseguir sempre.

Não poderia deixar de agradecer também a Prof. Dr. Nina Coichev, pelos sábios conselhos e incentivos, e a Prof. Dr. Helena Redigolo Pezza e seu aluno André Vicentin, pela generosidade e colaboração no andamento deste trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro ao projeto com a bolsa de mestrado.

CURRICULUM VITAE

Formação

Mestranda em Química Analítica

Instituto de Química – UNICAMP / Campinas, SP (2001-2003)

Graduação em Bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas

Instituto de Química – USP / São Paulo, SP (1997-2000)

Participação em Reuniões Científicas

Crivelente, W. C. T., Rossi, A. V., Vicentin, A., Pezza, H. R.; Analytical Procedures for Cortisone Analysis: A Comparative Study; 4th Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto/SP, 2003.

Crivelente, W. C. T., Terci, D. B. L., Terra, J., Pinheiro, T. A. L., Salomão, A. A., Rossi, A.; Experimentos com Pigmentos Naturais Testados e Avaliados por Professores de Química do Ensino Médio; 26^a RASBQ, Poços de Caldas/MG, 2003.

Crivelente, W. C. T., Terci, D. B. L., Terra, J., Pinheiro, T. A. L., Salomão, A. A., Rossi, A.; Estágio de Estudantes do Ensino Médio em Laboratório de Pesquisa: Vivência de Descobertas, Constatações e Aprimoramento Profissional; 26^a RASBQ, Poços de Caldas/MG, 2003.

Crivelente, W. C. T., Rossi, A. V., Vicentin, A., Pezza, H. R.; Determinação Fotométrica de Hidrocortisona: Uma proposta Alternativa com Procedimento Simples e de Baixo Custo; 26^a RASBQ, Poços de Caldas/MG, 2003.

Crivelente, W. C. T., Rossi, A. V.; Efeito Sensibilizador da Hidrocortisona em Fenômenos de Luminescência para Desenvolvimento Analítico; 25^a RASBQ, Poços de Caldas/MG, 2002.

Crivelente, W. C. T., Leite, H. M. S., Coichev, N.; Alguns Estudos de Mecanismo da Reação de Autooxidação do Complexo Co(II)/Tris(hidroximetil)aminometano na Presença de S(IV); 23^a RASBQ, Poços de Caldas/MG, 2000.

RESUMO

“REAÇÕES LUMINESCENTES E COLORIMÉTRICAS PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROCORTISONA EM FÁRMACOS”

Aluna: Wilma Cristina Tavares Crivelente

Orientadora: Prof. Dr. Adriana Vitorino Rossi

Hidrocortisona, assim como seus derivados sintéticos, é um fármaco muito utilizado em tratamentos para reações alérgicas e inflamatórias. Entretanto, seu uso impróprio pode ser caracterizado como doping em alguns esportes e induz a inúmeros efeitos colaterais, o que pode ocasionar até a morte do paciente. Atualmente, diversas técnicas analíticas vêm sendo propostas na literatura para determinação de hidrocortisona e derivados em medicamentos, buscando rapidez e simplicidade de análise sem ônus para a qualidade dos resultados e com baixo custo. Neste trabalho, foram realizados estudos de dois sistemas de reações químicas que podem servir para a determinação de hidrocortisona: um baseado em medidas de luminescência e outro baseado em medidas colorimétricas. A proposta com medidas colorimétricas apresentou bons resultados para a determinação de hidrocortisona em formulações farmacêuticas comerciais, com níveis de detecção em $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, resposta linear até $2,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e estimativa de desvio-padrão na ordem de 2%. O método desenvolvido também pode ser aplicado para substâncias derivadas da hidrocortisona, como acetato de hidrocortisona e acetato de dexametasona, além de cortisona e acetato de cortisona, com bons resultados. Modificações na proposta colorimétrica viabilizaram realizar leituras fotométricas em equipamento portátil de medidas de grande simplicidade e baixo custo, o que representa importante vantagem, já que pode ser implementado com infra-estrutura laboratorial muito simples. Além disto, o trabalho descreve algumas características das reações químicas envolvidas, apresentando algumas propostas e discussões.

ABSTRACT

“ LUMINESCENT AND COLORIMETRIC REACTIONS FOR HYDROCORTISONE DETERMINATION IN MEDICINES”

Author: Wilma Cristina Tavares Crivelente

Adviser: Dr. Adriana Vitorino Rossi

Hydrocortisone and other synthetic derivatives are widely used as anti-inflammatory and anti-allergic drugs. However, their improper use can be characterized as doping in some sports, as well as produce several side effects that can even kill the patient. Several analytical techniques for the determination of hydrocortisone and its derivatives in medicaments have been proposed in the recent literature, aiming fast, simple and low cost analytical procedures without prejudice of the quality of the results. In this work, two chemical reaction systems for determination of hydrocortisone were studied: one based in luminescent measurements and another basing on colorimetric measurements. The colorimetric method presented good results for the determination of hydrocortisone in commercial products, with detection limits in the 10^{-3} mol L⁻¹ range, linear response up to 2.8×10^{-3} mol L⁻¹ and precision expressed as relative standard deviations in the order of 2%. The developed method can also be applied for hydrocortisone derivatives such as hydrocortisone and dexametasone acetates, with favorable results and in addition to cortisone and cortisone acetate. After modification, the colorimetric method was employed with portable photometer with great simplicity and low cost, which is a significant improvement, since it does not require sophisticated instrumental. Finally, this work describes some characteristics of the chemical reactions involved, presenting some proposals and discussions.

SUMÁRIO

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO	01
1.1 – Hidrocortisona no organismo humano.....	03
1.2 – Hidrocortisona e derivados sintéticos.....	06
1.3 – Técnicas analíticas para determinação de hidrocortisona.....	09
1.4 – A luminescência do sistema Ce(IV) / SO_3^{2-}	12
1.4.1 – Reações de luminescência.....	12
1.4.2 – A reação de luminescência Ce(IV) / SO_3^{2-}	13
1.5 – O sistema químico Mo(VI) / H_2SO_4	16
1.5.1 – A reação Mo(VI) / H_2SO_4	16
1.5.2 – Métodos não usuais de medidas fotométricas	18
Capítulo 2 – OBJETIVOS.....	21
Capítulo 3 – PARTE EXPERIMENTAL	25
3.1 – Reagentes	27
3.1.1 – Solução de sulfato de cério(IV) amoniacal	27
3.1.2 – Solução de sulfito de sódio.....	27
3.1.3 – Solução de hidrocortisona em H_2SO_4 0,10 mol L^{-1}	27
3.1.4 – Soluções de ácido sulfúrico.....	27
3.1.5 – Solução de molibdato de amônio	28
3.1.6 – Solução de hidrocortisona em clorofórmio	28
3.1.7 – Solução de acetato de hidrocortisona	28
3.1.8 – Solução de cortisona.....	28
3.1.9 – Solução de acetato de cortisona	28
3.1.10 – Solução de acetato de dexametasona	28
3.2 – Equipamentos utilizados.....	29
3.3 – Procedimento experimental	31

3.3.1 – Estudo com reação de luminescência	31
3.3.2 – Estudo com reação colorimétrica.....	32
3.3.2.1 – Figuras de mérito	34
3.3.2.1.1 – Precisão das medidas.....	34
3.3.2.1.2 – Limites e linearidade	34
3.3.2.1.3 – Fator de recuperação.....	35
3.3.2.2 – Estudos com derivados da hidrocortisona	35
3.3.2.3 – Teste com medicamentos comerciais.....	36
3.3.2.3.1 – Hidrocortisona.....	37
3.3.2.3.2 – Acetato de cortisona.....	38
Capítulo 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 – Estudo com reação de luminescência.....	41
4.1.1 – Comportamento de quimiluminescência.....	41
4.1.1.1 – Estudo da estabilidade dos reagentes	42
4.1.1.2 – Efeito da variação na concentração dos reagentes ...	44
4.1.2 – Comportamento de fluorescência	47
4.1.2.1 – A fluorescência do sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$	47
4.1.2.2 – Efeito da variação na concentração dos reagentes ...	48
4.1.3 – Efeito da hidrocortisona sobre a fluorescência	53
4.2 – Estudo com reação colorimétrica	57
4.2.1 – Desenvolvimento analítico espectrofotométrico.....	57
4.2.2 – Desenvolvimento analítico fotométrico.....	59
4.2.3 – Figuras de mérito.....	61
4.2.3.1 – Precisão das medidas.....	61
4.2.3.2 – Limites e linearidade	62
4.2.3.3 – Fator de recuperação.....	62
4.2.4 – Estudos com derivados da hidrocortisona	63
4.2.5 – Teste com medicamentos comerciais.....	69
4.2.5.1 – Hidrocortisona.....	69
4.2.5.2 – Acetato de cortisona	72

Capítulo 5 – CONCLUSÕES	73
5.1 – Estudo com reação luminescente	75
5.2 – Estudo com reação colorimétrica	76
 Capítulo 6 – PERSPECTIVAS	 79
6.1 – Sistema Ce(IV) / SO_3^{2-}	81
6.2 – Sistema Mo(VI) / H_2SO_4	81
 Capítulo 7 – REFERÊNCIAS	 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Alterações comuns à molécula de hidrocortisona e seu efeito terapêutico ⁶	08
Tabela 1.2. Resumo de alguns conceitos envolvidos no estudo ¹¹⁴	13
Tabela 3.1. Preparo da solução de hidrocortisona para curva de calibração	33
Tabela 3.2. Preparo da solução de acetato de hidrocortisona para curva de calibração	35
Tabela 3.3. Preparo da solução de cortisona para curva de calibração	36
Tabela 3.4. Preparo da solução de acetato de cortisona para curva de calibração ..	36
Tabela 3.5. Preparo da solução de acetato de dexametasona para curva de calibração	36
Tabela 4.1. Resumo dos resultados obtidos na variação da concentração dos reagentes Ce(IV) e SO_3^{2-} , em quimiluminescência e em fluorescência	53
Tabela 4.2. Resultados obtidos para amostras contendo $1,10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hidrocortisona, submetidas ao ensaio de repetibilidade	61
Tabela 4.3. Análise de desempenho do método espectrofotométrico proposto	63
Tabela 4.4. Resultados obtidos para determinação de hidrocortisona em amostra comercial (juntamente com estimativa de desvio-padrão para $n=3$)	71
Tabela 4.5. Resultados obtidos para determinação de acetato de cortisona em amostra comercial (juntamente com estimativa de desvio-padrão para $n=3$)	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Localização da glândula adrenal no homem.....	03
Figura 1.2. Estrutura do colesterol.....	03
Figura 1.3. Estruturas: (A) Aldosterona (B) Desoxicortona.....	04
Figura 1.4. Estruturas: (A) Cortisona (B) Hidrocortisona.....	05
Figura 1.5. Mecanismo de ação da hidrocortisona (cortisol) no homem: (E) Esteróide (R) Receptor.....	06
Figura 1.6. Estrutura da hidrocortisona e os carbonos do ciclopentanoperidrofenantreno	08
Figura 1.7. Esquema de reação entre alguns agentes oxidantes e SO_3^{2-}	13
Figura 1.8. Esquema de reação entre MnO_4^- e SO_3^{2-} na presença de compostos contendo o grupo ciclohexil	14
Figura 1.9. Esquema de reação entre Mo(VI) , H_2SO_4 e cloridrato de amitriptilina ¹³⁴	17
Figura 1.10. Esquema de reação entre Mo(VI) / H_2SO_4 e acetato de hidrocortisona ^{111,112}	17
Figura 1.11. Diagrama esquemático do dispositivo utilizado por Rossi e colaboradores ¹⁵³ , com detalhe para as peças com as dimensões em mm (A, B e C) e ilustração da cela montada (D)	19
Figura 3.1. Espectrofluorímetro Aminco SPF-500C	29
Figura 3.2. Sistema óptico do espectrofluorímetro Aminco SPF-500C	29
Figura 3.3. Dispositivo portátil de medidas: (a) Montagem utilizada para realizar medidas fotométricas incluindo A - fonte de luz (luminária com lâmpada de 15W), B -multímetro, C-dispositivo de medidas fotométricas e uma régua de 15 cm para dar idéia da dimensão. (b) Esquema da cela de medidas confeccionado em TEFLON® grafitado.....	30
Figura 3.4. Descrição esquemática do procedimento de injeção na cela de reação	31
Figura 3.5. Esquema simplificado do procedimento analítico colorimétrico para hidrocortisona	33
Figura 4.1. Perfil de emissão de quimiluminescência de soluções, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$: (largura de fenda de emissão 7,5 nm) — Ce(IV) $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ --- Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	41

Figura 4.2. Perfil de emissão de quimiluminescência de soluções, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$:
(largura de fenda de emissão 7,5 nm)

— Ce(IV) $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$

— Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

“envelhecida” 42

Figura 4.3. Perfil de emissão de quimiluminescência de soluções, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$:
(largura de fenda de emissão 7,5 nm)

— Ce(IV) $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$

— SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

“envelhecida” 43

Figura 4.4. Efeito da variação da concentração de SO_3^{2-} nos espectros de quimiluminescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Largura de fenda de emissão = 7,5 nm. Concentração de SO_3^{2-} em mol L^{-1} : (A) $2,33 \times 10^{-3}$ (B) $2,66 \times 10^{-3}$ (C) $3,00 \times 10^{-3}$ (D) $3,33 \times 10^{-3}$ 44

Figura 4.5. Efeito da variação da concentração de SO_3^{2-} , em 370 nm, na quimiluminescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Largura de fenda de emissão = 7,5 nm. Concentração de SO_3^{2-} em mol L^{-1} : (A) $2,33 \times 10^{-3}$ (B) $2,66 \times 10^{-3}$ (C) $3,00 \times 10^{-3}$ (D) $3,33 \times 10^{-3}$ 45

Figura 4.6. Efeito da variação da concentração de Ce(IV) nos espectros de quimiluminescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Largura de fenda de emissão = 7,5 nm. Concentração de Ce(IV) em mol L^{-1} : (A) $0,33 \times 10^{-3}$ (B) $0,66 \times 10^{-3}$ (C) $1,00 \times 10^{-3}$ (D) $1,33 \times 10^{-3}$ (E) $1,66 \times 10^{-3}$ (F) $2,00 \times 10^{-3}$ (G) $2,33 \times 10^{-3}$ (H) $2,66 \times 10^{-3}$ (I) $3,33 \times 10^{-3}$ 46

Figura 4.7. Efeito da variação da concentração de Ce(IV), em 370 nm, na quimiluminescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Largura de fenda de emissão = 7,5 nm. Concentração de Ce(IV) em mol L^{-1} : (A) $0,33 \times 10^{-3}$ (B) $0,66 \times 10^{-3}$ (C) $1,00 \times 10^{-3}$ (D) $1,33 \times 10^{-3}$ (E) $1,66 \times 10^{-3}$ (F) $2,00 \times 10^{-3}$ (G) $2,33 \times 10^{-3}$ (H) $2,66 \times 10^{-3}$ (I) $3,33 \times 10^{-3}$ 47

Figura 4.8. Perfil de emissão de fluorescência de uma solução, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$:
(λ_{exc} = 290 nm e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm)

— Ce(IV) $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$

— Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 48

Figura 4.9. Efeito da variação da concentração de SO_3^{2-} nos espectros de fluorescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. (λ_{exc} = 290 nm e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm). Concentração de SO_3^{2-} em mol L^{-1} : (A) $2,00 \times 10^{-3}$ (B) $2,33 \times 10^{-3}$ (C) $2,66 \times 10^{-3}$ (D) $3,00 \times 10^{-3}$ (E) $3,33 \times 10^{-3}$ 49

Figura 4.10. Efeito da variação da concentração de SO_3^{2-} , em 370 nm, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, na fluorescência de uma solução Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. ($\lambda_{\text{exc}}=290 \text{ nm}$ e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm). Concentração de SO_3^{2-} em mol L^{-1} : (A) $2,00 \times 10^{-3}$ (B) $2,33 \times 10^{-3}$ (C) $2,66 \times 10^{-3}$ (D) $3,00 \times 10^{-3}$ (E) $3,33 \times 10^{-3}$ 50

Figura 4.11. Efeito da variação da concentração de Ce(IV) no espectro de fluorescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. ($\lambda_{\text{exc}}=290 \text{ nm}$ e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm). Concentração de Ce(IV) em mol L^{-1} : (A) $0,50 \times 10^{-3}$ (B) $1,00 \times 10^{-3}$ (C) $2,33 \times 10^{-3}$ (D) $2,66 \times 10^{-3}$ (E) $3,00 \times 10^{-3}$ (F) $3,33 \times 10^{-3}$ 51

Figura 4.12. Efeito da variação da concentração de Ce(IV) , em 370 nm, na fluorescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. ($\lambda_{\text{exc}}=290 \text{ nm}$ e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm). Concentração de Ce(IV) em mol L^{-1} : (A) $0,50 \times 10^{-3}$ (B) $1,00 \times 10^{-3}$ (C) $2,33 \times 10^{-3}$ (D) $2,66 \times 10^{-3}$ (E) $3,00 \times 10^{-3}$ (F) $3,33 \times 10^{-3}$ 52

Figura 4.13. Efeito da variação da concentração de Ce(IV) e H_2SO_4 no espectro de fluorescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. ($\lambda_{\text{exc}}=290 \text{ nm}$ e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm). Concentração de Ce(IV) e H_2SO_4 , respectivamente, em mol L^{-1} : (A) $0,33 \times 10^{-3}$ e $0,7 \times 10^{-2}$ (B) $0,66 \times 10^{-3}$ e $1,3 \times 10^{-2}$ (C) $1,00 \times 10^{-3}$ e $2,0 \times 10^{-2}$ (D) $1,33 \times 10^{-3}$ e $2,7 \times 10^{-2}$ (E) $1,66 \times 10^{-3}$ e $3,4 \times 10^{-2}$ (F) $2,00 \times 10^{-3}$ e $4,0 \times 10^{-2}$ (G) $2,33 \times 10^{-3}$ e $4,7 \times 10^{-2}$ (H) $2,66 \times 10^{-3}$ e $5,4 \times 10^{-2}$ (I) $3,00 \times 10^{-3}$ e $6,0 \times 10^{-2}$ (J) $3,33 \times 10^{-3}$ e $6,7 \times 10^{-2}$ 54

Figura 4.14. Efeito da variação da concentração de Ce(IV) e H_2SO_4 , em 370nm, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, na fluorescência de uma solução SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. ($\lambda_{\text{exc}}=290 \text{ nm}$ e largura de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm). Concentração de Ce(IV) e H_2SO_4 , respectivamente, em mol L^{-1} : (A) $0,33 \times 10^{-3}$ e $0,7 \times 10^{-2}$ (B) $0,66 \times 10^{-3}$ e $1,3 \times 10^{-2}$ (C) $1,00 \times 10^{-3}$ e $2,0 \times 10^{-2}$ (D) $1,33 \times 10^{-3}$ e $2,7 \times 10^{-2}$ (E) $1,66 \times 10^{-3}$ e $3,4 \times 10^{-2}$ (F) $2,00 \times 10^{-3}$ e $4,0 \times 10^{-2}$ (G) $2,33 \times 10^{-3}$ e $4,7 \times 10^{-2}$ (H) $2,66 \times 10^{-3}$ e $5,4 \times 10^{-2}$ (I) $3,00 \times 10^{-3}$ e $6,0 \times 10^{-2}$ (J) $3,33 \times 10^{-3}$ e $6,7 \times 10^{-2}$ 55

Figura 4.15. Efeito da presença de hidrocortisona na fluorescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de soluções Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e hidrocortisona variável, com excitação em 290 nm e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm 56

Figura 4.16. Efeito da variação da concentração de hidrocortisona na fluorescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de soluções Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de hidrocortisona, em mol L^{-1} : (A) $4,7 \times 10^{-5}$ (B) $5,6 \times 10^{-5}$ (C) $6,5 \times 10^{-5}$ (D) $7,4 \times 10^{-5}$ (E) $8,4 \times 10^{-5}$, com excitação em 290 nm e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm 57

Figura 4.17. Espectro de absorção do produto de reação entre Mo(VI) $3,24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2SO_4 $5,40 \text{ mol L}^{-1}$ e : (A) Ausente de hidrocortisona (B) $0,14 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hidrocortisona 58

Figura 4.18. Espectro de absorção do produto de reação entre Mo(VI) $3,24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2SO_4 $5,40 \text{ mol L}^{-1}$ e hidrocortisona: (A) Ausente (B) $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (C) $0,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (D) $1,10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (E) $1,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (F) $2,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (G) $2,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	58
Figura 4.19. Curva de calibração com medidas espectrofotométricas para hidrocortisona	59
Figura 4.20. Curva de calibração com medidas fotométricas para hidrocortisona...	60
Figura 4.21. Curva de calibração com medidas espectrofotométricas para cortisona, acetato de cortisona, acetato de hidrocortisona e acetato de dexametasona	64
Figura 4.22. Curva de calibração com medidas em dispositivo portátil para cortisona, acetato de cortisona, acetato de hidrocortisona e acetato de dexametasona	65
Figura 4.23. Espectros de absorbância de soluções Mo(VI) $3,24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2SO_4 $5,40 \text{ mol L}^{-1}$ e corticóide $1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	66
Figura 4.24. Estrutura da hidrocortisona: destaque para prováveis pontos de interação com Mo(VI)	68
Figura 4.25. Curva de calibração por adição de padrão para hidrocortisona em amostra comercial	69
Figura 4.26. Espectros de absorbância do produto de reação entre Mo(VI) / H_2SO_4 e a hidrocortisona extraída da amostra real (triplicata).....	70

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 Hidrocortisona no organismo humano

O córtex adrenal é uma glândula localizada na parte superior do rim humano (figura 1.1), por essa razão ela também recebe o nome de glândula supra-renal. Esta glândula é responsável pela produção de hormônios essenciais para a regulação do metabolismo e do equilíbrio hidroeletrolítico do homem¹, dentre eles o hormônio chamado hidrocortisona.

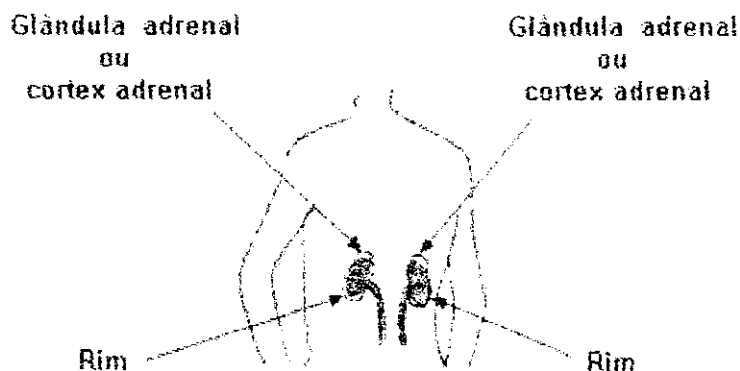


Figura 1.1. Localização da glândula adrenal no homem.

A atividade do córtex adrenal é controlada, no organismo humano, pela corticotropina (ou ACTH – Adrenocorticotropic Hormone), que é liberada pelo cérebro¹. Níveis elevados desta substância no sangue determinam maior secreção de hormônios por parte do córtex adrenal. Os hormônios produzidos pela glândula, que são em grande parte sintetizados a partir do colesterol (figura 1.2), são comumente chamados de hormônios corticóides ou corticosteróides².

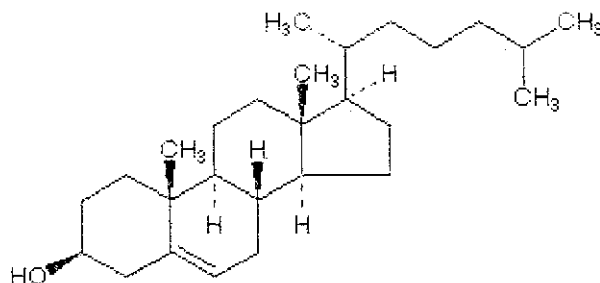


Figura 1.2. Estrutura do colesterol.

Os hormônios secretados pelo córtex adrenal podem ser classificados em três tipos, de acordo com a região da glândula em que são sintetizados³. Essas regiões recebem o nome de zonas ou camadas histológicas, são elas:

- (A) Camada glomerular externa
- (B) Camada fascicular média
- (C) Zona reticular interna

A camada glomerular externa é responsável pela secreção dos hormônios de atividade chamada mineralcorticóide, que atuam primariamente como substâncias reguladoras do balanço eletrolítico e aquoso do organismo humano. Os compostos mais representativos desta classe são aldosterona e desoxicortona (figura 1.3). O excesso destas substâncias no organismo pode causar aumento na retenção de sódio e na excreção de potássio pelos túbulos renais.

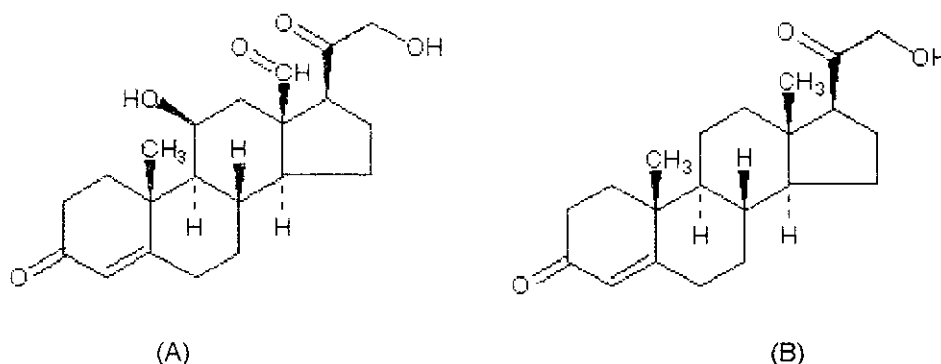


Figura 1.3. Estruturas: (A) Aldosterona (B) Desoxicortona.

A camada fascicular média secreta hormônios de atividade chamada glicocorticóide, primariamente envolvidos no metabolismo de carboidratos, mas que também apresentam atividade antiinflamatória. Os representantes principais desta classe de hormônios são a cortisona e a hidrocortisona (figura 1.4), que é o principal glicocorticóide produzido pelo homem³. A administração externa de glicocorticóides aumenta a glicogênese, ajuda na manutenção do tônus muscular, tem ação antiinflamatória e altera a excreção de cálcio, além de outros efeitos biológicos. Devido a sua influência em diversos mecanismos fisiológicos, estas substâncias podem otimizar o desempenho de atletas em determinados esportes, o que caracteriza *doping*⁴, e isso tem estimulado estudos para o desenvolvimento de métodos analíticos para o controle em amostras biológicas⁵.

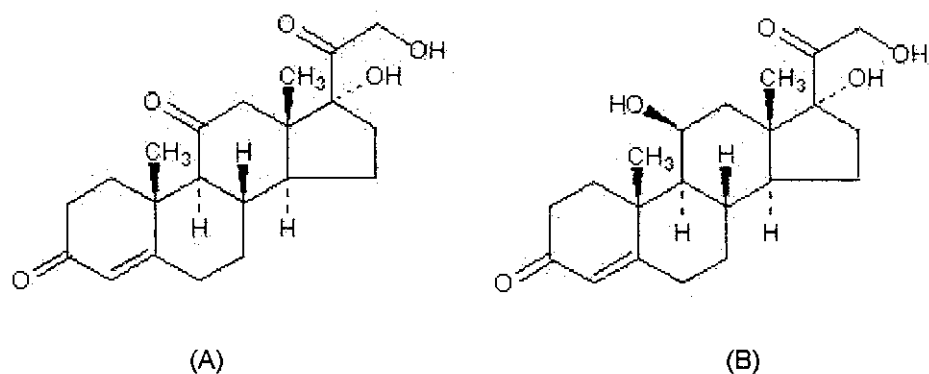


Figura 1.4. Estruturas: (A) Cortisona (B) Hidrocortisona

Além da camada glomerular externa (produz os mineralcorticóides), e fascicular média (produz os glicocorticóides), há também a chamada zona reticular interna, responsável pela secreção dos hormônios sexuais, também chamados androgênios⁶. Em resumo, os principais produtos de secreção do córtex adrenal humano são os hormônios aldosterona, hidrocortisona e androgênios. Dentre estes, a hidrocortisona (também chamada de cortisol) têm sido muito estudada devido a sua ação no tratamento de reações inflamatórias do organismo.

Para entender a função dos corticosteróides, mais especificamente os glicocorticóides, e sua indicação em tratamentos terapêuticos (corticoterapia), é importante conhecer um pouco seu mecanismo de ação no homem. Vale lembrar que os corticosteróides são hormônios naturais constituintes do ser humano e, portanto, suas funções já são normalmente realizadas, independente de uma terapêutica complementar.

