

3

Materiais e métodos

3.1.

Reagentes

Os solventes utilizados neste trabalho são de grau de pureza UV/HPLC e não sofreram etapas de purificação. A água utilizada foi água ultra-pura¹ (de 18,2 MΩ cm de resistividade).

As drogas pesquisadas e testadas, foram adquiridos da Sigma (USA), triancinolona acetonido pureza >99% (ref.: T-6501 lote 106H0887), prednisolona pureza >99% (ref.: P-6004 lote 27H0169). A succinato sódico de hidrocortisona foi obtida a partir da formulação CORTIZOL 500mg solução injetável da EMS (ref.: RO-408/071048 lote 01/3713).

Os solventes orgânicos foram adquiridos da TEDIABrazil (USA), metanol HPLC/SPECTRO (ref.: MS-1922 lote 205010 e 309138), acetonitrila HPLC/SPECTRO (ref.: AS-1122 lote 111098) e acetato de etila (ref.: EP-1513 lote 205055), diclorometano (ref.: DR-0440). Também foram utilizados, etanol absoluto PA-ACS, ref.: 1009831000 (Merck, Alemanha) e acetona PA ref.:201 (ISO FAR, Brasil). O metanol PA da Merck ref.: 1060091000, metanol UV/HPLC da Mallinckrodt (USA) ref. 3041, o metanol PA da Synth (Brasil) A1085.01.BJ e o metanol UV/HPLC da ISO FAR (Brasil) ref. 3009, foram também testados em relação ao sinal fluorescente de fundo.

Duas marcas de ácido sulfúrico foram utilizadas na reação de derivação: o ácido sulfúrico PA (pureza mín. 95% e máx. 98%), Ref.: 099, da ISO FAR (Brasil) e o ácido sulfúrico PA-ISO (pureza mín. 95% e máx. 97%), Ref.: 1007311000, lote K32091131, da Merck. Outros ácidos (ácido nítrico e clorídrico e ácido fosfórico, da Merck) também foram testados para o procedimento de indução de fluorescência.

Para o ajuste do pH das soluções irradiadas foram testados, hidróxidos de

¹ A água grau reagente tipo I, que atende os padrões ASTM, CAP, ACS e NCCLS de pureza.

sódio 32% (Merck, Alemanha) e hidróxido de amônio PA da ISO FAR (Brasil) ref. 223 e tampão fosfato de potássio monobásico pH 6.

Para teste de interferência foi utilizada solução metanólica de benzocaína (Sigma, USA) e solução aquosa de sulfato de polimixina B – 8023 un./mg (lote A1420385).

Os medicamentos usados para testar a metodologia analítica foram: PRELONE 5 mg comprimido (ASTA MEDICA, Brasil), PREDSIM 20 mg comprimido (Schering-Plough, Brasil), PREDMICIN pomada (SEM IND. FARM. LTDA, Brasil), OMCILON-A “M” creme (Bristol-Myers Squibb, Brasil), THERACORT20 suspensão injetável (TheraSkin, Brasil), VETALOG injetável (Novartis Argentina S.A, Argentina).

Para lavagem da vidraria foi utilizado Extran[®] MA 02 – Neutro da Merck (Brasil) e ácido nítrico PA adquirido da Reagen (Brasil).

3.2.

Instrumentação

3.2.1.

Reatores fotoquímicos

O ultravioleta próximo (UV) cobre a região do espectro eletromagnético entre 100 e 400 nm. Na prática, o aproveitamento do espectro UV é limitado pelos três tipos de fontes disponíveis comercialmente: lâmpadas de deutério, de xenônio e de vapor de mercúrio. Entre elas, as de vapor de mercúrio são as mais usadas em aplicações laboratoriais e industriais. Isto se deve ao baixo custo e a facilidade de operação. Dois outros fatores para a escolha das lâmpadas de mercúrio são: a boa eficiência energética (proporção de potência elétrica convertida em radiação) e eficiência espectral (proporção de radiação emitida no UV).

Nas lâmpadas de mercúrio por descarga em arco, a radiação UV é consequência do relaxamento luminescente de átomos de mercúrio excitados pelas colisões resultantes com elétrons e íons no arco formado entre os eletrodos montados no interior de um bulbo de quartzo (que contém além de uma determinada quantidade do metal, um gás nobre que é normalmente argônio). O espectro de emissão depende fortemente da

pressão dos gases no interior do bulbo havendo, por este motivo, a distinção entre lâmpadas de baixa, média e alta pressão. As fontes de média e alta pressão apresentam espectro de emissão caracterizado por linhas mais largas na região do UV e também na região do visível. Emitem também uma grande quantidade de calor que pode ser aproveitado analiticamente (Cavicchioli e Gutz, 2003).

