



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA

LETÍCIA DA SILVA NEVES

**DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL EM MEDICAMENTOS UTILIZANDO UM
 μ FIA CONTROLADO POR SMARTPHONE**

BRASÍLIA/DF
2021

LETÍCIA DA SILVA NEVES

**DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL EM MEDICAMENTOS UTILIZANDO UM
μFIA CONTROLADO POR SMARTPHONE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para obtenção de título de Bacharel em Química Tecnológica pelo programa de graduação do Instituto de Química da Universidade de Brasília-UnB.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

BRASÍLIA/DF
2021

DEDICATÓRIA

O próprio Senhor irá à sua frente e estará contigo; Ele nunca o deixará nunca o abandonará. Não tenha medo! Não desanime!

AGRADECIMENTO

Primeiro, quero agradecer a Deus que tem me sustentado até aqui.

Agradeço a minha família por todo apoio. Aos meus pais por todo amor e cuidado, aos meus irmãos pelo companheirismo, a minha sogra por toda ajuda, ao meu marido e ao meu filho pelo amor e dedicação.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Fonseca, por tornar esse trabalho possível, pela dedicação e carinho.

Aos meus amigos Mariana, Bia, Isabella, Elo, Rafael e Caio por compartilharem comigo ao longo desses anos todos momentos felizes ou não, por todo apoio e carinho.

Para todos que fizeram parte dessa caminhada, meu muito obrigada!

RESUMO

O presente trabalho descreve a utilização de um microssistema de análise por injeção em fluxo (μ FIA) com detecção por imagens digitais totalmente controlado por um smartphone, na determinação de paracetamol em medicamentos. Os sistemas FIA e as reações quimiluminescentes vem sendo utilizados de forma crescente na Química Analítica, devido a vantagens que incluem excelentes limites de detecção, a não necessidade do uso de fonte de radiação, alta frequência analítica e baixo consumo de reagentes. Aliando as vantagens de um sistema FIA e das reações quimiluminescentes a um sistema miniaturizado, proporcionam-se análises mais práticas e rápidas, além disso o uso de um smartphone para detecção por imagens digitais, torna o sistema verdadeiramente miniaturizado e portátil. O microssistema proposto neste trabalho foi construído por ablação a laser em polimetilmetacrilato (PMMA) e micro bombas piezoelétricas foram utilizadas para a propulsão das soluções de trabalho. Utilizando a estratégia de injeção direta e simultânea de soluções padrão (ou de amostras), contendo paracetamol, juntamente com uma solução de hipoclorito, foi possível detectar a atenuação do sinal quimiluminescente da componente B de RGB produzido pela reação do hipoclorito remanescente com uma solução de luminol em meio alcalino. A curva analítica construída para a determinação de paracetamol na faixa de (2,57 a 10,28 mg L⁻¹) apresentou uma linearidade adequada ($R^2 = 0,997$) proporcionando um limite de detecção de 0,95 mg L⁻¹, o qual possibilitou a determinação de paracetamol em comprimidos. Os sinais obtidos para injeções em triplicata dos padrões apresentaram precisões entre 2,9 e 7,9% e os teores de paracetamol determinados pelo método proposto em cinco de seis amostras analisadas não diferiram significativamente ao nível de 95 % de confiança dos teores encontrados pelo método de referência (espectrofotometria UV/VIS).

Palavras-chave: paracetamol, μ FIA, imagens digitais e quimiluminescência.

ABSTRACT

The present work describes the use of a microsystem of flow injection analysis (μ FIA) with detection by digital images fully controlled by a smartphone, in the determination of paracetamol in medications. FIA systems and chemiluminescent reactions have been increasingly used in Analytical Chemistry, due to advantages that include excellent detection limits, the lack of the need for radiation source use, high analytical frequency and low reagent consumption. Combining the advantages of an FIA system and the chemiluminescent reactions to a miniaturized system, more practical and fast analysis is provided, in addition the use of a smartphone for detection by digital images, makes the system truly miniaturized and portable. The microsystem proposed in this work was constructed by laser ablation in polymethylmethacrylate (PMMA) and piezoelectric micro pumps were used to propel the work solutions. Using the strategy of direct and simultaneous injection of standard solutions (or samples), containing paracetamol, together with a hypochlorite solution, it was possible to detect the attenuation of the chemiluminescent signal of the B component of RGB produced by the reaction of the remaining hypochlorite with a luminol solution in basic medium. The analytical curve constructed for the determination of paracetamol in the range of (2.57 to 10.28 mg L⁻¹) presented an adequate linearity ($R^2 = 0.997$) providing a detection limit of 0.95 mg L⁻¹, which allowed the determination of paracetamol in tablets. The signals obtained for injections in triplicate of the patterns showed precisions between 2.9 and 7.9% and the paracetamol contents determined by the method proposed in five out of six samples analyzed did not differ significantly at the level of 95% confidence of the levels found by the reference method (spectrophotometry UV/VIS).

Keywords: paracetamol, μ FIA, digital images and chemiluminescence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do paracetamol (N-(4-hidroxifenil)etanamida). Adaptado de Bertolini et al. (2006).....	10
Figura 2 - Cubo de cores RGB (R: vermelho; G: verde; B: azul). Adaptado de Godinho et al. (2008).....	14
Figura 3 - Layout dos canais a serem gravados no substrato.....	19
Figura 4 - Placa de PMMA (a) antes do polimento e (b) após o polimento.....	20
Figura 5 - Esquema das cavidades de entrada e saída das soluções no microsistema.	20
Figura 6 - Morsa abarcando duas placas de vidro, o substrato e a cobertura para a selagem.	21
Figura 7 - Placas de PMMA (a) antes da selagem e (b) depois da selagem.....	21
Figura 8 - Conexão da agulha na cavidade da placa.....	21
Figura 9 - Dimensões da estrutura suporte para acomodação do sistema de análise.	22
Figura 10 - Seção superior da estrutura suporte.	Error! Bookmark not defined.
Figura 11 - Esquema de fixação do smartphone para a realização das medidas.	23
Figura 12 - Seção dois utilizada para acomodação do microsistema.	23
Figura 13 - Seção três utilizada para acomodação dos circuitos eletrônicos.	23
Figura 14 - Ícone do aplicativo microFIA.....	24
Figura 15 - Tela inicial do aplicativo microFIA.....	25
Figura 16 - Tela de ajustes. (1) Tela de detecção em tempo real, (2) controle de exposição, (3) controle de sensibilidade a luz, (4) controle de branco, (5) controle de ajuste do tamanho dos amostradores, (6) amostradores RGB, (7) nome do arquivo, (8) número de injeções por segundo, (9) número de medidas, (10) número de ciclos, botões para condicionamento do sistema “ <i>pumps on</i> ” e “ <i>pumps off</i> ”, iniciar e finalizar medidas “ <i>start</i> ” e “ <i>reset</i> ”.	25
Figura 17 - Tela observada durante a aquisição do sinal analítico.	26
Figura 18 - Reação quimiluminescente luminol-hipoclorito em meio alcalino. Adaptado de Oliveira et al. (2009).....	29
Figura 19 - Diagrama esquemático do funcionamento do ensaio preliminar. Micro bombas piezoelétricas (P1, P2 e P3), célula de fluxo (FC) e descarte.....	29
Figura 20 - Diagrama do sistema com três micro bombas. Bombas (P1, P2 e P3), S1 - padrão ou padrão e amostra, S2 - solução carregadora (tampão ou água), S3 - luminol 0,2 mmol L ⁻¹ em CO ₃ ²⁻ 0,05 mol L ⁻¹ , RC - bobina de reação, CFC - célula de fluxo para quimiluminescência, W – descarte.	31
Figura 21 - Diagrama do sistema com quatro micro bombas. Bombas (P1, P2, P3 e P4), S1 - padrão, S2 - amostra, S3 - solução carregadora (água), S4 - luminol 0,2 mmol L ⁻¹ em CO ₃ ²⁻ 0,05 mol L ⁻¹ , RC - bobina de reação, CFC - célula de fluxo para quimiluminescência, W – descarte.....	31
Figura 22 - Reação paracetamol-hipoclorito. Adaptado de OLIVEIRA et al. (2009).....	33
Figura 23 - Diagrama adquirido para concentrações de hipoclorito entre (0,033 a 0,165 % (m/v)).....	34
Figura 24 - Curva analítica do sinal do componente B em função da concentração de hipoclorito.	34
Figura 25 - Diagrama adquirido para solução padrão de hipoclorito 1 % e 0,1 % (m/v) com diferentes soluções carregadoras. (a) solução tampão CO ₃ ²⁻ 0,05 mol L ⁻¹ e (b) água destilada.	35
Figura 26 - Diagrama adquirido para solução de paracetamol 100,0 mgL ⁻¹ com diferentes concentrações de hipoclorito. (a) hipoclorito 1 % (m/v) e (b) hipoclorito 0,1 % (m/v).	36
Figura 27 - Diagrama adquirido para soluções padrão de paracetamol (5,0 a 100,0 mg L ⁻¹)..	37

Figura 28 - Curva analítica construída para a faixa linear da soluções padrão de paracetamol com concentrações de 10,0 a 50,0 mg L ⁻¹ . *Δh - diferença entre a média de altura dos picos para o sinal do branco e a altura dos picos para os padrões/amostras.	37
Figura 29 - Diagrama adquirido para padrões e amostras de paracetamol.	39
Figura 30 - Curva analítica construída para a faixa linear soluções padrão de paracetamol com concentrações de 2,57 a 10,28 mg L ⁻¹ . *Δh - diferença entre a média de altura dos picos para o sinal do branco e a altura dos picos para os padrões/amostras.	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	MINIATURIZAÇÃO DE SISTEMAS ANALÍTICOS.....	12
2.1.1	Fabricação de microssistemas para análises.....	13
2.2	IMAGENS DIGITAIS COMO ESTRATÉGIA DE DETECÇÃO	13
2.3	QUIMILUMINESCÊNCIA	15
2.4	PARACETAMOL	16
3	OBJETIVOS.....	18
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	CONSTRUÇÃO DO MICROSSISTEMA	19
4.1.1	Montagem do aparato para medidas	22
4.1.2	Aplicativo microFIA.....	24
4.2	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	27
4.2.1	Soluções estoque.....	27
4.2.2	Soluções de trabalho	27
4.2.3	Preparo das amostras	28
4.3	ENSAIO PRELIMINAR.....	29
4.4	PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE	30
4.4.1	Estudos com três micro bombas	30
4.4.2	Estudos com quatro micro bombas.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1	RESULTADOS PRELIMINARES	33
5.2	ESTUDOS UTILIZANDO O SISTEMA COM TRÊS BOMBAS	35
5.2.1	Efeito da solução carregadora	35
5.2.2	Efeito da concentração de hipoclorito	35
5.2.3	Reação paracetamol-hipoclorito fora do sistema	36
5.3	ESTUDOS UTILIZANDO O SISTEMA COM QUATRO BOMBAS	38
5.3.1	Determinação da concentração de análise.....	38
5.3.2	Determinação de paracetamol em medicamentos	38
6	CONCLUSÃO.....	43

1 INTRODUÇÃO

O paracetamol ou acetaminofeno (Figura 1) é um fármaco que apresenta ações analgésicas e antipiréticas muito popular, indicado para tratar febre e dores leves e moderadas em adultos e crianças, sendo uma alternativa a aspirina embora não apresente atividade anti-inflamatória.