No organismo, a hidrocortisona liga-se a uma substância chamada transcortina (ou CBG – *Cortisol binding globulin*) e à albumina, que funcionam como carreadoras⁶. Apenas 5% da hidrocortisona circulante apresenta-se sob a forma livre. A partir deste momento, os efeitos biológicos e farmacológicos da hidrocortisona acontecem nas células alvo após uma interação do hormônio com estruturas localizadas no citoplasma (receptores de glicocorticóides), formando o complexo corticóide-receptor. Este complexo sofre algumas alterações adaptativas e dirige-se para o núcleo da célula, onde se liga em elementos específicos do DNA. Ocorre, então, a ativação da transcrição de RNA-mensageiros específicos, que estimulam a síntese de proteínas que são as responsáveis pelos efeitos dos

glicocorticóides⁶. Ao fim do processo, tanto os hormônios produzidos pelo homem quanto os administrados na forma de formulações farmacêuticas, são metabolizados nas células dos tecidos-alvo ou no fígado, num período de 1 a 2 horas. O fígado é o principal local de metabolização da hidrocortisona⁶, onde ocorre redução a diidro e tetraidro-hidrocortisona e, posteriormente, conjugação ao ácido glicurônico para aumentar a solubilidade e facilitar a excreção urinária. Menos de 1% da hidrocortisona humana é excretada na urina (40 a 80 mg/dia)⁶.

A sequência descrita está ilustrada na figura 1.5. É importante ressaltar aqui que este mecanismo, mostrado de maneira simplificada, ainda não está totalmente elucidado⁶. Ainda se encontram descritos na literatura trabalhos a respeito das diversas funções e mecanismos biológicos envolvendo hidrocortisona⁷⁻¹².

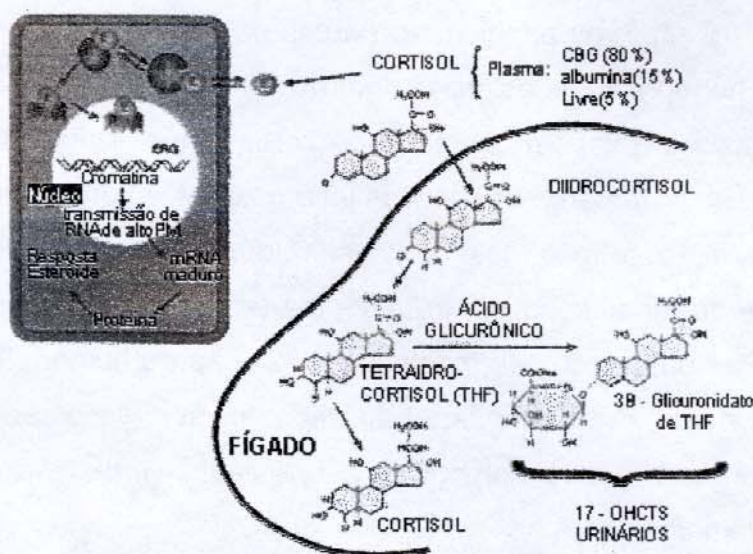


Figura 1.5. Mecanismo de ação da hidrocortisona (cortisol) no homem: (E) Esteróide (R) Receptor

1.2 Hidrocortisona e derivados sintéticos

Thomas Addison, em 1885, foi o primeiro a reconhecer que as glândulas adrenais desempenham função essencial no organismo¹³. Por essa razão, a doença conhecida como hipoadrenalismo, que causa deficiência na atividade produtiva dos hormônios pela glândula adrenal, foi durante muito tempo chamada de Mal de Addison.

Em 1927, Rogoff e Stewart¹⁴ comprovaram que as glândulas adrenais são indispensáveis à vida, observando que extratos destas glândulas eram eficazes para conservar vivos cães cuja atividade adrenal havia sido paralisada. Em 1930, Swingle e Pfiffner^{15,16} confirmaram os resultados de Rogoff e Stewart com novas pesquisas em gatos sem, contudo, identificar a(s) substância(s) responsável(is) por essa característica. O isolamento e identificação dos princípios ativos responsáveis pela atividade nos extratos das glândulas adrenais foram realizados no período de 1935 a 1937 por vários pesquisadores: Wintersteiner, Kendall, Reichstein e colaboradores¹⁷⁻²⁰. Em 1937, Reichstein sintetizou a desoxicortona²¹ (figura 1.3B) e, em 1948, Sarett sintetizou a cortisona²² (figura 1.4A).

Em 1949, Hench, Kendall e colaboradores introduziram a terapia a base de cortisona para o tratamento de artrite reumatóide^{23,24}. Esta aplicação clínica estimulou a extração de outros hormônios e também a síntese de análogos e derivados dos hormônios naturais. Atualmente, os corticóides utilizados são obtidos por síntese²⁵ ou por oxidação microbiológica de substâncias de origem animal²⁶ (colesterol, ácido biliares, etc.) ou vegetal²⁶ (aplicação de sapogeninas encontradas em plantas da família amarilidácea, dioscórea, liliácea, etc.).

Os corticosteróides adrenais e seus derivados sintéticos são usados tanto na terapia de reposição/substituição em insuficiência adrenocortical quanto no tratamento de muitas condições clínicas, principalmente condições inflamatórias e estados alérgicos⁶. Os glicocorticóides, especificamente, são eficazes contra a febre reumática, reações a drogas, soros e transfusões, dermatoses, algumas doenças oculares, edema cerebral e outros distúrbios³. Entretanto, são perigosos se forem usados imprópriamente, pois induzem ao hipercorticismismo, causador de muitas reações adversas^{27,28}, tais como atrofia da pele, agravamento de diabetes, mudanças de personalidade, acne, distúrbios menstruais, hipertensão, cefaléia, supressão no crescimento e osteoporose, além de grande número de outros efeitos colaterais. Em razão disto, a Associação Médica Norte Americana recomenda que “o uso prolongado de doses terapêuticas de corticosteróides deve ser reservado para pacientes em perigo de vida ou com sintomas graves que não respondem satisfatoriamente a medidas paliativas mais suaves^{1”}.

A hidrocortisona é um hormônio da classe dos glicocorticóides, muito utilizada, junto com seus derivados sintéticos, em tratamentos de ação antiinflamatória. Desde a descoberta de sua síntese, modificações estruturais específicas foram introduzidas na molécula para ressaltar alguma atividade farmacológica⁶. A figura 1.6 ilustra a estrutura da hidrocortisona conhecida como ciclopentanoperidrofenantreno⁶, que tem seus carbonos numerados para uma referência estrutural da posição onde a alteração é feita.

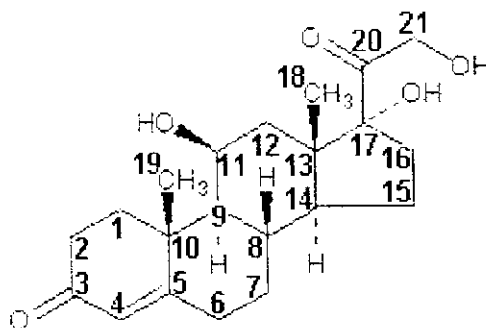


Figura 1.6. Estrutura da hidrocortisona e os carbonos do ciclopentanoperidrofenantreno.

Nesta fórmula, considerando-se um plano tridimensional da estrutura da molécula, as linhas pontilhadas refletem projeções para baixo do anel molecular (plano α) e indicam as chamadas substituições α . Já as ligações de cadeias laterais, mostradas com linhas contínuas, representam projeções para cima do anel molecular (plano β) e indicam as substituições β . Possíveis diferenças entre α e β do ponto de vista estrutural não estão associadas com modificações significativas no efeito terapêutico do produto, descritas na tabela 1.1.

Tabela 1.1. Alterações comuns à molécula de hidrocortisona e seu efeito terapêutico⁶.

Tipo de alteração	Efeito terapêutico	Derivado sintético
Radical ceto (=O) em C ₁₁	Inativação da atividade terapêutica	Cortisona
Dupla ligação entre C ₁ e C ₂	Aumento da atividade glicocorticóide	Prednisona Prednisolona
Introdução de um átomo de flúor em C ₉ , no plano α	Aumento da atividade glicocorticóide mas também em atividade mineralcorticóide	Triamcinolona
Introdução de radical CH ₃ em C ₁₆ , plano α ou β , em compostos 9 α - flúor	Minimizam a atividade mineralcorticóide	Dexametasona (plano α) Betametasona (plano β)

Das relações estruturais mostradas na tabela 1.1, é importante comentar alguns aspectos:

- A presença de um radical ceto ($=O$) na posição C_{11} torna os glicocorticóides menos ativos, como é o caso da cortisona. Para que esta se torne ativa, é necessário que o radical desta posição C_{11} seja substituído por um radical hidroxila ($-OH$), resultando na molécula da hidrocortisona. Desta maneira, para que a cortisona administrada a um paciente torne-se ativa é necessário que seja transformada em seu metabólito ativo, a hidrocortisona. Isto ocorre no fígado (metabolização hepática).
- A introdução de um radical metila ($-CH_3$) no carbono C_{16} , no plano α e no plano β , dá origem a betametasona e dexametasona, respectivamente. Apesar desta alteração espacial, betametasona e dexametasona não apresentam diferenças do ponto de vista farmacológico e terapêutico.

Modificações estruturais, como as descritas na tabela 1.1, geram novos glicocorticóides com estrutura molecular própria e, por isso, com um perfil específico de efeitos biológicos e farmacológicos. Por exemplo, em relação à hidrocortisona, que é o glicocorticóide natural, o análogo sintético dexametasona apresenta⁶: potência antiinflamatória 20 a 30 vezes maior, efeito de retenção de sódio ausente e duração de ação mais prolongada.

1.3 Técnicas analíticas para determinação de hidrocortisona

A partir de 1949, com a introdução da terapia de cortisona para o tratamento de algumas doenças^{23,24}, houve um estímulo na aplicação clínica da hidrocortisona e derivados. Neste período, começaram a ser descritos na literatura diversos trabalhos para determinação quantitativa de hidrocortisona em amostras biológicas e em extratos de tecidos humanos e bovinos²⁹⁻³⁹.

Em 1951 Seligman e Ravin²⁹ desenvolveram um método colorimétrico para estimar a presença de corticosteróides em urina. Trabalhos subsequentes apresentaram resultados semelhantes para amostras de pele humana³¹, urina de

porco³² e tecido bovino³⁹ usando, em geral, técnicas colorimétricas simples de identificação de compostos orgânicos, como determinação espectrofotométrica de corticosteróides pelo monitoramento de seu produto de reação com sais de tetrazolium⁴⁰.

Durante a década de 60, determinações colorimétricas⁴¹ de hidrocortisona passaram a oferecer resultados mais representativos quantitativamente, e passaram a ser realizadas também em amostras de leite^{42,43} e de antibióticos⁴⁴, além de amostras biológicas⁴⁵⁻⁴⁷. Nesta época, entretanto, as determinações colorimétricas simples começaram a ser substituídas por procedimentos e técnicas diferenciadas, como a fluorimetria⁴⁵, a espectrofluorimetria⁴⁷ e a cromatografia em camada delgada⁴³. Além disso, começou a ser proposto o uso de métodos de separação antes da identificação e quantificação⁴⁸ de hidrocortisona.

A partir de 1970, surgiram os primeiros trabalhos propondo o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)⁴⁹⁻⁵² para determinação de hidrocortisona e alguns derivados em amostras biológicas. Apesar das vantagens como precisão e eficiência de separação da cromatografia líquida, alguns trabalhos ainda sustentavam o uso de outras técnicas, como polarografia por pulso diferencial⁵³⁻⁵⁵, e cromatografia gasosa⁵⁶. Runikis e colaboradores⁵⁶ inovaram ao aplicar a derivatização em cromatografia gasosa para a determinação de hidrocortisona, que é um composto não volátil.

Apesar do intenso uso de CLAE, na década de 70 ainda surgiram trabalhos que defendiam o uso de técnicas colorimétricas⁵⁷⁻⁶⁰ para determinação de hidrocortisona. Em 1977, Oteiza e colaboradores⁶⁰ publicaram um trabalho que descrevia toda a cinética e mecanismo da reação dos corticosteróides com o azul de tetrazolium. Soluções alcoólicas de corticosteróides mostraram-se capazes de reduzir sais de tetrazolium na presença de hidróxido de tetrametilamônio e formar soluções coloridas. A absorbância da solução final era medida por após um período pré-estabelecido⁴⁰ ou num monitoramento cinético da reação⁶¹. O sucesso desta proposta e sua simplicidade fizeram com que o método fosse considerado referência para determinar a presença de corticosteróides, conforme consta na 3ª edição da Farmacopéia Brasileira⁶².

Durante a década de 80, houve publicação de muitos trabalhos⁶³⁻⁷³ que consagraram a CLAE como técnica oficial para determinação de hidrocortisona e seus derivados. Nesta época, poucos trabalhos apresentavam propostas colorimétricas⁷⁴⁻⁷⁵ ou com o uso de outras técnicas, como polarografia e fluorimetria⁷⁶⁻⁷⁸. Descobriu-se que hidrocortisona fluoresce em solução de ácido sulfúrico e pode ser determinada por espectrofluorimetria⁷⁷. Imunoensaios quimiluminescentes também foram desenvolvidos para quantificar cortisona e outros corticosteróides em plasma ou soro^{79,80}. A partir desta época, as Farmacopéias Britânica⁸¹ e Americana⁸² passaram a recomendar esta técnica como referência para determinação de hidrocortisona.

A partir de 1990, a maioria dos trabalhos publicados usando CLAE para determinação de hidrocortisona⁸³⁻⁸⁹ passou a utilizar diferenciais, como, por exemplo, tratamento pré-análise com extração em fase sólida⁹⁰. Alguns trabalhos com outros procedimentos retomaram métodos como coulometria⁹¹, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas⁹², colorimetria⁹³, espectrofotometria⁹⁴ e quimiluminescência^{95,96}. Nesta época, Calokerinos e colaboradores^{97,98} apresentam um trabalho inovador. Eles propuseram a quantificação de hidrocortisona e seus derivados baseada no efeito destas substâncias sobre a intensidade de quimiluminescência de uma reação química, obtendo bons resultados com um sistema simples em fluxo. Vale destacar que, nesta época, a maioria das novas propostas analíticas envolvia amostras de formulações farmacêuticas comerciais.

Desde o ano 2000, a maioria dos trabalhos apresentados para determinação de hidrocortisona envolve o uso de técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa⁹⁹⁻¹⁰¹, cromatografia líquida micelar¹⁰²⁻¹⁰⁶, eletroforese capilar¹⁰⁷, espectroscopia no infravermelho próximo¹⁰⁸, além de espectrofotometria¹⁰⁹⁻¹¹². Neste último caso, Pezza e colaboradores^{111,112} descreveram um sistema colorimétrico simples e interessante, baseado na reação entre molibdato de amônio e acetato de hidrocortisona, que foi usado para quantificar hidrocortisona em formulações farmacêuticas comerciais.

1.4 A luminescência do sistema Ce(IV) / SO₃²⁻

1.4.1 Reações de luminescência

Em um processo químico, o fenômeno da luminescência é caracterizado pela existência de uma substância capaz de absorver energia, atingir um estado excitado e em seguida decair emitindo radiação¹¹³. Se neste processo, a energia de excitação provém da transferência de energia de outras espécies químicas do sistema reacional, o fenômeno pode ser chamado de quimiluminescência. No entanto, se a energia de excitação provém de uma fonte externa ao sistema químico, como por exemplo, uma fonte de radiação eletromagnética, o fenômeno pode ser chamado fotoluminescência. Neste caso, o fenômeno pode ainda ser caracterizado como fluorescência ou fosforescência¹¹³, de acordo com as diferentes transições eletrônicas que ocorrem durante o processo de excitação e emissão, o que se reflete na duração da emissão, dentre outros aspectos.

Em fluorescência, ao contrário de fosforescência, a energia de transição eletrônica envolvida não acarreta mudanças no *spin* eletrônico e envolve estados excitados singletes. Por consequência, a fluorescência é um fenômeno com tempo de vida bastante curto ($<10^{-5}$ s) e a emissão praticamente se limita ao período de excitação da amostra. Já a fosforescência, envolve mudanças no *spin* eletrônico e estados excitados tripletes, o que caracteriza a manutenção da emissão por períodos relativamente longos após a interrupção da excitação da amostra¹¹³.

Em luminescência, o que geralmente se observa é que o decaimento energético de um intermediário ou produto em estado excitado ocorre pela transferência de energia a uma substância do próprio meio reacional, denominada fluoróforo¹¹³, que é capaz de se excitar e decair emitindo radiação. Neste contexto, define-se¹¹⁴ sensibilizador como qualquer substância química externa ao sistema reacional que, de alguma forma, é capaz de intensificar a duração e/ou intensidade da emissão. Um sensibilizador pode ainda ser denominado sensibilizador fluoróforo, quando é capaz de absorver energia e decair emitindo sua própria radiação; ou sensibilizador modificador, quando trata-se de uma substância que, mesmo não sendo capaz de se excitar e emitir radiação própria favorece a luminescência, pela simples interação em alguma etapa do mecanismo

da reação. A tabela 1.2 resume alguns desses conceitos abordados no estudo da luminescência do sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$.

Tabela 1.2.: Resumo de alguns conceitos envolvidos no estudo¹¹⁴

Denominação		Sistema reacional	Ação
Fluoróforo		Participa	É capaz de absorver energia, excitar-se e decair emitindo radiação
Sensibilizador	Modificador	Não participa	Não é capaz de se excitar e decair emitindo radiação
	Fluoróforo	Não participa	É capaz de absorver energia, excitar-se e decair emitindo radiação

Técnicas baseadas em fenômenos de luminescência têm se tornado uma poderosa ferramenta analítica, com larga aplicação em diversas áreas devido a sua sensibilidade, aplicabilidade e simplicidade de instrumentação¹¹⁵. Métodos analíticos luminescentes geralmente produzem resultados rápidos e sensíveis, vantagens de grande valor para a quantificação de insumos farmacêuticos¹¹⁵.

1.4.2 A reação de luminescência $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$

Em 1975, estudos para determinação de traços de SO_2 na atmosfera¹¹⁶ mostraram que a presença de Fe(III) em soluções aquosas de sulfito com oxigênio era acompanhada por quimiluminescência. Como a emissão de luz da reação entre Fe(III) e SO_3^{2-} não era reprodutível, outros oxidantes foram estudados. MnO_4^- , Ce(IV) e H_2O_2 em meio aquoso foram encontrados como agentes oxidantes capazes de produzir uma emissão de luz reprodutiva (figura 1.7). Neste trabalho¹¹⁶, MnO_4^- foi utilizado como agente oxidante e a luminescência foi proporcional à quantidade de sulfito presente.

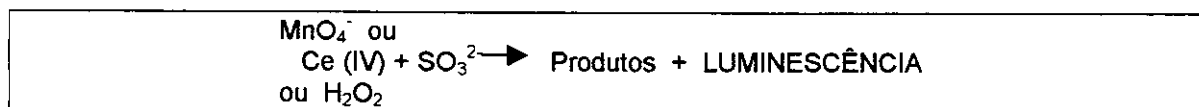


Figura 1.7. Esquema de reação entre alguns agentes oxidantes e SO_3^{2-} .

O sistema luminescente $\text{MnO}_4^- / \text{SO}_3^{2-}$ apresentou algumas desvantagens como baixa intensidade de emissão e limitações na concentração de MnO_4^- (devido à sobreposição dos espectros de absorção e de emissão)¹¹⁷. Outra

desvantagem do sistema $\text{MnO}_4^- / \text{SO}_3^{2-}$ é a instabilidade das soluções de SO_3^{2-} que são rapidamente oxidadas pelo ar. Para estabilizar as soluções de SO_3^{2-} , vários compostos podem ser adicionados, como tetracloromercurato de potássio ($\text{K}_2[\text{Hg}(\text{Cl})_4]$) e compostos carbonílicos¹¹⁸.

Num estudo sobre estabilização de soluções de SO_3^{2-} , Wheatley e colaboradores¹¹⁸ adicionaram ciclohexanona, um composto carbonílico, ao sistema $\text{MnO}_4^- / \text{SO}_3^{2-}$. Com soluções de ciclohexanona $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, a intensidade de radiação do sistema diminuía. Entretanto, para soluções de ciclohexanona mais diluídas, em torno de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, a intensidade obtida foi maior que o dobro da esperada. Em virtude destas observações, o efeito de outros compostos carbonílicos também foi investigado¹¹⁸. Compostos como *p*-benzoquinona, acetona e acetaldeído diminuíram a intensidade de emissão quando presentes em qualquer concentração. Por isso considerou-se a possibilidade da parte ciclohexil do composto (e não a função carbonílica) ser a responsável pelo aumento na intensidade de emissão, conforme ilustra a figura 1.8.

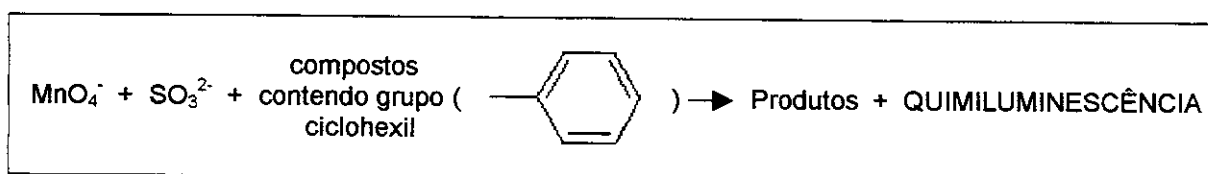


Figura 1.8. Esquema de reação entre MnO_4^- e SO_3^{2-} na presença de compostos contendo o grupo ciclohexil

Vários compostos contendo o grupo ciclohexil foram estudados, dentre eles, o ácido 3-ciclohexilaminopropanosulfônico - CAPS, o ácido ciclohexanocarboxílico, a ciclohexilamina, o ciclohexanol, a ciclohexanona, a 2-metil-ciclohexanona e o ciclohexano-1,4-diol. Todos produziram um aumento na intensidade de radiação do sistema $\text{MnO}_4^- / \text{SO}_3^{2-}$, sendo o maior aumento observado com CAPS.

O mecanismo de atuação destes compostos, chamados sensibilizadores modificadores, ainda é pouco entendido. Entretanto, sua aplicação e a dos sensibilizadores fluoróforos têm sido útil para o desenvolvimento de métodos analíticos. Como exemplos, podem ser citados trabalhos para determinação de SO_3^{2-} ¹¹⁹ e SO_2 ¹²⁰ utilizando como sensibilizadores rodamina 6G e flavina mononucleotídeo, respectivamente, em sistemas micelares.

Ainda com base na reação quimiluminescente $\text{MnO}_4^- / \text{SO}_3^{2-}$, alguns autores propuseram a substituição do sulfito pelas catecolaminas epinefrina, L-dopa, norepinefrina e dopamina¹²¹ e algumas substâncias usadas como anestésicos locais (benzocaína, butacaína, butofórmio, procaína e tetracaína)¹²². Surgiram também trabalhos propondo o uso de outros oxidantes, como KBr^{96} , Mn(III)^{123} e $\text{Ce(IV)}^{114,124}$ em substituição ao MnO_4^- em reações quimiluminescentes. Como o uso de MnO_4^- apresenta limitações (não é estável e sua concentração no meio deve ser minimizada para que a banda de absorção não sobreponha a banda de emissão¹²⁴), sua substituição é interessante.

Semelhante ao sistema $\text{MnO}_4^- / \text{SO}_3^{2-}$, a redução de Ce(IV) pelo SO_3^{2-} também apresenta fraca emissão de luz. Entretanto, o uso de Ce(IV) no lugar de MnO_4^- não tem a limitação de concentração do agente oxidante. É possível trabalhar com alta concentração de Ce(IV) , o que pode favorecer a emissão, sem problema de sobreposição da banda de absorção do oxidante com a banda de emissão dos produtos, uma das principais desvantagens do sistema $\text{MnO}_4^- / \text{SO}_3^{2-}$. Além disso, soluções de sulfato de Ce(IV) são relativamente mais estáveis.

A intensidade da emissão do sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$ também pode ser amplificada pela presença de vários compostos, como por exemplo o CAPS e compostos com estrutura similar¹¹⁴. O efeito de CAPS no sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$ é semelhante ao produzido no sistema $\text{MnO}_4^- / \text{SO}_3^{2-}$, mas a natureza da emissão ainda não está bem estabelecida. O Ce(III) , formado pela redução de Ce(IV) , é um íon com propriedades fluoróforas reconhecidas^{125,126} e, portanto, um possível responsável pela quimiluminescência. Alguns trabalhos¹²⁷ defendem que a formação da espécie SO_2^* , que emitiria um fóton quando decai ao estado fundamental, é a principal fonte de emissão do sistema químico $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$. Por outro lado, há autores que propõe a formação da espécie Ce(III)^* como responsável pela quimiluminescência da reação^{128,129}. Outros agentes redutores como nitrito, oxalato, e haletos não geram quimiluminescência com Ce(IV) ¹³⁰. Isto sugere que a simples formação e decaimento de Ce(III)^* não explica o fenômeno.

O efeito sensibilizador dos compostos contendo grupos ciclohexil na intensidade de emissão da reação quimiluminescente $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$ foi estudado e

aplicado na determinação de sulfito^{130,131}. Quando CAPS é empregado como sensibilizador, nitratos interferem severamente na determinação de SO_3^{2-} ¹³⁰, o que não acontece quando quinina é o sensibilizador fluoróforo usado. Isto reforça ainda mais a idéia de diferentes mecanismos de ação entre os sensibilizadores fluoróforos, no caso a quinina, e os sensibilizadores modificadores como o CAPS.

Neste contexto, uma interessante aplicação analítica da reação quimiluminescente $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$ é a determinação quantitativa de substâncias que atuam como sensibilizadoras desta reação^{95,97,98,132}, uma vez que, sob certas condições, a intensidade de luz emitida é diretamente proporcional a quantidade de sensibilizador presente. Esta característica foi utilizada no desenvolvimento de método analítico de determinação de ciclamato de sódio¹³² de 1,00 a 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Compostos esteroidais apresentam em suas estruturas grupos ciclohexil e, como esperado, aumentam a intensidade de emissão de luz da reação $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$. Cortisona e hidrocortisona emitem radiação em soluções de ácido sulfúrico, podendo ser determinadas por espectrofluorimetria^{77,78,133}. Esta característica foi aplicada na sensibilização da reação $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$ para determinação de esteróides em formulações farmacêuticas⁹⁷. Esteróides não fluorescentes, que apresentam grupos ciclohexil em sua estrutura, também aumentam a intensidade de emissão de luz da reação, mas em menor extensão que a hidrocortisona. Métodos rápidos e automatizados foram desenvolvidos para determinação de hidrocortisona e esteróides em formulações farmacêuticas^{95,97,98}.

1.5 O sistema químico $\text{Mo(VI)} / \text{H}_2\text{SO}_4$

1.5.1 A reação $\text{Mo(VI)} / \text{H}_2\text{SO}_4$

Em 2000, Aman e colaboradores¹³⁴ apresentaram um estudo para determinação colorimétrica de cloridrato de amitriptilina, um conhecido antidepressivo, baseado na sua reação com Mo(VI) em meio H_2SO_4 . O produto desta reação (figura 1.9) foi descrito apenas como sendo de coloração verde com absorvância máxima em 660 nm. A reação foi descrita como inédita e parte de

uma série de estudos¹³⁵⁻¹⁴³ para desenvolver procedimentos colorimétricos para análise de substâncias de uso farmacêutico.

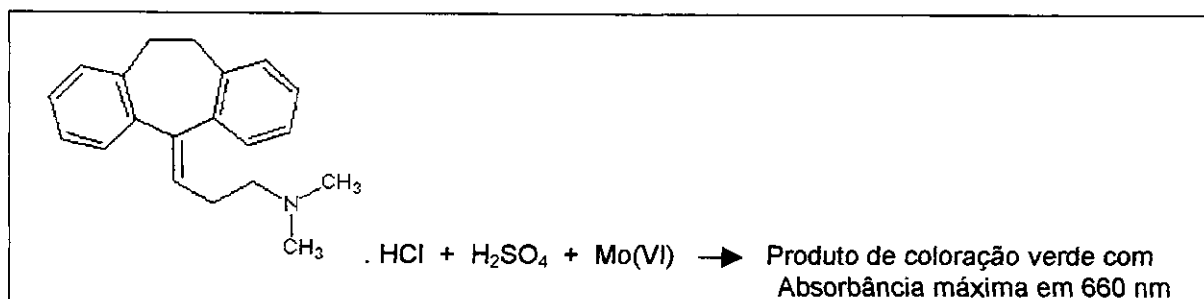


Figura 1.9. Esquema de reação entre Mo(VI), H₂SO₄ e cloridrato de amitriptilina¹³⁴

O trabalho de Aman¹³⁴ ainda destacou que o produto formado poderia ser resultante da ação oxidante do Mo(VI) sobre a amitriptilina. Outros agentes oxidantes como KMnO₄, K₂Cr₂O₇, K₂CrO₄, KIO₃, NaI, H₂O₂, NaNO₃ e NaNO₂ foram testados e não produziram complexos coloridos.