Desta forma, dois reatores fotoquímicos construídos no laboratório foram testados para irradiar as amostras de padrões de glicocorticóides. O primeiro reator fotoquímico (Figura 9A) já foi descrito anteriormente em detalhes (Cardoso, 2003), sendo constituído por quatro lâmpadas de emissão máxima (λ_{\max}) a 300 nm (lâmpada germicida de vapor de mercúrio de 6 W de potência cada, totalizando 24 W de potência).

Vislumbrou-se a possibilidade de se utilizar, como fonte de UV, lâmpadas de mercúrio utilizadas na iluminação pública e que são facilmente disponíveis no comércio a custo relativamente baixo. Com base nesta idéia, o segundo reator (Figura 9B) foi montado instalando-se no interior da carcaça de uma estufa desativada, uma ampola interna de lâmpada de mercúrio de 125 W de potência utilizada em iluminação pública (SYLVANIA, SP-Brasil). Para que a radiação UV (λ_{\max} de 300 nm) pudesse ser exposta, foi necessário quebrar o invólucro externo de vidro, expondo a ampola (núcleo interno da lâmpada). Essa ampola consiste em um tubo de quartzo contendo vapor de mercúrio de média/alta pressão. Um reator de 80 W foi utilizado para sustentar o funcionamento do núcleo da lâmpada. Como a lâmpada proporciona elevado aquecimento às suas vizinhanças, foi necessária a instalação de um sistema de refrigeração automático, para isto foi instalada uma ventoinha acoplada a um sensor de temperatura (termistor), o que possibilitou manter a temperatura no interior do reator estabilizada em torno de 65 ± 5 °C (monitorada por um termômetro – ARBA, com resolução de 1 °C). Para melhor aproveitamento da radiação, o interior da estufa foi forrado com papel alumínio. As amostras submetidas à radiação foram colocadas em tubos de quartzo (1,5 cm de diâmetro interno e 10 cm de altura) com rolha esmerilhada, e estes foram cuidadosamente acomodados em um suporte adaptado para esta prática.

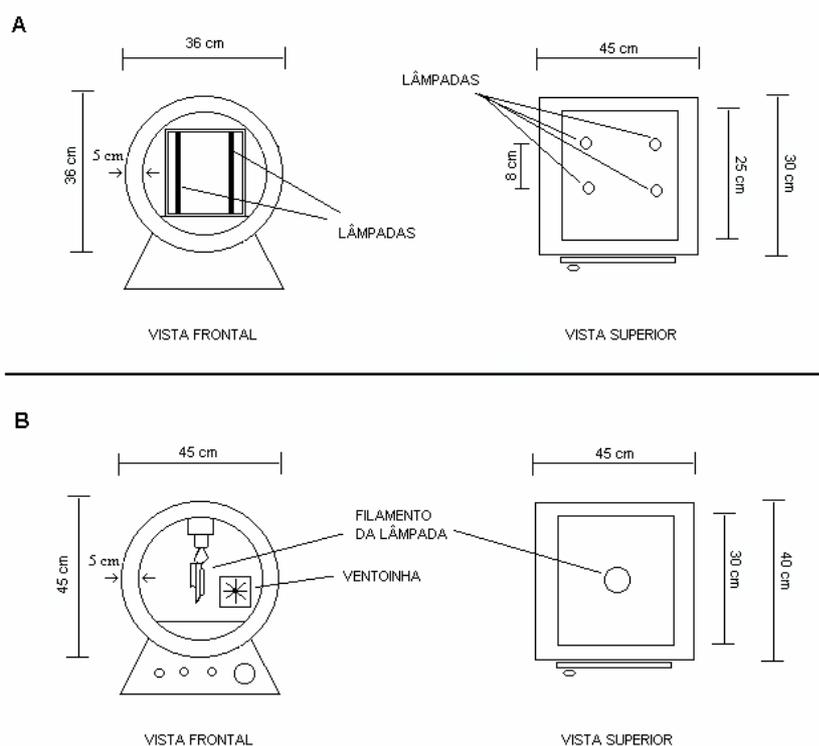


Figura 9: Representação esquemática dos reatores fotoquímicos: (A) Reator com lâmpada germicida de vapor de mercúrio (24 W de potência) e (B) Reator com lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W.

