

2 Fundamentação teórica

2.1. Considerações sobre os analitos estudados e os métodos analíticos para a sua determinação

2.1.1. Tetrabenazina

A tetrabenazina¹ (TBZ), Figura 1, é um derivado da benzoquinolizina que foi descoberto na década de 1950. Inicialmente, essa substância foi utilizada como antipsicótico. Mas na década de 1970 suas propriedades para tratar a discinesia (movimentos repetitivos involuntários) foram descobertas, e desde então a TBZ vem sendo utilizada para tratar diversos transtornos do movimento involuntário² (Hayden et al., 2009; Del Val et al., 2009).

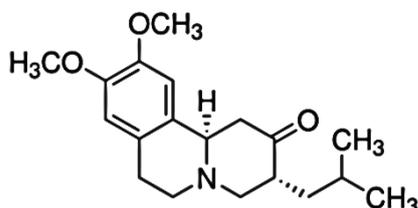


Figura 1 - Estrutura da tetrabenazina

As monoaminas cerebrais (dopamina, noradrenalina e serotonina) são neurotransmissores que controlam os movimentos corporais e a atividade excessiva dessas substâncias provoca os transtornos de movimento. O mecanismo de ação da TBZ se baseia na depleção dessas monoaminas e na inibição da captação de aminas (principalmente a dopamina) nas vesículas de armazenamento intracelular. A diminuição da concentração dos neurotransmissores se traduz na eliminação ou diminuição dos sintomas dos

¹ Nome IUPAC: cis rac -1,3,4,6,7,11b-hexahidro-9,10-dimetoxi-3-(2-metilpropil)-2H-benzo[a]quinolizin-2-ona. Fórmula molecular: C₁₉H₂₇NO₃. Massa molecular: 317,42 g mol⁻¹

² Movimentos involuntários associados à Doença de Huntington (Ondo *et al*, 2002), discinesia tardia (Ondo, Hanna e Jankovic, 1999), síndrome de Tourette (Faridi e Suchowersky 2003; Porta *et al*, 2008); entre outros.

transtornos de movimento. A vantagem da TBZ, se comparada com outros medicamentos utilizados para tratar transtornos de movimento (por exemplo, a reserpina), é que seus efeitos são reversíveis, permitindo a supressão da dopamina sem causar efeitos colaterais, como a discinesia tardia e a depressão (Del Val et al. 2009).

Após a administração oral da TBZ (12,5 a 50,0 mg), o medicamento é metabolizado no fígado gerando seus metabólitos dihidrogenados: α -HTBZ e β -HTB, cujas concentrações máximas plasmáticas ocorrem após 1 – 1 ½ h após a administração da dose de TBZ (Yero e Rey, 2008). A eliminação da TBZ ou seus metabólitos ocorre por via renal. Um balanço de massa indicou que aproximadamente 75% da dose administrada foi eliminada como as formas glucorinadas ou conjugadas com sulfato dos principais metabólitos α -HTBZ e β -HTBZ. Nesta matriz, não foi encontrada TBZ livre (Yero e Rey, 2008; Jankovic e Clarence-Smith, 2011).

A TBZ vem sendo utilizada para fins clínicos em diversos países (Austrália, Canadá e União Européia entre outros) durante décadas. Em 2008, o uso da TBZ foi aprovado nos Estados Unidos como o único tratamento para a doença de Huntington. Essa aprovação, feita pela FDA (*United States Food and Drug Administration*), alçou o medicamento a um mercado promissor, já que o laboratório fabricante possuía exclusividade no mercado por sete anos devido ao status do medicamento como medicamento órfão³. Dados da IMS (Intercontinental Marketing Services, Reino Unido) apontam que as vendas de TBZ em 2007 no mercado Europeu e Canadense foram respectivamente de U\$ 9 milhões e 5,5 milhões. Com o mercado estadunidense avaliado em U\$ 600 milhões e com a estimativa de que 90% dos pacientes da doença de Huntington sofrem dos movimentos involuntários, os analistas estimavam, em 2009, que as vendas de TBZ alcançassem nos anos seguintes, valores da ordem de U\$ 150 milhões por ano (Hayden *et al.*, 2009).

Embora a TBZ seja utilizada como princípio ativo do único medicamento utilizado no tratamento da doença de Huntington e de outros transtornos do movimento, há poucos métodos analíticos publicados na literatura para a determinação desta substância.

³ Medicamento órfão: denominação dada pela FDA aos medicamentos utilizados para tratar doenças raras, com pouco interesse financeiro por parte da indústria farmacêutica para desenvolver e comercializar este tipo de produto, destinado a um número restrito de doentes.

Para a realização de um estudo de monitoramento da concentração da TBZ em plasma humano foi desenvolvido um método por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência após a derivatização química da TBZ (Roberts *et al.*, 1981). O analito foi separado da amostra utilizando um pré-tratamento por precipitação de proteínas. A derivatização química da TBZ consistiu na reação do analito com acetato de mercúrio (30 min em banho-maria) que gerou um produto que permitiu a detecção indireta por fluorescência da TBZ e de seu principal metabólito (α -HTBZ) nos mesmos comprimentos de onda máximos de excitação (λ_{exc}) e de emissão (λ_{em}) de 265 e 418 nm. A separação foi realizada em uma coluna com fase estacionária reversa do tipo C18, com fase móvel constituída de acetonitrila e de tampão de acetato 1% (pH 4,5) na proporção de 50:50% v/v. O limite de detecção (LD) reportado foi de 3×10^{-9} mol L⁻¹, com recuperações de 76% e coeficiente de variação de 2,7% na concentração de $3,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. O método foi aplicado no monitoramento da concentração plasmática da TBZ ou do metabólito α -HTBZ em um paciente tratado com 50 mg de TBZ. As concentrações plasmáticas de TBZ ou do metabólito variaram entre $1,3$ e $4,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

Outro método em que se utiliza HPLC foi reportado por Mehvar *et al.* (1986) para a determinação de TBZ em plasma humano e de ratos. Para a separação da matriz, a amostra foi tratada por precipitação de proteínas. O método também foi baseado na derivatização química com acetato de mercúrio (reação a 110°C por 1 h), para a determinação de TBZ e do metabólito principal (α -HTBZ) com detecção por fluorescência usando o par $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 265/418 nm. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa C18 mantida a 60 °C, utilizando como fase móvel água/acetonitrila/ ácido acético/ trietilamina na proporção, em volume, igual a 65: 33: 2: 0,15 %. A faixa de resposta linear do método foi entre $1,6 \times 10^{-9}$ e $6,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de TBZ. O limite de detecção (LD) não foi reportado. O método foi aplicado para a determinação do analito em plasma de dois pacientes após a administração de 25 e 37 mg de medicamento. As concentrações plasmáticas para os pacientes foram de $3,2 \times 10^{-9}$ a $1,6 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para TBZ e de $4,8 \times 10^{-7}$ a $1,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para a α -HTBZ. Vale salientar que os dois métodos mencionados utilizam como agente derivatizante um sal de mercúrio, cujo uso seria atualmente evitado nos laboratórios devido aos riscos ambientais e de exposição a esse reagente tóxico.

Outro método analítico reportado foi baseado no uso da cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) para a determinação de TBZ

em plasma de rato e em cérebro de rato. No método se utilizou TBZ deuterada como padrão interno. A amostra foi previamente submetida a um procedimento de limpeza por precipitação de proteínas e foi derivatizada com ácido trifluoroacético (a 90 ° C por 1 h). O procedimento indicou que três íons resultavam da reação da TBZ (m/z de 413, 370 e 191 Da). O íon de m/z 370 foi utilizado para a quantificação do analito, permitindo obter um LD foi $6,3 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹, com recuperações de 82% na concentração de $7,9 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. (Jindal, *et al.* 1989). Recentemente, outro método por cromatografia a líquido com detecção por espectrometria de massa em modo tandem (LC-MS/MS) foi reportada para a determinação de TBZ e de seus metabólitos (α -HTBZ e β -HTBZ) em plasma humano (Derangula *et al.*, 2013). O método teve uma faixa linear de resposta entre $3,1 \times 10^{-11}$ e $1,6 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de TBZ. As recuperações reportadas para plasma fortificado com TBZ foram de 75%. O método foi aplicado para estudos farmacocinéticos após a administração de uma dosagem de 25 mg de TBZ em humanos.

2.1.2. Amitriptilina

A amitriptilina⁴ (AMT) é classificada como um antidepressivo tricíclico, classificação dada aos medicamentos com estrutura principal de três ciclos fusionados, conforme mostrado na Figura 2. O medicamento é utilizado como tratamento de referência, ou seja, como primeira opção de tratamento para a depressão, sendo também é utilizado para tratamento de dor crônica e outros transtornos como ansiedade e insônia (Barbui e Hotopf, 2001; Bryson e Wilde, 1996). Nos medicamentos, a substância é comercializada na forma de cloridrato, solúvel em água.

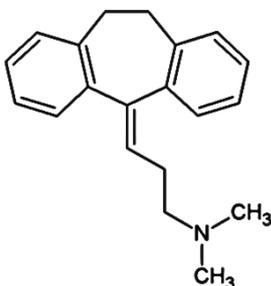


Figura 2 - Estrutura da amitriptilina

⁴ Nome IUPAC: 3-(10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d][7]annulen-5-ylidene)-N,N-dimethylpropan-1-amine; fórmula molecular (cloridrato): C₂₀H₂₃·HCl; massa molar 313,9 g mol⁻¹.