Quando se misturou amitriptilina e Mo(VI) sem adição de H₂SO₄, houve a formação de um precipitado amarelo, que se dissolveu em H₂SO₄ e a solução mudou de coloração amarela para verde. A formação do precipitado foi atribuída à presença de uma amina terciária, que usualmente leva a formação de precipitados¹⁴⁴ em reações. Na adição de H₂SO₄, a presença de íons H⁺ levaria à formação de N(R)₄⁺, que reagiria com o Mo(VI) formando um complexo verde de transferência de carga com absorvância máxima em 660 nm.

Em 2001, Pezza e colaboradores aplicaram o sistema Mo(VI) / H₂SO₄ com acetato de hidrocortisona^{111,112}. O produto de reação também apresentou coloração verde, porém com absorvância máxima em 409 nm (figura 1.10).

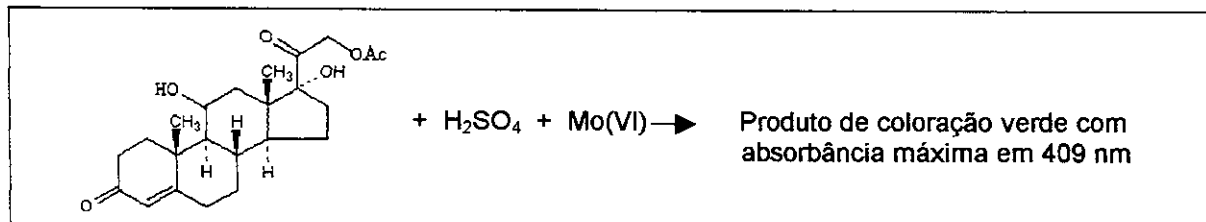


Figura 1.10. Esquema de reação entre Mo(VI) / H₂SO₄ e acetato de hidrocortisona^{111,112}

Assim como no caso da amitriptilina, o sistema Mo(VI) / H₂SO₄ / acetato de hidrocortisona gerou uma metodologia colorimétrica simples, rápida e eficiente para quantificar este composto em formulações farmacêuticas. Ainda não se

encontram trabalhos com informações relevantes para a explicação da reação entre Mo(VI), H₂SO₄ e glicocorticóides. Além disso, apenas no trabalho de Pezza e colaboradores^{111,112} o sistema foi aplicado para desenvolvimento de metodologia analítica, a despeito de seu considerável potencial aplicativo.

1.5.2 Métodos não usuais de medidas fotométricas

Dentre as diversas técnicas para análise quantitativa de espécies químicas, a fotometria merece destaque pois, embora apresente limitações, a qualidade dos resultados fotométricos faz com que a técnica seja amplamente difundida¹⁴⁵.

Métodos fotométricos podem ser colorimétricos e espectrofotométricos¹⁴⁶. Os métodos colorimétricos estão praticamente restritos à região do visível e utilizam detectores visuais ou instrumentais, com filtros (para isolar faixas de comprimentos de onda) ou diretamente a luz branca. Já os métodos espectrofotométricos podem ser aplicados também à região do ultravioleta e utilizam aparelhagem mais elaborada, com uso de radiação monocromática obtida por prismas ou grades de difração em sistemas ópticos de sofisticações variadas¹⁴⁶. A espectrofotometria, apesar da aparelhagem mais elaborada, não deixa de ser uma aplicação de "colorimetria", dada semelhança do sinal medido; a diferença fundamental está na instrumentação que, além de usar radiação monocromática, permite registrar todo o espectro¹⁴⁷ da substância.

Encontram-se na literatura trabalhos com propostas alternativas para aplicação da colorimetria, que não atingem o grau de sofisticação nem o custo dos espectrofotômetros comerciais¹⁴⁸⁻¹⁵³. Como exemplo, há o trabalho de Rossi e colaboradores¹⁵³, que desenvolveram um medidor colorimétrico simples e de baixo custo para rápidas determinações com medidas de resistência elétrica. Neste trabalho, os autores usaram um sensor óptico de medidas de resistência com comportamento que pode ser considerado análogo ao de dispositivos de medidas colorimétricas. O detector utilizado foi um resistor LDR (*Light Detector Resistor*), cujo valor de resistência varia com a intensidade de luz que incide sobre sua superfície, acoplado a um multímetro para a leitura dessa resistência.

O dispositivo portátil consistiu de um LDR montado numa cela de TEFLON[®] grafitado (capacidade para 62 μL de solução). A figura 1.11 ilustra a cela do dispositivo de medidas colorimétricas desenvolvido¹⁵³.

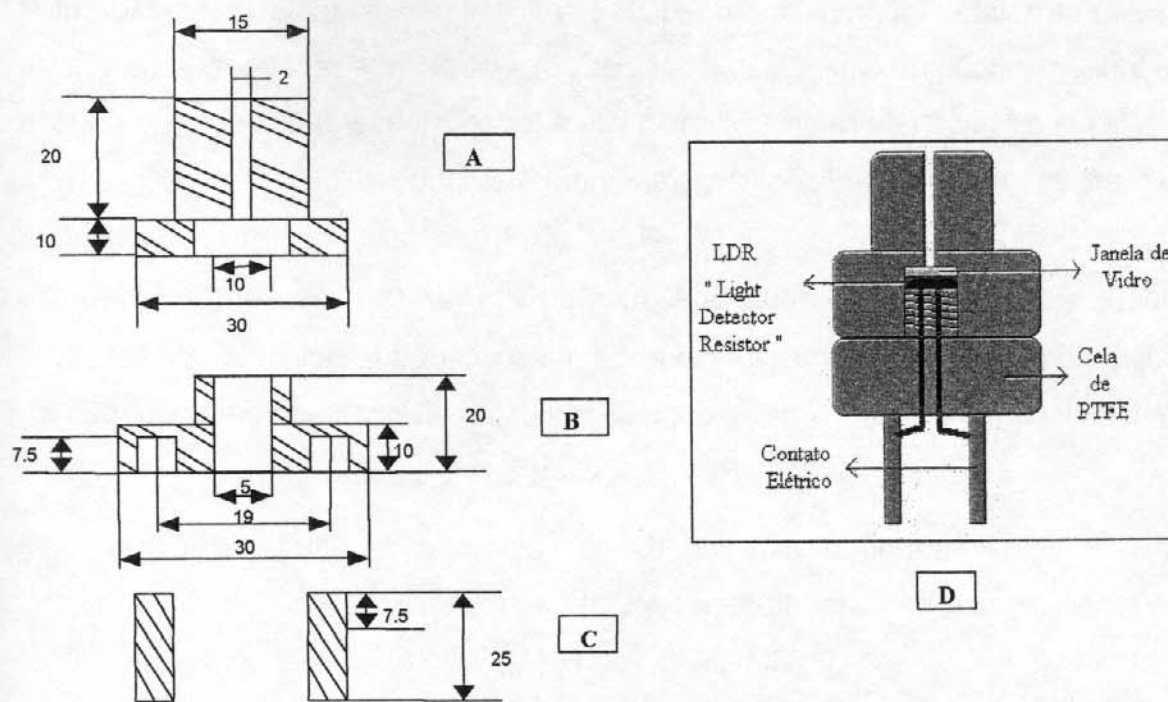


Figura 1.11. Diagrama esquemático do dispositivo utilizado por Rossi e colaboradores¹⁵³, com detalhe para as peças com as dimensões em mm (A, B e C) e ilustração da cela montada (D).

O resistor ao fundo da coluna recebe continuamente iluminação de uma lâmpada de 15W e sua resistência é mostrada no multímetro. Quando a coluna é preenchida com solução, a quantidade de luz que chega ao LDR muda e o valor da resistência é alterado. Na figura 1.11 é possível identificar o caminho óptico, a coluna que é preenchida com a solução colorida **(A)**. Uma janela de vidro é colocada em **a** e abaixo desta o dispositivo LDR é colocado em **b**. As peças **(A)** e **(B)** se encaixam pressionando o LDR e a janela de vidro. O LDR é conectado em **(C)** e encaixados em **(B)**, para o contato elétrico entre o LDR e o multímetro.

Este sistema serviu para determinação de vanádio em efluentes¹⁵³, onde as leituras de resistência foram relacionadas com a concentração de um complexo colorido de vanádio, sendo diretamente proporcionais, de acordo com a equação 1, obtida empiricamente:

$$\Delta R = k \times C_i \quad \text{Equação 1}$$

onde: ΔR = Variação de resistência indicada no multímetro, C_i = Concentração do analito na solução e k = constante de proporcionalidade

Entretanto, foi considerado que o valor de resistência do sensor LDR diminui em função da diminuição de intensidade de luz que recebe e que é correto supor que a relação entre a resistência (R_i) e a intensidade de luz sobre a solução (I_i) é exponencial, podendo ser descrita conforme equação 2:

$$R_i = R_{\infty} - \kappa \log I_i \quad \text{Equação 2}$$

onde: κ = Constante de proporcionalidade e R_{∞} = valor de resistência máxima do sensor obtida quando I_i tende a zero (total ausência de luz incidindo no LDR)

Seja R_b a resistência da solução usada como branco dada pela equação 3:

$$R_b = R_{\infty} - \kappa \log I_b \quad \text{Equação 3}$$

Pode-se subtrair o valor de R_b do valor medido para a amostra (R_i) e rearranjar a equação, obtendo-se a seguinte equação:

$$R_i = R_b - \kappa \log (I_i / I_b) \quad \text{Equação 4}$$

Uma vez que a transmitância (T) de uma solução é dada por I_i / I_b e $-\log T$ é a absorvância ($A = \epsilon b C_i$), então a equação 4 também pode ser descrita por:

$$R_i = R_b + \kappa \epsilon b C_i \quad \text{Equação 5}$$

onde ϵ = absorvividade molar e b = comprimento do caminho óptico.

Considerando $\kappa \epsilon b = k$, a equação 5 pode ser rearranjada e tornar-se a equação 1, obtida empiricamente. Demonstrou-se assim, matematicamente, a correlação das medidas de resistência com medidas colorimétricas.

Este tipo de medidor simples e de baixo custo vem de encontro às necessidades de estabelecimentos com poucos recursos, como por exemplo, laboratórios de pequeno porte e farmácias de manipulação. No caso das farmácias de manipulação, a legislação atual¹⁵⁴ requer a realização de controle de qualidade dos produtos manipulados, o que pode encarecer o processo e acarretar ônus tanto para o estabelecimento quanto para o produto final. Neste contexto, uma proposta com procedimentos simples e de baixo custo, como a utilização do dispositivo portátil, pode ser de interesse.

CAPÍTULO 2:

OBJETIVOS

Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo estudar e desenvolver procedimentos analíticos com medidas de luminescência e colorimétricas para determinação de hidrocortisona.

Para o estudo de luminescência os objetivos foram:

- Estudar a quimiluminescência do sistema químico $\text{Ce (IV) / SO}_3^{2-}$, obtendo-se espectros de quimiluminescência para avaliar o efeito da variação na concentração dos reagentes.
- Investigar as prováveis espécies responsáveis pela quimiluminescência.
- Verificar as eventuais propriedades de fluorescência do sistema químico $\text{Ce(IV) / SO}_3^{2-}$ e o efeito da variação na concentração dos reagentes.
- Verificar a influência da adição de hidrocortisona na luminescência do sistema $\text{Ce(IV) / SO}_3^{2-}$ e sua aplicabilidade para procedimento analítico para determinação de hidrocortisona.

No estudo colorimétrico, os objetivos foram:

- Investigar o sistema químico $\text{Mo(VI) / H}_2\text{SO}_4$ / hidrocortisona por analogia com o sistema $\text{Mo(VI) / H}_2\text{SO}_4$ / acetato de hidrocortisona.
- Desenvolver e validar metodologia analítica colorimétrica para determinação de hidrocortisona em formulações farmacêuticas comerciais.
- Adaptar o método colorimétrico desenvolvido para uso em dispositivo portátil de grande simplicidade e baixo custo.
- Estudar o comportamento do sistema químico $\text{Mo(VI) / H}_2\text{SO}_4$ na presença de algumas substâncias derivadas da hidrocortisona, discutindo alguns aspectos da reação envolvida.
- Avaliar a metodologia analítica colorimétrica na determinação de hidrocortisona em formulações farmacêuticas comerciais.

CAPÍTULO 3:

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

Para preparar todas as soluções utilizadas neste trabalho, foram utilizados reagentes de pureza analítica, marcas Merck, Sigma e Nuclear e água destilada (destilador de vidro).

Segue a descrição do procedimento de preparo de todas as soluções estoque utilizadas que foram padronizadas, nos casos recomendados pela literatura¹⁴⁵. Em função dos resultados obtidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho, optou-se, em alguns casos, pelo preparo diário de algumas soluções.

3.1.1 Solução de sulfato de cério (IV) amoniacal

A solução de sulfato de cério amoniacal $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução do sal $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (massa molar $632,58 \text{ g mol}^{-1}$) em solução de ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.2 Solução de sulfito de sódio

A solução de sulfito de sódio $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução do sal Na_2SO_3 (massa molar $126,04 \text{ g mol}^{-1}$) em água destilada.

3.1.3 Solução de hidrocortisona em H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$

Para o preparo da solução estoque de hidrocortisona $2,79 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pesou-se $0,0506 \text{ g}$ do reagente $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$ (massa molar $362,47 \text{ g mol}^{-1}$). A massa foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL contendo cerca de 300 mL de solução de ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Agitação constante ou ultra-som foram utilizados no processo de dissolução do reagente e a seguir completou-se o volume com solução de ácido sulfúrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.4 Soluções de ácido sulfúrico

Soluções $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e $9,00 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico foram obtidas por diluição do ácido concentrado (18 mol L^{-1}) com água destilada.

3.1.5 Solução de molibdato de amônio

A solução de molibdato de amônio foi preparada pela dissolução de 2,00 g do sal $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (massa molar $1163,80 \text{ g mol}^{-1}$) em 100 mL de água destilada, originando uma solução $1,62 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.6 Solução de hidrocortisona em clorofórmio

Esta solução foi preparada pela dissolução de 0,0100 g de $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$ (massa molar $362,47 \text{ g mol}^{-1}$), em balão volumétrico de 10 mL, com clorofórmio, originando uma solução $2,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.7 Solução de acetato de hidrocortisona

Esta solução foi preparada pela dissolução de 0,0100 g de $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_6$ (massa molar $404,50 \text{ g mol}^{-1}$), em balão volumétrico de 10 mL com clorofórmio, originando uma solução $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.8 Solução de cortisona

Esta solução foi preparada pela dissolução de 0,0100 g de $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_5$ (massa molar $360,45 \text{ g mol}^{-1}$), em balão volumétrico de 10 mL, com clorofórmio, originando uma solução $2,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.9 Solução de acetato de cortisona

Esta solução foi preparada pela dissolução de 0,0100 g de $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_6$ (massa molar $402,49 \text{ g mol}^{-1}$), em balão volumétrico de 10 mL, com clorofórmio, originando uma solução $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.10 Solução de acetato de dexametasona

Esta solução foi preparada pela dissolução de 0,0100 g de $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{FO}_6$ (massa molar $434,51 \text{ g mol}^{-1}$), em balão volumétrico de 10 mL, com clorofórmio, originando uma solução $2,30 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

3.2 Equipamentos utilizados

Nos estudos da quimiluminescência e fluorescência do sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$, utilizou-se um espectrofluorímetro Aminco SPF-500C (figura 3.1) acoplado a um banho termostático Lauda RC6 e cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm.

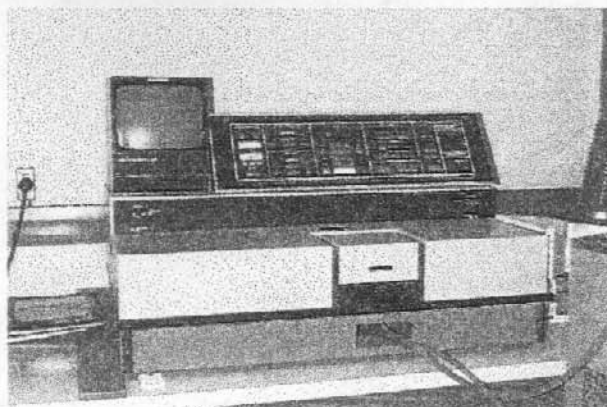


Figura 3.1. Espectrofluorímetro Aminco SPF-500C

A figura 3.2 ilustra o sistema óptico do espectrofluorímetro, indicando pela letra **A** as fendas de passagem de radiação com larguras ajustáveis (0 a 15 nm). Além disso ilustra a lâmpada de xenônio 250W, usada como fonte de excitação, e o dispositivo indicado pela letra **B**, que foi usado para barrar a incidência de radiação sobre a amostra no caso de estudos de quimiluminescência, uma vez que o espectrofluorímetro não funciona com a fonte de excitação desligada.

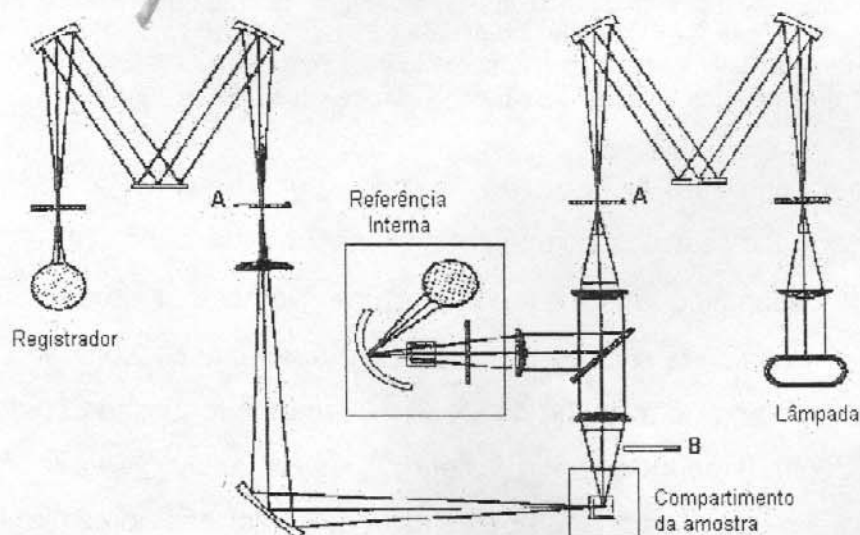


Figura 3.2. Sistema óptico do espectrofluorímetro Aminco SPF-500C

Nos estudos colorimétricos da reação de hidrocortisona e $\text{Mo(VI)} / \text{H}_2\text{SO}_4$ utilizou-se um espectrofotômetro UV/Vis Pharmacia Biotech modelo Ultrospec 2000 e cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Nesses estudos colorimétricos também se utilizou um dispositivo de medidas portátil, montado anteriormente¹⁵³ (figura 3.3a) e com cela de medidas adaptada para este trabalho com o uso de tubos de vidro (tipo Duran¹⁵⁵) com capacidade para 1,4 mL (figura 3.3b).

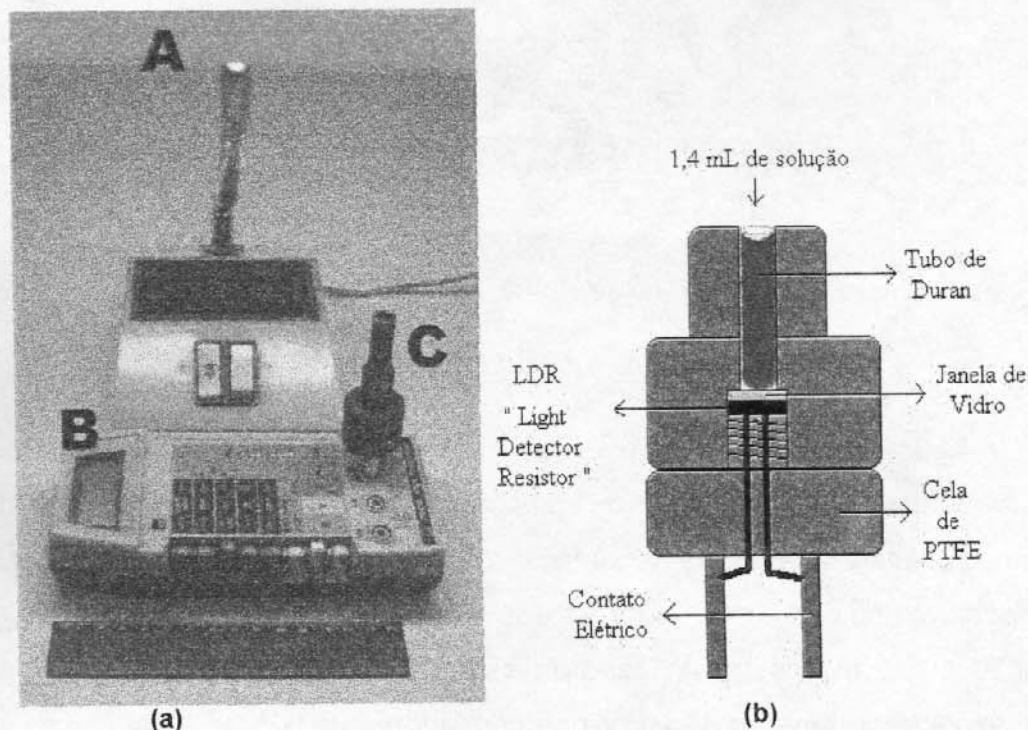


Figura 3.3. Dispositivo portátil de medidas: (a) Montagem utilizada para realizar medidas fotométricas incluindo A -fonte de luz (luminária com lâmpada de 15W), B -multímetro, C-dispositivo de medidas fotométricas e uma régua de 15 cm para dar idéia da dimensão. (b) Esquema da cela de medidas confeccionada em TEFLON[®] grafitado.

Este dispositivo é análogo ao descrito por Rossi e colaboradores¹⁵³. Entretanto, neste dispositivo, a solução não preenche o caminho óptico do tubo de TEFLON[®], ela é acondicionada em tubos de Duran (removidos do dispositivo após cada medida para limpeza e troca de solução) e o volume de solução utilizado é de 1,4 mL. Assim como no trabalho de Rossi¹⁵³, também foi utilizado uma fonte de luz incidindo continuamente sobre o sistema, para evitar outras variações de luz sobre o LDR, além das ocasionadas pelas soluções coloridas no caminho óptico.

3.3 Procedimento experimental

3.3.1 Estudo com reação de luminescência

Inicialmente, trabalhou-se com o sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$ que, conforme descrito no item 1.3, foi proposto por Calokerinos e colaboradores^{97,98} para determinação em fluxo de hidrocortisona, baseado em seu efeito sensibilizador sobre a quimiluminescência da reação. No presente trabalho, o sistema foi estudado em modo estacionário com modificações nas concentrações iniciais dos reagentes usados por Calokerinos^{97,98}. O procedimento experimental consistiu em injetar, com um sistema manual de injeção simultânea¹⁵⁶ (figura 3.4-1C), 1,0 mL da solução SO_3^{2-} $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e 1,0 mL da solução hidrocortisona em H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ simultaneamente sobre a solução de Ce(IV) , conforme figura 3.4-2.

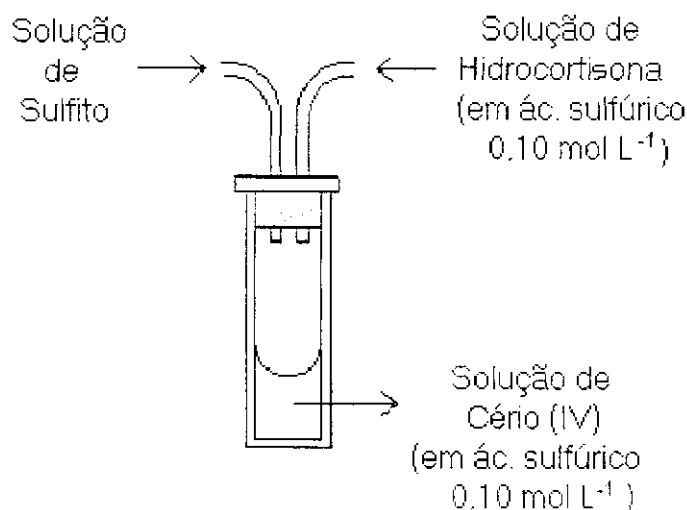


Figura 3.4. Descrição esquemática do procedimento de injeção na cela de reação

A emissão do sistema foi registrada imediatamente após a injeção, de 300 a 500 nm, a $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$, com largura de fenda de emissão 7,5 nm. Nesta abertura de fenda foi obtida a melhor relação sinal/ruído. O tempo total de registro de emissão foi de aproximadamente 5 s. Seguindo este procedimento, foram obtidas soluções: Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e hidrocortisona 0 a $8,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Este procedimento foi realizado para obtenção dos espectros de emissão de quimiluminescência e de fluorescência.

Nos estudos de quimiluminescência, o espectrofluorímetro foi utilizado mantendo-se fechado o dispositivo indicado pela letra **B** na figura 3.2, a fim de evitar incidência de radiação na solução. No estudo de fluorescência, as fendas de excitação e emissão foram mantidas em 7,5 nm (melhor relação sinal/ruído encontrada) e trabalhou-se com radiação de excitação em 290 nm. Todos os ensaios no estudo de luminescência foram efetuados pelo menos em duplicata e as diluições necessárias foram feitas com água destilada ou H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

3.3.2 Estudo com reação colorimétrica

Nesta etapa, trabalhou-se com o sistema $\text{Mo(VI)} / \text{H}_2\text{SO}_4$ e hidrocortisona. O procedimento experimental para obtenção do produto de reação foi o mesmo descrito por Pezza e colaboradores^{111,112} no estudo do sistema $\text{Mo(VI)} / \text{H}_2\text{SO}_4$ e acetato de hidrocortisona. O procedimento consistiu em transferir, com pipetas automáticas SciTech, 250 μL de solução hidrocortisona ($0,50$ a $2,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em clorofórmio (descritas na tabela 3.1), 750 μL de água destilada, 3,00 mL de solução H_2SO_4 $9,00 \text{ mol L}^{-1}$ e 1,00 mL de solução de molibdato de amônio $1,62 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para tubos de ensaio de 10 mL, nesta ordem de adição, sempre mantendo os tubos fechados com tampas de borracha. Nesta etapa ocorre a formação de duas fases (água / clorofórmio) no tubo de ensaio. Foram preparados 3 tubos de ensaio para cada concentração de hidrocortisona (triplicatas).

Os tubos de ensaio foram aquecidos em banho-maria a 94°C por 40 minutos, substituindo-se as tampas de borracha dos tubos por fitas de TEFLON[®] perfuradas, para permitir a lenta evaporação do CHCl_3 . Nesta etapa, o aquecimento inicia a reação para formação de um produto de coloração amarela. Após o aquecimento, os tubos foram resfriados em banho de gelo por 10 minutos e mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos para, em seguida, registrar o espectro da solução resultante de 300 a 800 nm. Durante esta etapa de resfriamento, a coloração do produto de reação passava de amarela para verde.

É importante destacar que durante a etapa de aquecimento, a presença da fita de TEFLON[®] garante que ocorra uma lenta evaporação da fase orgânica, de forma que a hidrocortisona passe lentamente para a fase aquosa, reagindo com o

Mo(VI). A figura 3.5 ilustra o procedimento experimental descrito para obtenção do produto de reação. Nesta ilustração, indica-se a observação de separação de fases no tubo de reação, o que se desfazia durante a etapa de aquecimento.