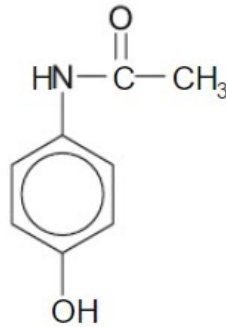


Figura 1 - Fórmula estrutural do paracetamol (N-(4-hidroxifenil)etanamida). Adaptado de Bertolini et al. (2006)

Existem na literatura variados métodos descritos para determinação de paracetamol em sua forma pura ou em formulações combinado com outras substâncias, entre eles tem-se: métodos espectrofotométricos UV / Vis, análise por injeção em fluxo, infravermelho próximo e FTIR (do inglês: *Fourier transform infrared*); e também métodos volumétricos, espectrofotométrico, fluorimétrico, cromatográficos, e de quimiluminescência (Bosch et al., 2006; Aniceto e Fatibello-Filho, 2002).

A Farmacopeia é o documento que estabelece os parâmetros de aceitabilidade e exigências mínimas de qualidade, autenticidade e pureza de insumos farmacêuticos, medicamentos e outros produtos disponibilizados à população, servindo de alicerce para as ações de controle e fiscalização sanitária, no Brasil ela é elaborada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Se tratando da determinação de paracetamol em amostras medicamentos, a Farmacopeia Brasileira estabelece três métodos: a espectrofotometria de absorção nas regiões do UV ou infravermelho e a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) (ANVISA, 2019).

Mesmo com as vantagens em utilizar esses métodos, eles apresentam algumas desvantagens, como o elevado valor da instrumentação, e se tratando da cromatografia o longo tempo de análise. Deste modo, os pesquisadores têm procurado novos procedimentos

para determinação desse fármaco, com análises mais rápidas e mais baratas, como os que empregam quimiluminescência e análise por injeção em fluxo.

Oliveira et al. (2009), propôs um método para determinação de paracetamol baseado na inibição da quimiluminescência, trata-se de uma quantificação indireta onde o fármaco atua inibindo o sinal da reação luminol-hipoclorito. Isso ocorre porque o paracetamol contido na amostra reage com o hipoclorito, fazendo com que haja redução deste oxidante para reagir com o luminol, desse modo o sinal quimiluminescente diminui e pode ser observado que essa redução é inversamente proporcional a concentração de paracetamol na amostra. Assim como Oliveira et al. (2009), Moura et al. (2018) também realizou essa determinação, porém utilizando estratégias de detecção diferentes.

Neste trabalho de conclusão de curso, foi proposto e avaliado um microsistema de análise por injeção em fluxo (μ FIA) com detecção por imagens digitais totalmente controlado por um smartphone, na determinação de paracetamol em medicamentos baseado na reação proposta por Oliveira et al. (2009). A utilização desse sistema apresenta muitas vantagens que incluem, pequeno tempo de análise, boa frequência analítica que é o número de injeções processadas em determinado período, pouco consumo de reagentes, baixa produção de resíduos, além da praticidade dos sistemas em miniatura em um procedimento automatizado e portátil.

O uso de um μ FIA envolve algumas etapas que vão além da fabricação dos canais (Coltro et al., 2007). A escolha dos mecanismos de bombeamento das soluções e de detecção do analito, são de suma importância. Idealmente, o microsistema deve integrar todas as etapas que envolvem a análise, todavia não é incomum deparar-se na literatura com microdispositivos de análise no qual os sistemas de detecção e de propulsão dos fluidos ocupam um volume muito superior à parte microfluídica, o que limita grandemente a miniaturização do sistema de análise como um todo. Nesse sentido, o sistema fluídico utilizado na presente proposta faz uso de minibombas piezoelétricas e detecção por imagem digital, com controle das bombas e aquisição do sinal analítico totalmente controlado por um smartphone através de um aplicativo dedicado, resultando em um sistema verdadeiramente miniaturizado, portátil e prático.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MINIATURIZAÇÃO DE SISTEMAS ANALÍTICOS

Nos últimos tempos foi demonstrado grande interesse na miniaturização em diversas ramificações na comunidade científica, não podendo ser diferente com a Química Analítica, onde tem se visto mais estudos acerca da miniaturização de sistemas para análise. Nos anos de 1960 a microeletrônica e a informática tiveram um avanço significativo com diminuição do volume dos dispositivos eletrônicos, possibilitando um grande progresso da tecnologia moderna tornando a miniaturização parte do cotidiano (Coltro et al., 2007).

O principal interesse da Química Analítica inicialmente era amplificar o desempenho analítico, mas logo percebeu-se que haviam outras vantagens na miniaturização como a redução de gastos com o processo de fabricação e também do tempo empregado nas análises (Coltro et al., 2007). O primeiro microssistema analítico foi construído nos anos de 1970, era um microcromatógrafo gasoso que foi construído em uma base circular de silício e utilizava um detector de condutividade térmica (Sampaio, 2013). Mesmo apresentando bom desempenho, a ideia não foi inicialmente aceita na comunidade científica.

A ideia ganhou força em 1990, quando Manz et al. propôs o conceito de microssistemas para análises totais, ou μ TAS (do inglês *micro total analytical systems*). Trata-se de um sistema diminuto e automatizado capaz de integrar todos os estágios de uma análise química, da inclusão da amostra até a detecção do analito (Manz et al., 1990; Coltro et al., 2007). A ideia do μ TAS é executar todos os estágios da análise incluindo diversas estruturas, como um chip, motivo pelo qual é também chamado de “laboratório em um chip” (LOC, do inglês *lab on a chip*).

Um μ TAS envolve além dos canais fabricados em escala reduzida, diversos outros componentes os quais devem ser idealmente miniaturizados, como dispositivos para manipulação dos fluidos nos canais, para a inclusão da amostra e detecção do analito. À vista disso, para a Química Analítica faz-se muito interessante conciliar os dispositivos miniaturizados com a análise em fluxo (FIA, do inglês *flow injection analysis*), caracterizando um microssistema de análise por injeção em fluxo (Moura et al., 2018). No sistema FIA consegue-se inserir as amostras de modo reprodutível em um fluxo contínuo. Assim, após ocorrerem as reações, as soluções são carreadas a um detector para registro da resposta, apresentando sinal em forma de pico (transiente), onde a altura relaciona-se com a concentração do analito (Sampaio, 2013).

O uso do μ FIA pode ser muito vantajoso pois apresenta portabilidade, automação, redução do consumo de reagentes e da produção de resíduos, e análises com tempo significativamente menores que os métodos de bancada. No entanto, algumas questões devem ser observadas, como a dificuldade na implantação de um meio de detecção em dimensões reduzidas, formação de bolhas nos canais e até entupimento.

2.1.1 Fabricação de microssistemas para análises

A fabricação dos microssistemas envolve basicamente duas etapas: primeiro a gravação dos canais no substrato seguida pela selagem, na qual pode ser utilizado o mesmo substrato ou outro.

Inicialmente utilizavam-se como substratos o silício, quartzo e vidro e as chamadas tecnologias convencionais de micro fabricação, onde se faz necessário a utilização de uma fonte energética para transferir os canais para o substrato. As técnicas mais utilizadas são: a litografia por raios-X, a litografia com radiação ultravioleta (UV), a litografia “soft” e a litografia por feixe de elétrons. A grande questão torna-se o custo e a implementação dessas técnicas nos laboratórios convencionais, visto que elas exigem um ambiente extremamente limpo, bem como uma estação fotolitográfica entre outros equipamentos, tornando o processo muito oneroso (Coltro et al., 2007).

Com isso, tem se buscado tecnologias alternativas, que tornem o processo mais economicamente viável. Já existem diversas técnicas descritas para a micro fabricação como: impressão direta, ablação a laser, toner-poliéster, micro fabricação por moldagem, entre outras (Coltro et al., 2007). Outros substratos também vêm sendo utilizados, tendo os polímeros mostrado grande potencial, dentre eles se destacam: o polimetilmetacrilato (PMMA), o policloreto de vinila (PVC), o policarbonato (PC), o poliuretano (PU), o polidimetilsiloxano (PDMS), o uretana-acrilato (UA) e o poliestireno (PE) (Sampaio, 2013). Neste trabalho foi empregado o PMMA, que possui atrativas propriedades químicas com excelente transparência óptica e é facilmente obtido com custo baixo, além disso utilizamos a técnica de ablação a laser para gravação dos canais, com laser de baixa potência, o qual pode ser adquirido atualmente por valores acessíveis, por volta R\$ 1.500.

2.2 IMAGENS DIGITAIS COMO ESTRATÉGIA DE DETECÇÃO

A utilização de imagens digitais para análises químicas como alternativa aos instrumentos utilizados para realização de medidas ópticas vem aumentando grandemente nos

últimos anos. Fazendo uso de imagens capturadas em dispositivos como: câmeras de smartphones, webcams, câmeras digitais, microscópios ópticos portáteis e scanners de mesa ou bancada (Souza et al., 2014), é possível efetuar determinações analíticas quantitativas e qualitativas com bom desempenho.

As imagens digitais são compostas por pequenas unidades, denominadas pixels, as quais apresentam cores normalmente definidas pelo sistema RGB. Nesse sistema, as cores são formadas pela combinação de três canais: R (*red*, vermelho), G (*green*, verde), e B (*blue*, azul), onde cada cor pode ser decomposta em matrizes de dados de 8 bits, e suas componentes variam como índices inteiros em uma faixa de intensidade entre 0 e 255, isso permite uma combinação de 256^3 tonalidades em cada pixel e possibilita a diferenciação das cores pela intensidade de cada componente. No sistema RGB um tom de uma cor representa um ponto no espaço tridimensional formado pelos três eixos R, G e B como mostrado na Figura 2 (Godinho et al., 2008).

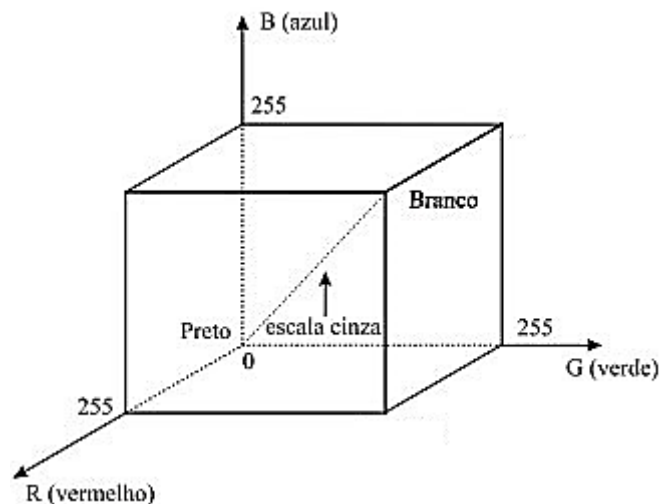


Figura 2 - Cubo de cores RGB (R: vermelho; G: verde; B: azul). Adaptado de Godinho et al. (2008)

Na literatura encontram-se várias aplicações da detecção colorimétrica mediante o uso de imagens digitais, devido a facilidade, baixo custo, além da possibilidade de monitoramento contínuo do sistema em análise.

Souza et al. (2014) utilizaram a captura de imagens digitais para detecção colorimétrica em microzonas impressas e também para a determinação de Fe^{2+} em medicamentos. Para detecção dos íons foi utilizado um scanner de uma impressora multifuncional, as imagens foram adquiridas nos canais RGB e CMYK (ciano, magenta, amarelo e preto). Quando comparado aos resultados com o método de referência (espectrofotometria na região do visível) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

De Paula e Lima (2014) analisaram amostras de corantes utilizando uma câmera de celular e o software ImageJ para separação das matrizes dos canais RGB, obtendo gráficos de absorvância muito semelhantes aos obtidos com espectrofotômetro. Godinho et al. (2008) realizaram a classificação de refrigerantes utilizando um scanner de mesa para obtenção das imagens digitais e lidas no programa Scilab, conseguindo classificar diferentes marcas da bebida com o mesmo tipo, sabor e categoria.

Embora as aplicações de imagens digitais na química analítica tenham crescido, ainda são muito limitados os usos em microssistemas de análise ou para detecção de reações quimiluminescentes, visto que uma aquisição em tempo real deve ser realizada para o registro do sinal.