Ainda não há um consenso em relação ao funcionamento da AMT como antidepressivo e sobre seu mecanismo de ação, dada a divergência de resultados de estudos farmacocinéticos, das taxas de absorção da substância e especialmente, da resposta de cada indivíduo ao tratamento da depressão com a AMT (Yu, 1992; Yazdi e Razavi, 2010). Entretanto, o mecanismo de ação mais aceito é baseado na inibição da chamada bomba de serotonina e norepinefrina, que pode causar a diminuição dos níveis dessas aminas biogênicas no cérebro. Apesar de terem surgido outros medicamentos com as mesmas propriedades farmacológicas que as da AMT, há 40 anos essa substância continua sendo utilizada como tratamento de referência (de primeira linha) para a depressão (Barbui e Hotopf, 2001). Ainda, durante estudos para o tratamento da depressão, as propriedades analgésicas da AMT foram descobertas, e embora não haja consenso se essas propriedades surgem como efeito secundário ou independente da atividade antidepressiva, a substância é utilizada para o tratamento de condições de dor crônica e neuropática, ansiedade e insônia (Bryson e Wilde, 1996).

A AMT é rapidamente absorvida após administração oral e é metabolizada no fígado, sendo seu principal metabólito a nortriptilina⁵, que também apresenta atividade farmacológica (Bryson e Wilde, 1996). A ligação da AMT com as proteínas plasmáticas é muito alta, sendo que as concentrações terapêuticas de AMT em soro humano (livre) variam entre 1,8 e 8,2 x 10⁻⁷ mol L⁻¹. Concentrações de AMT em plasma sanguíneo maiores que 2,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ são consideradas tóxicas (Wozniakiewicz et al., 2008). Os metabólitos da substância são eliminados pela urina, matriz onde praticamente não é detectada AMT livre.

No Brasil, os medicamentos que contêm nas suas formulações AMT ou o seu metabólito ativo, a nortriptilina, são de venda controlada pela ANVISA⁶, pois estes são classificados como substâncias psicotrópicas, conforme descrito na Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 37 de Julho de 2012; que dispõe sobre a atualização do Anexo A, Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas. Precursoras e Outras sob Controle Especial; da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998 (ANVISA, 2012).

Métodos analíticos para determinar AMT foram desenvolvidos para analisar medicamentos e fluidos biológicos. Dado que a substância é um

⁵ Metabólito des-metilado da AMT, M 263,38 g mol⁻¹; Fórmula molecular: C₁₉H₂₁N.

⁶ ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária

medicamento de referência, utilizado há mais de 40 anos, há uma vasta diversidade de métodos reportados. Na Tabela 1 se listam os métodos analíticos desenvolvidos para determinar AMT e/ou o metabolito (nortriptilina). Já no Anexo B são mostradas resumidamente as metodologias desenvolvidas para determinar AMT conjuntamente com outras substâncias.

Tabela 1 - Métodos analíticos desenvolvidos para determinar AMT

Análito(s)/ aplicação	Tratamento de amostra	Técnica analítica	LD (mol L ⁻¹)	Faixa linear (mol L ⁻¹)	Rec. (%)	Referência
AMT em urina, sangue e fígado após intoxicação fatal	Extração líquido-líquido, TLC	Espectrofotometria de absorção	2,2 x 10 ⁻⁵	n.i	n.i	Munksgaard, 1969
Amitriptilina e metabolito em sangue de rato após administração de dose aguda	Extração em fase sólida	GC - detector termoiônico/ GC-MS	n.i.	2,5 x 10 ⁻⁷ – 7,5 x 10 ⁻⁶	89 – 92%	Baeck et al., 2000
Amitriptilina e metabolito em leite humano fortificado	Extração em fase sólida	HPLC-DAD	6,9 x 10 ⁻⁹	< 9,5 x 10 ⁻⁷	89 – 92%	Caubet et al., 2001
Amitriptilina ou imipramina em plasma humano	Precipitação de proteínas	HPLC-CL	6,9 x 10 ⁻⁹	< 2,5 x 10 ⁻⁵	83 – 93%	Yoshida et al., 2000
Amitriptilina e metabolito em plasma humano fortificado	Extração líquido – líquido	MEKC	2,2 x 10 ⁻⁷	5,0 x 10 ⁻⁷ – 1,1 x 10 ⁻⁶	> 80%	Wu et al., 2000
Amitriptilina em urina humana	Microextração em fase sólida	CE	1,6 x 10 ⁻⁷	1,6 x 10 ⁻⁷ – 1,6 x 10 ⁻⁶	78 – 96 %	Jinno et al, 2001
Amostras simuladas de AMT em água	----	Potenciometria	5,0 x 10 ⁻⁹	1,0 x 10 ⁻⁸ – 1,0 x 10 ⁻³	97 – 102 %	Wang et al., 2003
Amitriptilina e perfenazina em medicamento	Calibração multivariada (Mínimos Quadrados parciais)	HPLC-UV	1,8 x 10 ⁻⁴	n.i.	n.i.	Escuder-Gilbert et al., 2004
AMT e metabolito em plasma humano	Precipitação de proteínas	CZE	7,2 x 10 ⁻⁹	3,1 x 10 ⁻⁸ - 1,6 x 10 ⁻⁶	> 99%	Chen et al., 2004
AMT em medicamentos	Filtração	FIA e potenciometria	5,0 x 10 ⁻⁵	5,0 x 10 ⁻⁵ – 1,0 x 10 ⁻²	99 – 107 %	El-Nashar, et al., 2004
AMT em medicamentos		HPTLC	**	**		Maslanka & Krez, 2005
AMT em medicamentos	Filtração	Espectrofotometria de absorção	n.i	6,4 x 10 ⁻⁶ – 1,6 x 10 ⁻⁴	98 – 102 %	El-Dien et al., 2006
AMT ou doxepina em soro fortificado	Extração em fase sólida	HPTLC	6,9 x 10 ⁻⁵	4 x 10 ⁻⁴ - 1 x 10 ⁻³	84%	Petruczynik et al., 2008
AMT em medicamentos	Filtração	TLC	*	*	100 – 101 %	Patel & Patel, 2009
AMT e metabolito em plasma humano	Extração em fase sólida	HPLC-MS/MS	1,3 x 10 ⁻⁹	< 3,0 x 10 ⁻⁷	81 – 85%	Bhatt et al., 2010
AMT e metabolito em plasma de rato	Extração líquido-líquido	HPLC-MS	3,6 x 10 ⁻⁸	3,1 x 10 ⁻⁸ – 1,0 x 10 ⁻⁵	95 – 102 %	Shen et al., 2010
AMT e nortriptilina em urina fortificada	Micro extração em fase líquida	GC-MS	1,1 x 10 ⁻⁷	< 2,0 x 10 ⁻⁵	76 %	Yazdi & Razavi, 2011
Metabolito da AMT in vitro por microssomas de fígado de rato	Extração em chip e eletromem-brana	ESI-MS	3,6 x 10 ⁻⁷	< 3,7 x 10 ⁻⁵	80%	Petersen et al., 2012
Óxidos de AMT em cartelas com sangue seco (<i>dried blood spot cards</i>)	Precipitação de proteínas	HPLC-MS/MS	2,0 x 10 ⁻⁷	2,0 x 10 ⁻⁷ - 2,0 x 10 ⁻⁵	n.i.	Temesi et al., 2013

* Foram "gotejados" volumes variáveis de amostra (1 – 12 µL), o LD foi indicado como 20 ng/gota e a faixa linear entre 50 e 1200 ng/ gota. ** Foram gotejados volumes variáveis de analito (0,5 – 6,0 µL) permitindo a determinação de 1.6 x 10⁻¹⁰ – 1.9 x 10⁻⁹ mol AMT/ volume gotejado. Rec. = recuperação. n.i não informado. TLC: cromatografia em camada fina, HPTLC: cromatografia de alta eficiência em camada fina, CE: eletroforese capilar; CE: eletroforese capilar por zona MEKC: eletrocromatografia capilar micelar, HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência, GC: cromatografia a gás, DAD: detecção por arranjo de diodos, UV: detecção por absorvância, MS: detecção por espectrometria de massas, CL: detecção por quimioluminescência, FID: detecção por ionização por chama, FIA: injeção por análise em fluxo.

Na sequência do texto, escolheu-se um exemplo emblemático para cada uma das técnicas empregadas para determinar a AMT, que são a potenciometria, a espectrofotometria de absorção molecular na região do visível, a eletroforese capilar e a cromatografia a gás, a líquido ou de camada fina. Vale salientar que nesta revisão bibliográfica, não foi encontrado método analítico para determinar a AMT por espectrofotometria de fluorescência molecular ou por HPLC com detecção por fluorescência.

Para a determinação por potenciometria, foi desenvolvido um eletrodo seletivo em uma membrana de PVC⁷ para determinar AMT na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (LD de $5,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹). Recuperações em soluções de padrão de AMT reportadas foram entre 97 e 102% (Wang et al., 2003).

A técnica de espectrofotometria de absorção foi aplicada para determinar AMT a partir da formação de par iônico entre o analito e um agente cromogênico (verde de bromocresol ou laranja de metila) permitindo a quantificação do analito (em 410 ou 420 nm) na faixa de concentração de $6,4 \times 10^{-6}$ a $1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O método foi aplicado para a determinação de AMT em formulações farmacêuticas com recuperações entre 98 e 102% (El-Dien et al., 2006).

A eletroforese capilar por zona foi utilizada para determinar AMT e nortriptilina medindo as absorvâncias características das substâncias em 200 nm⁸. A resposta linear do método foi entre $3,6 \times 10^{-8}$ a $1,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (LD reportado de $6,3 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ para a AMT). Testes indicaram recuperações de AMT maiores a 99% nas concentrações testadas ($1,6 \times 10^{-7}$; $6,4 \times 10^{-7}$ e $1,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹). O método foi aplicado para a determinação de AMT e do metabolito em plasma humano, com concentrações encontradas de AMT entre $1,4 \times 10^{-7}$ e $1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ monitoradas após 24 e 78 h de administração de 25 mg do medicamento (Chen et al., 2004).

