

3 Materiais e métodos

3.1. Reagentes

Todos os compostos e reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico e não sofreram etapas prévias de purificação. A água utilizada foi deionizada (resistividade de 18,2 MOhm cm) por um ultrapurificador Master System 1000 da Gehaka (São Paulo – Brasil).

O ciclofenil utilizado neste trabalho foi doado pelo Departamento de Farmacologia da Universidade de Brasília (UnB), sua pureza foi confirmada pela determinação do ponto de fusão (255-256 °C). Os testes de dosagem desse princípio ativo foram realizados no medicamento Menopax®, da Ache (Guarulhos, SP), apresentado em comprimidos de administração oral, contendo segundo bula, 200 mg de ciclofenil por cápsula.

O difosfato de primaquina foi obtido da Sigma Chem. Co. (St Louis, USA), e o teste de dosagem para a primaquina foi realizado no medicamento Primaquina do laboratório Far-Manguinhos (Rio de Janeiro - Brasil) apresentado em comprimidos de administração oral contendo segundo a bula 26,3 mg de difosfato de primaquina por comprimido.

O metanol, utilizado como solvente para o ciclofenil foi adquirido da Merck (Darmstad, Alemanha). Os diversos reagentes utilizados para se preparar os eletrólitos de suporte, foram hidróxido de sódio (Merck), hidróxido de amônio (Isofar, Rio de Janeiro, RJ), cloreto de amônio (Vetec Química Fina LTDA – Rio de Janeiro, RJ), cloreto de potássio (Vetec), nitrato de potássio (Merck), citrato de amônio (Química Moura Santo Amaro, SP) e acetato de sódio (Merck), todos de grau analítico.

Os diversos ácidos utilizados foram: ácido acético glacial (Vetec), ácido tartárico (Reagen, Rio de Janeiro, RJ), ácido clorídrico (Merck), ácido nítrico

(Vetec) ácido fosfórico (Vetec), ácido bórico (Reagen, Quimibrás Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro - Brasil) e ácido sulfúrico (Merck).

Outros reagentes foram utilizados apenas para alguns poucos testes, o pentóxido de vanádio (BDH, Poole, Inglaterra), iodeto de potássio (Merck, Rio).

O nitrogênio utilizado foi da White Martins (Rio de Janeiro, Brasil), com teor de pureza de 99,996 %. Mesmo com este teor de pureza o fabricante recomenda um procedimento para remoção do oxigênio ⁶⁸, neste procedimento utilizou-se metavanadato de amônio (Química Moura Brasil, São Paulo - Brasil), ácido clorídrico concentrado, zinco em pó, e uma pequena quantidade de mercúrio metálico. O mercúrio utilizado nesta etapa foi o mesmo utilizado em todo o trabalho, proveniente da Princeton Applied Research.

Para o procedimento de clarificação da urina foi utilizado sulfato de amônio (Reagen).

3.2. Instrumentação

3.2.1. Reator fotoquímico

O reator fotoquímico utilizado para irradiar a solução de ciclofenil, obtendo assim o seu fotoproduto, foi um reator construído no laboratório e constituído por quatro lâmpadas de emissão máxima (λ_{max}) a 300 nm (Lâmpada para esterilização de vapor de mercúrio, 6W cada. Microbiológica, Rio de Janeiro, Brasil). A Figura 10 mostra um esquema deste reator.