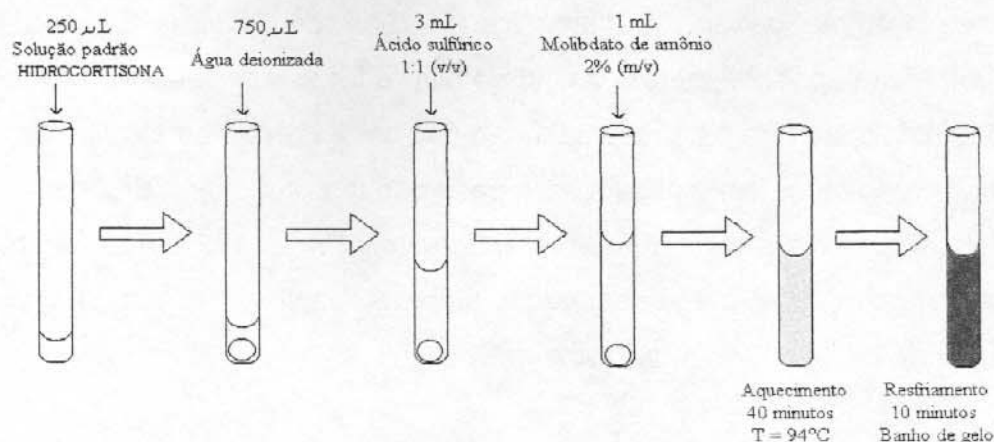


Figura 3.5. Esquema simplificado do procedimento analítico colorimétrico para hidrocortisona.

A tabela 3.1 descreve as quantidades de solução de hidrocortisona $2,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e clorofórmio, adicionadas em cada tubo de ensaio para obtenção de 250 µL de soluções com diferentes concentrações de hidrocortisona para construção da curva de calibração, lembrando que foram preparados 3 tubos de ensaio para cada concentração de utilizada (triplicata).

Tabela 3.1. Preparo da solução de hidrocortisona para curva de calibração

Volume de solução hidrocortisona $2,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (µL)	Volume de CHCl_3 (µL)	Concentração final de hidrocortisona ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)
0	250	0
50	200	0,50
75	125	0,80
100	150	1,10
125	75	1,40
200	50	2,20
250	0	2,80

Além das medidas espectrofotométricas, as soluções resultantes da reação entre Mo(VI), H_2SO_4 e hidrocortisona também foram medidas fotometricamente, utilizando-se dispositivo portátil descrito no item 3.2. O procedimento experimental consistiu em, primeiramente, ajustar valor de resistência $3,00 \times 10^3 \Omega$ no

multímetro, pelo adequado posicionamento da fonte de luz, cerca de 30 cm acima da cela de medida contendo apenas o tubo de vidro Duran vazio. Este valor foi considerado como “branco”. Em seguida, com uma pipeta automática SciTech, adicionou-se 1,40 mL da solução amostra no tubo de vidro e a medida da resistência foi feita após 2 minutos, quando a leitura foi estabilizada. Uma vez que as soluções utilizadas foram as mesmas medidas por espectrofotometria, também foram obtidos resultados em triplicata para cada concentração de hidrocortisona.

É importante ressaltar que este procedimento foi otimizado quanto à posição da lâmpada sobre o equipamento, o valor usado como “branco” e o tempo de espera antes da leitura no multímetro.

3.3.2.1 Figuras de mérito

Na sequência, descrevem-se procedimentos de obtenção de algumas figuras de mérito da proposta analítica com medidas espectrofotométricas para determinação de hidrocortisona.

3.3.2.1.1 Precisão das medidas

Para avaliar a precisão das medidas, foi realizado um ensaio de repetibilidade¹⁵⁷ de resultados. Para isto, foram preparadas 10 amostras contendo hidrocortisona $1,10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (diluição de 100 μL da solução $2,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hidrocortisona padrão para 250 μL com clorofórmio) e aplicou-se procedimento descrito no item 3.3.2. A seguir mediu-se a absorbância em 409 nm das soluções contendo o produto de reação e calculou-se a quantidade de hidrocortisona aplicando-se a curva de calibração cuja construção é descrita no item 3.3.2.

3.3.2.1.2 Limites e linearidade

O limite de detecção, determinação e a linearidade foram obtidos e/ou calculados a partir dos resultados do procedimento descrito no item 3.3.2, de construção da curva de calibração.

3.3.2.1.3 Fator de recuperação

O teste de recuperação foi realizado por fortificação de uma formulação farmacêutica comercial (amostra líquida contendo hidrocortisona em suspensão) a níveis de 17,4%, 30,9% e 40,1% sobre o valor nominal descrito no rótulo.

As amostras fortificadas foram tratadas seguindo procedimento analítico descrito no item 3.3.2 e o fator de recuperação foi calculado considerando 100% a quantidade de padrão hidrocortisona adicionado.

3.3.2.2 Estudos com derivados da hidrocortisona

O procedimento realizado no estudo do sistema Mo(VI) / H₂SO₄ e acetato de hidrocortisona foi o mesmo utilizado para a hidrocortisona (item 3.3.2).

Para cortisona, acetato de cortisona e acetato de dexametasona, o volume de solução padrão adicionado ao tubo de ensaio foi 750 µL (ao invés de 250 µL). Esta alteração no volume de solução padrão adicionado teve como objetivo otimizar a curva de calibração destes derivados. O procedimento de adição de soluções no tubo de ensaio de 10 mL ficou: 750 µL de solução padrão em clorofórmio, 750 µL de água destilada, 3,00 mL de solução H₂SO₄ 9,00 mol L⁻¹ e 1,00 mL de solução de Mo(VI) 1,62×10⁻² mol L⁻¹, nesta ordem de adição.

As tabelas 3.2 a 3.5 descrevem diluições da solução padrão de cada composto para construção da curva de calibração, partindo-se das respectivas soluções-estoque.

Tabela 3.2. Preparo da solução de acetato de hidrocortisona para curva de calibração

Volume de solução acetato de hidrocortisona $2,80 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ (µL)	Volume de CHCl ₃ (µL)	Concentração final (10 ⁻³ mol L ⁻¹)
0	250	0
50	200	0,50
75	125	0,70
100	150	1,00
125	75	1,20
200	50	2,00
250	0	2,50

Tabela 3.3. Preparo da solução de cortisona para curva de calibração

Volume de solução cortisona $2,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (μL)	Volume de CHCl_3 (μL)	Concentração final ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) ₂
0	750	0
250	500	0,90
370	380	1,40
500	250	1,90
620	130	2,30
750	0	2,80

Tabela 3.4. Preparo da solução de acetato de cortisona para curva de calibração

Volume de solução acetato de cortisona $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (μL)	Volume de CHCl_3 (μL)	Concentração final ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) ₂
0	750	0
250	500	0,80
370	380	1,20
500	250	1,70
620	130	2,00
750	0	2,50

Tabela 3.5. Preparo da solução de acetato de dexametasona para curva de calibração

Volume de solução acetato de dexametasona $2,30 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (μL)	Volume de CHCl_3 (μL)	Concentração final ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) ₂
0	750	0
250	500	0,80
370	380	1,10
500	250	1,50
620	130	1,90
750	0	2,30

Para avaliar a absorbância dos produtos de reação de cada corticóide (na mesma concentração em mol L^{-1}) preparou-se soluções de hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, cortisona, acetato de cortisona e acetato de dexametasona, todas $1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, estas soluções foram utilizadas, separadamente, no procedimento descrito no item 3.3.2 (também em triplicatas) e as soluções resultantes tiveram suas absorbâncias registradas de 300 a 800 nm.

3.3.2.3 Teste com medicamentos comerciais

Foram testadas duas amostras de formulações farmacêuticas comerciais: uma amostra líquida contendo hidrocortisona em suspensão e uma amostra na forma de pomada (base oleosa) contendo acetato de cortisona. Nenhum dado da

literatura consultada¹⁵⁸⁻¹⁶³ indicou reatividade com Mo(VI) / H₂SO₄ para qualquer um dos demais constituintes das duas formulações.

3.3.2.3.1 Hidrocortisona

A primeira etapa dos testes com amostra de formulação farmacêutica comercial foi buscar na literatura¹⁵⁸ uma amostra que pudesse ser utilizada diretamente no procedimento analítico descrito no item 3.3.2 e que apresentasse em sua fórmula outras substâncias além da hidrocortisona. Para preservar o produto e a Empresa, o medicamento escolhido foi descrito como “amostra comercial”. Entretanto, vale ressaltar que trata-se de um medicamento líquido (suspensão) contendo hidrocortisona em associação com outros princípios ativos, os quais não atuam como interferentes no sistema reacional¹⁵⁹⁻¹⁶³.

Primeiramente construiu-se uma curva de adição de padrão com medidas por espectrofotometria; para isto, alíquotas de 25 µL da amostra comercial foram adicionadas a cada tubo de ensaio antes da adição das demais soluções no procedimento analítico descrito no item 3.3.2. Esses 25 µL, de acordo com as especificações do fabricante, deveriam conter $2,70 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hidrocortisona.

O mesmo medicamento utilizado para obtenção da curva de adição de padrão foi usado para quantificar hidrocortisona aplicando-se a curva de calibração. Dentre todos os compostos constituintes da amostra real, tanto princípios ativos quanto excipientes, somente a hidrocortisona apresenta solubilidade em clorofórmio. Em razão disto optou-se por fazer a extração da hidrocortisona utilizando clorofórmio como solvente extrator. Desta forma, a solução resultante pode ser utilizada diretamente como “solução de hidrocortisona” no procedimento analítico já descrito no item 3.3.2

O procedimento consistiu em adicionar, com uma pipeta automática SciTech, 1,00 mL de amostra e 5,00 mL de clorofórmio em funil de separação para extração da hidrocortisona presente em suspensão. Foram realizadas 3 extrações consecutivas e a fase contendo clorofórmio foi recolhida em balão volumétrico, com volume completado a 25,00 mL com clorofórmio. Este procedimento originou uma solução que deveria conter hidrocortisona na faixa de $(0,9 \text{ a } 1,2) \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$,

segundo especificações do fabricante do medicamento. Esta solução foi utilizada como solução de hidrocortisona no procedimento descrito no item 3.3.2, realizado em triplicata, e a absorbância do produto final foi medida por espectrofotometria.

A solução resultante também teve sua resistência medida no dispositivo portátil e aplicada sobre a curva de calibração fotométrica, obtendo-se também uma determinação fotométrica para eventual comparação com os resultados obtidos por espectrofotometria. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

3.3.2.3.2 Acetato de cortisona

Com base nos resultados obtidos para as curvas de calibração por espectrofotometria das substâncias derivadas da hidrocortisona, que foram obtidas neste trabalho (item 4.2.2), optou-se por testar a quantificação de acetato de cortisona, já que sua curva de calibração apresentou, dentre os derivados testados, melhor linearidade.

Há atualmente no mercado um medicamento contendo esta substância como princípio ativo, também em associação com outras substâncias que não apresentam reatividade com $\text{Mo(VI)} / \text{H}_2\text{SO}_4$ ¹⁵⁹⁻¹⁶³. Do mesmo modo que foi feito para hidrocortisona, também se optou por preservar o nome do produto e do fabricante, sendo o mesmo descrito apenas como “amostra comercial”.

Para a amostra de formulação farmacêutica comercial (pomada) contendo acetato de cortisona como princípio ativo, o procedimento de preparo consistiu em solubilizar 1,3448 g de amostra em 5,00 mL de clorofórmio. Este procedimento originou uma solução que deveria conter acetato de cortisona na faixa de $(1,20 \text{ a } 1,47) \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, segundo especificações do fabricante do medicamento. Um volume de 750 μL desta solução foi adicionado ao tubo de ensaio e submetido ao procedimento analítico descrito no item 3.3.2, realizado em triplicata.

A solução resultante, quando necessário, foi submetida a filtração com papel comum e teve sua absorbância registrada de 300 a 800 nm e sua resistência medida no dispositivo portátil. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

CAPÍTULO 4:

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo com reação de luminescência

4.1.1 Comportamento de quimiluminescência

Neste trabalho, o sistema em fluxo descrito por Calokerinos^{97,98} foi adaptado para medidas em sistema estacionário. Isto permitiu obter experimentalmente espectros de quimiluminescência do sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$ (figura 4.1) e também atestou que a quimiluminescência deste sistema dura pelo menos por 5 s.

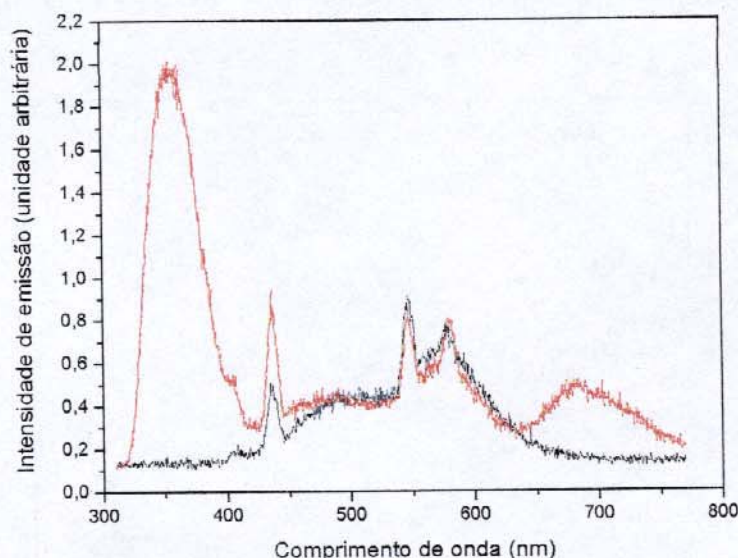


Figura 4.1. Perfil de emissão de quimiluminescência de soluções, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$:
(largura de fenda de emissão 7,5 nm)
— $\text{Ce(IV)} 1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{H}_2\text{SO}_4 0,10 \text{ mol L}^{-1}$
— $\text{Ce(IV)} 3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{SO}_3^{2-} 3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{H}_2\text{SO}_4 6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$

A figura 4.1 mostra o espectro de emissão da solução $\text{Ce(IV)} 3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{SO}_3^{2-} 3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em meio $\text{H}_2\text{SO}_4 6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, com largura de fenda de emissão 7,5 nm. Após a injeção da solução de SO_3^{2-} , notou-se o aparecimento de duas regiões com aumento significativo na emissão, em 370 nm e 690 nm. Entretanto, somente a região em 370 nm foi considerada em estudos posteriores, por representar a emissão mais intensa.

Com base em trabalhos da literatura^{125,126}, pode-se perceber que este espectro apresenta um perfil semelhante ao espectro de emissão de fluorescência

da espécie Ce(III). Uma vez que esta espécie também é apontada^{128,129} em alguns trabalhos como sendo a espécie responsável pela emissão quimiluminescente do sistema Ce(IV) / SO_3^{2-} , este resultado representa importante contribuição para futuramente identificarem-se as possíveis espécies responsáveis pela emissão.

4.1.1.1 Estudo da estabilidade dos reagentes

Estudos iniciais avaliaram a quimiluminescência do sistema Ce(IV) / SO_3^{2-} com soluções recém preparadas. A figura 4.1, apresentada anteriormente, mostra o espectro de emissão do sistema Ce(IV) / SO_3^{2-} com soluções recém-preparadas.

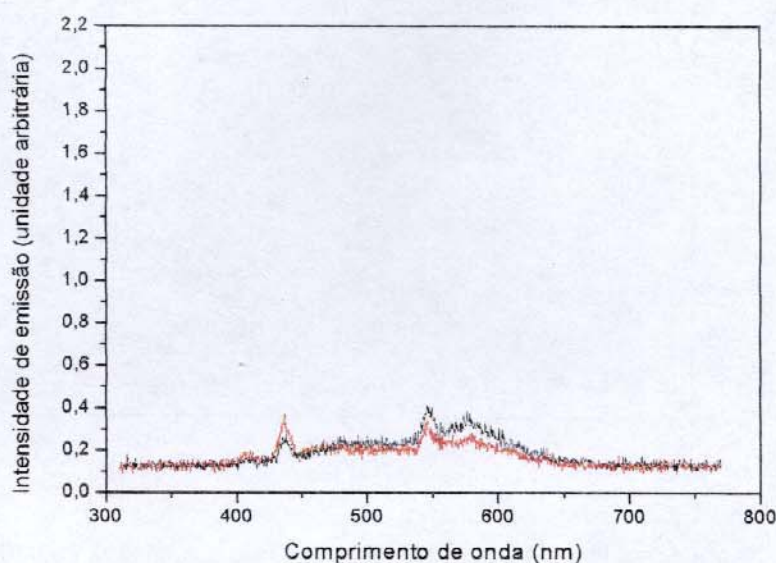


Figura 4.2. Perfil de emissão de quimiluminescência de soluções, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$:
(largura de fenda de emissão 7,5 nm)

— Ce(IV) $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$
— Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ "envelhecida".

Em seguida, realizou-se um estudo para de verificar a estabilidade das soluções de Ce(IV) e SO_3^{2-} . A figura 4.2 mostra o espectro de emissão de uma solução Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, obtido com largura de fenda de emissão 7,5 nm. Neste caso, a solução de Ce(IV) foi preparada no dia da medida e a solução de SO_3^{2-} foi preparada no dia anterior, sendo descrita como "envelhecida". Observou-se que o espectro de emissão após a injeção das soluções praticamente não se altera, não ocorrendo variação na

intensidade de emissão em 370nm, nem em 690nm. Este fato não apenas evidencia a influência deste reagente na reação de quimiluminescência como também confirma a conhecida instabilidade das soluções de SO_3^{2-} ¹⁶⁴, que podem gerar HSO_3^- e OH^- ¹⁶⁴. Para não comprometer o resultado dos experimentos, optou-se pelo preparo diário da solução de SO_3^{2-} .

A figura 4.3 mostra o espectro de emissão de uma solução $\text{Ce(IV)}\ 3,33\times 10^{-3}\ \text{mol L}^{-1}$, $\text{SO}_3^{2-}\ 3,33\times 10^{-3}\ \text{mol L}^{-1}$ e $\text{H}_2\text{SO}_4\ 6,7\times 10^{-2}\ \text{mol L}^{-1}$, obtido com largura de fenda de emissão 7,5 nm. Neste caso, ao contrário do ensaio anterior, a solução de Ce(IV) foi preparada no dia anterior ("envelhecida") e a solução de SO_3^{2-} foi preparada no dia da medida. Observou-se que apesar de ocorrer o aumento na intensidade de emissão em 370nm e em 690nm, este foi menos intenso, indicando que o envelhecimento da solução de Ce(IV) em apenas 24h também pode comprometer os resultados, o que ainda não havia sido descrito na literatura.

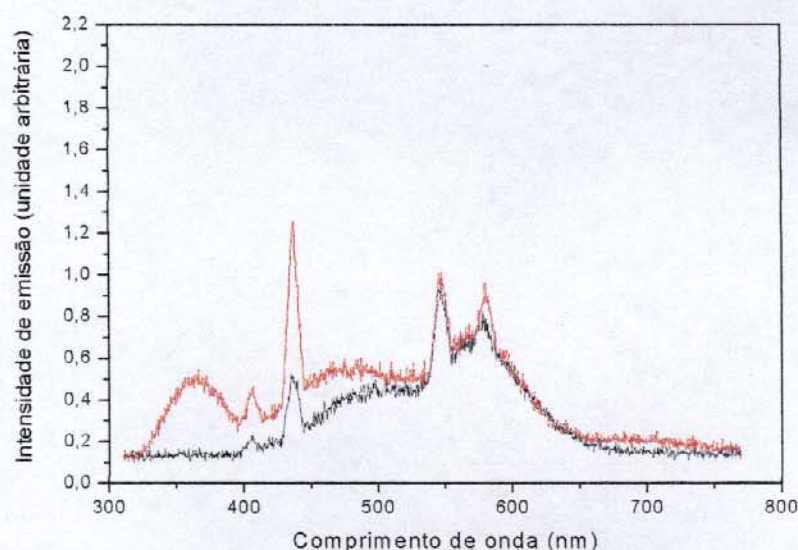


Figura 4.3. Perfil de emissão de quimiluminescência de soluções, a $25,0\pm 0,1^\circ\text{C}$:
(largura de fenda de emissão 7,5 nm)
— $\text{Ce(IV)}\ 1,00\times 10^{-2}\ \text{mol L}^{-1}$ e $\text{H}_2\text{SO}_4\ 0,10\ \text{mol L}^{-1}$
— $\text{SO}_3^{2-}\ 3,33\times 10^{-3}\ \text{mol L}^{-1}$, $\text{H}_2\text{SO}_4\ 6,7\times 10^{-2}\ \text{mol L}^{-1}$ e $\text{Ce(IV)}\ 3,33\times 10^{-3}\ \text{mol L}^{-1}$ "envelhecida".

Também foi observado o aparecimento de um precipitado em soluções de Ce(IV) em meio $\text{H}_2\text{SO}_4\ 0,10\ \text{mol L}^{-1}$ mantidas em frascos fechados, ao abrigo da luz, por um tempo de 15 dias. Estas observações foram contrárias a estudos

anteriores¹²⁴, que apontaram a solução de Ce(IV) como estável, podendo ser preparada a partir de solução-estoque concentrada, capaz de manter as condições de uso por semanas. Para o presente estudo, optou-se pelo preparo diário da solução de Ce(IV), a fim de não comprometer os resultados

4.1.1.2 Efeito da variação na concentração dos reagentes

Nesta etapa, efetuou-se um estudo com o objetivo de verificar o comportamento da quimiluminescência do sistema quando submetido à variação na concentração de Ce(IV) e SO_3^{2-} . Inicialmente, estudou-se a variação na concentração de SO_3^{2-} . A figura 4.4 mostra o espectro de emissão (obtido com largura de fenda de emissão 7,5 nm) de uma solução Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, com variação na concentração de solução de SO_3^{2-} .

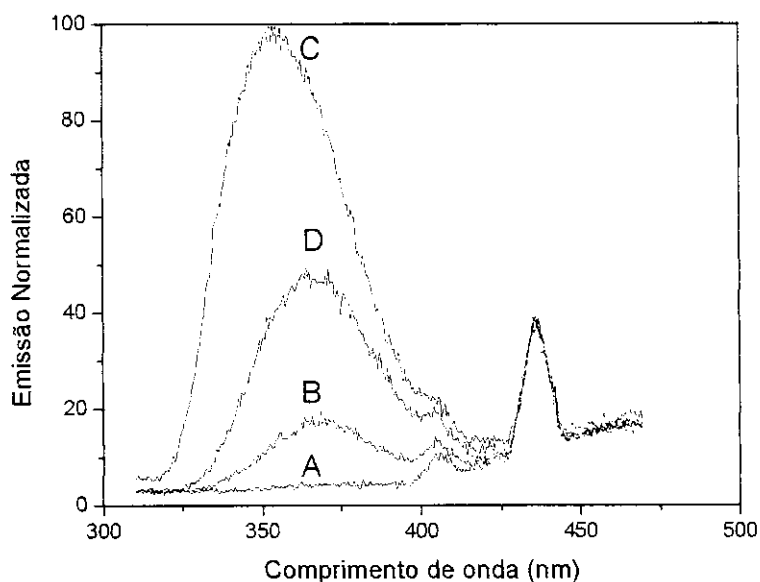


Figura 4.4. Efeito da variação da concentração de SO_3^{2-} nos espectros de quimiluminescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Largura de fenda de emissão = 7,5 nm. Concentração de SO_3^{2-} em mol L^{-1} : (A) $2,33 \times 10^{-3}$ (B) $2,66 \times 10^{-3}$ (C) $3,00 \times 10^{-3}$ (D) $3,33 \times 10^{-3}$

Para facilitar a comparação visual dos dados, adotou-se o uso da emissão normalizada (En) para as representações dos espectros:

$$En = \frac{\text{Emissão medida}}{\text{Emissão máxima}} \times 100$$

Equação 6

Observando a figura 4.4, foi possível notar uma diminuição no comprimento de onda de emissão máxima em função do aumento na concentração de SO_3^{2-} . Para concentrações maiores de SO_3^{2-} (pontos C e D), o comprimento de onda de emissão máxima passou de 370 nm para cerca de 360 nm. A figura 4.5 descreve a variação da intensidade de quimiluminescência do sistema, em 370 nm, em função da concentração de SO_3^{2-} presente, com “tendência” linear ($r = 0,848$).

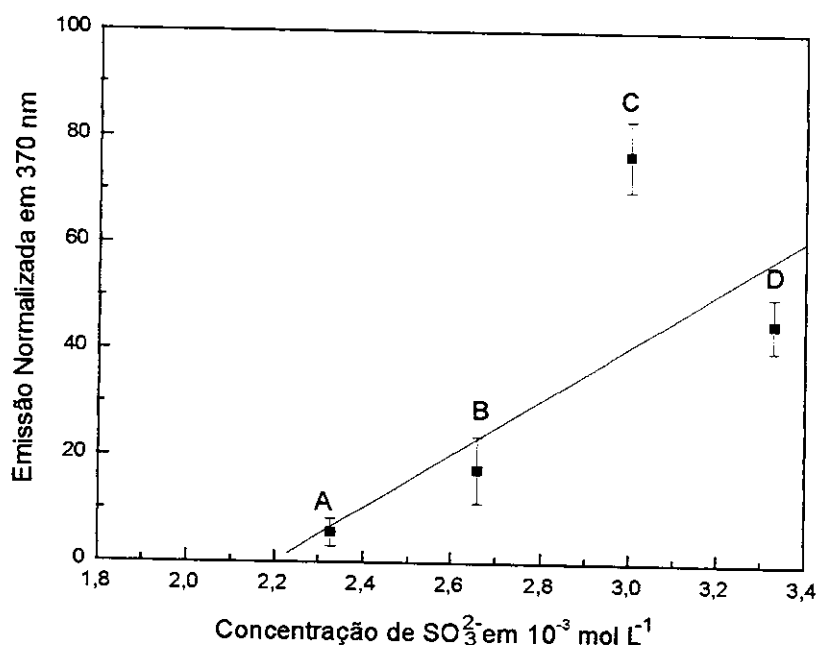


Figura 4.5. Efeito da variação da concentração de SO_3^{2-} , em 370 nm, na quimiluminescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução $\text{Ce(IV)} 3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{H}_2\text{SO}_4 6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Largura de fenda de emissão = 7,5 nm. Concentração de SO_3^{2-} em mol L^{-1} : (A) $2,33 \times 10^{-3}$ (B) $2,66 \times 10^{-3}$ (C) $3,00 \times 10^{-3}$ (D) $3,33 \times 10^{-3}$

Já o comportamento da quimiluminescência do sistema quando submetido à variação na concentração de Ce(IV) é mostrado na figura 4.6, com solução $\text{SO}_3^{2-} 3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{H}_2\text{SO}_4 6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Quando se variou a concentração de Ce(IV) , também se notou um ligeiro deslocamento no comprimento de onda de emissão máxima em função da concentração. Entretanto, neste caso ocorre

deslocamento para comprimentos de onda maiores, ou seja, o comprimento de onda de emissão máxima aumenta com o aumento da concentração de Ce(IV) (pontos F, G, H e I da figura 4.6).

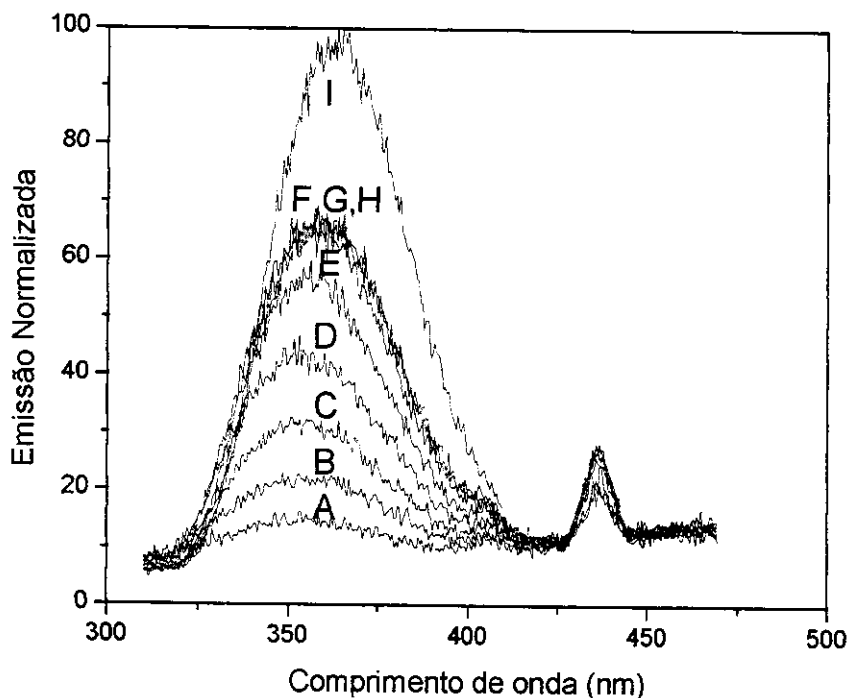


Figura 4.6. Efeito da variação da concentração de Ce(IV) nos espectros de quimiluminescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Largura de fenda de emissão = 7,5 nm. Concentração de Ce(IV) em mol L^{-1} : (A) $0,33 \times 10^{-3}$ (B) $0,66 \times 10^{-3}$ (C) $1,00 \times 10^{-3}$ (D) $1,33 \times 10^{-3}$ (E) $1,66 \times 10^{-3}$ (F) $2,00 \times 10^{-3}$ (G) $2,33 \times 10^{-3}$ (H) $2,66 \times 10^{-3}$ (I) $3,33 \times 10^{-3}$

Além do deslocamento no comprimento de onda de emissão máximo, também foi observado na variação da concentração de Ce(IV) que houve um aumento na emissão em 370 nm em função da variação na concentração, mostrado na figura 4.7.