2.3 QUIMILUMINESCÊNCIA

Segundo Ferreira e Rossi (2002) a quimiluminescência pode ser entendida como a emissão de radiação eletromagnética produzida por uma reação química. Quando isso ocorre em sistemas vivos é chamada de bioluminescência.

Radziszewski em 1877 produziu o primeiro composto sintético quimiluminescente, a lofina (2,4,5 - trifenilimidazol) que em contato com oxigênio produz uma luz verde. No entanto, a definição de quimiluminescência veio apenas em 1888, segundo Ferreira e Rossi (2002) Wiedemann definiu-a como “a emissão de luz que ocorre junto a processos químicos”, fazendo a distinção entre a luminescência e a incandescência, um processo físico e não químico no qual a emissão da luz se dá por aumento de temperatura. A luminescência foi definida em seis tipos: fotoluminescência, eletroluminescência, termoluminescência, triboluminescência, cristaloluminescência e quimiluminescência (Bartoloni et al., 2011).

Na literatura encontram-se diversos compostos utilizados como substratos para reações quimiluminescentes, sendo um dos mais amplamente estudados o luminol. Em 1928, Albrecht descreveu a primeira reação quimiluminescente com luminol, sua oxidação por H_2O_2 em meio alcalino. Desde então houveram diversos estudos apresentando mecanismos para reação e algumas etapas já são bem conhecidas, no entanto como em grande parte das reações quimiluminescentes existem aspectos ainda não bem esclarecidos, principalmente no tocante a formação dos estados excitados (Ferreira e Rossi, 2002).

Reações quimiluminescentes apresentam um estado excitado, que ocorre com a absorção de energia pelos reagentes, e pode ocorrer em fase sólida, líquida ou gasosa. Quando a espécie excitada retorna ao estado fundamental, há liberação do excesso de energia que ocorre na forma de radiação eletromagnética. A radiação pode ser liberada de maneira direta, quando a espécie excitada também é emissiva, ou de maneira indireta, quando a espécie excitada

transfere sua energia para uma outra molécula e está emitindo a radiação (Ferreira e Rossi, 2002). De modo geral todas as reações quimiluminescentes são exotérmicas, embora nem todas as reações exotérmicas sejam quimiluminescentes (Bartoloni et al., 2011).

Reações quimiluminescentes têm sido empregadas na Química Analítica, por proporcionar excelentes limites de detecção, emprego de instrumentação simples, além de não ser necessário o uso de fonte de radiação. No entanto pequenas variações nas condições reacionais como: temperatura, pH, cinética da reação, concentração e até mesmo o modo como os reagentes são misturados, interferem na quimiluminescência. Essas reações exigem rigoroso controle de tempo e alto índice de reprodutibilidade, pois interferem diretamente na variação de intensidade e nas medidas. Desse modo, a utilização de sistemas FIA trazem grandes vantagens, obtendo-se alta sensibilidade para determinação de diversas amostras.

2.4 PARACETAMOL

O paracetamol ou acetaminofeno possui propriedades analgésicas e antipiréticas, e tem sido amplamente utilizado para dores leves e moderadas a mais de 40 anos. A acetanilida, derivada da anilina, foi introduzida em 1866 para tratamento de febre graças às suas propriedades antipiréticas, no entanto mostrou-se tóxico e com isso voltou-se a atenção para outros derivados da anilina, o paracetamol e a fenacetina (Meredith e Goulding, 1980).

O paracetamol foi inicialmente sintetizado por Harmon Northrop Morse em 1878, e inserido clinicamente por von Mering em 1887, entretanto seu uso foi prontamente descartado dando lugar a fenacetina (Bertolini et al., 2006). Mais tarde foi descoberto que a fenacetina também possui efeitos adversos que inclui anemia hemolítica e formação de metahemoglobina (hemoglobina incapaz de transportar oxigênio) (Aniceto e Fatibello-Filho, 2002). Em 1948 foi demonstrado por Brodie e Axelrod que a ação analgésica e antipirética da acetanilida e da fenacetina era devido ao seu metabólito, o paracetamol, e que a toxicidade destes compostos era produzida por outro metabólito, a fenil-hidroxilamina (Bertolini et al., 2006).

Após ser “redescoberto” o paracetamol passou a ser comercializado em meados de 1950 e em 1956 foi introduzido no Reino Unido tornando-se muito popular, sendo mais vendido que a aspirina desde 1980. Na América foi comercializado inicialmente em 1950, contudo devido a algumas queixas foi recolhido em 1951, voltando a ser vendido com receita no ano seguinte. Desde 1955 está disponível sem prescrição médica (Bertolini et al., 2006; Meredith e Goulding, 1980).

O paracetamol apresenta propriedades muito similares às da aspirina, entretanto não apresenta ação anti-inflamatória significativa. Apresenta potente ação inibitória sob a prostaglandina sintetase, razão pela qual acredita-se que advenham seus efeitos analgésicos. Quando ministrado em doses terapêuticas é metabolizada rápida e completamente, sendo incomum efeitos colaterais. Entretanto, doses mais altas produzem metabólitos tóxicos e acumulação podendo ocorrer overdose e envenenamento, causando também problemas hepáticos e insuficiência renal (Bosch et al., 2006). Bem como os AINEs (anti-inflamatórios não esteroides) e de maneira oposta aos analgésicos do tipo opióides, o paracetamol não causa euforia ou alteração do humor, além de não apresentar risco de vício, dependência ou efeito depressivo (Castro, 2014).

O paracetamol quimicamente chamado de N-(4-hidroxifenil)etanamida, apresenta-se como um pó branco, cristalino e sem cheiro. É ligeiramente solúvel em água, solúvel em água fervente, facilmente solúvel em álcool etílico, solúvel em hidróxido de sódio e apresenta intervalo de fusão entre 168 °C a 172 °C.^[3] Sua fórmula molecular é $C_8H_9NO_2$ cujo a massa molar é de 151,16 g mol⁻¹. A fórmula estrutural foi indicada na Figura 1. Sua síntese ocorre pela acetilação do p-aminofenol com ácido acético glacial e anidrido acético (Korolkovas e Burckhalter, 1988).

3 OBJETIVOS

Este projeto tem como proposta realizar um estudo acerca da aplicabilidade de um sistema de análise miniaturizado controlado por smartphone, para a determinação quimiluminométrica de paracetamol em medicamentos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o uso de um microssistema fabricado em polimetilmetacrilato (PMMA) para determinações quimiluminescentes;
- Verificar o potencial de detecção para medidas quimiluminescentes em um μ FIA, baseada no uso de imagens digitais;
- Determinar paracetamol em medicamentos com base na inibição do sinal da quimiluminescência na reação luminol-hipoclorito;
- Verificar o desempenho para determinações quantitativas em um μ FIA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSTRUÇÃO DO MICROSSISTEMA

O microssistema analisado no presente trabalho de conclusão de curso foi construído em PMMA empregando a técnica de ablação a laser para gravação dos canais. Essa técnica consiste na incidência de um laser sobre o substrato promovendo foto e termodegradação. A elaboração do sistema é dividida basicamente em duas etapas: gravação e selagem, e estas serão detalhadas a seguir.

Primeira etapa: Gravação dos canais no substrato

O processo começa com o desenvolvimento do *layout* dos canais, que foi efetuado utilizando o programa AutoCad (Figura 3). Posteriormente o *layout* é transferido para o *software LightBurn 8.01* onde é realizada a gravação a laser. A velocidade empregada durante a ablação é o que determina a profundidade dos canais, além disso outros fatores como potência, taxa de pulsação e tempo de exposição também podem interferir (Coltro et al., 2007). Neste caso as cavidades em vermelho na Figura 3 foram gravadas no modo *scan*, de forma que houve ablação de todo o interior da forma e do contorno, empregando uma velocidade de 300 mm/min. Os canais em preto foram gravados no modo *cut*, onde houve ablação apenas do contorno e a velocidade empregada foi de 40 mm/min. As velocidades empregadas para gravação dos canais foram previamente avaliadas com o objetivo de determinar aquela que forneceria a profundidade apropriada para o propósito do estudo, sem que houvesse perfuração da placa.

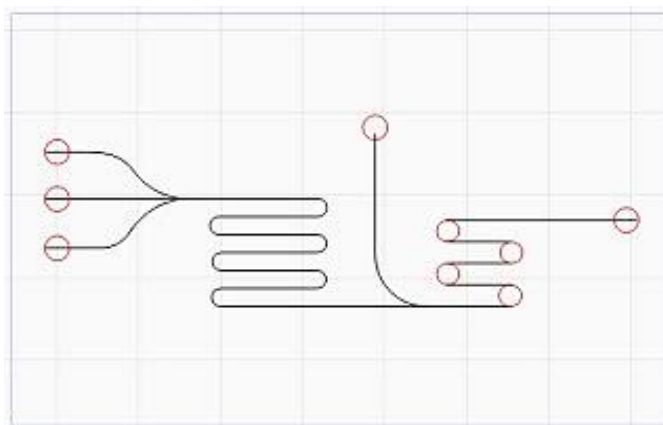


Figura 3 - Layout dos canais a serem gravados no substrato

O substrato utilizado foi uma placa de PMMA com dimensões de 8,0 x 5,0 cm, na cor vermelha. Essa cor foi escolhida pois proporciona a absorção da radiação pelo material, posto que para ablação foi utilizado um laser de diodo de baixa potência que emite radiação azul, caso

o material não fosse capaz de absorver essa radiação, como seria com uma placa transparente, o laser não causaria o aquecimento necessário da placa nas regiões pré-determinadas e não seria possível efetuar a gravação dos canais.

Segunda etapa: Selagem

Após o processo de ablação, pode-se observar pequenas irregularidades ao longo dos canais na superfície da placa, como na Figura 4a, isso dificulta a etapa de selagem, desse modo é necessário realizar o polimento da placa. O polimento é realizado inicialmente com uma lixa grão 280, seguida por uma lixa grão 400 e um lixa grão 600. Posteriormente com a ajuda de um algodão aplica-se uma suspensão polidora (Kaol®) para finalizar o polimento e obter uma superfície regular como pode ser visto na Figura 4b.

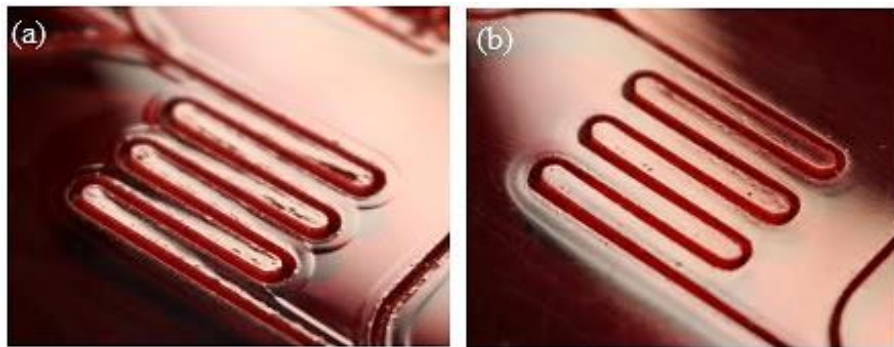


Figura 4 - Placa de PMMA (a) antes do polimento e (b) após o polimento

Após a ablação e o polimento a placa é perfurada nas cavidades 1, 2, 3 e 4 para introdução das soluções no microsistema e na cavidade 5 para a saída (Figura 5). Os furos são feitos com uma broca e possuem 1,5 mm de diâmetro.