Um método de cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC) foi desenvolvido para determinar AMT em medicamentos. A separação do analito da matriz foi realizada em placas de sílica gel e uma fase móvel constituída de clorofórmio, tolueno, metanol e trietilamina (4:3:2:0,2 v/v), e a

⁷ Eletrodo de membrana seletivo de íons, composto por PVC e 4% de clonidina-tetrafenilborato como componente eletroativo, e solução de referência interna de NaCl $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e clonidina $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Wang et al., 2002).

⁸ A separação foi realizada utilizando um capilar de sílica fundida, tampão Tris (1,4 M pH 4,5), 10 mM de b-ciclodextrina, 50% de etileno glicol, 25 kV (Chen, et al 2004).

detecção foi realizada por medições densitométricas da mancha de AMT. Adições entre 0,5 e 6 μL de solução foram feitas permitindo a determinações na ordem de $1,6 \times 10^{-10}$ a $1,9 \times 10^{-9}$ mol de AMT/mancha (Maslanka e Krez, 2005).

A determinação de AMT e do seu metabólito (nortriptilina) foi reportada com uso de HPLC com um detector de arranjo de diodos (DAD) (Caubet et al., 2001). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa C18 (30 x 4,6 mm; 3,5 μm), utilizando a mistura de acetonitrila e acetato de amônio (0,1 mol L^{-1}), na proporção de 33 e 67% v/v como fase móvel na vazão de 1,5 mL min^{-1} e detecção em 238 nm. O tempo de retenção da AMT foi de 1,32 min. A resposta linear do método ficou entre 1,91 e $9,5 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} de AMT. O LD reportado para a AMT foi $6,1 \times 10^{-9}$ mol L^{-1} . O método foi aplicado para determinar AMT e o metabólito em amostras de leite fortificadas com o analito, com recuperações entre 99 e 101% para as concentrações de 2,9 e $7,6 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} de AMT. A extração por fase sólida foi utilizado para o tratamento da amostra.

Um método baseado em cromatografia líquida de ultra-eficiência com detecção por espectrometria de massas em modo tandem (UPLC-MS/MS) foi desenvolvida para determinar AMT e seu metabólito em plasma. A separação cromatográfica foi realizada a 45 $^{\circ}\text{C}$ utilizando uma coluna C18 e fase móvel de acetonitrila/ tampão de acetato de amônia pH 3,5 0,01 mol L^{-1} (85:15 v/v) a uma vazão de 0,3 mL min^{-1} , o tempo de retenção da AMT foi 0,45 min. A extração dos analitos foi realizada por extração em fase sólida (SPE), permitindo a determinação da AMT na faixa de concentrações de $1,2 \times 10^{-9}$ – $3,2 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} , com recuperações entre 85 e 88%. O método foi aplicado para estudos de bioequivalência de AMT, após administrar uma dose de 50 mg em 24 pacientes (Bhatt et al., 2010).

A cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID) foi aplicada para determinar AMT e nortriptilina em urina fortificada após um procedimento de microextração líquido-líquido dos analitos. A separação foi realizada utilizando uma coluna CP-Sil 24CB e hélio como gás carregador. As condições de GC foram uma temperatura de injeção de 280 $^{\circ}\text{C}$, temperatura de forno inicial de 100 $^{\circ}\text{C}$ incrementada a 2 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. O FID foi mantido a 280 $^{\circ}\text{C}$ e uma vazão de hidrogênio de 30 mL min^{-1} . A faixa linear do método foi de 1,6 e $6,4 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} de AMT, com um LD de $9,6 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} e recuperações em urina de 78 a 86% para a AMT (Yazdi et al., 2008).

2.1.3. Vareniclina

A vareniclina⁹ (VRN), Figura 3, é o primeiro medicamento formulado para atuar como antagonista parcial dos receptores nicotínicos de acetilcolina. A VRN foi aprovada em 2006 para ser utilizada no tratamento da dependência de nicotina, tanto pela FDA¹⁰ quanto pela EMEA¹¹.

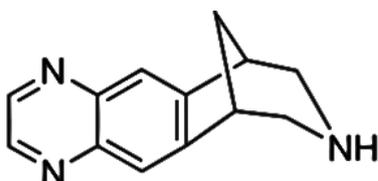


Figura 3 - Estrutura da vareniclina

A VRN ajuda a aliviar os sintomas causados durante a abstinência da nicotina e protege os fumantes dos seus efeitos durante uma eventual recaída (Coe *et al.*, 2009). A substância foi descoberta a partir da síntese de compostos inspirados na estrutura do aminoácido natural citisina, que possui uma ação antagonista parcial em relação aos receptores nicotínicos (Coe *et al.*, 2009; Niaura *et al.*, 2006).

Em um mercado onde o tratamento para o tabagismo se baseia principalmente na substituição do cigarro com produtos contendo doses mínimas de nicotina (adesivos, inaladores, ou goma de mascar); ou pela utilização de medicamentos contendo bupropiona¹² como ingrediente ativo, a VRN tem se mostrado muito eficiente neste tipo de tratamento (Niaura, *et al.* 2006). Resultados de um estudo para avaliar três estratégias para induzir voluntários a parar de fumar (utilizando (i) placebo; (ii) bupropiona e (iii) VRN) apontaram o sucesso do tratamento com VRN quatro vezes maior comparado com os resultados obtidos com o placebo, e de até duas vezes maior em relação ao tratamento com a bupropiona (Nides *et al.*, 2008).

⁹ Nome IUPAC: 7,8,9,10-Tetrahydro-6,10-methano-6H-pyrazino[2,3-h][3]benzazepine, fórmula molecular: C₁₃H₁₃N₃·C₄H₆O₆. Massa molar (tartarato): 316,35 g mol⁻¹; pK_a = 9,2.

¹⁰ *Food and Drug Administration*, Agência estadunidense encarregada da aprovação e controle de medicamentos.

¹¹ *European Medicines Agency*, Agência europeia encarregada do controle de medicamentos.

¹² Antidepressivo que atua como inibidor da dopamina e serotonina no sistema nervoso central, que em estudos clínicos para a depressão, mostrou-se também eficaz para diminuir o uso do cigarro. Possui efeitos secundários como insônia, cefaleia e boca seca.

A afinidade da VRN pelas proteínas plasmáticas é relativamente baixa, assim, entre 80 e 90% da droga é excretada pela urina sem modificações (Obach et al., 2006; Coe et al., 2009). Por ser uma substância relativamente nova, métodos analíticos reportados para a determinação da VRN são escassos na literatura.

Métodos cromatográficos com detecção por espectrometria de massas foram desenvolvidos para determinar VRN. Por exemplo, Dobrinhas *et al.* (2011) desenvolveram um método cromatográfico em regime de resolução rápida (ou ultra eficiência) com um sistema de detecção MS/MS em tandem para a determinação de VRN e nicotina em plasma humano. O pré-tratamento da amostra foi realizado com SPE e a separação cromatográfica foi realizada em uma coluna por interação hidrofílica e eluição por gradiente da fase móvel, composta por tampão de formato de amônio (pH 3) e acetonitrila, a uma vazão de 0,4 ml min⁻¹. A resposta analítica linear para VRN cobriu a faixa de concentração entre 3,2 x 10⁻⁹ mol L⁻¹ a 1,6 x 10⁻⁶ mol L⁻¹. As recuperações de VRN em plasma humano fortificado foram de 83 a 96% nas concentrações testadas (3,2 x 10⁻⁸ e 8,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, respectivamente). O método foi aplicado na análise de amostras de pacientes em tratamento do tabagismo, encontrando VRN em concentrações até 6,4 x 10⁻⁸ mol L⁻¹.

Em outro trabalho, HPLC-MS foi usado para estudar o metabolismo da VRN em ratos, macacos e humanos após administração oral de VRN enriquecida com ¹⁴C. A resposta analítica cobriu uma faixa de concentração entre 1,6 x 10⁻⁹ e 3,2 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ do analito (Obach et al., 2006). A concentração de VRN foi monitorada de 0,5 a 192 h após a sua administração, tanto em plasma como em urina. Apesar de ser constatado nesse estudo que a VRN é pouco metabolizada no organismo, foram identificadas pequenas quantidades de sete metabólitos no plasma humano. Somente dois metabólitos foram identificados em urina humana, que corresponderam a 3% da dose total de VRN administrada.

Mais recentemente, um método por GC-MS foi desenvolvido e usado para determinar os níveis de VRN no organismo de um indivíduo após um caso de óbito causado por ingestão excessiva do medicamento e álcool. A VRN foi determinada em sangue, urina e humor vítreo, removendo o analito da matriz mediante precipitação de proteínas, e derivatizando o analito com ácido heptafluorobutírico previamente à introdução ao GC-MS. Os ions monitorados para a VRN foram os de m/z 407, 240 e 180. O método foi validado em

concentrações de VRN consideradas como terapêuticas (entre $7,4 \times 10^{-9}$ e $2,4 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹), porém, dada a alta concentração de VRN nas amostras, diluições tiveram que ser feitas. Concentrações maiores que $1,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ foram encontradas no organismo da vítima (Stove et al., 2013). Segundo os autores, atualmente não existem dados toxicológicos consistentes para concluir se os níveis de VRN encontrados na vítima indicam contribuição da droga no óbito.