Percebeu-se que, também neste caso, o comportamento segue uma variação com “tendência” linear, como mostra a linha sobre os pontos ($r = 0,996$). Esta tendência não é observada para toda a faixa de concentração (pontos G e H), o que pode indicar que em alguns pontos, a variação na concentração de Ce(IV) não altera a quimiluminescência da reação.

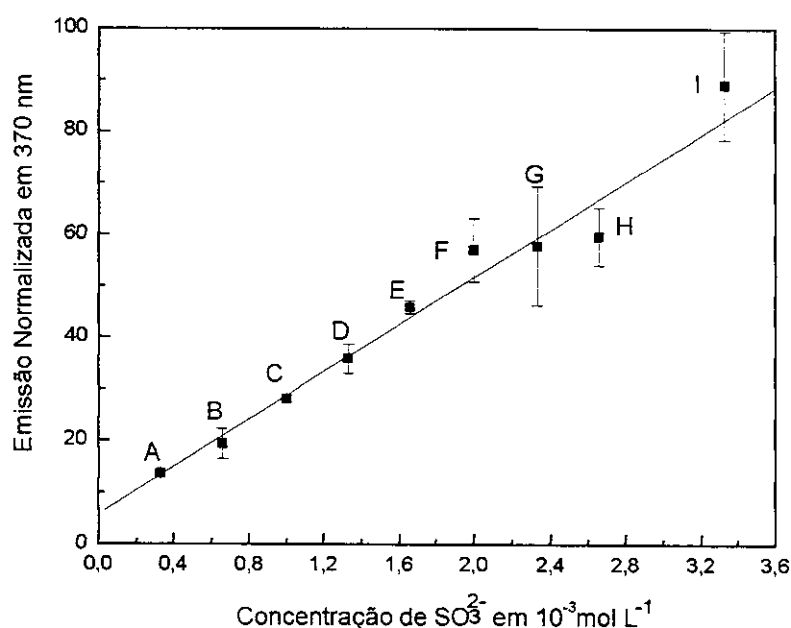


Figura 4.7. Efeito da variação da concentração de Ce(IV), em 370nm, na quimiluminescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Largura de fenda de emissão = 7,5 nm. Concentração de Ce(IV) em mol L^{-1} : (A) $0,33 \times 10^{-3}$ (B) $0,66 \times 10^{-3}$ (C) $1,00 \times 10^{-3}$ (D) $1,33 \times 10^{-3}$ (E) $1,66 \times 10^{-3}$ (F) $2,00 \times 10^{-3}$ (G) $2,33 \times 10^{-3}$ (H) $2,66 \times 10^{-3}$ (I) $3,33 \times 10^{-3}$

4.1.2 Comportamento de fluorescência

4.1.2.1 A fluorescência do sistema Ce(IV) / SO_3^{2-}

Esta etapa do trabalho buscou avaliar a possibilidade de obtenção de espectros de fluorescência do sistema Ce(IV) / SO_3^{2-} , uma vez que até o momento a literatura descreve apenas estudos de seu comportamento de quimiluminescência. Considerando os resultados preliminares descritos no item 4.1.1 (espectro de quimiluminescência é semelhante ao de emissão fluorescente da espécie Ce(III)^{*}), escolheu-se como comprimento de onda de excitação 290 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$), o mesmo descrito para excitação de Ce(III) na literatura^{128,129}. A figura 4.8 mostra o espectro de emissão, mediante excitação em 290 nm, obtido para uma solução Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, com fendas de excitação e de emissão iguais a 7,5 nm.

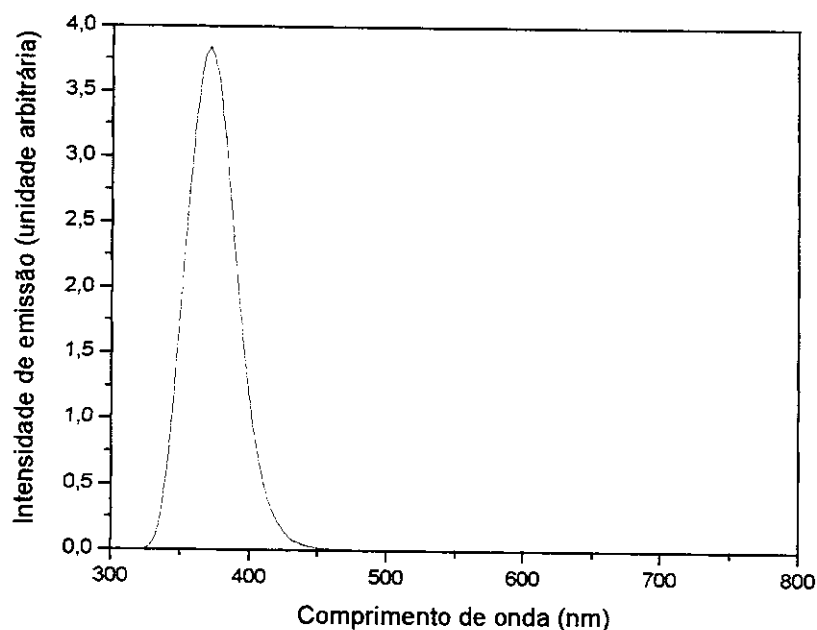


Figura 4.8. Perfil de emissão de fluorescência de uma solução, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$:
($\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm)
— Ce(IV) $1,00 \times 10^{-2}$ mol L $^{-1}$ e H $_2$ SO $_4$ 0,10 mol L $^{-1}$
— Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$, H $_2$ SO $_4$ $6,7 \times 10^{-2}$ mol L $^{-1}$ e SO $_3^{2-}$ $3,33 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$.

Na figura 4.8, observou-se que a emissão de fluorescência do sistema também apresenta comprimento de onda de emissão máxima em torno de 370 nm mas não evidencia outro pico de emissão em 690 nm. Além disso, a intensidade de emissão em 370 nm é quase o dobro da emissão de quimiluminescência (figura 4.1). O aumento na intensidade de emissão e a alteração no perfil do espectro de emissão podem indicar que a incidência de radiação de excitação em 290 nm influi diretamente na quantidade de espécies excitadas e/ou no mecanismo de excitação. Este resultado também contribui para reforçar a idéia de que a espécie Ce(III) pode ser a principal espécie emissora na luminescência do sistema químico Ce(IV) / SO $_3^{2-}$, uma vez que a incidência de radiação em 290 nm é indicada para esta espécie em trabalhos descritos na literatura^{128,129}.

4.1.2.2 Efeito da variação na concentração dos reagentes

Neste estudo buscou-se avaliar a fluorescência do sistema quando submetido à variação nas concentrações de Ce(IV) e SO $_3^{2-}$ e eventualmente

compará-lo com o comportamento na quimiluminescência. Neste caso também se optou por apresentar os dados na forma de emissão normalizada.

A figura 4.9 mostra os espectros de fluorescência de soluções de Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, com diferentes concentrações de SO_3^{2-} , obtidos mediante excitação em 290 nm e com larguras de fenda de excitação e emissão iguais a 7,5 nm.

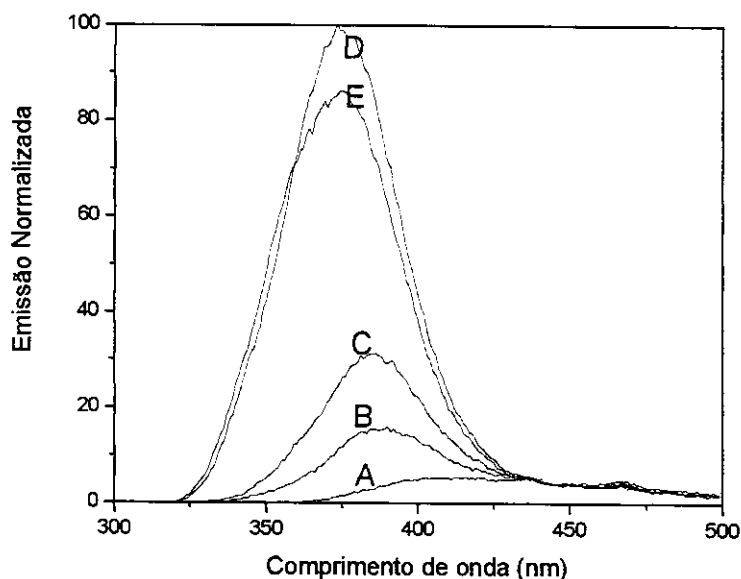


Figura 4.9. Efeito da variação da concentração de SO_3^{2-} nos espectros de fluorescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. ($\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$ e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm). Concentração de SO_3^{2-} em mol L^{-1} : (A) $2,00 \times 10^{-3}$ (B) $2,33 \times 10^{-3}$ (C) $2,66 \times 10^{-3}$ (D) $3,00 \times 10^{-3}$ (E) $3,33 \times 10^{-3}$

Analogamente ao efeito observado na quimiluminescência, a fluorescência em 370 nm também aumenta com o aumento da concentração de SO_3^{2-} até um limite de concentração (figura 4.10), seguindo uma “tendência” linear ($r = 0,803$).

Assim como na quimiluminescência, esta “tendência” não é observada para toda faixa de concentração estudada, o que pode ser melhor observado comparando-se a figura 4.5 com a figura 4.10 (ambas descrevem a variação da emissão em 370 nm em função da variação na concentração de SO_3^{2-} , no estudo da quimiluminescência e da fluorescência do sistema, respectivamente).

Não foram realizados testes para concentrações de SO_3^{2-} acima de $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

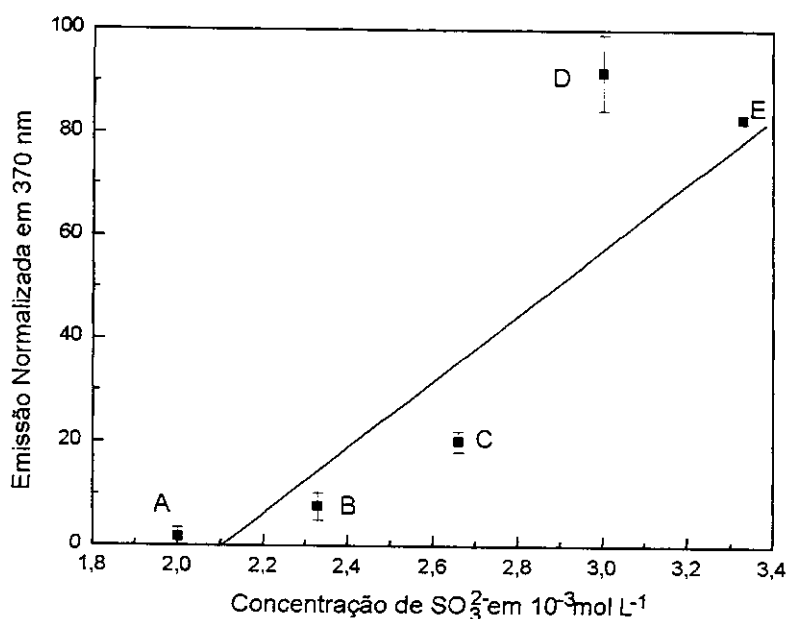


Figura 4.10. Efeito da variação da concentração de SO_3^{2-} , em 370nm, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, na fluorescência de uma solução $\text{Ce(IV)} 3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{H}_2\text{SO}_4 6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. ($\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$ e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm). Concentração de SO_3^{2-} em mol L^{-1} : (A) $2,00 \times 10^{-3}$ (B) $2,33 \times 10^{-3}$ (C) $2,66 \times 10^{-3}$ (D) $3,00 \times 10^{-3}$ (E) $3,33 \times 10^{-3}$

Os resultados até então descritos demonstraram que tanto a fluorescência quanto a quimiluminescência do sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$ são sensíveis à variações na concentração de SO_3^{2-} . Entretanto, em condições de fluorescência, a reação com $\text{SO}_3^{2-} 2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ gerou emissão detectável (ponto A da figura 4.10). Isto não ocorreu na quimiluminescência, fenômeno para o qual a concentração mínima de SO_3^{2-} para detectar emissão foi de $2,66 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (ponto B da figura 4.5). Este pequeno aumento na sensibilidade da reação reforça a idéia de que a excitação do sistema em 290 nm influi diretamente na quantidade de espécies excitadas e/ou no mecanismo de excitação.

Além deste aumento na sensibilidade, quando se estudou a fluorescência do sistema (em função do aumento na concentração de SO_3^{2-}), observou-se que o deslocamento no comprimento de onda de emissão máxima (para valores menores) observado na figura 4.4 ocorre de forma mais acentuada. Isto significa que quando se aumenta a concentração de SO_3^{2-} (pontos C, D e E da figura 4.9), o comprimento de onda de emissão máxima (esperado em torno de 370nm)

também diminui para valores em torno de 360 nm. Ainda se observou que para as concentrações mais baixas de SO_3^{2-} , $2,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pontos A e B da figura 4.9), o comprimento de onda de emissão máxima chegou a 430 nm (ponto A figura 4.9).

Em seguida, verificou-se a fluorescência do sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$ quando submetido à variação na concentração de Ce(IV) . A figura 4.11 mostra o espectro de emissão de uma solução SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, com diferentes concentrações de Ce(IV) mediante excitação em 290 nm e com largura de fenda de excitação e emissão 7,5 nm.

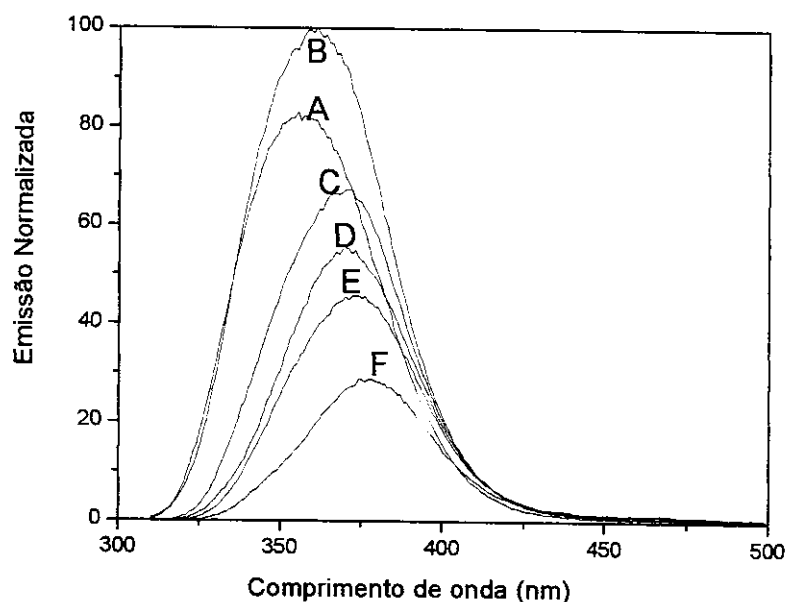


Figura 4.11. Efeito da variação da concentração de Ce(IV) no espectro de fluorescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. ($\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$ e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm). Concentração de Ce(IV) em mol L^{-1} : (A) $0,50 \times 10^{-3}$ (B) $1,00 \times 10^{-3}$ (C) $2,33 \times 10^{-3}$ (D) $2,66 \times 10^{-3}$ (E) $3,00 \times 10^{-3}$ (F) $3,33 \times 10^{-3}$

Na figura 4.11, a variação da intensidade de emissão em 370 nm (mediante excitação em 290 nm) diminuiu em função do aumento na concentração de Ce(IV) , fato contrário ao observado para a quimiluminescência (figura 4.8). Este fato também é ilustrado quando se compara a figura 4.9 com a figura 4.12.

Ainda na figura 4.12, verificou-se que a presença de Ce(IV) $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ apresenta um comportamento diferenciado. Estas observações sugerem

que, apesar dos espectros de quimiluminescência e fluorescência serem muito semelhantes, o mecanismo de reação da fluorescência deva ser diferente da quimiluminescência.

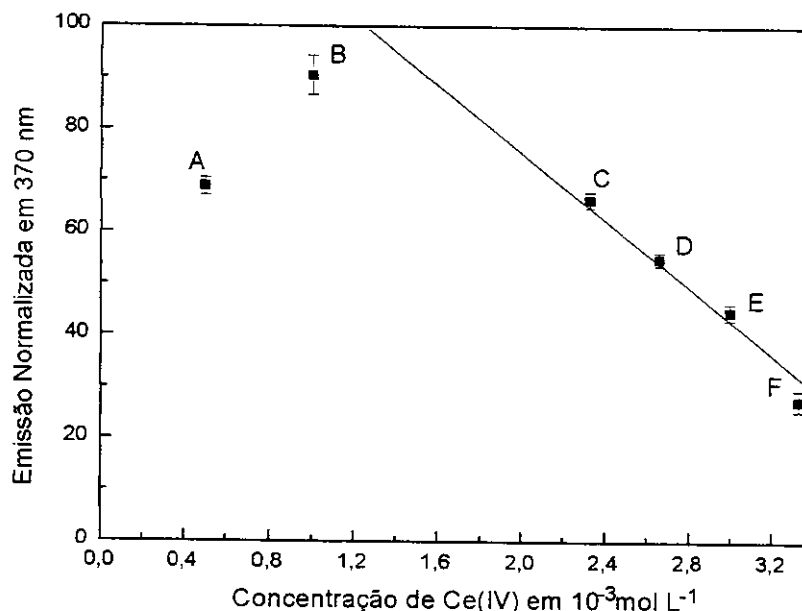


Figura 4.12. Efeito da variação da concentração de Ce(IV), em 370nm, na fluorescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. ($\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$ e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm). Concentração de Ce(IV) em mol L^{-1} : (A) $0,50 \times 10^{-3}$ (B) $1,00 \times 10^{-3}$ (C) $2,33 \times 10^{-3}$ (D) $2,66 \times 10^{-3}$ (E) $3,00 \times 10^{-3}$ (F) $3,33 \times 10^{-3}$

Ainda com base no efeito da variação da concentração de Ce(IV) no espectro de fluorescência (figura 4.11), observou-se que o deslocamento no comprimento de onda de emissão máxima para valores maiores também ocorre, como observado para quimiluminescência (figura 4.6). Neste caso, notou-se que os pontos E e F da figura 4.11 representam as maiores concentrações de Ce(IV) e as emissões são máximas em valores ligeiramente maiores que 370 nm.

A tabela 4.1 descreve em resumo os resultados obtidos nos estudos de variação na concentração dos reagentes para o comportamento de quimiluminescência e fluorescência do sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$. Em ambos, observou-se variação na intensidade de emissão em 370 nm e deslocamento no comprimento de onda de emissão máxima com o aumento na concentração dos reagentes.

Tabela 4.1. Resumo dos resultados obtidos na variação da concentração dos reagentes Ce(IV) e SO_3^{2-} , em quimiluminescência e em fluorescência.

Característica alterada em função do aumento na concentração do reagente	Comportamento de Quimiluminescência		Comportamento de Fluorescência	
	Ce(IV)	SO_3^{2-}	Ce(IV)	SO_3^{2-}
Intensidade de emissão em 370 nm	Aumenta	Aumenta	Diminui	Aumenta
Direção de deslocamento no comprimento de onda (λ) de emissão máxima	Valores menores	Valores maiores	Valores menores	Valores maiores

Quando se aumentou a concentração de SO_3^{2-} nos estudos de quimiluminescência e fluorescência, os resultados apontaram para um deslocamento no comprimento de onda de emissão máximo para valores maiores. Este fato pode ser devido à ocorrência de fenômenos de reabsorção e reemissão, o que sempre acarreta em perda de energia do sistema e desloca a emissão para comprimentos de onda maiores, que são menos energéticos.

No aumento na concentração de Ce(IV) nos estudos de quimiluminescência e fluorescência, os resultados apontaram para um deslocamento no comprimento de onda de emissão máximo para valores menores. Não há na literatura consultada, casos de fenômenos que acarretem em um deslocamento para valores maiores de comprimento de onda, podendo-se supor que o mecanismo de reação seja bem mais complexo e dependente da quantidade de Ce(IV).

4.1.3 Efeito da hidrocortisona sobre a fluorescência

O efeito sensibilizador da hidrocortisona sobre a intensidade de emissão quimiluminescente do sistema químico Ce(IV) / SO_3^{2-} é descrito na literatura^{97,98} e foi aplicado para desenvolvimento de metodologia analítica em fluxo para quantificação desta substância em formulações farmacêuticas comerciais. No presente trabalho, optou-se por investigar o efeito da hidrocortisona sobre a fluorescência de sistema Ce(IV) / SO_3^{2-} , uma vez que esta apresentou emissões mais intensas que a quimiluminescência.

Estudos iniciais avaliaram a possibilidade de se trabalhar com soluções de hidrocortisona em meio aquoso, o que acarretaria em uma diluição na quantidade de H_2SO_4 no sistema reacional após a injeção das soluções.

Conhecendo-se o comportamento da fluorescência do sistema frente à variação na concentração de Ce(IV), avaliou-se o comportamento frente à uma variação na concentração de H_2SO_4 , mantendo-se a proporção Ce(IV) / H_2SO_4 . Para isto, realizou-se diluições da solução de Ce(IV) com água destilada. As figuras 4.13 e 4.14 ilustram a fluorescência do sistema ($\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$) com diferentes concentrações de Ce(IV) e H_2SO_4 , mantendo-se a proporção entre os reagentes, com largura de fenda de excitação e emissão 7,5 nm.

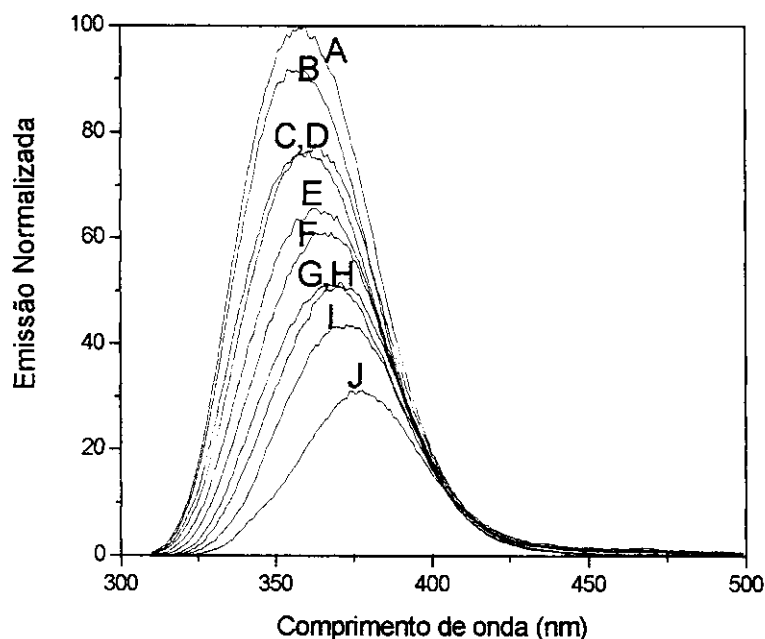


Figura 4.13. Efeito da variação da concentração de Ce(IV) e H_2SO_4 no espectro de fluorescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de uma solução SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. ($\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$ e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm). Concentração de Ce(IV) e H_2SO_4 , respectivamente, em mol L^{-1} : (A) $0,33 \times 10^{-3}$ e $0,7 \times 10^{-2}$ (B) $0,66 \times 10^{-3}$ e $1,3 \times 10^{-2}$ (C) $1,00 \times 10^{-3}$ e $2,0 \times 10^{-2}$ (D) $1,33 \times 10^{-3}$ e $2,7 \times 10^{-2}$ (E) $1,66 \times 10^{-3}$ e $3,4 \times 10^{-2}$ (F) $2,00 \times 10^{-3}$ e $4,0 \times 10^{-2}$ (G) $2,33 \times 10^{-3}$ e $4,7 \times 10^{-2}$ (H) $2,66 \times 10^{-3}$ e $5,4 \times 10^{-2}$ (I) $3,00 \times 10^{-3}$ e $6,0 \times 10^{-2}$ (J) $3,33 \times 10^{-3}$ e $6,7 \times 10^{-2}$

A figura 4.13 ilustra os espectros de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$) de diferentes diluições na concentração da solução de Ce(IV). Notou-se que o sistema segue a mesma tendência de comportamento (aumento da intensidade de emissão em função do aumento na concentração dos reagentes) observado em condições de concentração de H_2SO_4 constante (figuras 4.10 e 4.11), ou seja, quando as diluições foram realizadas com solução de H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

A figura 4.14 ilustra o efeito da variação na concentração dos reagentes na intensidade de emissão em 370 nm, indicando que a alteração na concentração de H_2SO_4 , na faixa estudada, não afeta o comportamento da fluorescência do sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$. Entretanto, comparando-se as figuras 4.12 e 4.14 observou-se que na variação de Ce(IV) e H_2SO_4 , mesmo mantendo-se a proporção dos mesmos, houve maior dispersão dos resultados, o que pode estar relacionado com a variação na quantidade de H_2SO_4 presente no meio reacional. Com base nestes resultados optou-se pelo estudo da influência da presença de hidrocortisona na fluorescência mantendo-se constante a quantidade de H_2SO_4 .