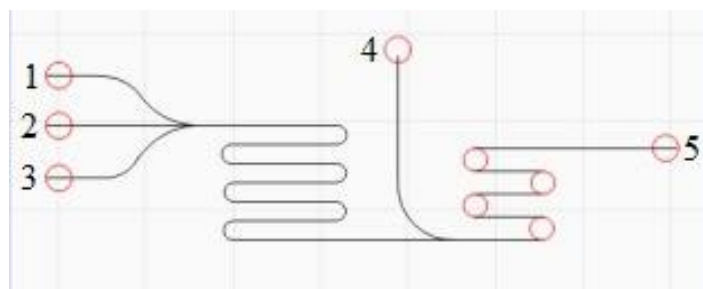


Figura 5 - Esquema das cavidades de entrada e saída das soluções no microsistema.

Nesse microsistema é realizada uma selagem térmica, na qual utiliza-se como cobertura uma placa transparente de PMMA cuja espessura é de 2 mm. Essa placa é posicionada junto à placa gravada, e ambas são colocadas entre duas placas de vidro e pressionadas por uma morsa

(Figura 6). Essa montagem é levada a estufa para aquecimento das placas a uma temperatura de 140 °C cerca de 40 min, de modo a promover a selagem dos canais (Figura 7).

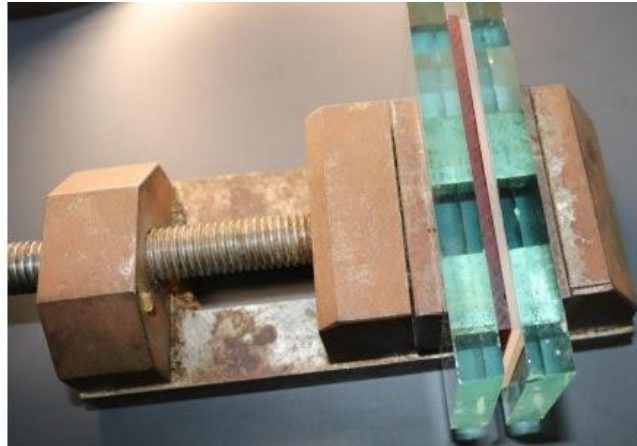


Figura 6 - Morsa abarcando duas placas de vidro, o substrato e a cobertura para a selagem.

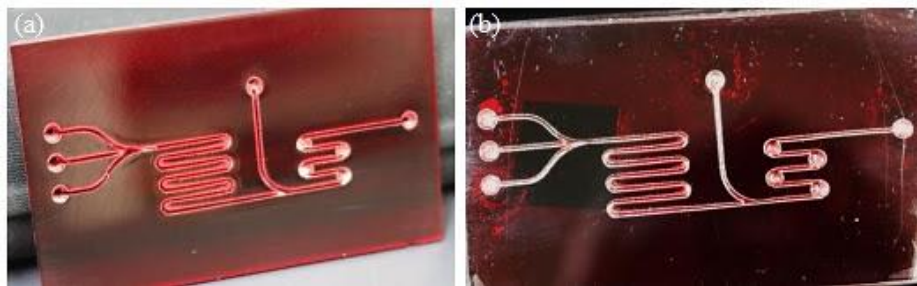


Figura 7 - Placas de PMMA (a) antes da selagem e (b) depois da selagem.

Seguidamente à selagem foram feitas as conexões nas cavidades previamente perfuradas, para tanto foram utilizadas agulhas hipodérmicas cujo diâmetro externo é de 1,6 mm, ajustando-as cuidadosamente nas perfurações de 1,5 mm de diâmetro de modo que a junção fosse bem ajustada. Junto às agulhas também foram inseridos tubos de Tygon®, que foram colados na parte externa da placa com a cola instantânea, processo realizado para evitar vazamentos (Figura 8).



Figura 8 - Conexão da agulha na cavidade da placa.

4.1.1 Montagem do aparato para medidas

O aparato de análise completo conta com o micro sistema, as micro bombas piezoelétricas, os circuitos eletrônicos, a fonte de alimentação e o dispositivo de detecção (smartphone), todos acondicionados em uma estrutura suporte construída com filamentos de ácido polilático (PLA) em uma impressora 3D (Cliever – CL1 Black). A estrutura conta com três seções e possui dimensões de 14 cm de comprimento, 13 cm de largura e 9 cm de altura (Figura 9).



Figura 9 - Dimensões da estrutura suporte para acomodação do sistema de análise.

Na primeira seção a estrutura conta com um apoio para o smartphone (Samsung J5 pró), uma janela para aquisição das medidas via câmera do smartphone, além de quatro compartimentos onde são colocados os recipientes contendo as soluções (Figura 10). A estrutura de apoio do celular é uma espécie de tampa que é utilizada também para impedir a entrada de luminosidade no sistema durante as medidas, nela possuem duas perfurações para fixação e alinhamento do celular feita por dois pinos adicionados na parte de trás do mesmo (Figura 11). Vale ressaltar que esta estrutura foi desenhada para smartphones desse modelo, embora a detecção possa ser efetuada com outros modelos também.



Figura 10 - Seção superior da estrutura suporte.

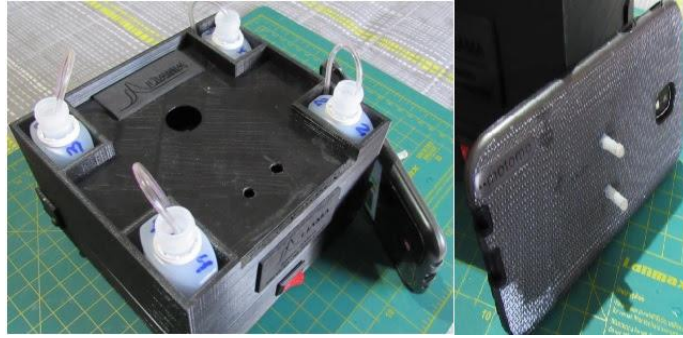


Figura 11 - Esquema de fixação do smartphone para a realização das medidas.

Na segunda seção está acomodado o microssistema, ele é fixado à estrutura por fita dupla-face (3M VHB) e, as conexões dos canais com as bombas é feita na parte inferior do microssistema (Figura 12).

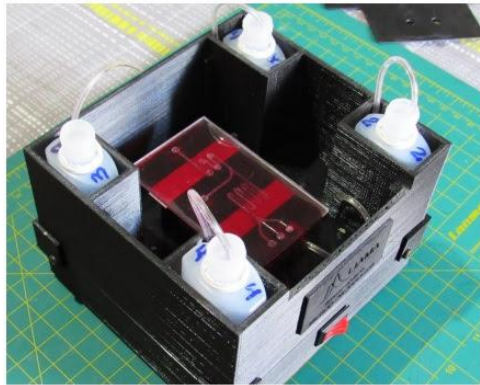


Figura 12 - Seção dois utilizada para acomodação do microssistema.

Na terceira seção, são acondicionados os circuitos eletrônicos e as micro bombas para o funcionamento do microssistema. Na Figura 13 vemos: um dispositivo HC-05 para conexão via *bluetooth* (1), um driver da bomba (2), um controlador Arduino Nano (3), uma bateria 9V cuja autonomia é de 2h (4), além de quatro micro bombas piezoelétricas (P1, P2, P3 e P4) e tubos Tygon® (5) que conectam as micro bombas aos recipientes contendo as soluções.

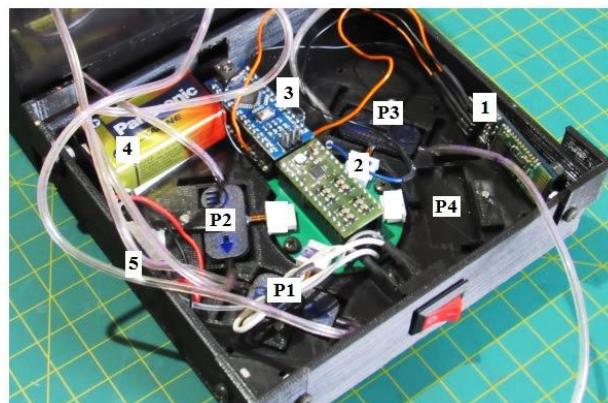


Figura 13 - Seção três utilizada para acomodação dos circuitos eletrônicos.

O dispositivo HC-05 faz a comunicação do smartphone com o Arduino Nano e este se comunica com o driver da bomba permitindo o controle individual de P1, P2, P3 e P4. Vale ressaltar que inicialmente foram utilizadas apenas três micro bombas, mas posteriormente utilizou-se as quatro micro bombas disponíveis. Todo o sistema incluindo a bateria e o smartphone pesa 600 g e cabe na palma da mão, provando-se ser um sistema verdadeiramente miniaturizado e portátil.

4.1.2 Aplicativo microFIA

O microssistema proposto e avaliado no presente estudo é inteiramente controlado por um smartphone por meio de um aplicativo chamado microFIA (Figura 14). Através deste aplicativo é realizado o acionamento das micro bombas piezoelétricas para propulsão das soluções de trabalho, além da aquisição dos dados para detecção do analito por imagem digital (Sistema RGB).



Figura 14 - Ícone do aplicativo microFIA.

Para utilizar o aplicativo primeiro deve-se clicar no ícone (microFIA) na seção de aplicativos do celular, ele vai abrir em uma tela inicial (Figura 15) onde o usuário deve selecionar a opção HC-05 para parrear o smartphone ao sistema de análise. Feito isso, uma outra tela será aberta (Figura 16) onde deve-se clicar no botão *pumps on*, para acionamento de todas as bombas simultaneamente, de modo que as soluções preenchem os canais para o condicionamento do sistema. No canto superior esquerdo da tela é possível visualizar a imagem da resposta quimiluminescente na célula de fluxo, devido a inserção de reagente (luminol) e analito (hipoclorito) no sistema. Para melhorar a sensibilidade à intensidade da luminescência produzida é possível ajustar três parâmetros de imagem, o equilíbrio de branco (AWB), os níveis de exposição (EXP) e a sensibilidade à luz (ISO), iniciando sempre com o equilíbrio de branco pois sempre que ele for ajustado é necessário ajustar também os outros dois parâmetros. Esses ajustes são feitos através de controles deslizantes situados no canto superior direito da tela onde também é possível ajustar os tamanhos dos amostradores de RGB (SSW), círculos coloridos na Figura 16 que delimitam os pixels que serão utilizados para captação dos sinais.

Os amostradores podem ser posicionados conforme a escolha do usuário, sendo recomendado posicioná-los nos pontos em que a luminescência esteja mais intensa, aumentando a sensibilidade das medidas. O sistema faz a leitura de R, G e B de cada amostrador e o sinal analítico é gerado, sendo este a soma da média do sinal dos seis amostradores. Após realização dos ajustes o as bombas são desligadas pressionando o botão *pumps off*.



Figura 15 - Tela inicial do aplicativo microFIA.

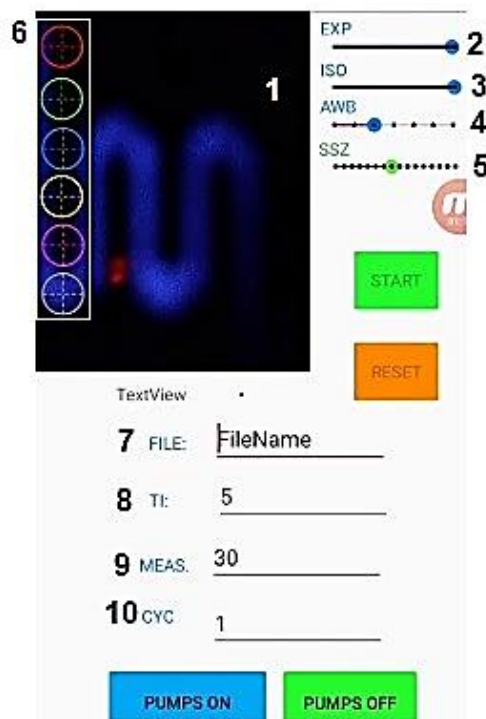


Figura 16 - Tela de ajustes. (1) Tela de detecção em tempo real, (2) controle de exposição, (3) controle de sensibilidade a luz, (4) controle de branco, (5) controle de ajuste do tamanho dos amostradores, (6) amostradores RGB, (7) nome do arquivo, (8) número de injeções por segundo, (9) número de medidas, (10) número de ciclos, botões para condicionamento do sistema “*pumps on*” e “*pumps off*”, iniciar e finalizar medidas “*start*” e “*reset*”.