Análises de medicamento a base de VRN por HPLC com detecção por fotometria de absorção molecular (no UV) foram reportados. A quantificação da VRN na presença de produtos de degradação foi feita em medicamentos (Pujeri et al., 2012). A separação foi realizada em uma coluna com fase estacionária C18 com fase móvel composta de tampão de acetato de amônia ($0,02$ mol L⁻¹, pH 4) e acetonitrila. A eluição foi feita no modo gradiente, a 40 °C, e detecção da VRN foi em 237 nm, com um tempo de retenção de 8,46 min. A VRN foi detectada na presença dos produtos e degradação do medicamento nas concentrações de $4,8 \times 10^{-7}$ a $9,1 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de VRN.

Outro método por cromatografia líquida foi desenvolvido por Channabasavaraj et al. (2011) para determinar VRN em medicamentos. Uma fase estacionária reversa (coluna C18) e fase móvel contendo tampão fosfato (pH 3) e metanol foram usadas. A eluição foi feita por gradiente, com um tempo de retenção da VRN de 2,99 min, detectada medindo-se a absorvância a 237 nm. O método foi aplicado na faixa de concentrações entre $4,7 \times 10^{-5}$ e $1,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de VRN, com recuperações de 100%.

Um método eletroquímico utilizando eletrodos de vidro dopados com boro ou eletrodo de carbono o alcance de valores de LD da ordem de 10^{-7} mol L⁻¹ de VRN (Aleksic et al., 2012). Mais recentemente, um método por espectrofotometria de absorção molecular foi desenvolvido para a análise de medicamentos. A VRN foi detectada (sem modificação química) em 319 nm em solução contendo tampão fosfato (pH 7), medindo o analito em uma faixa linear de $2,6 \times 10^{-6}$ a $2,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Koçak et al., 2013).

2.2. Fluorescência molecular

A luminescência é o fenômeno de emissão de radiação eletromagnética na região do UV-Vis emitida por uma espécie química quando esta sofre uma transição eletrônica de um estado de maior energia (excitado) para um de menor

energia (em geral o fundamental). A fluorescência é a luminescência estimulada por fótons (fotoluminescência) que decorre de uma transição eletrônica entre dois estados com a mesma multiplicidade. Num estado excitado com multiplicidade singleto, o elétron promovido a um orbital de maior energia retém seu número quântico de spin original, isto é, oposto ao do elétron remanescente no orbital de menor energia. Quando a espécie química relaxa emitindo luz, o elétron retorna para o orbital original de menor energia numa transição singleto-singleto ($S_n \rightarrow S_0$) onde S_n , em geral, é o primeiro estado de energia excitado, com $n = 1$, e S_0 indica o estado fundamental singleto. Por ser uma transição entre estados de mesma multiplicidade, a fluorescência é quanticamente permitida (favorável) e ocorre com tempos de vida da ordem de nanosegundos (10^{-9} a 10^{-7} s) (Lakowicz, 2006).

A desativação de uma população de espécies químicas excitadas por fluorescência sofre competição de outros processos, em especial os não-radiativos (que não envolvem emissão de luz). Esses processos concorrentes podem ser compreendidos ao se analisar o diagrama (modificado) de Jablonski que indica os processos de mudança de energia para uma população de moléculas (Figura 4).

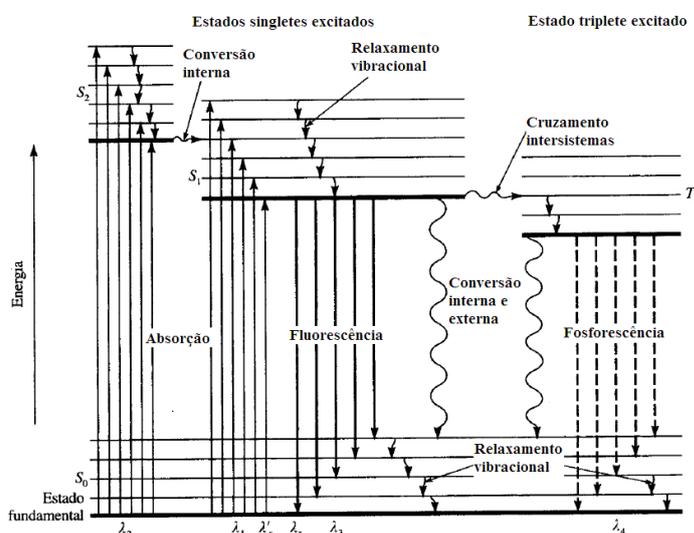


Figura 4 - Diagrama de Jablonski modificado (Adaptado de Skoog *et al.*, 2001)

Seguindo o diagrama, após a excitação de uma população de moléculas, pela absorção de energia proveniente de fótons, esta população tende a retornar ao estado fundamental (S_0) mediante diversos processos. A fluorescência é um desses processos e se refere à radiação emitida quando a população se desativa do menor nível vibracional do estado de energia S_1 para os diferentes níveis vibracionais de S_0 (obedecendo as restrições impostas pelas regras de

seleção). Paralelamente, a transição entre S_1 e S_0 pode ocorrer sem a emissão de luz (conversão interna), caso a diferença de energia entre estes estados seja pequena a ponto de haver níveis vibracionais degenerados associados aos dois estados eletrônicos, ou quando a perda de energia for provocada por transferências de energia decorrentes de colisões entre espécies químicas durante o tempo que a população está em estado excitado. A conversão interna é um processo muito eficiente sendo a principal via que compete com a fluorescência na desativação do estado excitado de energia. Outro processo possível para a desativação de energia, embora menos eficiente, pois é quânticamente proibido (pouco provável), é o cruzamento intersistemas. Nesse processo, a multiplicidade da população no estado excitado é invertida (passando de singleto para tripleto: $S_1 \rightarrow T_1$). Tal cruzamento somente é favorecido em condições especiais que permitem o denominado acoplamento spin-orbital (que favorece a inversão do spin do elétron no orbital de mais alta energia). Caso a população, ou parte dela, mude de multiplicidade ao estado tripleto (T_1), a desativação energética pode ocorrer mediante emissão de luz (fótons), no que é denominado fosforescência, ou; via processos não radiativos de cruzamento interno (Ingle e Crouch, 1999; Lackowickz, 2006).

A eficiência quântica fluorescente (Φ_F) é um parâmetro que indica a eficiência da desativação radiativa por fluorescência, o que, por sua vez, reflete na intensidade da fluorescência medida. A Φ_F é dada pela razão entre o número de fótons emitidos por uma população na forma de fluorescência e o número de fótons (com energia suficiente para promover a transição eletrônica) absorvidos por essa mesma população. Essa relação pode ainda ser reescrita conforme indicado na Equação 1, relacionando as constantes de velocidade (em s^{-1}) dos processos envolvidos na despopulação do estado excitado singleto, isto é, da fluorescência (k_F), e dos processos não radiativos (k_{nr}) que são a conversão interna e o cruzamento intersistemas.

$$\varphi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}} \quad (1)$$

A eficiência quântica de uma molécula é apreciável quando o valor de k_F é comparável ou maior do que o valor de k_{nr} , isto é, quando os valores de Φ_F estão entre 0,1 a 1. Em tal situação, a probabilidade de emissão de fótons é elevada, pois as condições são favoráveis para fazer da fluorescência um processo competitivo em relação aos processos de desativação não-radiativos.

A estrutura da molécula é importante para que se tenha um valor de Φ_F relevante. Primeiramente, a molécula deve possuir grupos cromóforos relevantes para que ocorra absorção e fótons na região do UV-vis. Em moléculas orgânicas, as transições do estado S_0 para o S_1 podem ser do tipo $\pi-\pi^*$ ou $n-\pi^*$, onde elétrons não ligantes (n) ou envolvidos numa ligação π são promovidos para um orbital molecular π^* . Outro aspecto importante é a rigidez da estrutura da molécula, o que está relacionado com a capacidade da molécula vibrar e com isso perder energia por processos não-radiativos. Moléculas com estruturas mais rígidas favorecem a desativação energética por emissão de fótons, em detrimento aos processos de relaxação vibracional. A fluorescência usualmente é decorrente de transições $\pi-\pi^*$ de elevada probabilidade. Para a transição $n-\pi^*$, a probabilidade de fluorescência é menor, devido ao menor grau de sobreposição entre os orbitais envolvidos e pelo favorecimento de acoplamento spin-orbital, que retira a população do estado excitado singleto via cruzamento intersistemas. A partir desses pré-requisitos podem ser feitas algumas generalizações (Ingle e Crouch, 1988; Lackowicz, 2006):

- A fotoluminescência não é observada em hidrocarbonetos saturados.
- Diversos hidrocarbonetos aromáticos apresentam fluorescência intensa, pois apresentam um estado singleto $\pi-\pi^*$ de baixa energia. A luminescência aumenta em intensidade e diminui em energia com o número de anéis aromáticos acoplados uns nos outros.
- A fluorescência tende a ser desfavorecida em moléculas aromáticas que apresentam grupos carbonil ou heteroátomos por causa da ocorrência de acoplamento spin-orbital.
- Os grupos substituintes nos anéis aromáticos tem uma grande influência sobre as eficiências quânticas e os comprimentos de onda de emissão.
- A estrutura planar rígida em uma molécula favorece a luminescência.