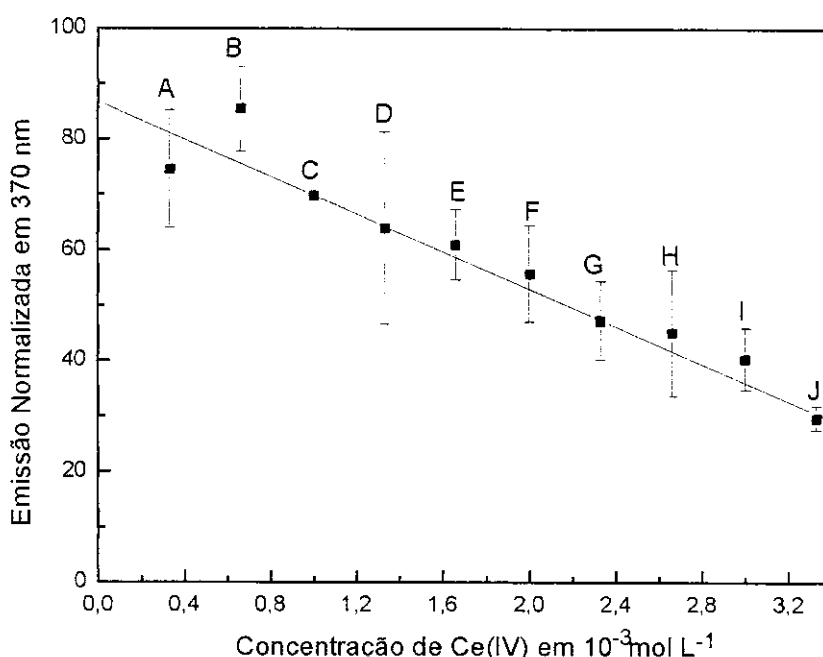


Figura 4.14. Efeito da variação da concentração de Ce(IV) e H_2SO_4 , em 370nm, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, na fluorescência de uma solução SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. ($\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$ e largura de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm). Concentração de Ce(IV) e H_2SO_4 , respectivamente, em mol L^{-1} : (A) $0,33 \times 10^{-3}$ e $0,7 \times 10^{-2}$ (B) $0,66 \times 10^{-3}$ e $1,3 \times 10^{-2}$ (C) $1,00 \times 10^{-3}$ e $2,0 \times 10^{-2}$ (D) $1,33 \times 10^{-3}$ e $2,7 \times 10^{-2}$ (E) $1,66 \times 10^{-3}$ e $3,4 \times 10^{-2}$ (F) $2,00 \times 10^{-3}$ e $4,0 \times 10^{-2}$ (G) $2,33 \times 10^{-3}$ e $4,7 \times 10^{-2}$ (H) $2,66 \times 10^{-3}$ e $5,4 \times 10^{-2}$ (I) $3,00 \times 10^{-3}$ e $6,0 \times 10^{-2}$ (J) $3,33 \times 10^{-3}$ e $6,7 \times 10^{-2}$

A investigação do efeito sensibilizador da hidrocortisona no sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$ forneceu os dados descritos nas figuras 4.15(a) e 4.15(b), onde se percebeu que a hidrocortisona altera a intensidade de emissão da fluorescência do sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$ quando em concentrações acima de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

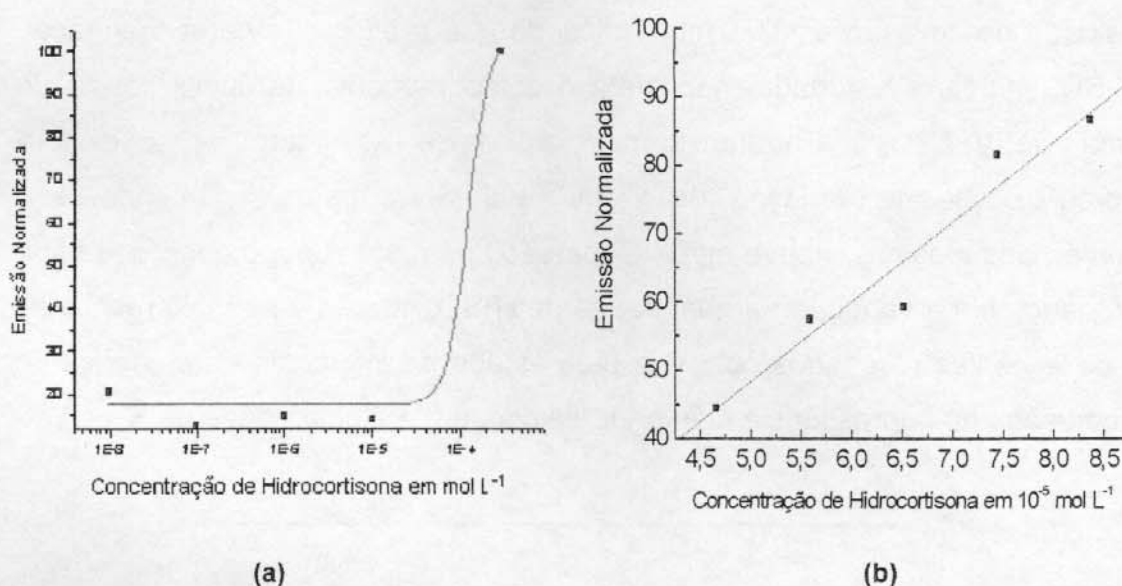


Figura 4.15. Efeito da presença de hidrocortisona na fluorescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de soluções $\text{Ce(IV)} 3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{SO}_3^{2-} 3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}$, $\text{H}_2\text{SO}_4 6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e hidrocortisona variável, com excitação em 290 nm e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm.

A figura 4.15(a) mostra que a intensidade de fluorescência do sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-} / \text{hidrocortisona}$ praticamente não se altera para concentrações de hidrocortisona entre 10^{-8} a $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Para concentrações de hidrocortisona maiores que $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, observou-se que a intensidade de fluorescência aumentou bruscamente. Este aumento foi verificado para concentrações de hidrocortisona até $2,79 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração máxima em que se obteve soluções homogêneas de hidrocortisona em $\text{H}_2\text{SO}_4 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (acima desta ocorreu precipitação de soluto). A figura 4.15(b) descreve a faixa de concentração ($4,7 \times 10^{-5}$ a $8,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em que a presença de hidrocortisona alterou de forma linear ($r = 0,961$) a intensidade de fluorescência do sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$.

A figura 4.16 ilustra o efeito sensibilizador da hidrocortisona nos espectros de fluorescência do sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$. Os resultados ilustrados nas figuras 4.15 e 4.16, mostram que a intensidade de emissão de fluorescência do sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$, assim como a de quimiluminescência^{97,98}, sofre ação sensibilizadora da hidrocortisona, podendo ser base para o desenvolvimento de metodologia analítica com medidas de fluorescência para quantificar esta substância em formulações farmacêuticas.

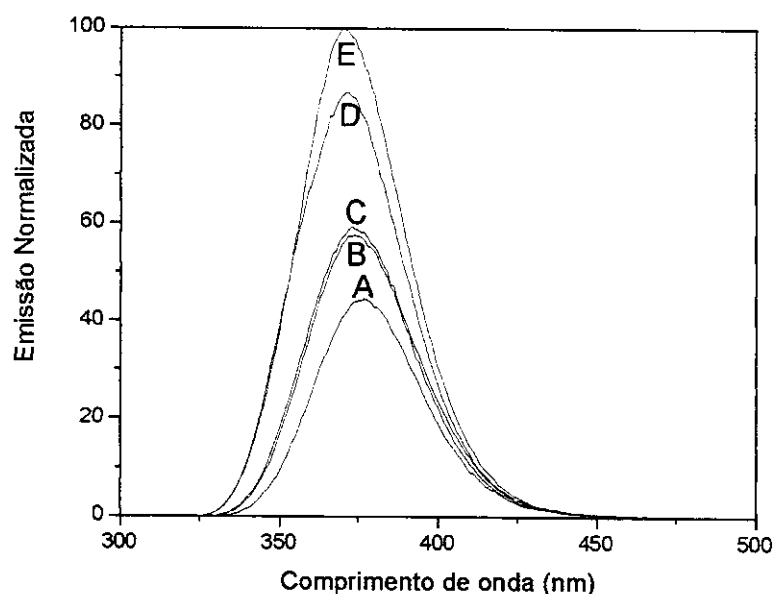


Figura 4.16. Efeito da variação da concentração de hidrocortisona na fluorescência, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, de soluções Ce(IV) $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, SO_3^{2-} $3,33 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de hidrocortisona, em mol L^{-1} : (A) $4,7 \times 10^{-5}$ (B) $5,6 \times 10^{-5}$ (C) $6,5 \times 10^{-5}$ (D) $7,4 \times 10^{-5}$ (E) $8,4 \times 10^{-5}$, com excitação em 290 nm e larguras de fenda de excitação e emissão = 7,5 nm.

4.2 Estudo com reação colorimétrica

Este estudo foi realizado em colaboração com a Prof. Dr. Helena R. Pezza e seu orientado André Vicentin, do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP), que forneceram subsídios iniciais para o desenvolvimento do trabalho, a partir de sua proposta de quantificação de acetato de hidrocortisona¹¹².

4.2.1 Desenvolvimento analítico espectrofotométrico

Nesta etapa, a reação entre Mo(VI) , H_2SO_4 e acetato de hidrocortisona descrita na literatura^{111,112} para quantificação deste corticóide em formulações farmacêuticas, foi testada para hidrocortisona. A figura 4.17 mostra o espectro de absorção do produto de reação de Mo(VI) $3,24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $5,40 \text{ mol L}^{-1}$, na ausência e presença de hidrocortisona $0,14 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Observou-se que o produto de reação com hidrocortisona apresentou aumento na absorbância em 409 nm, análogo ao descrito^{111,112} para reação com acetato de hidrocortisona.

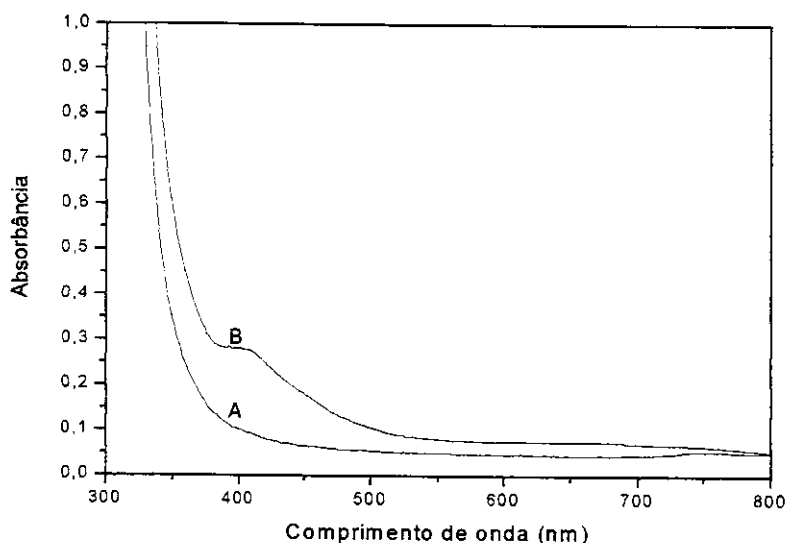


Figura 4.17. Espectro de absorção do produto de reação entre Mo(VI) $3,24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2SO_4 $5,40 \text{ mol L}^{-1}$ e :
(A) Ausente de hidrocortisona (B) $0,14 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hidrocortisona

Em seguida, avaliou-se a absorbância do produto de reação em função da concentração de hidrocortisona em solução inicial. A figura 4.18 mostra o espectro de absorção do produto de reação de Mo(VI) $3,24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2SO_4 $5,40 \text{ mol L}^{-1}$ e hidrocortisona $0,50$ a $2,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

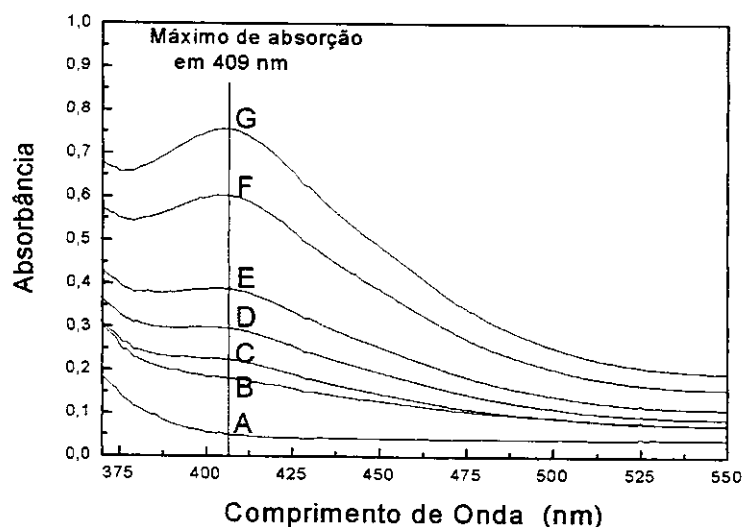


Figura 4.18. Espectro de absorção do produto de reação entre Mo(VI) $3,24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2SO_4 $5,40 \text{ mol L}^{-1}$ e hidrocortisona: (A) Ausente (B) $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (C) $0,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (D) $1,10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (E) $1,40 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (F) $2,20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (G) $2,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Na figura 4.18 observou-se que a absorvância do produto de reação aumentou com a concentração de hidrocortisona até $2,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Construiu-se uma curva de calibração de determinação de hidrocortisona, (figura 4.19), descrita pela equação 7, com coeficiente de correlação linear (r) 0,999.

$$A = 0,003 + 0,237 \times C \quad \text{Equação 7}$$

(A = Absorvância em 409 nm, C = Concentração de Hidrocortisona $\times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)

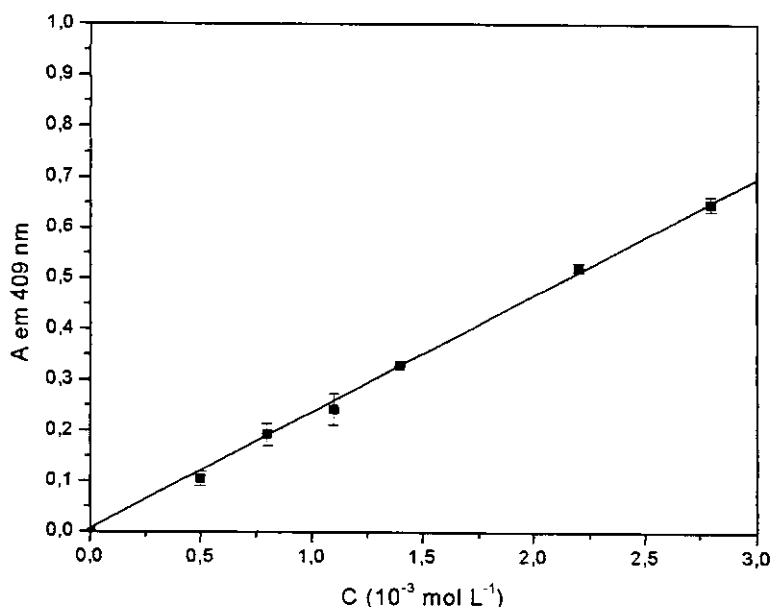


Figura 4.19. Curva de calibração com medidas espectrofotométricas para hidrocortisona

4.2.2 Desenvolvimento analítico fotométrico

Neste estudo, utilizou-se o equipamento portátil (item 3.3.2) para medir a resistência do LDR em função da coloração da solução contendo o produto de reação de Mo(VI) $3,24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2SO_4 $5,40 \text{ mol L}^{-1}$ e hidrocortisona $0,50$ a $2,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, cuja coloração (proporcional à concentração) afeta a incidência de luz sobre o LDR. A resistência, portanto, é proporcional à concentração da espécie colorida. A figura 4.20 mostra as leituras de resistência em função da variação na concentração de hidrocortisona inicialmente adicionada, descrita pela equação 8, com coeficiente de correlação linear (r) = 0,993. Vale dizer que as soluções medidas foram as mesmas que originaram a curva de calibração espectrofotométrica da figura 4.19.

$$R = 2,56 + 1,14 \times C$$

Equação 8

(R= Resistência em $10^3 \Omega$, C= Concentração de Hidrocortisona $\times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)

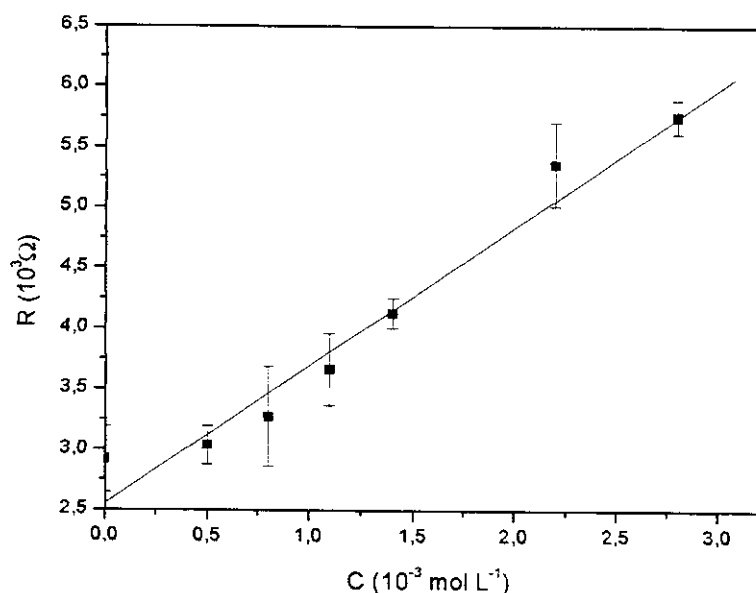


Figura 4.20. Curva de calibração com medidas fotométricas para hidrocortisona

Comparando-se as curvas de calibração por espectrofotometria e por fotometria, notou-se estas apresentaram diferença na dispersão dos resultados (barras verticais no gráfico). Apesar de se utilizarem as mesmas soluções, as medidas espectrofotométricas apresentaram dispersão na ordem de $\pm 2\%$, enquanto as medidas fotométricas chegaram a $\pm 9\%$ em alguns pontos.

Entretanto, mesmo com a perda na precisão das medidas fotométricas, obteve-se coeficiente de correlação linear 0,993 para curva de calibração do dispositivo portátil. Este resultado indica que o dispositivo fotométrico também pode ser utilizado para determinação de hidrocortisona, porém com um custo menor que por espectrofotometria, uma vez que o custo de montagem de todo o sistema fotométrico (luminária, LDR, multímetro, vidro de Duran, TEFLON® grafitado, contatos elétricos e mão-de-obra para montagem) é cerca de R\$ 500,00, enquanto o sistema espectrofotométrico (espectrofômetro e cubetas de quartzo) tem um custo de no mínimo R\$ 5.000,00. Dependendo da precisão desejada para a medida, pode ser uma boa opção em termos de custo / benefício.

4.2.3 Figuras de Mérito

Neste trabalho foram estudadas e discutidas algumas figuras de mérito do método espectrofotométrico: estimativa de desvio-padrão, precisão, limite de determinação, limite de detecção, faixa linear de resposta e fator de resposta.

4.2.3.1 Precisão das medidas

Qualquer medida experimental está sujeita a um erro, ou seja, há sempre uma diferença entre os valores, mesmo em amostras obtidas em triplicata. No presente trabalho, a amplitude da variação das medidas em replicata foi medida a partir de um ensaio de repetibilidade¹⁵⁷.

A tabela 4.2 descreve os resultados obtidos para 10 replicatas padrão contendo $1,10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hidrocortisona, submetidas ao procedimento descrito no item 3.3.2.

Tabela 4.2. Resultados obtidos para amostras contendo $1,10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de hidrocortisona, submetidas ao ensaio de repetibilidade

Amostra	Concentração de hidrocortisona ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)
X1	1,080
X2	0,976
X3	1,060
X4	0,993
X5	0,972
X6	0,971
X7	1,050
X8	1,060
X9	0,973
X10	1,050

Com os dados da tabela 4.2 calculou-se a estimativa de desvio-padrão¹⁶⁶ (equação 9), que representa a amplitude dos desvios das medidas geradas pelo procedimento em relação à média, que foram causados por erros indeterminados.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Equação 9

$$s = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

($\bar{X}$ = média aritmética das concentrações de hidrocortisona, X = concentração de hidrocortisona em cada replicata, n = número de replicatas e s = estimativa de desvio-padrão)

O resultado das medidas descritas na tabela 4.2 pode então ser escrito:

$$\bar{X} = (1,02 \pm 0,04) \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

Este valor representa a média das medidas em replicata e a amplitude de variação (estimativa de desvio padrão), cerca de $\pm 4\%$.

4.2.3.2 Limites e Linearidade

O limite de detecção de um método analítico é calculado como sendo 3 vezes o nível de ruído médio medido com a solução “branco”^{167,168}. Neste caso, refere-se às leituras espectrofotométricas de soluções livres de hidrocortisona, que foram submetidas ao procedimento analítico descrito no item 3.3.2.

Pela curva de calibração (figura 4.19), o nível de ruído representaria uma quantidade de hidrocortisona $0,093 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e, portanto, o método proposto apresenta limite de detecção de $0,28 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Já o limite de determinação é dado pelo menor valor, dentro de erros, que pode ser atribuído à presença do analito¹⁶⁸, sendo este $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Além disso, a curva analítica descrita na figura 4.19 também indica que a faixa linear de resposta para do método proposto para determinação de hidrocortisona é de $0,50$ a $2,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

4.2.3.3 Fator de recuperação

O fator de recuperação foi obtido por comparação direta da concentração de hidrocortisona de uma amostra fortificada com a concentração obtida pela curva de calibração. Assim sendo, o fator de recuperação para o método proposto foi dado por:

$$\text{Fator}_{\text{rec}} = \frac{A_r \times 100}{A_i} = 101,2 \quad \text{Equação 10}$$

(A_r = analito padrão recuperado e A_i = analito padrão introduzido, em $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)

A tabela 4.3 ilustra algumas figuras de mérito obtidas para o método analítico proposto para determinação de hidrocortisona. Além destas, também se obteve a precisão das medidas, sendo $\pm 4 \%$.

Tabela 4.3. Análise de desempenho do método espectrofotométrico proposto.

Figura de Mérito / Parâmetro	Resultado
Limite de detecção	$0,28 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
Limite de determinação	$0,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
Faixa linear de resposta	$(0,50 \text{ a } 2,80) \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
Linearidade	0,999
Fator de recuperação	101,2%

4.2.4 Estudos com derivados da hidrocortisona

Estudos subseqüentes avaliaram a reação de Mo(VI) , H_2SO_4 e substâncias derivadas da hidrocortisona. As substâncias cortisona, acetato de cortisona, acetato de hidrocortisona e acetato de dexametasona foram utilizadas e seus produtos de reação apresentaram espectros de absorção com perfil semelhante ao obtido para hidrocortisona, com máximo de absorção em torno de 410 nm.

Em seguida, verificou-se a viabilidade de relacionar a absorbância máxima do produto de reação com a concentração de cada corticóide em solução. A figura 4.21 mostra o efeito da variação da concentração dos corticóides na absorbância em 409 nm.

As equações 11 a 14 indicaram relação linear da concentração dos corticóides em $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}(\text{C})$ com absorbância em 409 nm (A). O termo (r) representa o coeficiente de correlação linear.

$$A = -0,0156 + 0,229 \times C_{\text{cortisona}} \quad \text{Equação 11}$$

(r) = 0,998

$$A = 0,0050 + 0,261 \times C_{\text{acetato de cortisona}} \quad \text{Equação 12}$$

$$(r) = 0,999$$

$$A = -0,0290 + 0,271 \times C_{\text{acetato de hidrocortisona}} \quad \text{Equação 13}$$

$$(r) = 0,994$$

$$A = -0,0363 + 0,488 \times C_{\text{acetato de dexametasona}} \quad \text{Equação 14}$$

$$(r) = 0,995$$

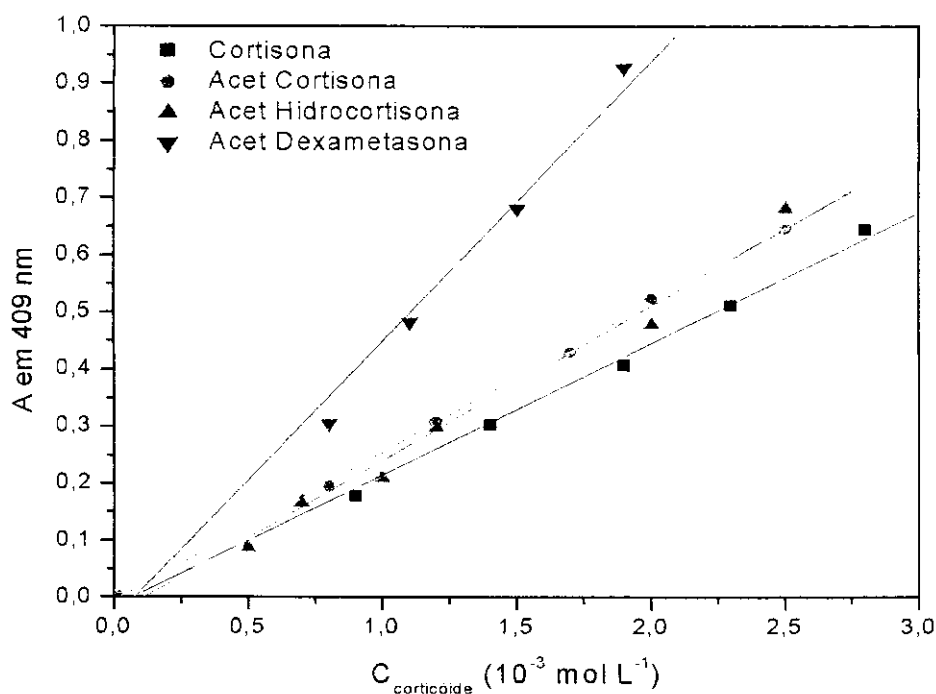


Figura 4.21. Curvas de calibração com medidas espectrofotométricas para cortisona, acetato de cortisona, acetato de hidrocortisona e acetato de dexametasona.

Resultados semelhantes aos espectrofotométricos foram obtidos com as medidas fotométricas dessas soluções (figura 4.22). As relações obtidas entre a concentração dos corticóides (C , em $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e a resistência (R , em $10^3 \Omega$) do LDR em função da coloração da solução contendo o produto de reação (que afeta a incidência de luz sobre o resistor) são descritas pelas equações 15 a 18. O termo (r) representa o coeficiente de correlação linear:

$$R = 2,44 + 1,09 \times C_{\text{cortisona}} \quad \text{Equação 15}$$

$$(r) = 0,987$$

$$R = 2,78 + 1,78 \times C_{\text{acetato de cortisona}} \quad \text{Equação 16}$$

$$(r) = 0,990$$

$$R = 2,69 + 1,57 \times C_{\text{acetato de hidrocortisona}} \quad \text{Equação 17}$$

$$(r) = 0,954$$

$$R = 1,94 + 4,37 \times C_{\text{acetato de dexametasona}} \quad \text{Equação 18}$$

$$(r) = 0,956$$

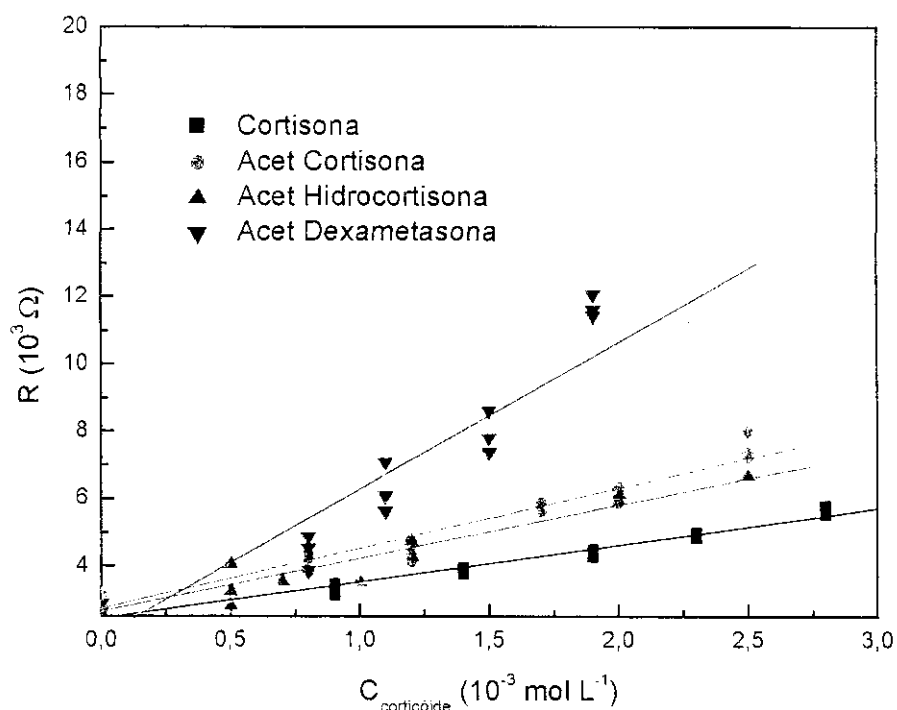


Figura 4.22. Curvas de calibração com medidas em dispositivo portátil para cortisona, acetato de cortisona, acetato de hidrocortisona e acetato de dexametasona

Em seguida avaliou-se a absorbância máxima dos produtos de reação entre Mo(VI) $3,24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2SO_4 $5,40 \text{ mol L}^{-1}$ e $1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cortisona, acetato de cortisona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona e acetato de dexametasona, separadamente.

A figura 4.23 mostra o espectro de absorção de soluções contendo produtos de reação de cada corticóide e suas respectivas estruturas.