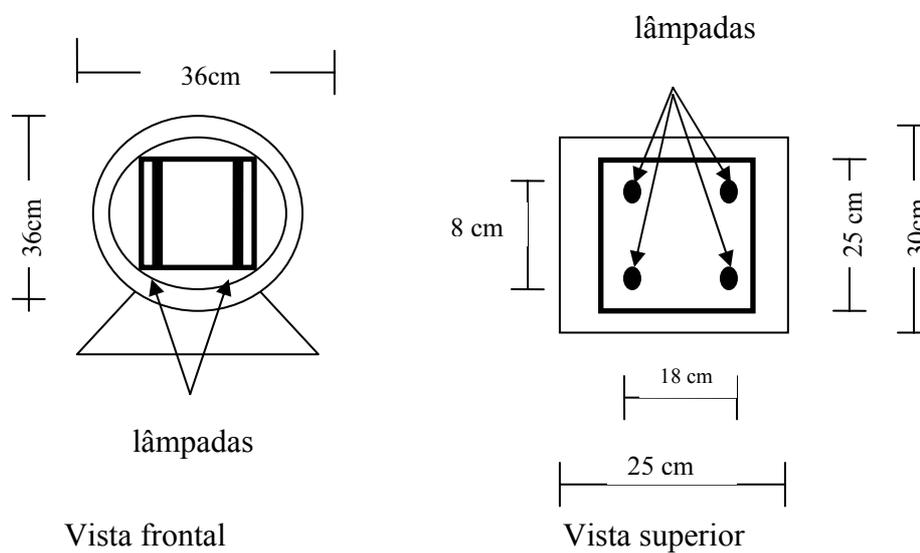


Figura 10 – Representação esquemática do reator fotoquímico utilizado.

3.2.2. Analisador polarográfico

O analisador polarográfico utilizado foi um da EG&G Princeton Applied Research (PAR) modelo 384 B Polarographic Analyser, acoplado a um eletrodo de gota pendente de mercúrio (SMDE) modelo 303-A PAR, utilizado no modo HMDE (eletrodo de gota pendente de mercúrio). Nos estudos com a primaquina, foi também utilizado o eletrodo de trabalho de carbono vítreo (ECV). O agitador magnético para manter a agitação nas celas polarográficas foi um modelo 305 PAR.

O potenciostato (Figura 11) é constituído de dois circuitos principais, um que aplica o potencial na célula eletroquímica (mais exatamente, entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência) e um circuito que monitora a corrente na célula (entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar) ^{51 69}. Além desses, existem amplificadores operacionais utilizados para corrigir o potencial do eletrodo de referência, quando este apresenta um valor muito baixo, o amplificador operacional controlará um “loop”, corrigindo este potencial.

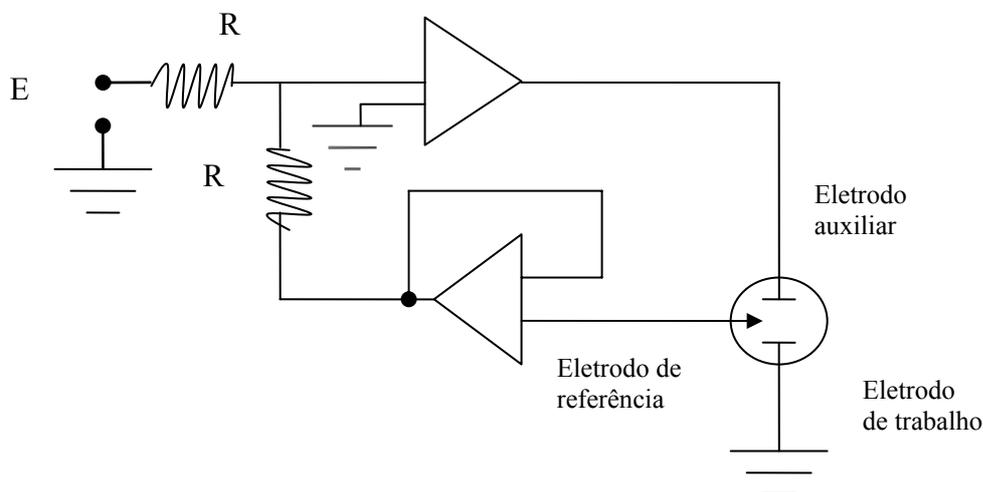


Figura 11 – Representação esquemática do potenciostato de três eletrodos, com loop de retorno.

As características importantes para um potenciostato são o baixo ruído, alta *compliance voltage* (capacidade de aplicar altos potenciais ao eletrodo de

trabalho, embora muitas vezes altos potenciais podem acarretar em maior ruído), *broad bandwidth* (parâmetro que se refere ao tempo de resposta do aparelho, para análises voltamétricas de altas velocidades de varredura este parâmetro é essencial), a habilidade de manter baixas correntes e a capacidade de aplicar potencial em um grande intervalo de potencial ⁷⁰.