As condições do ambiente também exercem influência sobre o fluoróforo (espécie química fluorescente) afetando sua capacidade de fluorescer. Por exemplo, o aumento da temperatura diminui a eficiência quântica fluorescente, pois provoca o aumento das vibrações moleculares e também aumenta a probabilidade da ocorrência de colisões entre o fluoróforo no estado excitado com outras espécies químicas, com conseqüente desativação não-radiativa

(supressão dinâmica de fluorescência). Outro fator é o provocado pelo solvente onde fluoróforo se encontra. O aumento da viscosidade do solvente implica na diminuição das vibrações moleculares e na diminuição das taxas de colisões que provocam supressão dinâmica de fluorescência. Por outro lado, solventes que provoquem maior estabilização do estado excitado (pelo aumento da solvatação das espécies no estado excitado em solventes polares) podem provocar uma aproximação energética entre estado excitado e estado fundamental que acarreta no aumento da eficiência do cruzamento interno. O pH do sistema de solventes também pode exercer efeito crítico na estabilização de estados excitados de moléculas com propriedades ácido-base. Em muitos casos, existe diferenças relevantes na fluorescência das espécies quando ionizadas ou não em solução tanto em termos de intensidade quanto em termos da posição espectral das bandas. Finalmente, a fluorescência de uma molécula tende a se reduzir em sistemas contendo espécies químicas com elementos de elevada massa atômica. Por exemplo, quando dissolvidos em solventes contendo iodo ou bromo, o acoplamento spin-orbital tende favorecer o cruzamento inter-sistemas que diminui a população do estado excitado singleto. (Ingle e Crouch, 1999; Lackowickz, 2006 Skoog, Holler e Nieman, 2001).

A fluorescência molecular é um fenômeno relativamente seletivo dado que pequenas diferenças nas estruturas das moléculas podem implicar em significantes diferenças nas características da emissão de fluorescência. Adicionalmente, quando a estrutura do fluoróforo é adequada e quando este se encontra em um ambiente com condições adequadas, a fluorescência é um fenômeno extremamente intenso permitindo que se meça experimentalmente o sinal luminoso proveniente de quantidades de espécie química que chegam na ordem de 10^{-9} mol L⁻¹. Por esse motivo, técnicas analíticas voltadas para a análise de alimentos, fluidos biológicos, amostras ambientais entre outras se baseiam na detecção de fluorescência. Por exemplo, se pode destacar a espectrofluorimetria (em domínio espectral e temporal), e as diversas técnicas que utilizam a detecção por fluorimetria como a cromatografia líquida, as técnicas de eletroforese capilar, as técnicas de análise por injeção em fluxo e as técnicas em plataformas microfluídicas e em leitores de placas com múltiplos poços para amostras. É importante salientar que mesmo quando a espécie química de interesse não tem fluorescência intrínseca, existem abordagens que possibilitam torná-las fluorescentes por meio de reações com agentes químicos orgânicos (derivatização química), reações com ácidos e bases, complexação

com íons de terras raras e por meio de transformações fotoinduzidas (derivatização fotoquímica).

2.3. Fluorescência induzida fotoquimicamente

2.3.1. Considerações sobre a derivatização fotoquímica e a aplicação em química analítica

Um processo fotoquímico é uma reação química que ocorre sob a influência de luz. Considera-se que a maioria das reações fotoquímicas ocorre em diversas etapas. A absorção de radiação eletromagnética (fóton) leva a molécula (M) do estado fundamental para um estado eletrônico excitado (M^*). Em seguida ocorrem processos fotoquímicos primários que envolvem M^* , as reações secundárias, denominadas escuras, pois ocorrem em uma etapa que não depende de luz, e que podem levar a produção de fotoprodutos estáveis ou ainda a reações de M^* com outra espécie em solução (um catalizador ou coadjuvante) levando a produção (por fotosensibilização) de produtos estáveis (Albini e Germani, 2010; Suppan, 1973). No diagrama da Figura 5 são representados alguns dos processos e algumas das etapas de uma reação fotoquímica.

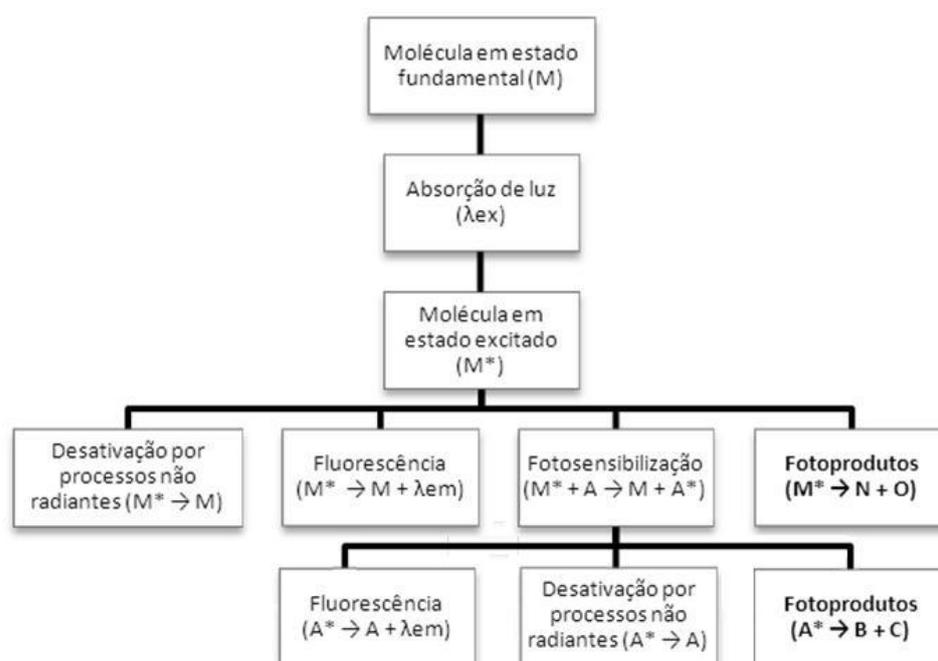


Figura 5 - Etapas em uma reação fotoquímica (Adaptado de Borrell, 1973)

Para que ocorra uma reação fotoquímica deve haver correspondência entre o comprimento de onda emitido pela fonte de irradiação (λ_{ex}) e o comprimento de onda de absorção (λ_{abs}) do analito ou de uma outra espécie química que produzirá a reação com o analito. Para isso se faz necessário que o ambiente onde a reação ocorre (solventes) e os recipientes sejam transparentes à radiação incidente. A eficiência da reação química secundária ou fotosensibilização em relação aos outros eventos que envolvem M^* (fluorescência, cruzamento inter-sistemas e relaxamentos não radiativos) deve ser elevada, do contrário, a molécula retorna para o estado fundamental sem modificações (Albini e Germani, 2010).

Os parâmetros experimentais usualmente considerados para induzir reações fotoquímicas incluem a energia e radiância da fonte irradiação e o tempo de exposição. Os fatores acima estão ligados à natureza da fonte e à arquitetura do reator fotoquímico. Além disso, devem ser considerados a composição e as condições do sistema de solventes no qual ocorrem as reações além dos possíveis coadjuvantes ou catalisadores.

Como as reações fotoquímicas geralmente envolvem a quebra de ligações químicas covalentes das moléculas orgânicas, as fontes mais eficientes são aquelas que emitem na região do UV. Energias nesta região acarretam na fotólise de ligações C-H, H-X, C-O e C-C em moléculas de baixa massa molar. Já na região do visível, menos energética, pode ocorrer a fotólise de ligações C-X (Wells, 1972). A fonte mais popular e conveniente, por causa da sua simplicidade e preço e baixa tensão de operação é a lâmpada de mercúrio, que emite as linhas características do mercúrio (253 nm e na faixa entre 296 e 313 nm). No entanto, fontes de xenônio (faixa do UV) e lasers como o NdYAG podem ser usados. O desenho dos reatores é feito de modo a maximizar a radiância recebida pela amostra, o que implica na otimização da distância entre as lâmpadas e a amostra e o melhor aproveitamento da reflexão interna de modo a tirar melhor proveito exposição.

Os materiais utilizados para reações fotoquímicas em pequena escala¹³, consistem em tubos de quartzo e tubulações de PTFE (polifluorotetraetileno ou teflon) que são materiais transparentes no UV próximo (absorvem radiação abaixo de 320, 200 e até 170 nm) (Wells, 1972). Os solventes utilizados para as

¹³ Em sínteses fotoquímicas em grande escala, a irradiação da amostra se realiza introduzindo lâmpadas de maior potência no meio de reação, já em reações em pequena escala a fonte de irradiação pode estar próxima, mas não no mesmo recipiente que a amostra.

reações fotoquímicas também devem ser transparentes à radiação incidente. Por exemplo, a água, a acetonitrila ou o ciclohexano, que são usualmente escolhidos, só absorvem radiação abaixo da faixa entre 190 a 205 nm. Ao considerar preceitos relacionados com a química limpa, desses solventes, a água é o solvente mais apropriado. Finalmente, a presença de coadjuvantes pode ser necessária para induzir a reação fotoquímica, o que implica na introdução de espécies químicas reativas que usualmente contém um grupo funcional sensível à radiação UV como o carbonila (ex. benzofenona, acetona) ou um peróxido (Albini e Girani, 2010).

Utilizar a radiação para produzir modificações químicas e usar meios reacionais essencialmente aquosos são escolhas que estão em consonância com preceitos da química verde (química limpa), que é definida segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) como a invenção, desenvolvimento e aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas (substâncias nocivas de algum modo à saúde ou ao meio ambiente). A USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) e a ACS (*American Chemical Society*) propuseram 12 princípios, para nortear a pesquisa em química verde que busca a redução da produção de rejeitos, do uso de materiais e energia, do risco e da periculosidade, e do custo de processos. Koel e Kaljunard (2006) ressaltaram que dentre os 12 princípios da química verde indicados no quadro (página seguinte), os que têm maior aplicabilidade para o desenvolvimento de metodologias mais “verdes” em química analítica são: (1) a prevenção de geração de resíduos, (3) o uso de reagentes e processos mais seguros, (4) o desenho de processos para maior eficiência energética e (12) o uso de processos, materiais e reagentes mais seguros para minimizar o potencial de acidentes químicos.