Estudos comparativos foram realizados a fim de demonstrar a eficiência da indução de fluorescência utilizando os diferentes reatores. As intensidades de fluorescência dos fotoprodutos adquiridos no primeiro reator foram menores, necessitando ainda de prévio aquecimento (80 °C por 10 min.) da solução da amostra para que se houvesse a formação dos fotoprodutos (Cardoso, 2002). A substituição das lâmpadas germicidas por uma única de maior potência possibilitou um grande ganho de eficiência na formação dos fotoprodutos. Sendo assim, o reator de 125 W foi usado neste trabalho. A utilização deste reator requer cuidados com a segurança. Devido à alta intensidade de radiação da lâmpada, faz-se necessário o uso de luvas e óculos apropriados para o manuseio das amostras no interior do reator, pois a exposição aos raios UV são prejudiciais, podendo causar cegueira e danos à pele.

3.2.2.

Espectrofluorímetro

O espectrofluorímetro utilizado foi um Perkin-Elmer LS-55 que possui uma lâmpada pulsada de xenônio (20 kW por pulso de 8 us) como fonte de excitação e dois monocromadores independentes com grades de difração de 1200 ranhuras mm^{-1} . O detector é um tubo fotomultiplicador R928 da Hamamatsu, com resposta espectral S5. Bandas espectrais de passagem de entrada e saída dos monocromadores foram fixadas em 8. Brancos e amostras foram acondicionadas em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os espectros foram adquiridos em um computador pessoal PC da Dell utilizando o programa Fwinlab da Perkin-Elmer.

3.2.3.

Cromatógrafo

Estudos com cromatografia em fase líquida foram realizados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) modelo HP 1050 acoplado a dois detectores, sendo um espectrofotométrico por arranjo de fotodiodos (DAD) modelo HP 1050 e o outro, de fluorescência modelo HP 1046A (todos da Agilent, USA).

As colunas cromatográficas utilizadas foram: SymmetryShield RP18 3,5 μm (4,6 x 150mm) ref.: 186000180 (Waters, USA), HP Spherisorb ODS 2 – C18 5 μm (4 x 250mm) ref.: 7992402-584 (HP, Alemanha) e Lichrospher 100 CN 5 μm (4 x 125mm) ref.: 50825 (Merck).

Para filtrar as soluções injetadas no HPLC foi utilizada a unidade filtrante HV MILLEX 0,45U de poro, 13 mm de diâmetro (JBR610245) da Millipore Corporation,USA.

3.2.4.

Equipamentos auxiliares

Espectrofotômetro

Um espectrofotômetro UV-visível DMS – Intralab com feixe duplo separado temporalmente, foi utilizado para obter espectros de absorção.

Sistema de purificação de água

Para obter água ultra-pura de grau reagente tipo I foi utilizado um sistema Milli-Q Plus (Millipore Corporation, USA), que utiliza cartucho de purificação do modelo QPAK1[®] (específico para o uso com água de alimentação destilada).

Banho ultra-sônico

O banho ultra-sônico utilizado para auxiliar na homogeneização das amostras foi um modelo CLE-PARMER 8893 da Cole-Parmer (USA).

Balança Analítica

Foram utilizadas balanças analíticas da METTLER TOLEDO (USA): balança analítica de prato externo modelo PB602, com resolução de 10 mg e a micro balança analítica modelo MT5, com resolução de 0,001 mg.

pH-metro

As leituras de pH foram realizadas no medidor pH-metro modelo 350 de ThermoOrion (USA), acoplado a um eletrodo combinado de vidro PerpHecT ROSS[®] ELETRODES 0 –14 pH, modelo 8256BN.

Centrífuga

Para centrifugar as amostras de formulações farmacêuticas foi utilizada a centrífuga modelo MARATHON 22K da Fisher Scientific (Alemanha)

3.3.

Procedimentos

3.3.1.

Lavagem do material

A vidraria utilizada em todos os procedimentos analíticos foi deixada de molho 2 horas em solução de Extran[®] 5% v/v e depois enxaguada em água corrente. Após esta etapa, o material foi deixado em imersão em solução de ácido nítrico 20% v/v por um período mínimo de 4 horas, e depois enxaguado com água destilada e com água ultra-pura. O material foi seco em estufa a 100 °C e guardado em recipientes hermeticamente fechados.