Antes de iniciar as medidas é necessário definir um nome para o arquivo que será gerado, o tempo de injeção em segundos, o número de medidas a serem executadas e a quantidade de ciclos de medidas. Esses parâmetros são definidos nos campos “FILE”, “TI”,

“MEAS” e “CYC” respectivamente. A injeção das soluções das amostras ou padrões é realizada de maneira direta e o tempo de injeção ajustado define o volume a ser injetado no microssistema. O número de medidas indica o número de aquisições do sinal a serem realizadas, em intervalos de 0,3 s, para adquirir um pico. O número de ciclos indica quantos picos serão obtidos para a mesma amostra, de modo que quando definimos quatro ciclos vamos ter ao final da medida quatro picos. Vale pontuar que a primeira injeção de cada ciclo de medidas é realizada com um tempo maior (30 s), assim garantimos que seja realizada a ambientação da linha que liga o reservatório de soluções de amostra/padrão ao microssistema quando realizada a troca dessas soluções. Em outras palavras, ajustando a opção “CYC” em 4 unidades, significa que serão gerados quatro picos, mas o primeiro pico não deve ser utilizado como um sinal analítico pois refere-se a um pico de condicionamento.

Concluídas todas as etapas de ajuste pode-se dar início às medidas. Clicando no botão “start” o aplicativo passa a exibir uma nova tela (Figura 17), onde é possível ver a formação dos picos referentes a resposta analítica em tempo real. Os picos apresentam três linhas, onde cada uma delas representa o sinal de uma componente na escala RGB, sendo a vermelha para a componente R, verde para a componente G e ciano para a componente B.

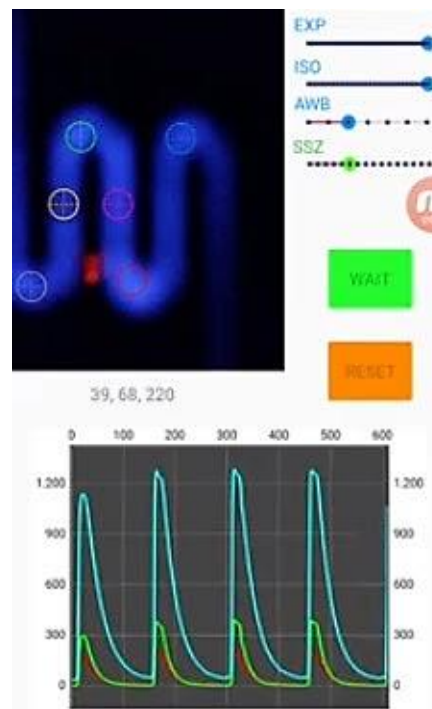


Figura 17 - Tela observada durante a aquisição do sinal analítico.

Ao final de um ciclo o aplicativo emite um sinal sonoro que indica ao analista que a amostra/padrão pode ser trocada. Feito isso aciona-se novamente o “start” e tem-se início a

aquisição do sinal para um novo ciclo. Quando todas as amostras tiverem sido analisadas basta acionar “reset” para finalizar as medidas, com isso um arquivo em formato .txt é gerado, contendo o número da medida e as respostas sinais individuais para as somas de R, G e B nos amostradores de sinal. Este arquivo é armazenado em uma pasta interna no smartphone, sendo necessário o uso de um software externo para manipulação dos dados. Caso o analista queira realizar novas medidas basta adicionar um novo nome para o arquivo e acionar “start”, sem que haja necessidade de configurar todos os parâmetros novamente.

4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções que foram utilizadas na etapa experimental foram prontadas com água purificada por osmose reversa, e grande parte com reagentes de grau analítico. A descrição específica do preparo de cada uma será feita a seguir.

4.2.1 Soluções estoque

Partindo do reagente NaClO (Dinâmica, solução 10% (m/v)) foram preparadas duas soluções de NaClO nas concentrações 1,0% (m/v) e 0,1% (m/v), diluindo o volume adequado de reagente em água. Foi preparada uma solução de paracetamol 1028,0 mg L⁻¹ dissolvendo em água a massa adequada do reagente (Sigma-Aldrich).

4.2.2 Soluções de trabalho

Uma solução de NaOH com concentração 0,4 mol L⁻¹ foi preparada pela dissolução em água da quantidade adequada de reagente NaOH (Sigma-Aldrich, pureza 97%). A solução de luminol com concentração de 16,93 mmol L⁻¹ foi preparada dissolvendo a massa adequada do reagente (Aldrich, pureza de 99%) em uma solução de NaOH 0,4 mol L⁻¹.

Soluções padrão de OCl⁻ em cinco diferentes concentrações na faixa de 0,033 a 0,165% (m/v), foram preparadas pela dissolução de NaClO (Dinâmica, solução 10% (m/v)) em água.

Uma solução tampão de carbonato na concentração de 0,05 mol L⁻¹ e pH 11, foi preparada pela dissolução da massa apropriada de K₂CO₃ (Carlo Erba) em água. O ajuste do pH foi realizado com a ajuda de um pHmetro adicionando ao tampão pequenas quantidades de uma solução concentrada de HCl (Quimex, solução 37 % (m/v)), então o volume final da solução foi ajustado.

Uma solução de luminol (3-aminoftalohidrazida) com concentração de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, foi preparada dissolvendo a massa adequada do reagente (Aldrich, pureza de 99%) com a solução tampão de carbonato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 11. Para acelerar o processo, a mistura foi levada para o banho ultrassônico até que todo reagente tivesse sido solubilizado.

Para a curva analítica foram preparadas onze soluções padrão de paracetamol, utilizando balões de 25 mL e uma solução de OCl^- 0,12% (m/v), foram adicionados em cada balão, individualmente, volumes adequados de hipoclorito e da solução estoque de paracetamol $1028,0 \text{ mg L}^{-1}$ obtendo-se soluções padrão cujo a concentração do analito está na faixa de 5,0 a $100,0 \text{ mg L}^{-1}$. A solução de referência foi elaborada com a mesma concentração de OCl^- 0,12% (m/v) em água.

Outras cinco soluções padrão de paracetamol foram preparadas adicionando em água volumes adequados da solução estoque de paracetamol $1028,0 \text{ mg L}^{-1}$, obtendo soluções cujo a faixa de concentração varia de 2,5 à 15 mg L^{-1} .

4.2.3 Preparo das amostras

Na determinação de paracetamol em medicamentos foram analisadas seis amostras comerciais, adquiridas em farmácias locais. Apesar de encontramos paracetamol em diferentes formulações, todas as amostras analisadas foram obtidas em comprimido nomeadas como M1 a M6. A Tabela 1 mostra a concentração do fármaco no rótulo de cada medicamento segundo o fabricante.

Tabela 1 - Amostras e dosagem de paracetamol no rótulo segundo o fabricante

Amostra	Concentração (mg/comprimido)
M1	500
M2	500
M3	750
M4	750
M5	750
M6	750

As amostras foram preparadas da seguinte forma, três comprimidos foram pesados separadamente e as massas anotadas, depois com o auxílio de um almofariz os três comprimidos

foram macerados e o pó homogeneizado. A massa média de um comprimido foi dissolvida em etanol 1% (v/v) e armazenadas em temperatura ambiente em local escuro. Para a análise foi coletada uma alíquota do sobrenadante da solução estoque, que foi diluída em água de modo que a concentração do analito fosse adequada para a curva analítica.

4.3 ENSAIO PRELIMINAR

O microsistema proposto foi avaliado preliminarmente para a determinação de hipoclorito em diversas concentrações pela reação quimiluminescente luminol-hipoclorito em meio alcalino (Figura 18).

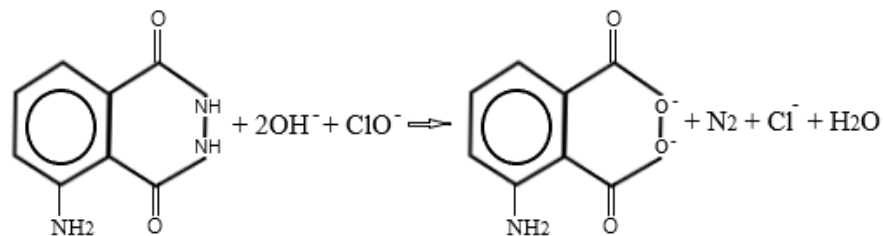


Figura 18 - Reação quimiluminescente luminol-hipoclorito em meio alcalino. Adaptado de Oliveira et al. (2009)

O ensaio foi realizado conforme diagrama apresentado da Figura 19, onde foram usadas três micro bombas para propulsão das soluções sendo P1 para o luminol $3,0 \text{ g L}^{-1}$, P2 para o analito (OCl^-) e P3 para a solução carregadora ($\text{NaOH } 0,4 \text{ mol L}^{-1}$). Inicialmente apenas P2 foi ligada, fazendo com que parte dos canais fossem preenchidos pela solução de hipoclorito. Após cerca de 5 s P2 foi desligada e P1 e P3 foram ligadas simultaneamente. Desse modo a solução carregadora conduz o segmento de solução do analito injetado pelos canais até a confluência onde é inserido o luminol. A reação ocorre e a quimiluminescência pode ser vista na célula de fluxo, onde é feita a aquisição do sinal através da câmera do smartphone.

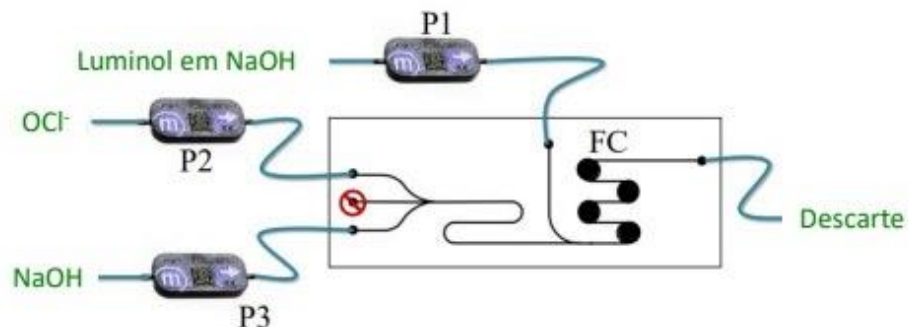


Figura 19 - Diagrama esquemático do funcionamento do ensaio preliminar. Micro bombas piezoelétricas (P1, P2 e P3), célula de fluxo (FC) e descarte.

4.4 PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE

Foram realizados dois procedimentos de análise neste trabalho. No primeiro foram utilizadas três micro bombas piezoelétricas, inserindo no micro sistema um fluxo carregador e um segmento contendo apenas o reagente (OCl^-) ou o reagente e o analito juntos ($\text{OCl}^- + \text{paracetamol}$), com a reação de oxidação do paracetamol ocorrendo fora do sistema. Posteriormente foram utilizadas quatro micro bombas piezoelétricas, onde o reagente e o analito foram inseridos em fluxos diferentes, com a reação citada acima ocorrendo dentro do micro sistema.