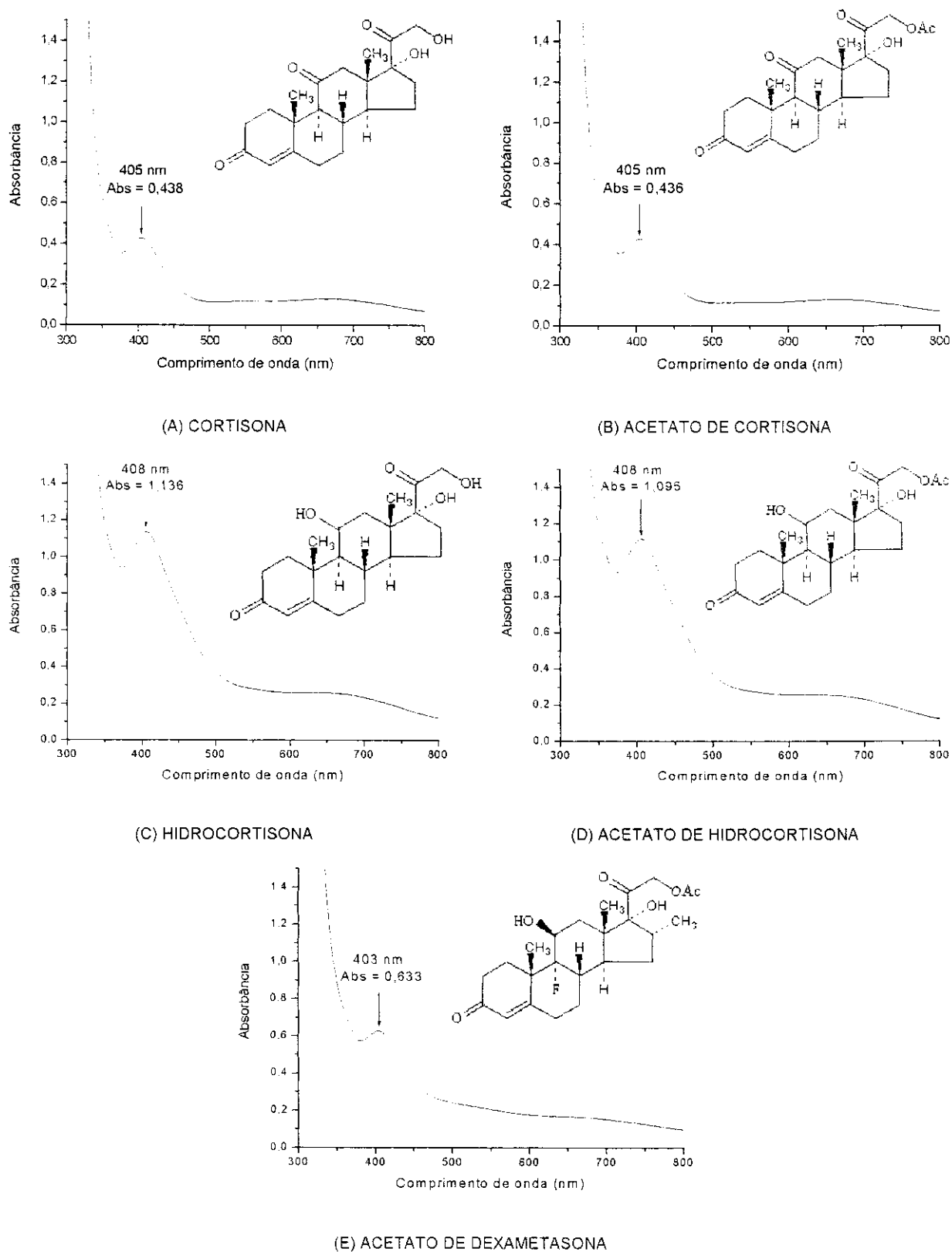


Figura 4.23. Espectros de absorvância de soluções $\text{Mo(VI)}\ 3,24 \times 10^{-3}\ \text{mol L}^{-1}$, $\text{H}_2\text{SO}_4\ 5,40\ \text{mol L}^{-1}$ e corticóide $1,34 \times 10^{-3}\ \text{mol L}^{-1}$.

Observou-se que os produtos de reação de hidrocortisona e de acetato de hidrocortisona apresentaram espectro de absorção semelhante, indicando que a presença do radical acetato não afeta a absorvidade molar do produto. Isto também ocorre com produtos de reação da cortisona e do acetato de cortisona. Entretanto, quando comparados os espectros de absorção dos produtos de reação da cortisona e da hidrocortisona, percebeu-se que a presença do radical hidroxila no lugar do radical ceto aumentou a absorvidade molar do produto. Este efeito também foi observado quando se comparou o espectro dos produtos de reação de acetato de dexametasona e hidrocortisona, indicando que a introdução de radicais metila e flúor diminuem a absorvidade molar do produto.

Quando o grupo de Aman¹³⁴ estudou o sistema $\text{Mo(VI)} / \text{H}_2\text{SO}_4 / \text{Cloridrato de amitriptilina}$, destacou-se que o produto de reação poderia ser resultante da ação oxidante do Mo(VI) sobre a amitriptilina. Além disso, também foi enfatizado que o produto colorido poderia ser atribuído à formação da espécie N(R)_4^+ , que reagiria com o íon molibdato formando um complexo verde de máxima absorbância em 660 nm. No presente estudo, observou-se que o produto de reação entre $\text{Mo(VI)} / \text{H}_2\text{SO}_4$ e cortisona, acetato de cortisona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona e acetato de dexametasona, também apresentou coloração verde, porém com absorbância máxima variando de 403 a 409 nm.

Encontram-se descritos na literatura¹⁵⁹⁻¹⁶³ diversos trabalhos envolvendo reações de molibdênio em meio ácido com formação de compostos coloridos. Dentre estas, a reação de Mo(VI) em meio ácido com íons SCN^- para a formação de um complexo laranja-avermelhado tornou-se clássica para determinação colorimétrica de Mo(VI) ¹⁶⁹. Avaliando a configuração eletrônica do molibdênio no estado fundamental (d^5s^1), com orbitais semi-preenchidos estáveis, pressupõe-se que formem compostos com o metal nos estados de oxidação entre (+I) e (+VI). O estado mais estável do molibdênio é (VI), embora existam compostos de Mo(V) estáveis em água¹⁶². Dentre as colorações apresentadas pelos complexos de molibdênio, somente o Mo(VI) é descrito na literatura como de coloração verde¹⁵⁹.

Quando soluções de Mo(VI) são acidificadas, ocorrem reações de condensação e a formação de uma série de polimolibdatos de Mo(V) , sendo que

abaixo de pH 1 pode ocorrer precipitação de óxidos hidratados $\text{MoO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, de coloração amarela. Durante a etapa de aquecimento, o produto de reação apresenta coloração amarela, porém é solúvel, o que descarta a possível formação do óxido hidratado. Também é descrito na literatura¹⁵⁹ que, em meio fortemente ácido, pode ocorrer formação de cátions molibdenil MoO^{2+} e MoO^+ , nos estados de oxidação (VI) e (V), respectivamente. Uma vez que a maioria dos complexos de Mo(V) são amarelos¹⁶⁰ e de Mo(VI) são verdes, considerou-se que no presente trabalho deva ocorrer a formação de cátions molibdenil, que formariam complexos com os corticóides estudados, apresentando coloração amarelada durante a etapa de aquecimento e verde em temperatura ambiente.

No presente estudo, avaliou-se a absorvidade molar dos produtos de reação com diferentes corticóides (figura 4.23), e todos apresentaram características espectrais semelhantes. Estes resultados indicam que a reação deva ocorrer em um ponto comum a todos os corticóides estudados, gerando um produto de estrutura similar no que diz respeito aos grupos cromóforos. Os possíveis pontos reativos na estrutura dos corticóides seriam nas ligações carbonílicas, uma vez que o meio fortemente ácido causa protonação destas espécies^{170,171}. A figura 4.24, mostra a molécula da hidrocortisona com os possíveis pontos de ligação para formação de complexos com Mo(VI) destacados.

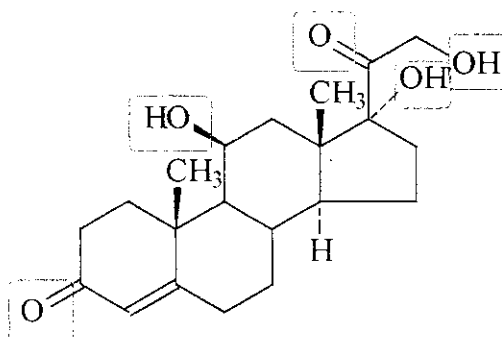


Figura 4.24. Estrutura da hidrocortisona: destaque para prováveis pontos de interação com Mo(VI)

Os espectros da figura 4.23 indicam que algumas substituições na molécula da hidrocortisona (derivados sintéticos) alteram a absorvidade molar do produto, assim como o comprimento de onda de absorção máximo. Quando foram comparados os espectros de absorção dos produtos de reação da cortisona e da hidrocortisona, percebeu-se que a presença do radical hidroxila no lugar do radical

ceto em C₁₁ aumentou a absorvidade molar do produto. Este resultado indica que a protonação em C₁₁ pode contribuir para a formação do complexo com Mo(VI) e/ou alterar o complexo formado, uma vez que o comprimento de onda de absorção máximo passou de 409 nm para 405 nm. Este mesmo raciocínio também pode ser usado na comparação da absorvidade molar e do comprimento de onda de emissão máximo da hidrocortisona e do acetato de dexametasona. Notou-se que a introdução de radicais metila e flúor diminuem a absorvidade molar do produto. Neste caso, a alteração na estrutura não afetou diretamente os possíveis pontos de reação, mas foi suficiente para reprimir e/ou alterar a formação do complexo com Mo(VI), que possui máximo de absorção em 403 nm.

4.2.5 Teste com medicamentos comerciais

Duas formulações farmacêuticas foram testadas: uma com hidrocortisona como princípio ativo e outra com acetato de cortisona. Comparou-se os resultados espectrofotométricos e fotométricos entre si e com obtido por adição de padrão.

4.2.5.1 Hidrocortisona

A curva de calibração por adição de padrão para a denominada “amostra comercial” é apresentada na figura 4.25 e descrita pela equação 19, com coeficiente de correlação linear (r) = 0,999.

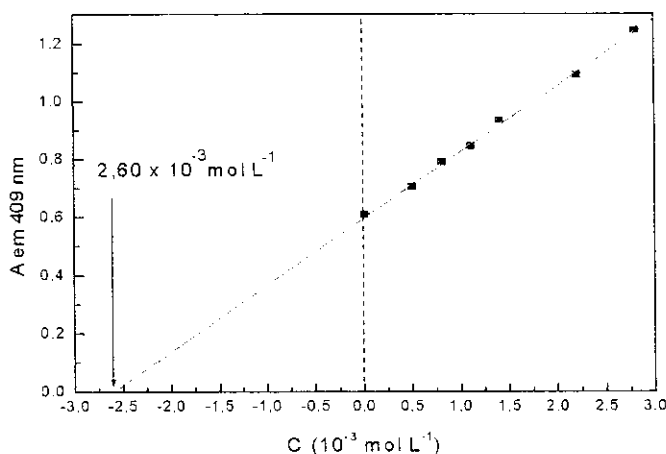


Figura 4.25. Curva de calibração por adição de padrão para hidrocortisona em *amostra comercial*.

$$A = 0,599 + 0,229 \times C$$

Equação 19

(A = Absorbância em 409 nm, C = Concentração de Hidrocortisona $\times 10^{-3}$ mol L⁻¹)

O valor obtido para a concentração da amostra ($2,60 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) é próximo ao esperado ($2,70 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), com diferença percentual de - 4%. Isto significa que a “amostra comercial” contém 9,42 mg mL⁻¹ de hidrocortisona.

O medicamento utilizado para construção da curva de adição de padrão foi também analisado quanto à quantidade de hidrocortisona por comparação da absorbância (em 409 nm) de seu produto de reação com a curva de calibração. A figura 4.26 mostra o espectro de absorção do produto de reação entre a hidrocortisona extraída da amostra (extração líquido-líquido) e Mo(VI) / H₂SO₄, seguindo procedimento analítico (em triplicata) descrito no item 3.3.2.

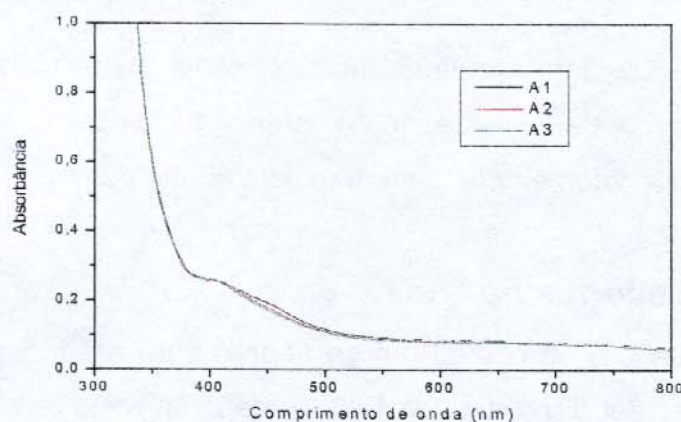


Figura 4.26. Espectros de absorbância do produto de reação entre Mo(VI) / H₂SO₄ e a hidrocortisona extraída da amostra real (triplicata).

Observou-se que o espectro apresentou perfil semelhante ao obtido quando a reação é feita a partir de solução de hidrocortisona padrão. A tabela 4.4 traz os resultados aplicando-se as curvas de calibração por espectrofotometria e fotometria. Além disto, também traz os dados da quantidade de hidrocortisona na amostra segundo especificações do fabricante e pela curva de adição de padrão.

Foram analisadas amostras de dois frascos (denominados A e B) da formulação farmacêutica comercial com diferentes “idades” a partir das datas de fabricação, sendo o prazo de validade estipulado no rótulo de 24 meses:

(A) 30 meses

(B) 2 meses

Tabela 4.4. Resultados obtidos para determinação de hidrocortisona em amostra comercial. (juntamente com estimativa de desvio-padrão para $n = 3$)

Concentração de hidrocortisona em amostra (10^{-2} mol L $^{-1}$)		Concentração obtida pelo método proposto (10^{-2} mol L $^{-1}$)			
Fabricante	Curva de adição de padrão	Medidas espectrofotométricas		Medidas fotométricas	
		A	B	A	B
0,9 a 1,2	1,04*	$0,886 \pm 0,009$	$1,02 \pm 0,01$	$0,9 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,2$

*Este valor refere-se à concentração esperada usando como referência dados obtidos na curva de adição de padrão, construída com amostra B.

Pela tabela 4.4 notou-se que o medicamento utilizado fora do prazo de validade apresentou resultados abaixo do valor mínimo determinado por adição de padrão. Isto pode indicar que, a princípio, possíveis produtos de degradação da hidrocortisona não sejam determinados pelo método proposto. Também se observou que resultados obtidos com medidas fotométricas apresentaram menor precisão, com estimativa de desvio-padrão chegando a $\pm 20\%$, enquanto que para as medidas por espectrofotometria o desvio não superou a $\pm 2\%$.

Utilizando o valor determinado pela curva de adição de padrão como referência, a análise do medicamento dentro do prazo de validade apresentou diferença percentual entre os valores de cerca de $\pm 2\%$ para o método proposto com medidas por espectrofotometria e $\pm 3\%$ para as medidas fotométricas.

Comparando-se os resultados obtidos por espectrofotometria com os obtidos por fotometria, empregou-se o teste t de Student¹⁷² para verificar se a diferença entre as médias dos conjuntos é significativa, considerando nível de confiança 95%:

$$t = \frac{\bar{X}_A - \bar{X}_B}{\sqrt{\frac{s_A^2 + s_B^2}{n-1}}} \quad \text{Equação 20}$$

Onde: $\bar{X}_A$ = média aritmética obtida pelo método espectrofotométrico, $\bar{X}_B$ = média aritmética obtida pelo método fotométrico, n = número de medidas, s = estimativa de desvio padrão do método espectrofotométrico (s_A) e fotométrico (s_B).

O valor de t encontrado (1,412) é menor que o valor tabelado¹⁷² (2,350), o que garante que os dois métodos fornecem resultados estatisticamente

semelhantes, considerando nível de confiança de 95%. Dentre todos os resultados obtidos, comparados com o estipulado pelo fabricante (pelo teste t), somente os resultados espectrofotométricos apresentaram-se significativamente semelhantes.

4.2.5.2 Acetato de cortisona

Nesta etapa, avaliou-se o desempenho do método quando aplicado a amostra comercial (na forma de pomada) contendo como princípio ativo um derivado da hidrocortisona, o acetato de cortisona. É importante ressaltar que, segundo dados fornecidos por *email* pelo laboratório responsável pelo medicamento, o fabricante utiliza cromatografia em camada delgada (CCD) para extração do princípio ativo e que, no presente trabalho, procedimentos (item 3.3.2.3.2) sem prévia extração do princípio ativo foram adequados para obtenção de resultados dentro da faixa de concentração estipulada pelo fabricante. A tabela 4.5 traz os resultados obtidos em medidas por espectrofotometria e por fotometria.

Tabela 4.5. Resultados obtidos para determinação de acetato de cortisona em amostra comercial (juntamente com estimativa do desvio-padrão para $n = 3$).

Concentração de Acetato de Cortisona fornecido pelo fabricante ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	Concentração obtida pelo método proposto ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	
	Medidas espectrofotométricas	Medidas fotométricas
1,20 a 1,47	$1,420 \pm 0,008$	$1,46 \pm 0,02$

Os resultados da tabela 4.5 indicam que o método proposto neste trabalho para determinação de hidrocortisona em medicamentos comerciais forneceu resultados dentro das especificações estipuladas pelo fabricante. Entretanto, para que se possa assegurar que o método possa ser aplicado para determinação desta substância é fundamental que também seja realizado um ensaio de recuperação.

Quando comparados os resultados espectrofotométricos com os fotométricos (com base no teste t ¹⁷²), também foram obtidos resultados estatisticamente semelhantes, considerando nível de confiança de 95 %.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

5.1 Estudo com reação luminescente

Pelo estudo de desenvolvimento analítico de luminescência foi possível concluir que:

- ▶ O trabalho proposto apresentou avanços no estudo da luminescência do sistema químico $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$, uma vez que foram obtidos os espectros de emissão da quimiluminescência do mesmo em regime estacionário, características ainda não descritas na literatura.
- ▶ O trabalho também apresentou um estudo da fluorescência do sistema $\text{Ce(IV)} / \text{SO}_3^{2-}$, não descrito na literatura consultada, o que representa importante contribuição na elucidação da(s) espécie(s) responsável(is) pela emissão, pois se pode observar que o sistema apresenta espectro de emissão de fluorescência bastante semelhante ao descrito na literatura para a espécie Ce(III)^* , mediante excitação em 290 nm.
- ▶ A semelhança do efeito da variação na concentração de sulfito nos espectros de emissão tanto na fluorescência quanto na quimiluminescência, que têm perfis análogos, pode indicar que a incidência de radiação representa uma contribuição favorável à formação de espécies excitadas em maior quantidade ou ao processo de decaimento emissivo, já que a intensidade aumenta na fluorescência.
- ▶ Estudando-se o efeito da variação da concentração de Ce(IV) nos espectros de emissão de quimiluminescência e fluorescência, observou-se uma tendência inversa de resultados, ou seja, enquanto a emissão nos espectros de quimiluminescência aumenta com o aumento na concentração de Ce(IV) , os máximos de emissão de fluorescência diminuem. Isto indica que a incidência de radiação pode levar a alterações no mecanismo de reação de luminescência.

- ▶ Nas condições estudadas de fluorescência, pequenas variações na concentração de H_2SO_4 e de Ce(IV) , não alteram a tendência de comportamento observada nas reações com concentração de H_2SO_4 constante. Entretanto, introduz-se grande dispersão nos resultados obtidos.
- ▶ Os diferentes comportamentos de alteração no comprimento de onda de emissão máximo, observados na quimiluminescência e na fluorescência, indicam que o mecanismo de emissão de fluorescência deve ser mais complexo e diferente que o de quimiluminescência.
- ▶ Para fins de desenvolvimento de aplicação analítica de luminescência para determinação de hidrocortisona, a condição de fluorescência pode ser viável, já que a intensidade de emissão é proporcional à concentração do corticóide.

5.2 Estudo com reação colorimétrica

Para os estudos de desenvolvimento analítico colorimétrico foi possível concluir que:

- ▶ O sistema reagente inicialmente proposto para determinação de acetato de hidrocortisona responde de maneira semelhante quando este é substituído por hidrocortisona, cortisona, acetato de cortisona e acetato de dexametasona.
- ▶ A adaptação do método analítico espectrofotométrico para leituras em equipamento portátil de medidas com grande simplicidade é possível. Isto pode estimular a realização de análises para controle de dosagens de corticóides em farmácias de manipulação.

- ▶ As figuras de mérito obtidas para o método analítico por medidas de espectrofotometria para determinação de hidrocortisona em formulações farmacêuticas comerciais indicam a validade da metodologia proposta. Além disso, quando os resultados obtidos por espectrofotometria e por fotometria foram comparados, obteve-se concordância significativa em teste estatístico.
- ▶ Quando aplicado à amostra comercial contendo como princípio ativo o acetato de cortisona, o método analítico também forneceu resultados estatisticamente semelhantes por medidas espectrofotométricas e fotométricas.
- ▶ A semelhança entre os espectros de absorção do produto de reação de todos os corticóides testados indica que a reação entre estes e o Mo(VI) em meio fortemente ácido depende de uma estrutura comum a todos.
- ▶ Algumas diferenças estruturais entre os corticóides não alteram o comprimento de onda de absorbância máxima do produto (como é o caso da presença do radical acetato), enquanto que outras alteram (radical ceto da cortisona por radical hidroxila na hidrocortisona e a introdução de radicais metila e flúor no acetato de dexametasona). Estas observações indicam que os produtos de reação entre os corticóides estudados, embora apresentem uma estrutura principal em comum, devem diferir nos pontos onde os derivados são substituídos.

CAPÍTULO 6: PERSPECTIVAS

6.1 Sistema Ce(IV) / SO_3^{2-}

- A luminescência do sistema químico Ce(IV) / SO_3^{2-} foi estudada em sistema estacionário, trazendo informações que podem ser úteis para complementar estudos futuros da quimiluminescência deste sistema.
- Descobriu-se que o sistema possui propriedades de fluorescência, que podem estar relacionadas com a formação da espécie excitada Ce(III)*, o que pode contribuir para elucidar o mecanismo de reação deste sistema.
- O sistema também tem sua intensidade de emissão de fluorescência alterada pela presença de hidrocortisona, o que aponta para a possibilidade de o desenvolvimento de método analítico para análise desta substância sensibilizadora também com base em propriedades de fluorescência.

6.2 Sistema Mo(VI) / H_2SO_4

- Este sistema também pode ser aplicado para hidrocortisona, o que permitiu desenvolver metodologia analítica para determinação de hidrocortisona e traz perspectivas futuras de desenvolvimento de proposta analítica para outras substâncias derivadas deste corticóide.
- O estudo adaptou o método analítico desenvolvido para medidas em equipamento fotométrico simples e de baixo custo, abrindo oportunidades para o desenvolvimento de metodologias analíticas rápidas e baratas para análise de hidrocortisona e substâncias correlatas em medicamentos.
- Discussões a respeito da reação entre Mo(VI) / H_2SO_4 e alguns corticóides trazem novas perspectivas para identificação do produto da reação e também de aplicação deste sistema para desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de substâncias com estruturas similares.

CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS

1. Korolkovas, A.; Burckhalter, J. H.; Química farmacêutica (trad. Essentials of medicinal chemistry); Ed. Guanabara Dois, Rio de Janeiro (1982).
2. Silva, P.; Farmacologia; Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (1994).
3. Martindale, W.; Reynold, J. E. F.; Martindale the Extra Pharmacopoeia; Ed. Pharmaceutical Press, London (1993).
4. List (IOC/WADA) of prohibited classes of substances and prohibited methods as from 2003 - Lista de classes de drogas proibidas do Comitê Olímpico Internacional (COI) de 2003, disponível em <http://www.olympic.org>, consultado em 8 de agosto de 2003.
5. Bévalot, F.; Gaillard, Y.; Lhermitte, M. A.; Pépin, G.; Analysis of corticosteroids in hair by liquid chromatography – electrospray ionization mass spectroscopy; *J. Chromatogr. B*, **740**, 227 (2000).
6. Atualização em corticoterapia, disponível em <http://www.corticoides.com.br>, consultado em 8 de agosto de 2003.
7. Cormier, C.; Effects of corticosteroids on bone. Bone loss kinetics and clinical impact management; *Rev. Fr. Allergol.*, **38**, 109 (1998).
8. Bozovic, V.; Enesco, H. E.; Cortisone extends life span in the rotifer *Asplanchna brightwelli*; *Arch. Gerontol. Geriat.*, **9**, 45 (1989).
9. Meulenberg, P. M. M.; Hofman, J. A.; The effect of oral contraceptive use and pregnancy on the daily rhythm of cortisol and cortisone; *Clin. Chim. Acta*, **190**, 211 (1990).
10. Vermeer, H.; Hendriks, B. I. S.; Van der Brink, C. E.; Van der Saag, P. T.; Van der Burg, B.; Van Buul-Offers, S. C.; Jansen, M.; A novel specific bioassay for the determination of glucocorticoid bioavailability in human serum; *Clin. Endocrinol.*, **59**, 49 (2003).
11. Klaitman, V.; Almog, Y.; Corticosteroids in sepsis: A new concept for an old drug; *Israel Med. Assoc. J.*, **5**, 51 (2003).
12. Florio, S.; Ciarcia, R.; Crispino, L.; Pagnini, U.; Ruocco, A.; Kumar, C.; D'Andrilli, G.; Russo, F.; Hydrocortisone has a protective effect on cyclosporinA-induced cardiotoxicity; *J. Cell. Physiol.*, **195**, 21 (2003).
13. Addison, T.; On the constitutional and local effects of disease of the supra-renal capsules; Ed. Samuel Highley (1855).
14. Rogoff, J. M.; Stewart, G. N.; Influence of adrenal extracts on the survival period of adrenalectomized dogs; *Science*, **66**, 327 (1927).

15. Swingle, W. W.; Pfiffner, J. J.; An aqueous extract of supra-renal cortex which maintains the life of bilaterally adrenalectomized cats; *Science*, **71**, 321 (1930).
16. Swingle, W. W.; Pfiffner, J. J.; The revival of comatose adrenalectomized cats with an extract of the supra-renal cortex; *Science*, **72**, 75 (1930).
17. Wintersteiner, O.; Pfiffner, J. J.; Vars, H. M.; Chemical studies on the adrenal cortex. I. Fractionation studies on hormones concentrates; *J. Biol. Chem.*, **111**, 585 (1935).
18. Kendall, E. C.; Adrenal cortex extract; *J. Am. Med. Assoc.*, **105**, 1486 (1935).
19. Kendall, E. C.; Mason, H. L.; Myers, C. S.; Chemical studies of the supra-renal cortex. II. The identification of a substance which possesses the qualitative action of cortin, its conversion into a diketone closely related to androstenedione; *J. Biol. Chem.*, **116**, 267 (1936).
20. Reichstein, T.; Cortin, the adrenal cortical hormone; *Helv. Chim. Acta*, **19**, 29 (1936).
21. Reichstein, T.; Constituents of the adrenal cortex. XXI. Constitution of substances R and S; *Helv. Chim. Acta*, **21**, 1490 (1938).
22. Sarett, L. H.; The partial synthesis of dehydrocorticosterone acetate; *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 2478 (1946).
23. Hench, P. S.; Kendall, E. C.; Slocumb, C. H.; Polley, H. F.; The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone-compound-E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis – preliminary report; *Ann. Rheum. Dis.*, **8**, 97 (1949).
24. Hench, P. S.; Kendall, E. C.; Slocumb, C. H.; Polley, H. F.; Cortisone – Effects on rheumatoid arthritis, rheumatic fever and other conditions; *Merck Rept.*, **59**, 9 (1950).
25. Song, N.; Li, Y. X.; Qu, F.; Synthesis of hydrocortisone glycosylamine derivatives; *Chin. J. Org. Chem.*, **23**, 361 (2003).
26. Oashi, M. C. G.; Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agronegócio do sisal na Paraíba; *Tese de Doutorado em engenharia- Pós-graduação em Engenharia de Produção*, Universidade Federal de Santa Catarina (1999).
27. Abad-Santos, F.; Zapater, P.; Novalbos, J.; Gallego-Sandín, S.; Galvez-Mugica, A.; Priego, J.; García, A. G.; Survey of oral hydrocortisone utilization in Madri (Spain); *Pharmacol. Res.*, **45**, 15 (2002).