OS 12 PRINCÍPIOS DA QUÍMICA VERDE

1. **Prevenção:** é melhor prevenir a geração de material de descarte do que tratá-lo
2. **Economia de átomos:** os procedimentos sintéticos deveriam ser desenhados para maximizar a incorporação de todos os materiais utilizados no processo de síntese no produto final.
3. **Síntese química menos perigosa:** quando possível, as metodologias sintéticas devem ser desenhadas para gerar substâncias que possuem pouca ou nenhuma toxicidade para o ser humano e o meio ambiente.
4. **Desenho de produtos químicos mais seguros:** os produtos químicos deveriam ser desenhados para preservar a eficácia de funcionamento e reduzir ao mesmo tempo a sua toxicidade.
5. **Solventes e auxiliares mais seguros.** O uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação) deveria ser reduzido e quando usados, deveriam ser inócuos.
6. **Eficiência energética.** O impacto econômico e ambiental dos processos químicos deve ser minimizado. Se possível, os processos sintéticos deveriam ser conduzidos em temperatura e pressão ambientes.
7. **Uso de matérias primas renováveis:** caso seja técnica ou economicamente possível, prefere-se o uso de matérias primas renováveis em lugar de matérias primas degradáveis
8. **Redução de derivados:** A derivatização desnecessária deve ser minimizada ou evitada
9. **Catálise:** os reagentes catalíticos deveriam ser preferidos aos estequiométricos
10. **Desenho de produtos para degradação inócua:** os produtos químicos deveriam ser desenhados para que no final de sua vida útil, se decomponham em produtos inócuos e não persistentes no meio ambiente
11. **Análise em tempo real para prevenção de poluição:** as metodologias analíticas deveriam ser desenhadas para permitir análise em tempo real a modo de evitar a formação de substâncias perigosas
12. **Química mais segura para prevenção de acidentes:** as substâncias usadas em procedimentos químicos devem ser escolhidas para minimizar potenciais acidentes, explosões, vazamentos e incêndios. .
(Anastas & Eghbali, 2010; Anastas e Kirchoff, 2002; Koel e Kaljunard, 2006)

A partir do ponto de vista da química verde surge o conceito da química analítica verde, uma tendência de importância crescente em química analítica que estimula o desenho, desenvolvimento e a implementação de métodos que visam reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao meio ambiente Em 2001, Namiesnik, baseado nos 12 princípios da química verde e em quatro prioridades (a eliminação do consumo de reagentes, a redução na emissão de vapores e gases, a eliminação do uso de reagentes de alta toxicidade e a redução do consumo de energia) definiu sete princípios da química analítica verde que implicam a utilização de:

- i. Técnicas analíticas / processos de produção não poluentes;
- ii. Tempo, trabalho e eficiência energética;
- iii. Nenhuma ou simples preparação amostra;
- iv. Pouca ou nenhuma destruição da amostra;

- v. Baixo ou sem qualquer custo de reagentes e liberação de resíduos, e eliminação de reagentes altamente tóxicos de procedimentos analíticos;
- vi. Monitoramento em tempo real do processo de análise;
- vii. Instrumentação portátil, mantendo alta seletividade e sensibilidade.

Estes sete aspectos devem ser vistos como um todo e não individualmente, quando se trata de química analítica verde. O conceito é simples, porém nem sempre é possível fazer com que todas os métodos analíticas cumpram os sete princípios em questão, mas é benéfico para toda a sociedade que se tenha procedimentos analíticos que sejam norteados por tais preceitos.

Na derivatização fotoquímica a introdução de fótons em lugar de agentes químicos de derivatização permite uma economia de átomos na produção de derivados. Por outro lado, quando são utilizados inicializadores ou coadjuvantes nas reações fotoquímicas, estes são introduzidos em proporções catalíticas. Além disso, no processo de derivatização fotoquímica há uma maior eficiência energética e econômica associadas, devido ao fato de que as reações fotoquímicas podem ser conduzidas em condições de pressão e temperatura ambiente, e as fontes de irradiação, especialmente as de baixa pressão, não oferecem um custo energético ou econômico considerável. Ainda, quando aplicável, as reações fotoquímicas podem ser realizadas em meio aquoso, o que reduz o uso de solventes orgânicos e a geração de material de descarte tóxico. Finalmente, a derivatização fotoquímica se realiza mediante um processo químico mais seguro, já que com a proteção adequada à radiação, a utilização de fótons como reagentes oferece menos riscos de acidentes químicos.

2.3.2.

Métodos desenvolvidos para determinar medicamentos após fluorescência fotoinduzida

O objetivo da derivatização fotoquímica no desenvolvimento de métodos analíticos é o de obter um derivado químico com alguma propriedade que possa ser usada com vantagem do ponto de vista analítico, por exemplo: o aumento do sinal analítico; a diminuição do sinal de fundo; o aumento de seletividade; a melhoria da precisão; a eliminação do sinal de um interferente, ou a modificação de propriedades eletroquímicas ou de retenção. Ao mesmo tempo, o derivado ou

fotoproduto formado deve manter uma relação de proporcionalidade com a quantidade original do analito e o sinal analítico do fotoproduto gerado deve ser respeitada, pelo menos durante o período da análise de modo a se obter informação quantitativa válida.

No caso de métodos desenvolvidos visando a detecção da fluorescência dos produtos gerados por fotoderivatização, a exposição de espécies químicas não fluorescentes ou pouco fluorescentes ao UV pode promover reações de fotoredução, fotoxidação, fotociclização e fotólise que resultam em produtos com maior eficiência quântica fluorescente por causa da eliminação de cadeias alifáticas, que na molécula original favoreciam a desativação do estado excitado por processos não-radiativos. O processo pode ainda promover a formação de insaturações, que no fotoproduto favorecem a conjugação eletrônica de elétrons π e beneficiam a ocorrência da fluorescência (Yates, 2001).

Na literatura há trabalhos de revisão que abordam: (i) o uso da derivatização fotoquímica pós-coluna em métodos baseados na técnica de HPLC com detecção dos produtos a partir da quimioluminescência dos mesmos (Fedorowski e Lacourse, 2010); (ii) a derivatização fotoquímica de pesticidas utilizando detecção por fluorescência ou pela quimioluminescência produzida no decorrer do processo reacional com ênfase em métodos por injeção de fluxo (Icardo e Calatayud, 2008); (iii) os avanços da espectroscopia de luminescência aplicada a análise dos princípios ativos farmacêuticos (Sotomayor et al., 2008) ou (iv) os métodos aplicados na análise de medicamentos por técnicas de injeção em fluxo (Evgen'ev et al., 2001). Os métodos baseados na aplicação da fotoderivatização para a determinação fluorimétrica de substâncias utilizadas como princípio ativo em medicamentos são resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Métodos analíticos baseados na indução fotoquímica de fluorescência para determinação de medicamentos

Analito e aplicação/técnica	Dispositivo para fotoderivatização	Condições de fotoderivatização	Mecanismo de reação/fotoproduto	LD/ Faixa linear (mol L ⁻¹)	Rec. (%)	Ref.
Sulfonamidas em medicamento e leite fortificado / FIA – FL	Tubulação de PTFE (100 cm, 0,5 mm DI) colocada ao redor de uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão (254 nm)	Fluido carregador: água; vazão: 5 mL min ⁻¹	Fotólise	6,4 x 10 ⁻⁸ / 1,7 – 8,5 x 10 ⁻⁷	97 – 103	Mahedero e Aaron, 1992
Zuclopentixol e metabólito em urina fortificada /HPLC-FI	Tubo de teflon (5 m x 0,5 mm DI) entrelaçado ao redor de uma lâmpada de mercúrio de 8W	Irradiação por um minuto em fase móvel (ACN/ tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ ; pH 6,6; água; 36:5:59 v/v/v; 1 mL min ⁻¹)	Fotólise seguida de foto-oxidação / Tioxantona	5,0 x 10 ⁻¹⁰ / 2,5 x 10 ⁻⁹ – 1,2 x 10 ⁻⁶	62 – 85	Hansen e Hansen, 1994