4.4.1 Estudos com três micro bombas

Utilizando a configuração apresentada na Figura 20, foram realizados alguns testes para avaliar alguns parâmetros importantes para a determinação proposta neste trabalho. No reservatório S1 foi disposta a solução de hipoclorito ou uma mistura de hipoclorito e paracetamol, no reservatório S2 foi acondicionada a solução carregadora sendo testada a utilização de tampão ou água e em S3 foi adicionada a solução de luminol. O sistema foi configurado de modo que, o padrão de hipoclorito ou a mistura hipoclorito-paracetamol é inserido no micro sistema acionando-se a bomba piezoelétrica P1 por 5,0 s, então o segmento é carregado pela solução carregadora desligando-se P1 e acionando P2 e P3 simultaneamente por 12,0 s. Isto faz com que o segmento injetado conflua com a solução de luminol e ocorra a luminescência na célula de fluxo onde é feita a detecção do sinal de RGB em intervalos de 0,3 s. É importante relatar que todas as bombas operavam à mesma vazão de $75 \mu\text{L s}^{-1}$ e que esse procedimento era repetido automaticamente por três vezes, de modo a permitir a obtenção de replicatas de picos para a mesma amostra/padrão. Além disso, uma primeira injeção para ambientação do sistema era realizada antes das injeções em triplicata, empregando-se um tempo maior (30 s) para evitar possíveis efeitos de memória.

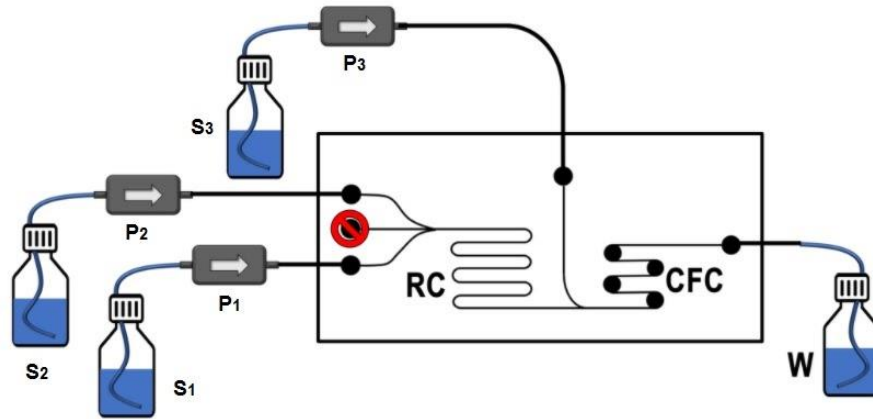


Figura 20 - Diagrama do sistema com três micro bombas. Bombas (P1, P2 e P3), S1 - padrão ou padrão e amostra, S2 - solução carregadora (tampão ou água), S3 - luminol $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{CO}_3^{2-} 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, RC - bobina de reação, CFC - célula de fluxo para quimiluminescência, W - descarte.

4.4.2 Estudos com quatro micro bombas

Neste estudo, foi realizada a determinação de paracetamol em medicamentos o diagrama mostrado na Figura 21. No reservatório S1 foi disposta a solução de hipoclorito, no reservatório S2 as soluções de amostras ou padrões de paracetamol, no reservatório S3 a solução carregadora (água destilada) e no reservatório S4 a solução de luminol.

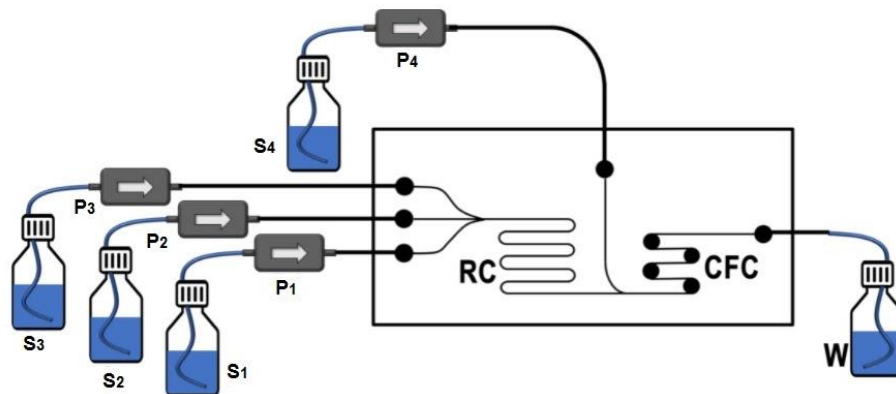


Figura 21- Diagrama do sistema com quatro micro bombas. Bombas (P1, P2, P3 e P4), S1 - padrão, S2 - amostra, S3 - solução carregadora (água), S4 - luminol $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{CO}_3^{2-} 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, RC - bobina de reação, CFC - célula de fluxo para quimiluminescência, W - descarte.

O sistema foi reconfigurado de modo que primeiro foram ligadas as micro bombas P1 e P2 sendo inseridos no sistema as soluções de hipoclorito e de padrões/amostras de paracetamol durante 5,0 s. Depois, P1 e P2 foram desligadas e P3 e P4 foram ligadas também por 12,0 s, de forma a permitir o carregamento das soluções injetadas para a confluência com luminol e depois para a célula de fluxo, onde é realizada a aquisição do sinal analítico em intervalos de 0,3 s. Vale pontuar que, assim como no procedimento anterior, todas as micro bombas operavam com vazão de $75 \mu\text{L s}^{-1}$ e o procedimento era repetido automaticamente por três vezes, de modo a

permitir a obtenção de replicatas de picos para a mesma amostra/padrão. Além disso, uma primeira injeção para ambientação do sistema era realizada antes das injeções em triplicata, empregando-se um tempo maior (30 s) para evitar possíveis efeitos de memória.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação de paracetamol foi realizada baseada na ação supressora que o fármaco exerce na quimiluminescência da reação luminol-hipoclorito. Quando ocorre a reação entre paracetamol e hipoclorito (Figura 24) parte desse oxidante é consumido e, assim, apenas o hipoclorito remanescente reage com o luminol, gerando um sinal analítico que diminui de intensidade com a quantidade de paracetamol na amostra. Dessa forma o μ FIA proposto foi avaliado com o objetivo de realizar essas reações em linha, de maneira miniaturizada e com a detecção por imagem utilizando um smartphone.

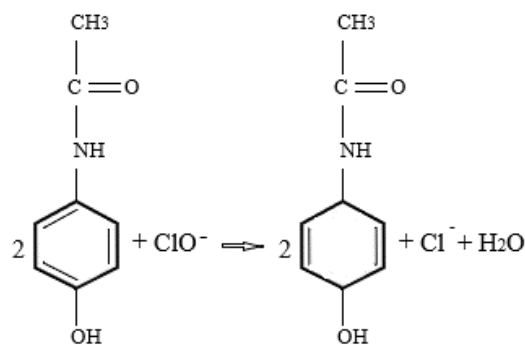


Figura 22 - Reação paracetamol-hipoclorito. Adaptado de OLIVEIRA et al. (2009).

5.1 RESULTADOS PRELIMINARES

O microsistema avaliado mostrou excelente desempenho no que tange às etapas de micro fabricação, uma vez que não houve ocorrências de vazamentos ou entupimento dos canais e as soluções fluíram bem ao longo de todo o sistema. O sistema suportou bem a pressão aplicada pelas micro bombas, não ocorrendo nenhum vazamento nas junções ou nos canais, isso indica que o processo de selagem escolhido foi eficiente.

O ensaio preliminar foi realizado com cinco concentrações diferentes de hipoclorito (0,033 a 0,165 % (m/v)) e conforme mostra o fiograma obtido, que relaciona o sinal da reação com o tempo de injeção da amostra (Figura 23), vemos que a altura dos picos aumenta com o aumento da concentração da amostra, mostrando uma boa resposta do sistema. Além disso, observa-se que a linha de base é praticamente constante e próxima a zero. Vale ressaltar que o fiograma apresenta apenas o sinal do componente B do sistema RGB, pois este exibiu maior sinal para a reação embora os componentes R e G também respondam a reação.

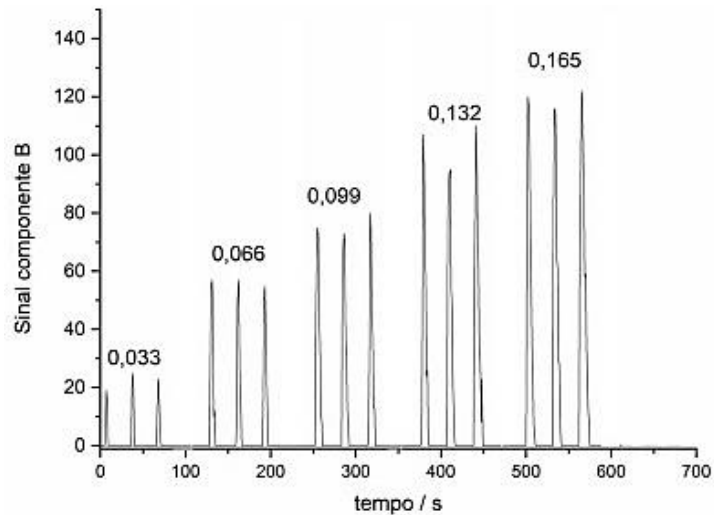


Figura 23 - Fiograma adquirido para concentrações de hipoclorito entre (0,033 a 0,165 % (m/v)).

Com a altura dos picos adquiridos para a reação foi construída uma curva analítica do sinal do componente B em função da concentração do analito. De acordo com a Figura 24 a curva analítica apresentou uma tendência linear, embora o coeficiente de correlação linear obtido ($R = 0,988$) não seja plenamente satisfatório. É possível observar que as medidas demonstraram alguns problemas com relação a precisão e repetibilidade, apresentando certo desvio padrão especialmente a amostra com concentração de 0,132 % (m/v). Um fator que pode explicar esse resultado é que para este ensaio foi utilizada uma versão do aplicativo, na qual o sinal era obtido baseado na leitura de apenas um pixel.

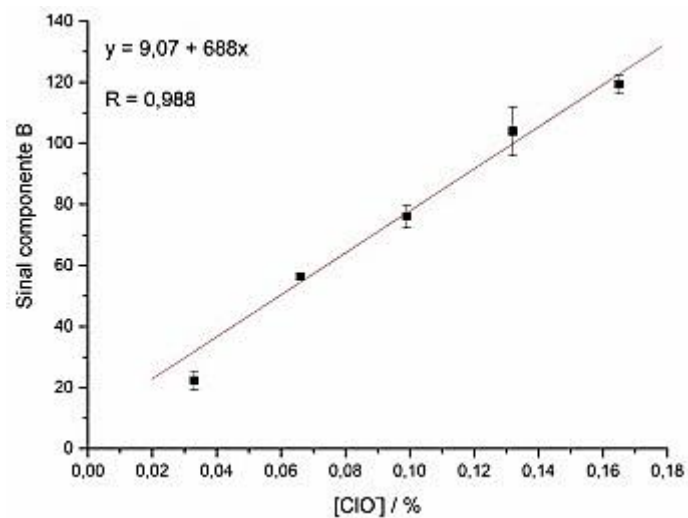


Figura 24 - Curva analítica do sinal do componente B em função da concentração de hipoclorito.

5.2 ESTUDOS UTILIZANDO O SISTEMA COM TRÊS BOMBAS

Com este sistema (Figura 20) foram avaliados três parâmetros importantes: composição da solução carregadora, concentração da solução de hipoclorito e atenuação do sinal luminescente com a reação (hipoclorito-paracetamol) realizada fora do sistema.

5.2.1 Efeito da solução carregadora

Foi avaliado o efeito da solução carregadora no sinal analítico utilizando a solução tampão carbonato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 11) ou água destilada. Neste estudo foram empregadas as seguintes soluções: solução de hipoclorito 1 % e 0,1 % (m/v) e solução de luminol $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão, de modo que os sinais analíticos obtidos podem ser observados nos diagramas da Figura 25. Verificou-se que para a solução de hipoclorito 1 % (m/v) os sinais foram muito próximos apresentando intensidades semelhantes para ambas as soluções carregadoras (tampão ou água). Já para a solução de 0,1 % (m/v), o sinal é menor quando se utiliza água destilada como solução carregadora. De fato, quando se utiliza água como solução carregadora, houve uma variação maior entre os sinais adquiridos para 1,0 % e 0,1 % de hipoclorito, o que sugere uma maior sensibilidade para variações das concentrações de hipoclorito, o que constitui o princípio de medida do método. Dessa forma, optou-se por usar água destilada como carregador para os demais estudos.