28. Dotsch, J.; Dorr, H. G.; Stalla, G. K.; Sippell, W. G.; Effect of glucocorticoid excess on the cortisol/cortisone ratio; *Steroids*, **66**, 817 (2001).
29. Seligman, A. M.; Ravin, H. A.; A new method for the colorimetric estimation of urinary corticosteroids; *Cancer Res.*, **11**, 277 (1951).
30. Sobel, E. H.; Clark, L. C.; Brussel, M.; Prior, G.; Colorimetric fractionation of urinary ketosteroids in congenital adrenal hyperplasia – The induction of qualitative changes by treatment with cortisone and hydrocortisone; *AMA Am. J. Dis. Child*, **86**, 661 (1953).
31. Goldman, L.; Emura, E.; Baskett, J.; Quantitative colorimetric assay technic for corticosteroids in the skin of man; *J. Invest. Dermatol.*, **20**, 333 (1953).
32. Burstein, S.; Dorfman, R. I.; Hydrocortisone in normal guinea pig urine – isolation and quantitative determination; *J. Biol. Chem.*, **206**, 607 (1954).
33. Moog, F.; Kirsch, M. H.; Quantitative determination of phosphatase activity in chick embryo duodenum cultured in fluid media with and without hydrocortisone; *Nature*, **175**, 722 (1955).
34. Anonymous; Colorimetric reaction for the estimation of cortisone, hydrocortisone, aldosterone and related steroids; *Nature*, **175**, 123 (1955).
35. Szalkowski, C. R.; Obrien, M. G.; Mader, W. J.; Determination of hydrocortisone; *Anal. Chem.*, **27**, 944 (1955).
36. Silber, R. H.; Busch, R. D.; Improved procedure for the determination of hydrocortisone in human plasma; *J. Clin. Endocr. Metab.*, **16**, 1333 (1956).
37. Schulz, E. P.; Neuss, J. D.; Colorimetric assay for cortisone, hydrocortisone, and related steroids; *Anal. Chem.*, **29**, 1662 (1957).
38. Peterson, R. E.; Karrer, A.; Guerra, S. L.; Evaluation of silber-porter procedure for determination of plasma hydrocortisone; *Anal. Chem.*, **29**, 144 (1957).
39. Kurath, P.; Ganis, F. M.; Radakovich, M.; Determination of the site of C-14 in hydrocortisone-C-14 derived from cholesterol-21-C-14 incubated with bovine adrenal gland tissue; *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5323 (1957).
40. Mader, W. J.; Buck, R. R.; Colorimetric determination of cortisone and related ketol steroids; *Anal. Chem.*, **24**, 666 (1952).
41. Ansari, S.; Khan, R. A.; A note on the colorimetric assay of cortisone and hydrocortisone; *J. Pharm. Pharmacol.*, **12**, 122 (1960).

42. Truckses, M. W.; Donoso, J.; Craig, G.; Colorimetric determination of hydrocortisone in milk; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **52**, 932 (1969).
43. Mooney, R. P.; Pasarela, N. R.; Residue determination – A thin layer chromatographic procedure for determination of hydrocortisone acetate and alcohol residues in milk; *J. Agr. Food Chem.*, **14**, 12 (1966).
44. Bracey, A.; Garrett, L.; Weiss, P. J.; Determination of hydrocortisone and hydrocortisone acetate in antibiotic mastitis preparation; *J. Pharm. Sci.*, **55**, 1113 (1966).
45. Rudd, B. T.; Cowper, J. M.; Crawford, N.; Determination of plasma free hydrocortisone and corticosterone by a combined fluorimetric and modified porter-silber procedure; *Clin. Chim. Acta*, **6**, 686 (1961).
46. Bertrand, J.; Frederich, A.; Gilly, R.; Roux, L. B.; Saez, J. M.; Determination de la secretion cortico-surrenale en hydrocortisone par une technique de dilution isotopique – Chez deux nourrissons atteints de syndrome de debre-fibiger et dans deux cas de nanisme hypophysaire traite par lhormone de croissance humaine; *Arch. Fr. Pediatr.*, **20**, 299 (1963).
47. Jansen, J. A.; Hvidberg, E.; Schou, J.; A spectrophotofluorometric micromethod for determination of cortisol (hydrocortisone) in plasma and tissue obtained by needle biopsies; *Scand. J. Clin. Lab. Inv.*, **20**, 49 (1967).
48. Bruinvels, J.; A simple method for separation and determination of aldosterone, hydrocortisone and corticosterone; *Experientia*, **19**, 551 (1963).
49. Garg, D. C.; Ayres, J. W.; Wagner, J. G.; Determination of methylprednisolone and hydrocortisone in plasma using high-pressure liquid-chromatography; *Res. Commun. Chem. Path.*, **18**, 137 (1977).
50. Smith, M. D.; Hoffman, D. J.; High-performance liquid-chromatographic determination of hydrocortisone and methylprednisolone and their hemisuccinate salts; *J. Chromatogr.*, **168**, 163 (1979).
51. Goehl, T. J.; Sundaresan, G. M.; Prasad, V. K.; Fluorometric high-pressure liquid-chromatographic determination of hydrocortisone in human-plasma; *J. Pharm. Sci.*, **68**, 1374 (1979).
52. Smith, M. D.; High-performance liquid-chromatographic determination of hydrocortisone and methylprednisolone and their hemisuccinate esters in human-serum; *J. Chromatogr.*, **164**, 129 (1979).

53. Jacobsen, E.; Korvald, B.; Differential pulse polarographic-determination of hydrocortisone in pharmaceutical preparations; *Anal. Chim. Acta*, **99**, 255 (1978).
54. De Boer, H. S.; Lansaat, P. H.; Van Oort, W. J.; Polarographic analysis for corticosteroids. 2. Determination of corticosteroids in single-component solutions, suspensions ointments and creams; *Anal. Chim. Acta*, **108**, 389 (1979).
55. De Boer, H. S.; Lansaat, P. H.; Kooistra, K. R.; Van Oort, W. J.; Polarographic analysis for corticosteroids. 3. Determination of corticosteroids in single-component tablets; *Anal. Chim. Acta*, **111**, 275 (1979).
56. Au, D. C.; Runikis, J. O.; Abbott, F. S.; Determination of hydrocortisone and triamcinolone acetonide in tissue-culture by gas-liquid-chromatography; *Can. J. Pharm. Sci.*, **13**, 101 (1978).
57. Ibrahim, E. A.; Wahbi, A. M.; Abdelsal, M. A.; Colorimetric determination of corticosteróides using aldehyde-sulfuric acid color-reaction.2.; *Pharmazie*, **28**, 232 (1973).
58. Brahim, E. A. I.; Wahbi, A. M.; Salam, M. A.; Colorimetric determination of corticosteroids using ammonium molybdate; *Pharmazie*, **28**, 195 (1973).
59. Oteiza, R. M.; Krottinger, D. L.; McCracken, M. S.; Malmstadt, H. V.; Reaction-rate method for determination of hydrocortisone; *Anal. Chem.*, **49**, 1586 (1977).
60. Oteiza, R. M.; Wooten, R. S.; Kenner, C. T.; Graham, R. E.; Biehl, E. R.; Kinetics and mechanism of blue tetrazolium reaction with corticosteroids; *J. Pharm. Sci.*, **66**, 1385 (1977).
61. Koupparis, M. A.; Walczak, K. M.; Malmstadt, H. V.; Corticosteroid determination in skin preparations by a reaction – rate method; *J. Pharm. Sci.*, **68**, 1479 (1979).
62. Farmacopéia Brasileira - 3ª edição, Ed. Organização Andrei, São Paulo (1977).
63. Agabeyoglu, I. T.; Wagner, J. G.; Kay, D. R.; A sensitive high-pressure liquid-chromatographic method for the determination of prednisone, prednisolone and hydrocortisone in plasma; *Res. Comm. Chem. Path. Pharm.*, **28**, 163 (1980).
64. Petersen, M. C.; Nation, R. L.; Ashley, J. J.; Simultaneous determination of bethametasone, bethametasone acetate and hydrocortisone in biological-fluids using high-performance liquid-chromatography; *J. Chromatogr.*, **183**, 131 (1980).

65. Munson, J. W.; Wilson, T. D.; High-performance liquid-chromatographic determination of hydrocortisone cyprionate – Method development and characterization of chromatographic behavior; *J. Pharm. Sci.*, **70**, 177 (1981).
66. Alvinerie, M.; Toutain, P. L.; Simultaneous determination of corticosterone, hydrocortisone, and dexamethasone in dog plasma using high-performance liquid-chromatography; *J. Pharm. Sci.*, **71**, 816 (1982).
67. Rego, A.; Nelson, B.; Simultaneous determination of hydrocortisone and benzyl alcohol in pharmaceutical formulations by reversed-phase high-pressure liquid-chromatography; *J. Pharm. Sci.*, **71**, 1219 (1982).
68. Walters, M. J.; Liquid-chromatographic determination of hydrocortisone in bulk drug substance and tablets – collaborative study; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 218 (1984).
69. Rohdewald, P.; Rehder, J.; Drehsen, G.; Hochhaus, G.; Derendorf, H.; Mollmann, H.; Simultaneous determination of glucocorticoid alcohols, their succinates and hydrocortisone in plasma; *J. Pharm. Biom. Anal.*, **3**, 565 (1985).
70. Derendorf, H.; Rohdewald, P.; Hochhaus, G.; Mollmann, H.; HPLC determination of glucocorticoid alcohols, their phosphates and hydrocortisone in aqueous-solutions and biological-fluids; *J. Pharm. Biom. Anal.*, **4**, 197 (1986).
71. Prasad, V. K.; Ho, B.; Haneke, C.; Simultaneous determination of prednisolone acetate, prednisolone, prednisone, cortisone and hydrocortisone in swine plasma using solid-phase and liquid-liquid-extraction techniques; *J. Chromatogr.*, **378**, 305 (1986).
72. Williams, P. A.; Biehl, E. R.; High-Pressure Liquid Chromatographic determination of corticosteroids in topical pharmaceuticals; *J. Pharm. Sci.*, **70**, 530 (1981).
73. Scott, N. R.; Chakraborty, J.; Marks, V.; Determination of prednisolone, prednisone and cortisol in human – plasma by High-Performance Liquid-Chromatography; *Anal. Biochem.*, **108**, 266 (1980).
74. Tokunaga, H.; Kimura, T.; Kawamura, J.; determination of corticoids using pyrrole.3. Fluorometric-determination of hydrocortisone, prednisolone and cortisone; *Yakugaku Zasshi*, **100**, 200 (1980).
75. Tokunaga, H.; Tanno, M.; Kimura, T.; Determination of corticoids using pyrrole. 5. Studies on the colored products; *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1118 (1987).

76. Mynka, A. F.; Sen'kiv, N. P.; Kopiichuk, I. I.; Yavorskaya, L. P.; Quantitative polarographic determination of drugs from the cortisone group; *Farm. Zh. (Kiev)*, **6**, 45 (1989).
77. Mohamed, A. S.; Mohamed, F. A.; Hassan, H. A.; Selim, N. M.; Fluorimetric determination of plasma cortisol in chronic renal failure; *Anal. Lett.*, **20**, 1265 (1987).
78. Portugal, H.; Pauli, A. M.; Pastor, J.; Dosage spectrofluorimétrique de l'hydrocortisone et de la cortisone; *Analisis*, **16**, 63 (1988).
79. De Boever, J.; Kohen, F.; Serreyn, R.; Vendekerckhove, D.; Van Maele, G.; Application of chemiluminescence immunoassays for steroid-hormones in clinical endocrinological investigations in women; *Anal. Chim. Acta*, **170**, 125 (1985).
80. Van Dyke, K.; Bioluminescence and chemiluminescence: Instruments and applications; volumes I e II. Ed. CRC Press, Boca Raton (1985).
81. "British Pharmacopoeia" HM Stationery Office, London (1980).
82. The United States Pharmacopeia: The National Formulary - 25th edition, United States Pharmacopeial Convention (2002).
83. Weidmer, S. K.; Siren, H.; Riekkola, M. L.; Determination of serum corticosteroids by mixed micellar electro-kinetic capillary chromatography with sodium dodecyl sulfate and sodium cholate; *Electrophoresis*, **18**, 1861 (1997).
84. Turpeinen, U.; Markkanen, H.; Valimaki, M.; Stenman, U. H.; Determination of urinary free cortisol by HPLC; *Clin. Chem.*, **43**, 1386 (1997).
85. Doppenschmitt, S. A.; Scheidel, B.; Harrison, F.; Surmann, J. P.; Simultaneous determination of triamcinolone acetonide and hydrocortisone in human plasma by high-performance liquid chromatography; *J. Chromatogr. B - Biom. Appl.*, **682**, 79 (1996).
86. Doppenschmitt, S. A.; Scheidel, B.; Harrison, F.; Surmann, J. P.; Simultaneous determination of prednisolone, prednisolone acetate and hydrocortisone in human serum by high-performance liquid chromatography; *J. Chromatogr. B - Biom. Appl.*, **674**, 237 (1995).
87. Kountourellis, J. E.; Markopoulou, C. K.; Ebete, K. O.; Stratis, J. A.; Separation and determination of some corticosteroids combined with bamipine in pharmaceutical formulations by high-performance liquid-chromatography; *J. Liq. Chromatogr.*, **18**, 3507 (1995).

88. Terada, H.; Yamamoto, K.; Miyabe, M.; Determination of corticosteroids and anabolic agents in health food by high-performance liquid-chromatography; *Japanese J. Toxicol. Env. Health*, **38**, 537 (1992).
89. Glowka, F. K.; Hermann, T. W.; RP-HPLC procedure for determination of hydrocortisone in serum for use in pharmacokinetics; *Chemia Analityczna*, **44**, 373 (1999).
90. Ku, Y. R.; Wen, K. C.; Ho, L. K.; Chang, Y. S.; Solid-phase extraction and high performance liquid chromatographic determination of steroids adulterated in traditional Chinese medicines; *J. Food Drug Analysis*, **7**, 123 (1999).
91. Nikolic, K.; Medenica, M.; Bogavac, M.; Arsenijevic, L.; Chlorocoulometric determination of hydrocortisone and hydrocortisone acetate; *Farmaco*, **46**, 623 (1991).
92. Dikkeschei, L. D.; Nagel, G. T.; Kraan, G. P. B.; Deruyterbuitenhuys, A. W.; Schade, J. H.; Wolthers, B. G.; Vanderslik, W.; GC-MS as a reference method immunochemical steroid-hormone analyses; *J. Clin. Immun.*, **14**, 37 (1991).
93. Amin, A. S.; Colorimetric microdetermination of some corticosteroid drugs using indophenol as chromophoric reagent; *Anal. Lett.*, **29**, 1527 (1996).
94. Blanco, M.; Coelho, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Villegas, N.; Kinetic spectrophotometric determination of hydrocortisone acetate in a pharmaceutical preparation by use of partial least-squares regression; *Analyst*, **124**, 911 (1999).
95. Li, H.; Ci, Y. X.; Flow – injection chemiluminescence method for the determination of hydrocortisone and progesterone; *Applied Spect.*, **51**, 1484 (1997).
96. Syropoulos, A. B.; Sarantonis, E. G.; Calokerinos, A. C.; Flow - injection chemiluminometric analysis of some steroids by their sensitizing effect on the bromate – sulphite reaction; *Anal. Chim. Acta*, **239**, 195 (1990).
97. Koukli, I. I.; Calokerinos, A. C.; Continuous flow chemiluminescence determination of some corticosteroids; *Analyst*, **115**, 1553 (1990).
98. Deftereos, N. T.; Calokerinos, A. C.; Flow-injection chemiluminometric determination of steroids; *Anal. Chim. Acta*, **290**, 190 (1994).

99. Grippa, E.; Santini, L.; Castellano, G.; Gatto, M. T.; Leone, M. G.; Saso, L.; Simultaneous determination of hydrocortisone, dexamethasone, indomethacin, phenylbutazone and oxyphenbutazone in equine serum by high-performance liquid-chromatography; *J. Chromatogr. B*, **738**, 17 (2000).
100. Gallego, J. M. L.; Arroyo, J. P.; Simultaneous determination of hydrocortisone, oxytetracycline and nystatin by liquid chromatography; *Chromatographia*, **55**, 749 (2002).
101. Gallego, J. M. L.; Arroyo, J. P.; Comparison of HPLC and multivariate regression methods for hydrocortisone and lidocaine analysis of pharmaceutical preparations; *Anal. Bioanal. Chem.*, **374**, 282 (2002).
102. Gallego, J. M. L.; Arroyo, J. P.; Determination of hydrocortisone and associated compounds in pharmaceutical preparations by micellar electrokinetic chromatography; *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, **26**, 1011 (2003).
103. Gallego, J. M. L.; Arroyo, J. P.; Determination of hydrocortisone, polymyxin B and Zn-bacitracin in pharmaceutical preparations by micellar electro-kinetic chromatography; *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**, 617 (2003).
104. Gallego, J. M. L.; Arroyo, J. P.; Micellar electro-kinetic capillary chromatography as an alternative method for determination of hydrocortisone and its most important associated compounds in local pharmaceutical preparations; *Chromatographia*, **56**, 455 (2002).
105. Peiro, M. E. C.; Agusti, M. G.; Pons, L. M.; Romero, J. E.; Direct injection micellar liquid chromatographic method for the analysis of corticosteroids in creams, ointments and other pharmaceuticals; *Anal. Chim. Acta*, **454**, 125 (2002).
106. Okamoto, H.; Uetake, A.; Tamaya, R.; Nakajima, T.; Sagara, K.; Ito, Y.; Simultaneous determination of ingredients in an ointment by hydrophobic interaction electro-kinetic chromatography; *J. Chromatogr. A*, **929**, 133 (2001).
107. Gallego, J. M. L.; Arroyo, J. P.; Determination of hydrocortisone 21-hemisuccinate, oxytetracycline and nystatin in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis; *Anal. Lett.*, **35**, 2105 (2002).
108. Nikolich, K.; Sergides, C.; Pittas, A.; The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the quantitative analysis of hydrocortisone in primary materials; *J. Serb. Chem. Soc.*, **66**, 189 (2001).

109. Gallego, J. M. L.; Arroyo, J. P.; Spectrophotometric determination of hydrocortisone, nystadin and oxytetracycline in synthetic and pharmaceutical preparations based on various univariate and multivariate methods; *Anal. Chim. Acta*, **460**, 85 (2002).
110. Gallego, J. M. L.; Arroyo, J. P.; Simultaneous determination of hydrocortisone and Zn-Bacitracin by spectrophotometric derivative and multivariate methods; *Microchim. Acta*, **141**, 133 (2003).
111. Vicentin, A.; Pezza, L.; Pezza, H. R.; Desenvolvimento de método espectrofotométrico para análise de acetato de hidrocortisona em pomadas usando molibdato de amônio; *XLII Congresso Brasileiro de Química – Livro de Resumos*, 128 (2002).
112. Vicentin, A.; Franzini, V. P.; Pezza, L.; Pezza, H. R.; Determinação espectrofotométrica de acetato de hidrocortisona usando molibdato de amônio; *49ª Jornada Farmacêutica da UNESP – CD de resumos*, (2002).
113. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; Principles of Instrumental analysis; 5th ed., Ed. Sounders College, Philadelphia (1998).
114. Koukli, I. I.; Sarantonis, E. G.; Calokerinos, A. C.; Effect of sensitizers on the chemiluminescent reduction of cerium (IV) by sulphite; *Anal. Lett.*, **23**, 1167 (1990).
115. Dodeigne, C.; Thunus, L.; Lejeune, R.; Chemiluminescence as diagnostic tool. A review; *Talanta*, **51**, 415 (2000).
116. Stauff, J.; Jaeschke, W.; A chemiluminescence technique for measuring atmospheric trace concentrations of sulfur dioxide; *Atmos. Environ.*, **9**, 1038 (1975).
117. Yamada, M.; Nakada, T.; Suzuki, S.; The determination of sulfite in a flow injection system with chemiluminescence detection; *Anal. Chim. Acta*, **147**, 401 (1983).
118. Al-Tamrah, S. A.; Townshend, A.; Wheatley, A. R.; Flow injection chemiluminescence determination of sulphite; *Analyst*, **112**, 883 (1987).
119. Huang, Y.; Zhang, C.; Zhang, X.; Zhang, Z.; Chemiluminescence of sulfite based on auto-oxidation sensitized by rhodamine 6G; *Anal. Chim. Acta*, **391**, 95 (1999).

120. Kato, M.; Yamada, M.; Suzuki, S.; Flavin mononucleotide sensitized and polyoxyethylene (20) sorbitan trioleate Michelle-enhanced gas / solution chemiluminescence for direct continuous monitoring of sulfur dioxide in the atmosphere; *Anal. Chem.*, **56**, 2529 (1984).
121. Deftereos, N. T.; Calokerinos, A. C.; Efstathiou, C. E.; Flow injection chemiluminometric determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and L-dopa; *Analyst*, **118**, 627 (1993).
122. Zhang, X. R.; Baeyens, W. R. G.; Van der Weken, G.; Calokerinos, A. C.; Imai, K.; Chemiluminescence determination of some local anaesthetics; *Anal. Chim. Acta*, **303**, 137 (1995).
123. Zheng, X.; Zhang, Z.; Flow injection chemiluminescence determination of quinine using Mn^{3+} as the oxidant; *Anal. Sci.*, **16**, 1345 (2000).
124. Takeuchi, K.; Ibusuki, T.; Determination of traces of hydrogen sulfite by chemiluminescence with cerium (IV) sulfate as the reagent; *Anal. Chim. Acta*, **174**, 359 (1985).
125. Cukor, P.; Weberling, R. P.; Spectrofluorimetric determination of trace amounts of cerium in yttrium oxide; *Anal. Chim. Acta*, **41**, 404 (1968).
126. Kirkbright, G. F.; West, T. S.; Woodward, C.; Some spectrofluorimetric applications of the cerium (IV) – cerium (III) system; *Anal. Chim. Acta*, **36**, 298 (1966).
127. Huang, Y.; Chen, Z.; Zhang, Z.; Chemiluminescent determination of menadione sodium bisulfite; *Anal. Lett.*, **32**, 2789 (1999).
128. Rao, Y.; Tong, Y.; Zhang, X.; Luo, G.; Baeyens, W. R. G.; Determination of ofloxacin using a chemiluminescence flow – injection method; *Anal. Chim. Acta*, **416**, 227 (2000).
129. Rao, Y.; Tong, Y.; Zhang, X.; Luo, G.; Baeyens, W. R. G.; Flow – injection chemiluminescence determination of fluoroquinolones; *Anal. Lett.*, **33**, 1117 (2000).
130. Koukli, I. I.; Sarantonis, E. G.; Calokerinos, A. C.; Continuous-flow chemiluminescence determination of sulphite and sulphur-dioxide; *Analyst*, **113**, 603 (1988).
131. Paulls, D. A.; Townshend, A.; Sensitized determination of sulfite using flow injection with chemiluminescence detection; *Analyst*, **120**, 467 (1995).

132. Psarellis, I. M.; Sarantonis, E. G.; Calokerinos, A. C.; Flow injection chemiluminometric determination of sodium cyclamate; *Anal. Chim. Acta*, **272**, 265 (1993).
133. Cardoso, C. E.; Martins, R. O. R.; Telles, C. A. S.; Aucélio, R. Q.; Método espectrofluorimétrico com pré-tratamento fotoquímico para a determinação de succinato sódico de hidrocortisona e epinefrina; *25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Livro de resumos*, QA 007 (2002).
134. Aman, T.; Kazi, A. A.; Hussain, M. I.; Firdous, S.; Khan, I. U.; Spectrophotometric determination of amitriptyline-HCl in pure and pharmaceutical preparations; *Anal. Lett.*, **33**, 2477 (2000).
135. Aman, T.; Rashid, A.; Khokhar, I.; Spectrophotometric determination of canabidiol; *Anal. Lett.*, **26**, 2113 (1993).
136. Aman, T.; Hassan, A.; Khokhar, I.; Rashid, A.; Spectrophotometric determination of atropine; *Anal. Lett.*, **27**, 1833 (1994).
137. Aman, T.; Rashid, A.; Kulsoom, R.; Khokhar, I.; Spectrophotometric determination of streptomycin; *Anal. Lett.*, **28**, 881 (1995).
138. Aman, T.; Ali, A.; Khokhar, I.; Rashid, A.; Spectrophotometric determination of some antipsychotic phenothiazines; *Mikrochim. Acta*, **126**, 295 (1997).
139. Aman, T.; Rashid, A.; Khokhar, I.; Iqbal, J.; Spectrophotometric determination of chlorpromazine; *Anal. Lett.*, **30**, 109 (1997).
140. Aman, T.; Shahid, M. S.; Rashid, A.; Khokhar, I.; Spectrophotometric determination of ephedrin hydrochloride; *Anal. Lett.*, **30**, 1517 (1997).
141. Aman, T.; Khan, I. U.; Parveen, Z.; Spectrophotometric determination of barbituric acid; *Anal. Lett.*, **30**, 2765 (1997).
142. Aman, T.; Khan, I. U.; Aslam, N.; Ahmad, I.; Spectrophotometric determination of methyldopa in pure and pharmaceutical preparations; *Anal. Lett.*, **31**, 1007 (1998).
143. Khan, I. U.; Aman, T.; Ashraf, A.; Kazi, A. A.; Spectrophotometric determination of naproxen in pure and pharmaceutical preparations; *Anal. Lett.*, **32**, 2035 (1999).
144. Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; Advanced Inorganic Chemistry; Ed. John Wiley and Sons (1980).

145. Vogel, A. I.; *Análise Inorgânica Quantitativa*; Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (1981).
146. Ewing, G. W.; *Instrumental Methods of Chemical Analysis*; Ed. McGraw-Hill, New York (1975).
147. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; *Fundamentals of Analytical Chemistry*; Ed. Saunders College, Philadelphia (1992).
148. Koch, W.; Dunkhorst, W.; Lodding, H.; Design and performance of a new personal aerosol monitor; *Aerosol Sci. Tech.*, **31**, 231 (1999).
149. Dasgupta, P. K.; Huang, H.; Zhang, G.; Cobb, G. P.; Photometric measurement of trace As(III) and As(V) in drinking water; *Talanta*, **58**, 153 (2002).
150. Anon; New analytical technique 2 – Measures butterfat in 30 sec – Simple photometric unit gives precise direct readings on skim and milk – At about half cost of babcock test; *Food Eng.*, **39**, 78 (1967).
151. Spolaczyk, R.; Maas, A.; Treptow, R.; New device for the photometric measurement of samples is useful to provide continuous evaluation of a polymerase chain reaction in a thermocycler; *Patent Number: WO2003002991A2 (German)*.
152. Berry, R. J.; Harris, J. E.; Williams, R. R.; Light-emitting diodes as sensors for colorimetric analyses; *Appl. Spectrosc.*, **51**, 1521 (1997).
153. Rossi, A. V.; He, X.; Tubino, M.; A simple, portable and low cost device for a colorimetric spot-test quantitative analysis; *Anal. Lett.*, **33**, 1885 (2000).
154. Resolução do Conselho Federal de Farmácia nº 357 de 2001, disponível em http://www.uff.org.br/legis/resolucoes/res_357_2001.htm, consultado em 3 de setembro de 2002.
155. Vidros qualidade Duran, disponível <http://www.laborglas.com.br/duran2.htm>, consultado em 3 de setembro de 2002.
156. Ferreira, E. C.; Rossi, A. V.; Sistema de injeção simultânea de reagentes líquidos para monitoramento cinético com aplicações analíticas; *20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Livro de resumos*, ED 047 (1997).
157. Youmans, H. L.; *Statistic for Chemistry*; Ed. C. E. Merrill, Columbus (1973).
158. Dicionário de especialidades farmacêuticas (DEF); Edição 2001/02. Ed. de Publicações Científicas, Rio de Janeiro (2002).

159. Balcerzak, M.; Marczenko, Z.; Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis; Ed. Elsevier Sciences, Amsterdam (2000).
160. Snell, F. D.; Snell, C. T.; Snell, C. A.; Colorimetric methods of analysis – Vol. 2A; Ed.: D. Van Nostrand Company, Princeton (1959).
161. Brauer, G.; Handbook of preparative inorganic chemistry – Vol.2; Ed. Academic Press, New York (1965).
162. Lee, J. D.; Química Inorgânica Concisa (trad. 5ªed. inglesa); Ed. Edgard Blucher, São Paulo (1999).
163. Sawicki, E.; Photometric Organic Analysis – Basic principles with applications; Ed. Wiley-Interscience, New York (1970).
164. Guekezian, M.; Coichev, N.; Suárez-Iha, M. E. V.; Stability of sulfur(IV) solutions in the presence of amines and the tendency of sulfite ions to disproportionate in stock solutions; *Anal. Lett.*, **30**, 1423 (1997).
165. Anderson, R. L.; Practical Statistics for analytical chemists; Ed. Van Nostrand Reinhold, New York (1987).
166. Baccan, N.; Andrade, J. C.; Godinho, O. E. S.; Barone, J. S.; Química analítica quantitativa elementar, 2ª ed.; Ed. Unicamp, Campinas (1985).
167. Harris, D. C.; Análise Química Quantitativa; Ed. Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro (2001).
168. Kellner, R.; Mermet, J. M.; Otto, M. Widmer, H. M.; Analytical Chemistry; Ed. Wiley-VHC, New York (1998).
169. Loumanna, N.; Absorptiometric determination of molybdenum as molybdenum (V) thiocyanate in steel; *Anal. Chim. Acta*, **33**, 21 (1965).
170. Solomons, T. W. G.; Química Orgânica; Ed. Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro (1996).
171. Sykes, P.; Investigación de mecanismos de reacción en química orgánica; Ed. Reverté, Barcelona (1975).
172. Caulcutt, R.; Boddy, R.; Statistics for analytical chemists; Ed. Chapman & Hall, London (1989).