Tabela 2: continuação

Análito e aplicação/técnica	Dispositivo para fotoderivatização	Condições de fotoderivatização	Mecanismo de reação/fotoproduto	LD/ Faixa linear (mol L ⁻¹)	Rec. (%)	Ref.
Fenotiazinas em urina fortificada/ Fluorimetria	Cubeta de quartzo irradiada com uma lâmpada de alta pressão de mercúrio (200 W)	2 – 1020s de irradiação UV; pH 2 – 13, dependendo do composto	Foto-oxidação	4,2 x 10 ⁻⁸ / 3,5 – 5,0 x 10 ⁻⁷	87 – 116	Laassis, et al., 1994
Azure – A/ Fluorimetria	Cubeta de quartzo colocada a 30 cm de uma lâmpada de alta pressão de mercúrio (200 W)	Tampão NH ₃ / NH ₄ Cl (pH 10,5); Complexação 1:1 com β –CD; 6 min de irradiação	Fotólise	3,8 x 10 ⁻⁸ / 1,7 x 10 ⁻⁷ – 5,1 x 10 ⁻⁷	n.i.	Maafi et al., 1995
Estrogênios em medicamento/ HPLC-FL	Reator comercial: tubulação capilar de PTFE (20 m, 0,3 mm ID) ao redor de uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão (254 nm; 8 W)	Fase móvel: tampão fosfato 0,05 mol L ⁻¹ pH 4/ ACN 64:36 ou 70:30; 1,0 mL min ⁻¹ .	n.i.	1 x 10 ⁻⁶ / 2,7 x 10 ⁻⁶ - 1 x 10 ⁻⁵	98 – 101	Gatti et al., 1998
Antidepressivos em plasma humano fortificado / HPLC-FI	Reator comercial: Tubulação (10 m x 0,3 mm DI) ao redor de lâmpada 254nm	Fase móvel: ACN/ MeOH/ tampão de fosfato de amônia 0,005 mol L ⁻¹ pH 7 70:15:15; 1 mL min ⁻¹ .	n.i.	1,7 – 40 x10 ⁻⁹ / 5 x 10 ⁻⁸ – 2 x 10 ⁻⁶	52 – 66	Johansen e Rasmussen, 1998
Sulfametazina em medicamento / FIA-FI	Tubulação de PTFE (150 cm, 0,5 mm ID) ao redor de uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão (6W)	Analito em 0,01 mol L ⁻¹ HCl, solução fotoreativa: 0,03 mol L ⁻¹ Na ₂ SO ₄ / tampão fosfato (pH 8,8 , 0,01 mol L ⁻¹)	n.i.	1,3 x 10 ⁻⁸ / 7,2 x 10 ⁻⁸ - 7,2 x 10 ⁻⁶	99 – 103	He, Chen e Cao, 1999
Diclofenaco em medicamento/ SIA – FI	Tubulação de PTFE (200 cm; 0,8 mm DI) ao redor de uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão (245 nm, 15 W); câmara protetora e ventilador	Fluido carregador: tampão amônia pH 9,9; 30 s de irradiação, 2,0 mL min ⁻¹	Fotólise	6 x 10 ⁻⁷ / 1, x 10 ⁻⁶ – 1 x10 ⁻⁵	n.i.	Pimenta, et al., 2002
Efavirenz em plasma humano / HPLC-FL	Reator fotoquímico comercial (PHRED TM): PTFE colocado em serpentina ao redor de uma lâmpada de 254 nm UV	Fase móvel: ACN/ tampão fosfato 0,05 mol L ⁻¹ pH 3,5 (53:47 v/v); 1 mL min ⁻¹	Foto-decarboxilação / Quinolona substituída	1,6 x10 ⁻⁹ / 4,7 x 10 ⁻⁹ - 2,5 x 10 ⁻⁷	98 – 102	Matthews et al., 2002
Carbamazepina em medicamento/ FIA – FL	Tubulação de PTFE (200 cm x 0,5 mm DI) ao redor de uma lâmpada de mercúrio (6W) de baixa pressão	Fluido carregador: água; reagente: HCl 0,01 mol L ⁻¹ ; vazão: 1,5 mL min ⁻¹ .	Foto-oxidação	3,4 x 10 ⁻¹⁰ / 8,5 x 10 ⁻⁹ – 1,1 x 10 ⁻⁶	99 – 101	Huang, He e Chen, 2002
Rofecoxib em plasma humano/ HPLC-FI	Reator comercial: serpentina (10 m x 0,3 DI) ao redor de uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão (254 nm)	Fase móvel: ACN/ água (35:65) v/v; 1,2 mL min ⁻¹	Fotociclação	1,6 x 10 ⁻⁹ / 1,6 x 10 ⁻⁹ - 2,5 x 10 ⁻⁷	98 – 100	Matthews , et al., 2002
Khellin em urina e soro fortificados / HPLC-FI	Tubulação de PTFE (18m, 0,25 mm DI) ao redor de uma lâmpada de luz negra (20 W)	Fase móvel: 40% EtOH contendo 0,075 mol L ⁻¹ H ₂ O ₂ ; 0,5 mL min ⁻¹ ; Reagente pós-coluna: tampão fosfatos 0,07 mol L ⁻¹ (pH 12,7) contendo 50% EtOH a 0,4 mL min ⁻¹ .	n.i.	1,2 – 2,5 x 10 ⁻⁷ / 1,8 x 10 ⁻⁷ – 7,2 x 10 ⁻⁶	94 – 99	Mawatari et al., 2003
Talidomida em medicamento e soro humano fortificado/ Fluorimetria	Estrutura de estufa com 6 lâmpadas de mercúrio, baixa pressão (353 nm, 6W) e amostra em tubos de quartzo	60 min de irradiação; pH 2; na presença ou ausência de sulfanilamida (no medicamento)	n.i.	4,6 x 10 ⁻⁹ / < 5 x 10 ⁻⁵	104 – 120	Cardoso, et al., 2004
Hidro cortisona em medicamento / Fluorimetria	Estrutura de estufa com 6 lâmpadas de mercúrio, baixa pressão (353 nm, 6W) e amostra em tubos de quartzo	Analito aquecido por 5 min a 60°C, posteriormente irradiado por 30 min em 0,8 mol L ⁻¹ HCl	Fotooxidação	1,1 x 10 ⁻⁷ / < 5 x 10 ⁻⁵	96 – 103	Cardoso et al., 2004

Tabela 2: continuação

Analito e aplicação/técnica	Dispositivo para fotoderivatização	Condições de fotoderivatização	Mecanismo de reação/fotoproduto	LD/ Faixa linear (mol L ⁻¹)	Rec. (%)	Ref.
Antibióticos fluoroquinolônicos em plasma e urina / HPLC-FI	Lâmpada de mercúrio de alta pressão (200W); localizada a 30 cm de uma célula de 3 ou 10 mL.	Irradiação pré-coluna em 50:50 EtOH/tampão TRIS (pH 7,05; 0,015 mol L ⁻¹), sob agitação magnética. Após irradiação; as soluções foram diluídas em tampão fosfatos (0,03 mol L ⁻¹ , pH 3) antes da injeção no HPLC	Fotólise / Eliminação de anel nitrogenado de 6 membros, estudado por (Burhenne, Ludwig e Spitteller, 1997)	1,9 – 3,9 x 10 ⁻⁸ / 1,3 – 4 x 10 ⁻⁷	98 – 103	Espinosa-Mansilla <i>et al.</i> , 2005
Prednisolona e tramcinolona em medicamento/ Fluorimetria	Amostras acomodadas em tubos de quartzo; irradiadas com lâmpadas de mercúrio de 80 W (254 e 300 nm)	40 min de irradiação em 2 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄ , 65° C	n.i.	1,4 x 10 ⁻⁸ / Até 5 x 10 ⁻⁸	95 – 107	Coelho e Aucélio, 2006
L-dopa e dopamina em medicamento / FIA-FI	Tubulação de PTFE (200 cm, 0,5 mm ID) ao redor de um tubo de vidro com duas paredes (0,5 mm D), refrigerado com água (2 mL min ⁻¹). Lâmpada de tungstênio (500 W, 250 V) colocada a 20 cm do reator.	Determinação indireta, medindo a inibição da reação fotoquímica do EDTA-tionina causada pelo analito. Meio: tampão acetato pH 5 (0,1 mol L ⁻¹); EDTA e azul de tionina (0,1 e 2 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹).	n.i.	3,3 x 10 ⁻⁶ / 1,3 x 10 ⁻⁵ – 6,4 x 10 ⁻⁴	100 %	Perez-Ruiz <i>et al.</i> , 2007
Tetraciclina em água de superfície / Fluorimetria com calibração multivariada	Ventilador, lâmpada de Xenônio de 50 – 500 W, lente de quartzo e cubeta de quartzo a 30 cm da lâmpada	Tampão carbonato 0,02 mol L ⁻¹ pH 10; 2,5% MeOH homogeneizado por 8 min e irradiado por 3 min com agitação constante	Fotólise	1,6 x 10 ⁻⁶ / n.i.	97 – 101 %	Valverde <i>et al.</i> , 2006
Eritromicina em medicamento/ Fluorimetria	Estrutura de estufa com 6 lâmpadas de mercúrio, baixa pressão (353 nm, 6W) e amostra em tubos de quartzo	Amostras em H ₂ SO ₄ (6,3 mol L ⁻¹) aquecidas por 5 min (65 °C) e posteriormente irradiadas por 60 min	n.i.	3,4 x 10 ⁻⁸ / < 2,7 x 10 ⁻⁴	98 – 105 %	Finete, <i>et al.</i> , 2008
Ácido fólico e metabólitos em soro / Fluorimetria com calibração multivariada	Tubulação de PTFE (0,5 mm ID) ao redor de um reator UV	Analitos em tampão acetato pH 4, 0,4 mol L ⁻¹ .	n.i.	7,2 x 10 ⁻⁸	88 – 104 %	Giron <i>et al.</i> , 2008
Ciclofenil em medicamento / Fluorimetria	Estrutura de estufa com 6 lâmpadas de mercúrio, baixa pressão (254 nm, 6W) e amostra em tubos de quartzo	Analito irradiado em metanol por 120 min. 1 mL da solução irradiada foi diluída com 1 mL de tampão Britton-Robinson (pH 10,5) e avolumado a 10 mL com metanol.	Fotólise em duas etapas (fotodecarboxilação) / Identificado por GC-MS	1,1 x 10 ⁻⁸ / < 8 x 10 ⁻⁵	94 – 101 %	Pacheco <i>et al.</i> , 2008
Camptotecina em medicamentos de topotecan e irinotecan fortificados / LIF	Amostra acomodada em tubos de quartzo e irradiada com 6 lâmpadas de baixa pressão de mercúrio (6W, 254 nm)	Analito em NaOH 1 mol L ⁻¹ ; irradiado por 26 min.	n.i.	4 x 10 ⁻¹⁰ / < 1 x 10 ⁻⁶	92 – 94%	Marques, <i>et al.</i> , 2010
Indometacina em medicamentos SIA-FI	Tubo de PTFE (90 cm, 0,8 mm DI) em serpentina ao redor de uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão (15 W/G15T8), ligada 10 min antes das medições.	Fluido carregador: tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ ; pH 7,2; 25 min de irradiação e vazão: 2 mL min ⁻¹	Fotodecarboxilação / Estudado por (Weedon e Wong, 1991) (5,6)	1,23 x 10 ⁻⁶ / 4,6 x 10 ⁻⁶ – 9 x 10 ⁻⁵	99%	Passos <i>et al.</i> , 2011
Tigeciclina em medicamento/ FIA-FI e SIA-FI	Tubulação de PTFE (300 cm) ao redor de uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão (30W, 254 nm)	Fluido carregador: água, analito em ácido nítrico pH 4; 3 ml min ⁻¹ ; 330 s de irradiação	Fotólise em duas etapas	5,6 x 10 ⁻⁸ / 2,1 x 10 ⁻⁷ – 4,2 x 10 ⁻⁶	99 – 101 %	Molina-Garcia <i>et al.</i> , 2011