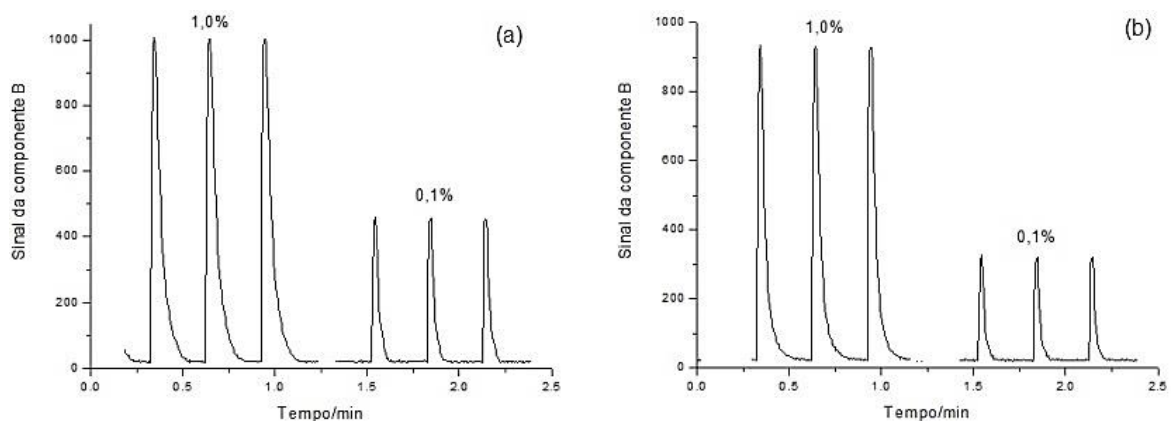


Figura 25 - Diagrama adquirido para solução padrão de hipoclorito 1 % e 0,1 % (m/v) com diferentes soluções carregadoras. (a) solução tampão CO_3^{2-} $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e (b) água destilada.

5.2.2 Efeito da concentração de hipoclorito

Nesse ensaio foram testadas duas concentrações para a solução de hipoclorito (1% e 0,1% (m/v)) e avaliado qual delas daria uma resposta adequada para o paracetamol. Foram

empregadas as seguintes soluções: solução de paracetamol $100,0 \text{ mg L}^{-1}$, água destilada como carregador e solução de luminol $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão carbonato.

Como mostrado no fiograma da Figura 26, observa-se que há uma queda mais acentuada do sinal quando utilizada a solução de hipoclorito $0,1 \text{ \% (m/v)}$ em relação a queda do sinal quando utilizado a solução de $1,0 \text{ \% (m/v)}$, dessa forma optou-se por utilizar nos estudos posteriores a concentração de $0,1 \text{ \%}$ do oxidante.

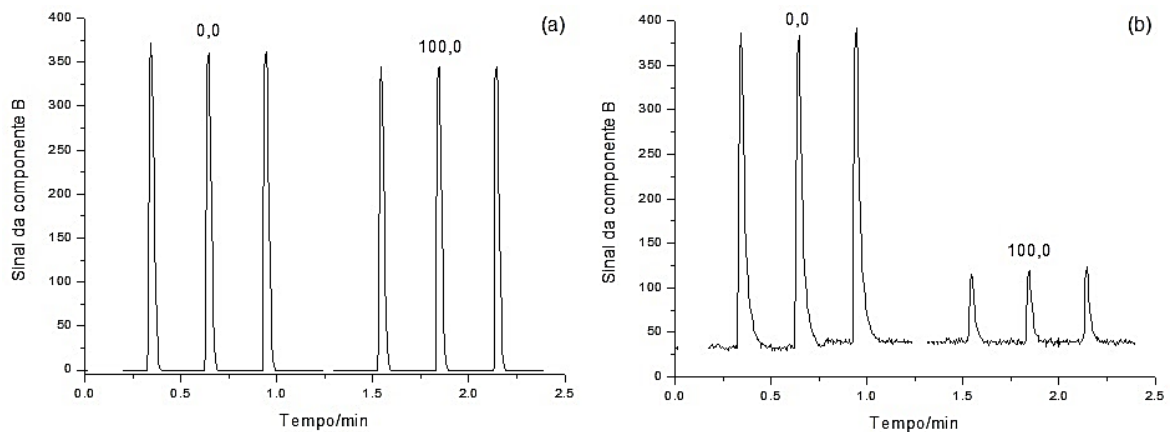


Figura 26 - Fiograma adquirido para solução de paracetamol $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ com diferentes concentrações de hipoclorito. (a) hipoclorito 1 \% (m/v) e (b) hipoclorito $0,1 \text{ \% (m/v)}$.

5.2.3 Reação paracetamol-hipoclorito fora do sistema

Ainda com o sistema de três bombas, foi construída uma curva analítica para diferentes concentrações de paracetamol, sendo que a reação entre paracetamol e hipoclorito foi realizada fora do sistema. Neste estudo empregou-se as seguintes condições: soluções de paracetamol com concentrações de $5,0$ a $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ com OCl^- $0,12\% \text{ (m/v)}$, água destilada como carregador e solução de luminol $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ em CO_3^{2-} $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Os sinais obtidos são mostrados no fiograma da Figura 27, onde observa-se que, como esperado, o sinal diminui com o aumento da concentração de paracetamol, pois há uma redução na concentração de hipoclorito, ou seja, a intensidade do sinal observado no fiograma é inversamente proporcional à concentração de paracetamol. Nota-se também que a linha de base é praticamente constante e próxima a zero, indicando que não houve interferência de radiação externa. Vale pontuar também que o fiograma foi construído apenas com o sinal da componente B do sistema RGB, pois este apresentou maior sinal para quimiluminescência em relação aos outros dois componentes.

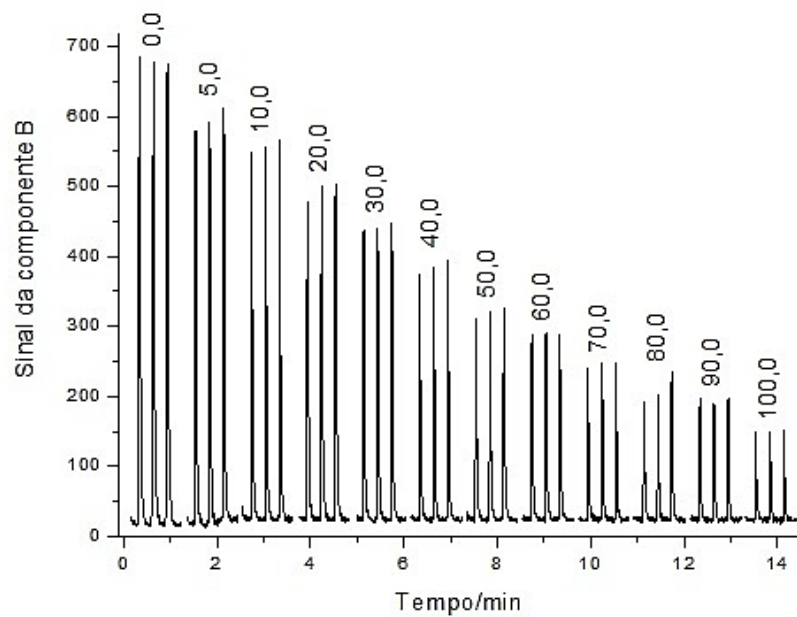


Figura 27- Diagrama adquirido para soluções padrão de paracetamol (5,0 a 100,0 mg L⁻¹)

Todas as medidas foram realizadas em triplicada, e posteriormente foi feita a média das alturas dos picos que foram descontadas do valor do branco, fornecendo os valores para a elaboração da curva analítica ascendente. A resposta se mostrou linear para as concentrações de paracetamol entre 10,0 e 50,0 mg L⁻¹ sendo observada há perda da tendência linear após a concentração de 50,0 mg L⁻¹. A curva analítica (Figura 28) construída para a faixa linear, apresentou um coeficiente de determinação adequado ($R^2 = 0,9992$) e uma sensibilidade de 5,90 u.a. / mg L⁻¹.

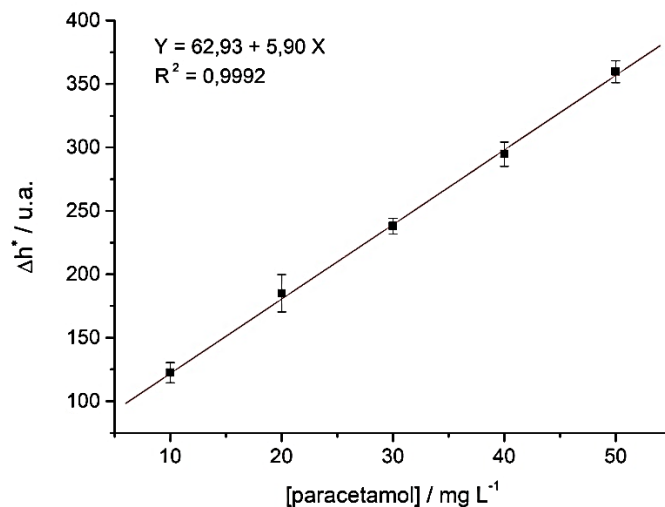


Figura 28 - Curva analítica construída para a faixa linear das soluções padrão de paracetamol com concentrações de 10,0 a 50,0 mg L⁻¹. *Δh - diferença entre a média de altura dos picos para o sinal do branco e a altura dos picos para os padrões/amostras.

A fim de avaliar a precisão das medidas calculou-se o coeficiente de variação (CV) para os picos que apresentaram maior desvio padrão (referentes a solução padrão de 20,0 mg L⁻¹), sendo o valor calculado de 7,9 %. Para os demais padrões a imprecisão ficou abaixo dos 5 % indicando uma repetibilidade adequada das etapas de injeção, reação e detecção do sinal analítico no sistema miniaturizado.

Além da precisão foi estimado também o limite de detecção (LD) instrumental com base no sinal obtido pelo valor do coeficiente linear da reta (b) adicionado de três vezes o seu desvio padrão, sendo obtido o valor de 4,69 mg L⁻¹, que satisfaz plenamente a aplicação para medicamentos cuja concentração é bastante superior à do LD.

5.3 ESTUDOS UTILIZANDO O SISTEMA COM QUATRO BOMBAS

Embora tenha sido mostrado na seção anterior a possibilidade de realização da determinação de paracetamol com um sistema proposto, uma etapa adicional de automação, ou seja, a realização da reação de oxidação do paracetamol com hipoclorito em linha, tornaria a proposta mais elegante. Desse modo foi avaliado o uso do microssistema apresentado na Figura 21, com o qual também realizou-se a determinação de paracetamol em medicamentos.

5.3.1 Determinação da concentração de análise

Inicialmente foi realizado um estudo para avaliar qual a melhor faixa de concentração para determinação do analito. Foram testados padrões com concentrações variando de 2,5 a 50,0 mg L⁻¹ e foi observada a tendência linear das respostas para os padrões com concentrações de 2,5 a 15,0 mg L⁻¹, optando-se por diluir as amostras para a concentração aproximada de 8,0 mg L⁻¹ (região central da faixa) antes das análises.

5.3.2 Determinação de paracetamol em medicamentos

O paracetamol foi determinado em seis amostras de medicamentos nomeadas de M1 a M6, as medidas foram realizadas utilizando as condições a seguir: soluções padrão de paracetamol com concentrações de 2,5 a 15,0 mg L⁻¹, amostras de medicamentos diluídas a cerca de 8,0 mg L⁻¹ de paracetamol, solução de hipoclorito 0,12% (m/v), água destilada e luminol 0,2 mmol L⁻¹ em CO₃²⁻ 0,05 mol L⁻¹. O diagrama obtido para os padrões e as amostras é mostrado na Figura 29.