Os eletrodos nestes tipos de analisadores são três. Um é o eletrodo de referência, que é constituído de um fio de prata, imerso em uma solução saturada de cloreto de potássio, de forma a ocorrer à deposição de uma fina camada de cloreto sob o fio de prata (eletrodo Ag/AgCl). Este eletrodo possui potencial fixo e conhecido de -45 mV com relação a um Eletrodo de referência saturado de Calomelano (ESC). Seu contato com a solução analítica se dá através de um disco de vidro sinterizado adaptado a um tubo de vidro que envolve o eletrodo de referência.

Outro eletrodo é o auxiliar (ou contra eletrodo), feito de um fio de platina. Ele tem como função principal minimizar os erros causados pela resistência da célula no controle do potencial do eletrodo de trabalho. Para isto, ele deve ficar o mais próximo possível do eletrodo de trabalho, e a corrente resultante entre este eletrodo e o eletrodo de trabalho é a corrente que será registrada.

Existe um certo número de outros eletrodos de trabalho além do eletrodo de mercúrio e do eletrodo de carbono vítreo. Por exemplo, podemos citar os eletrodos de platina, ouro, cera impregnada com grafite, eletrodos de pasta de carbono modificados com substâncias químicas para determinações específicas, e o de filme de mercúrio (TFE). O TFE é preparado pela deposição eletrolítica de uma pequena quantidade de mercúrio sob um dos eletrodos sólidos mencionados sendo um substituto do eletrodo de gota de mercúrio.

O eletrodo de gota pendente de mercúrio foi escolhido para ser empregado neste trabalho devido a sua alta sensibilidade, reprodutividade, simplicidade de uso e por possuir uma faixa de potencial catódico relativamente grande (0,000 V a -1,900 V). Para os estudos com a primaquina, esta janela de potencial não foi satisfatória, pois o sinal da primaquina aparece em regiões mais positivas (0,592 V). Para se conseguir uma condição favorável para a determinação deste composto, foi utilizado o eletrodo de carbono vítreo, uma vez que este eletrodo abrange uma faixa de potencial positiva muito maior que o eletrodo de mercúrio (Figura 12).

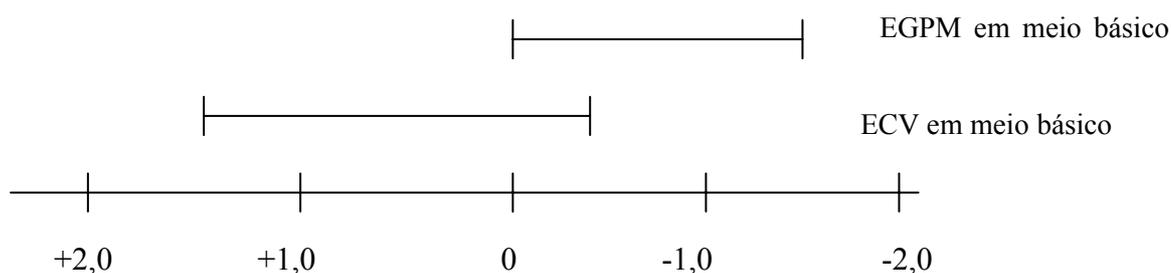


Figura 12 – Faixa de potencial de trabalho para o eletrodo de carbono vítreo (ECV) e para o eletrodo de gota pendente de mercúrio (EGPM) nos eletrólitos suportes utilizados.

As células utilizadas foram de borossilicato, possuindo cada uma, capacidade para 10 mL. Os voltamogramas foram registrados em um registrador digital da PAR modelo RE0093 (EUA).

3.2.3 Equipamentos auxiliares

Centrífuga

A centrífuga utilizada neste trabalho foi um modelo 208N da Fanem LTDA, (Rio de Janeiro Brasil).

Banho ultra-sônico

O banho ultra-sônico utilizado para auxiliar na homogeneização das amostras foi um modelo USB 124 da CTA do Brasil.