n.i.: não informado. * em métodos de separação, a proporção de fase móvel é indicada como v/v. HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência, FIA: análise por injeção em fluxo, SIA: análise por injeção sequencial, LIF: fluorescência induzida por laser, SPS: espectroscopia em fase sólida, FL: detecção por fluorescência. PTFE: polifluoruretano,

Algumas aplicações usando espectrofotometria de fluorescência acoplada com técnicas de injeção em fluxo ou HPLC com detecção por fluorescência para determinar medicamentos após derivatização fotoquímica pós ou pré coluna são descritos brevemente a seguir.

Nos métodos onde a derivatização fotoquímica ocorre em regime de fluxo, o sistema mais amplamente utilizado é o composto por tubulação de PTFE ao redor de uma (Hansen & Hansen, 1994; Huang, et al, 2002; Passos et al., 2011) ou várias lâmpadas de mercúrio de baixa pressão (Nieder & Jaeger, 1987). Em muitos casos, reatores pós-coluna comerciais de sistemas de HPLC foram usados (Matthews et al., 2002; Gatti et al., 2000; Johansen & Rasmussen, 1998), porém, na maior parte dos métodos descritos, os equipamentos para derivatização fotoquímica são feitos nos próprios laboratórios (Tabela 2).

A maior parte dos métodos que se baseiam na indução de fluorescência de analitos por derivatização fotoquímica são desenvolvidos em sistemas em linha, como análise por injeção em fluxo (FIA), análise por injeção sequencial (SIA) ou HPLC. As vantagens de se utilizar esses sistemas em fluxo são claramente a automação, a diminuição do tempo de análise e o aumento da precisão na medição do sinal analítico em um momento específico do processo reacional. Porém, dado ao baixo tempo de exposição ao UV típico dos sistemas em linha, a sensibilidade do método é muitas vezes sacrificada a não ser nos casos onde são usados inicializadores/catalisadores das reações fotoquímicas no sistema em fluxo (Mawatari et al., 2003; Chen e He, 2000; Nieder e Jaeger, 1987). Porém, de um modo geral, nos métodos reportados com FIA ou SIA, estabelecer um compromisso entre o tempo de reação e o comprimento da tubulação representou um desafio para a otimização dos métodos (Passos et al., 2011; Molina-Garcia et al., 2011). Além disso, por causa das limitações de resistência química da tubulação de PTFE ou dos componentes de um sistema cromatográfico, nas condições de reação utilizadas com estes métodos se empregam soluções aquosas com valores de pH não corrosivos, como pH 9 (Pimenta et al., 2002) ou pH 4 (Molina-Garcia et al., 2011; Giron et al., 2008) limitando assim a eficiência da derivatização de alguns compostos.

Nas derivatizações fotoquímicas realizadas em batelada (fora de linha), a desvantagem da não automação é compensada pela maior flexibilidade no emprego de condições experimentais para produzir a reação fotoquímica. Entre essas vantagens podem ser citadas: (i) a utilização de fontes de radiação com maior potência (Espinosa-Mansilla et al. 1995; Laassis et al.,1994) que

produzem maior eficiência na derivatização, desde que seja utilizado acoplamento com um sistema de refrigeração para evitar grande elevação da temperatura do meio reacional; (ii) a utilização de uma maior quantidade de lâmpadas para aumentar a efetividade da derivatização fotoquímica (Cardoso et al, 2004; Marques et al, 2010; Pacheco et al., 2008) e (iii) uso de soluções com valores de pH mais extremos como meio de reação (ácidos ou bases fortes nas concentrações maiores que $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) (Finete, et al 2008; Cardoso et al., 2004).

Embora o conhecimento dos mecanismos envolvidos nas reações fotoquímicas não seja fundamental para viabilizar a aplicação dos métodos analíticos baseados na determinação de analitos de interesse pela fluorescência obtida após derivatização fotoquímica, diversos trabalhos indicaram possíveis mecanismos de reação a fim de justificar o aumento do sinal obtido e, em alguns casos, os fotoprodutos formados foram identificados.

O mecanismo de reação mais frequente nas reações fotoquímicas aplicadas para induzir fluorescência é a fotólise. Tabela 2 na qual, a eficiência quântica da molécula aumenta por causa da perda de cadeias alifáticas saturadas, que no produto original prejudicam a fluorescência por promover a desativação do estado excitado mediante processos não-radiativos. Um exemplo deste processo é mostrado na Figura 6, em que após duas etapas, a radiação promoveu o aumento da fluorescência de fluoroquinolonas (Mansilla, et al 2005).

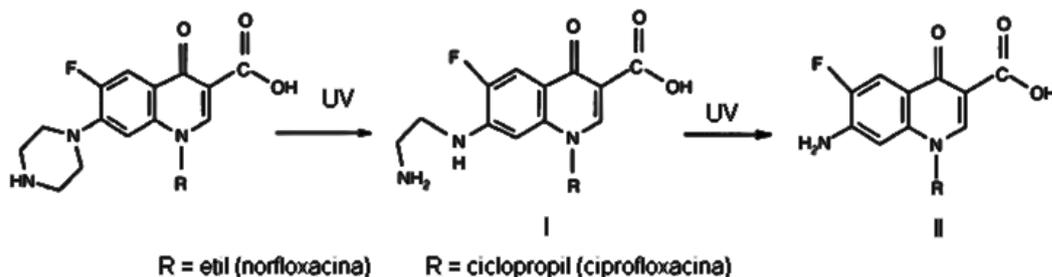


Figura 6 - Fotoderivatização da ciprofloxacina e norfloxacina (Adaptado de Mansilla et al, 2005)

No caso da derivatização do clopentiixol (um antipsicótico), a fotoderivatização ocorreu em duas etapas, primeiro pela fotólise da cadeia alifática, e depois pela formação de dois produtos de oxidação (Figura 7). Estes produtos, formados por derivatização pós-coluna, possuem maior rigidez estrutural do que a molécula original (e maior fluorescência) o que permitiu a determinação da substância por HPLC com detecção por fluorescência (Hansen e Hansen, 1994).

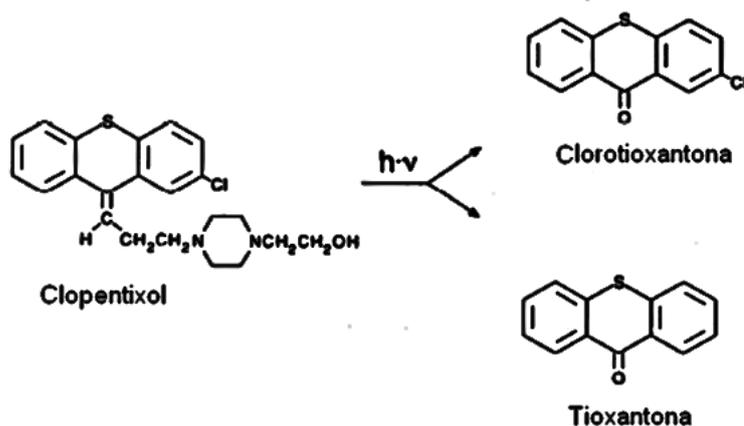


Figura 7 - Fotoderivatização do clopentixol (Adaptado de Hansen & Hansen, 1994)

A fotociclização é um tipo de reação menos comum em procedimentos de fotoderivatização. No caso da derivatização em linha do rofecoxib (um anti-inflamatório), a reação fotoquímica ocorreu em duas etapas, primeiro com a fotociclização e, posteriormente com a redução (eliminação de hidrogênio), o que favoreceu a formação de um produto com maior rigidez estrutural e maior conjugação de elétrons π , conforme mostrado na Figura 8. A formação deste produto de reação, que é fortemente fluorescente, permitiu a quantificação indireta do rofecoxib por HPLC detectando fluorescência após a derivatização pós-coluna.

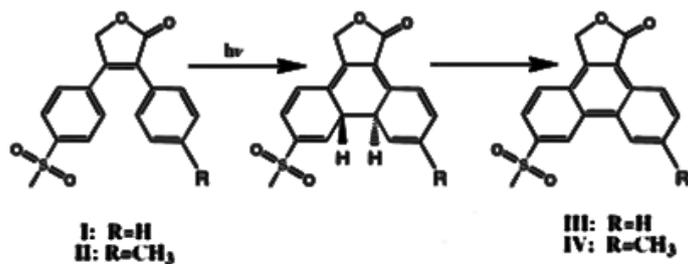


Figura 8 - Fotoderivatização do rofecoxib (Mathews et al., 1999)