A limpeza das cubetas foi realizada com água ultra-pura, seguida de enxágüe com ácido nítrico 20 % v/v e novo enxágüe com água ultra-pura. Estas etapas foram realizadas previamente e posteriormente a todas as medições.

3.3.2.

Preparação dos padrões e amostras para tratamento fotoquímico

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas soluções estoque de prednisolona, triancinolona acetinado e hidrocortisona em metanol. A partir destas soluções, foram preparadas as amostras para o estudo do procedimento de derivação fotoquímica. Para que ocorresse esta reação (Cardoso *et al*, 2004) as quantidades de metanol, água e ácido sulfúrico foram cuidadosamente otimizados até se estabelecer os percentuais de cada componente, dando origem à solução que foi chamada de “mistura reacional”. A esta solução foram adicionadas alíquotas de soluções estoque conforme o estudo em questão.

Estas amostras foram preparadas diretamente em tubos de quartzo (1,5 cm de diâmetro interno e 10 cm de altura) com rolha esmerilhada, adicionando-se uma alíquota da solução estoque e completando o volume para 5 mL com a mistura reacional. Depois de homogeneizadas, as soluções foram colocadas no reator

fotoquímico para serem expostas à radiação ultravioleta (UV) a uma temperatura média de 65 °C (temperatura interna do reator) durante um tempo determinado.

3.3.3.

Preparação das curvas analíticas e procedimento de adição de analito

Os diferentes pontos das curvas analíticas foram preparados adicionando-se alíquotas crescentes de uma solução padrão estoque de prednisolona e triancinolona acetinado ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) em balão volumétrico de 5 mL e completando o volume com a mistura de água/metanol/ácido sulfúrico (mistura reacional). As soluções correspondentes à curva analítica foram acondicionadas em tubos de quartzo com rolha esmerilhada e colocadas no reator fotoquímico para serem expostas à radiação UV.

Para minimizar interferências, fez-se necessário utilizar a técnica de curva de calibração com adição de analito, para tanto foram preparadas 4 amostras contendo 10 μL de uma solução do medicamento a ser analisado (1 comprimido do medicamento para 50 mL de metanol). A primeira amostra teve seu volume final levado a 5 mL avolumando com a mistura reacional. As amostras seguintes tiveram adição de alíquotas crescentes (10, 20 e 30 μL) de uma solução padrão estoque de prednisolona ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$), tendo posteriormente o seu volume final levado a 5 mL com uso da mistura reacional.

3.3.4.

Formulações farmacêuticas

As amostras das formulações farmacêuticas foram preparadas conforme sua apresentação. Para medicamentos disponíveis na forma de comprimidos, adotou-se o procedimento de macerar uma unidade e solubilizar em metanol. Para auxiliar o processo de dissolução e extração do fármaco a solução foi colocada no banho ultrassônico por 20 min., seguida de centrifugação e filtração. Para pomadas foi testada a dissolução em vários solventes. E para soluções injetáveis foi adotado o procedimento

de dissolução de todo o conteúdo da ampola em um volume conhecido de água ultra-pura. Para o desenvolvimento destes preparos foi consultada a farmacopéia (USP XXII, 1990).

3.3.5.

Procedimento para a medição no espectrofluorímetro

A leitura do sinal fluorescente das soluções foi feita em uma cubeta de quartzo, previamente limpa e homogeneizada com a amostra a ser medida. As medidas de intensidade de fluorescência das soluções foram tomadas após 10 segundos de exposição à luz radiante. Esse procedimento teve o objetivo de compensar qualquer flutuação do sinal. Os valores reportados como o sinal da intensidade fluorescente foi o valor médio de 10 leituras deste sinal durante o tempo em que a amostra permaneceu no caminho ótico da radiação.

3.3.6.

Procedimento para medição no cromatógrafo líquido

As soluções submetidas à análise cromatográfica foram acondicionadas em frascos amostradores de vidro (vial) com capacidade de 2 mL, após terem sido filtradas com o auxílio de unidades filtrantes para amostras.

Os frascos foram acomodados no injetor automático, e injetados seguindo a seqüência estabelecida no programa gerenciador do cromatógrafo. Parâmetros cromatográficos como, vazão de bombeamento da fase móvel, composição da fase móvel e coluna cromatográfica, foram estabelecidos conforme o teste em questão.