Balança Analítica

A balança utilizada foi uma balança de precisão analítica de quatro casas decimais da Bel Equipamentos analíticos Ltda (Piracicaba – Brasil).

pHmetro

As leituras de pH foram realizadas no medidor pH-metro Tecnoyon MPA 210 (São Paulo, Brasil), acoplado a um eletrodo combinado de vidro.

3.3 Metodologia de trabalho

3.3.1 Lavagem do material

O material utilizado em todos os procedimentos foi previamente enxaguado com água destilada, sendo então imerso em solução de ácido nítrico 20% por um período mínimo de 24 horas. O material descontaminado foi mantido em recipientes hermeticamente fechados.

A limpeza dos eletrodos foi realizada com água deionizada, seguida de rinsagem com ácido nítrico 20 % e novo enxágue com água deionizada. Estas etapas foram realizadas posteriormente e previamente a todas as análises. Os eletrodos eram mantidos limpos em água deionizada de um dia para o outro.

3.3.2 Preparação de amostras e padrões

A solução de ciclofenil foi preparada em solução alcoólica (metanol), todas as demais soluções utilizadas foram preparadas em solução aquosa.

As soluções tampões Britton-Robbinson foram preparadas através da mistura de soluções 0,04 mol L⁻¹ de ácido acético, ácido fosfórico e ácido bórico, seguida da adição de pequenos volumes de solução de NaOH 0,2 mol L⁻¹ até que o valor de pH desejado fosse atingido.

A limpeza do mercúrio foi realizada segundo adaptação do procedimento descrito por Whinack e Sasseli ⁷¹, o qual envolve a retirada de impurezas solúveis em ácido e em base. Este procedimento também envolve a destilação do mercúrio, porém esta etapa não se mostrou necessária.

Os diferentes pontos das curvas analíticas foram preparados normalmente por diluições de uma solução padrão de ciclofenil ou de primaquina.

3.3.3 Tratamento fotoquímico

A irradiação das soluções de analito e da amostra foi feita colocando-se 10 mL dos mesmos em tubos de quartzo (1,9 cm de diâmetro e 13,7 cm de altura) no centro do reator, os quais receberam irradiação ultravioleta proveniente das lâmpadas durante o tempo desejado.

3.3.4 Formulações farmacêuticas

As soluções de amostras de formulações comerciais foram obtidas pela maceração de pelo menos 5 comprimidos com pistilo e gral. Uma massa conhecida foi dissolvida em metanol e posteriormente filtrada em papel qualitativo da Qualy, (São José dos Pinhais – PR - Brasil) o filtrado foi então diluído para 10 mL em balão volumétrico com metanol.

3.3.5 Fluídos Biológicos

As amostras de urina, obtidas de voluntários do sexo masculino do próprio laboratório, foram enriquecidas com ciclofenil, as amostras foram irradiadas pelo mesmo tempo que os padrões no reator fotoquímico e as determinações foram feitas com e sem tratamento prévio da amostra.

3.3.6 Procedimento de “clean-up” com sulfato de amônio

O procedimento de clean-up com sulfato de amônio consiste em se pesar 1 g de sulfato de amônio em um tubo digestor contendo 5 mL de urina (usa-se dois tubos, um com urina enriquecida (amostra) e outro com urina limpa, (branco), os tubos são vigorosamente agitado por 5 minutos e mantidos por mais 10 minutos em um banho ultra-sônico para auxiliar na homogeneização das soluções. Os tubos são então centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm numa centrífuga, e o sobrenadante é utilizado para se realizar as medidas voltamétricas).

3.3.7 Procedimento para a medida eletroquímica

Para as medida voltamétrica, fez-se uso de uma micropipeta para se adicionar quantidades (20 μ L) da solução de interesse a uma célula de borosilicato contendo 10 mL do eletrólito de suporte. Antes da adição da solução de ciclofenil a célula foi purgada com nitrogênio durante um tempo de 300 s. Para as leituras seguidas, a purga foi interrompida, pois se constatou resultados mais reprodutivos sem purgas posteriores.

Para as análises de primaquina, não houve necessidade de se interromper a purga, apenas diminui-se o seu tempo.