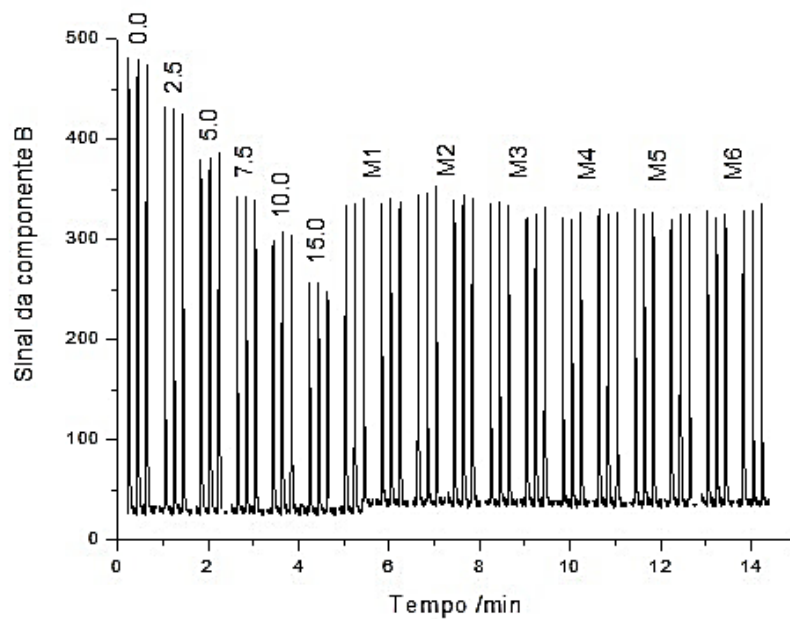


Figura 29 - Fiograma adquirido para padrões e amostras de paracetamol.

Deste fiograma obteve-se a altura dos picos cujo sinal é inversamente proporcional às concentrações de paracetamol, utilizadas para construção da curva analítica apresentada na Figura 30 e, cujo coeficiente de determinação é $R^2 = 0,997$. Deve-se destacar, entretanto, que a linearidade só foi atingida para os picos dos quatro primeiros padrões, desconsiderando-se o ponto para $15,0 \text{ mg L}^{-1}$. De qualquer forma, nenhuma das amostras apresentou picos mais baixos que aqueles obtidos para o padrão de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, permitindo a análise sem extrapolação da curva analítica.

As barras de erro observadas nesta curva foram pequenas indicando maior precisão nas medidas em relação àquelas efetuadas com o sistema de três bombas. De fato, quando calculado o coeficiente de variação para o padrão com maior desvio padrão, obteve-se um valor de 2,9 %, muito menor que obtido para a outra curva (Figura 28) indicando uma melhora na precisão do sinal possivelmente devido ao controle do tempo reacional entre o hipoclorito e o paracetamol obtido com o procedimento em linha.

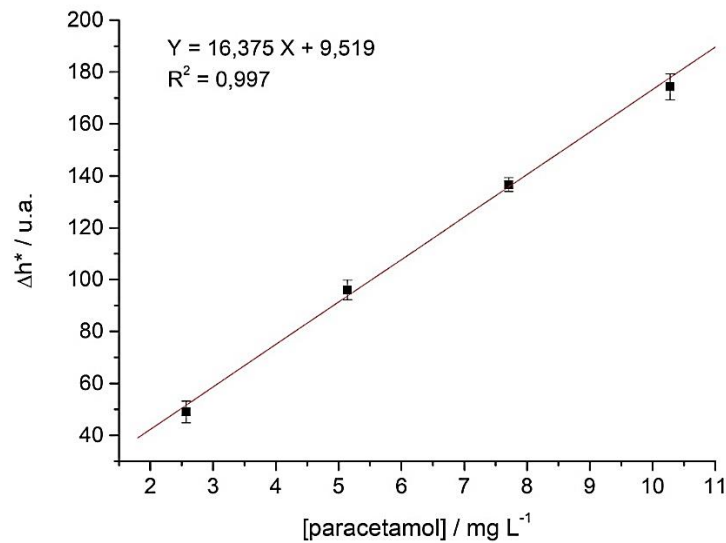


Figura 30 - Curva analítica construída para a faixa linear soluções padrão de paracetamol com concentrações de 2,57 a 10,28 mg L⁻¹. *Δh - diferença entre a média de altura dos picos para o sinal do branco e a altura dos picos para os padrões/amostras.

O limite de detecção (LD) foi calculado pela equação $(3s_{y/x})/a$, onde $s_{y/x}$ é o erro relacionado ao intercepto e “a” o coeficiente angular. O valor obtido foi de 0,95 mg L⁻¹, muito abaixo do obtido para a outra configuração do sistema que foi de 4,69 mg L⁻¹, e menor ainda ao obtido por Moura et al. (2018), o qual foi estimado em 30 mg L⁻¹ ao utilizar a detecção por imagens digitais com uma webcam e um microssistema de uretana-acrilato. Desse modo, esse resultado demonstra uma melhora na sensibilidade ao se realizar as medidas com a câmera do celular e o aplicativo proposto.

Apesar disto, se comparado com outras abordagens na literatura que não utilizam imagens, o limite de detecção ainda é alto, superior ao obtido por Oliveira et al. (2009) de 0,27 mg L⁻¹ utilizando um sistema por injeção em fluxo com multicomutação e detecção com fotodiodos de silício, e ao de Moura et al. (2018) que foi de 0,25 mg L⁻¹ com detecção com uma fotomultiplicadora. Vale ressaltar que para os objetivos propostos neste estudo o limite de detecção obtido é suficiente, uma vez que as amostras de medicamentos possuem concentrações elevadas de paracetamol, muito acima deste limite de detecção. Além disso, o uso do celular dispensa o uso de fotomultiplicadoras ou sistemas de amplificação de sinal, permitindo também a visualização em tempo real do processo.

Os resultados obtidos para os medicamentos foram comparados com o método de referência (espectrofotometria de absorção na região do UV) recomendado pela Farmacopeia

Brasileira.^[3] Os dados foram apresentados na Tabela 2 e pode-se observar que as amostras apresentaram erros relativos abaixo de 5,0 % para quatro das seis amostras analisadas e que esses erros variaram acima e abaixo do valor de referência, indicando a ausência de erros sistemáticos. Adicionalmente, apenas a amostra M5 apresentou diferença estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança ao se aplicar o teste t de student aos resultados obtidos, indicando uma boa acurácia para o método proposto

Tabela 2 - Comparação das concentrações de paracetamol em amostras de medicamentos.

Amostras	Método proposto	Método de referência	Erro relativo
	[paracetamol] (mg comprimido ⁻¹)	[paracetamol] (mg comprimido ⁻¹)	
M1	499,9	515,0	-2,9 %
M2	485,6	478,9	1,3 %
M3	786,1	738,6	6,4 %
M4	820,5	784,2	4,6 %
M5	820,5	756,6	8,4 %
M6	802,4	841,1	-4,6 %

Comparando os resultados obtidos com os estudos realizados por Oliveira et al. (2009) e Moura et al. (2018), observou-se que neste trabalho a frequência analítica obtida foi de 155 injeções h⁻¹, enquanto a frequência obtida pelos autores foi de 180 injeções h⁻¹, as quais podem ser consideradas semelhantes. Em relação às vazões, neste trabalho utilizou-se uma vazão de 4,5 mL min⁻¹, consideravelmente maior que a utilizada por outros como Oliveira et al. (2009) que utilizou 2,0 mL min⁻¹ e de Moura et al. (2018) de 0,15 e 1,5 mL min⁻¹. Deve-se salientar que não foi realizada uma otimização da vazão para o processo, porém, observou-se sinais mais intensos para vazões maiores como a utilizada.

A principal vantagem da abordagem feita neste trabalho em relação a utilizada por Oliveira et al. (2009) é a integração de todas as etapas da análise em um único microsistema, sendo realizado a introdução da amostra, a reação e a detecção do analito de

forma conjunta, enquanto os autores realizam a detecção separadamente, aumentando o número de etapas e os custos da instrumentação.

Outro ponto a ser observado foi o baixo consumo de reagentes proporcionado pelo uso de um μ FIA. Dos reagentes utilizados o luminol é o que apresenta custo mais elevado, o qual 1,0 g chega a cerca de R\$100,00. Nesse sentido, na determinação realizada neste trabalho foram gastos 0,023 g de luminol e 27,0 mL de hipoclorito o que indica um consumo de reagentes muito baixo e, por consequência uma produção de resíduos também reduzida minimizando os impactos ambientais e contribuindo para a Química Verde, abordagem que vem ganhando força atualmente (Farias e Fávaro, 2011).

6 CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou um método para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas usando um microssistema de análise por injeção em fluxo com detecção por imagem digital controlado por smartphone. Este método é simples, rápido e de baixo custo, apresentando potencial para aplicações quimiluminescentes em análises de rotina.

O aparato de análise utilizado, demonstrou bom desempenho analítico e vantagens como: baixo custo de fabricação, automação e portabilidade. Além disso o microssistema pode ser construído de forma rápida e fácil. A utilização do smartphone para detecção baseada em imagens digitais, tornou a análise mais prática e simples, podendo ser realizada por analistas pouco experientes. Ademais, o aplicativo desenvolvido permite o monitoramento do sinal analítico em tempo real, facilitando a avaliação das medidas.

O sistema com quatro micro bombas piezoelétricas no qual a reação (paracetamol-hipoclorito) ocorre dentro dos canais do microssistema, se mostrou mais adequado que aquela utilizando três micro bombas onde a reação é feita fora dos canais, sendo que o primeiro apresentou limite de detecção de $0,95 \text{ mg L}^{-1}$ e o segundo de $4,69 \text{ mg L}^{-1}$. Apesar do LD ainda ser considerado alto em comparação aos métodos convencionais, ele é bastante adequado para os objetivos deste trabalho e para determinações que não exijam alta sensibilidade.

De modo geral o μ FIA mostrou bom desempenho para medidas quimiluminescentes e determinações quantitativas. De fato, cinco das seis amostras analisadas, não mostraram diferenças significativas (com 95% de confiança) quando comparadas ao método de referência. Além disso, o sistema não apresentou erro sistemático e obteve-se uma boa precisão nas medidas e alta frequência analítica.

REFERÊNCIAS

- [1] ANICETO, C.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação espectrofotométrica por injeção em fluxo de paracetamol (acetaminofeno) em formulações farmacêuticas. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 387-391, 2002.
- [2] ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 6 ed., v. 1, 2019.
- [3] ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 6 ed., v. 2, 2019.
- [4] BARTOLONI, F. H. et al. Luz: um raro produto de reação. *Química Nova*, v. 34, n. 3, p. 544-554, 2011.
- [5] BERTOLINI, A., et al. Paracetamol: New Vistas of an Old Drug. Blackwell Publishing Inc., 12, p. 250–275, 2006
- [6] BOSCH, M. E. SÁNCHEZ, A.J.R.; ROJAS, F. S.; OJEDA, C. B. Determination of paracetamol: Historical evolution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006.
- [7] BYRNE, L. et al. Digital imaging as a detector for generic analytical measurements. *Trends in analytical chemistry*, v. 19, n. 8, 2000.
- [8] COLTRO, W. K. T., et al. Microsistemas de análises químicas: introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. *Química Nova*, v.30, n.8, p. 1986-2000, 2007.
- [9] DE PAULA, V. I.; LIMA, D. R. S. Uso de análise de imagens para quantificação de compostos. *Engenho*, v.9, 2014.
- [10] FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T. Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. *Química Nova*, v.34, n.6, p. 1089-1093, 2011.
- [11] FERREIRA, E. C.; ROSSI, A. V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicação da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. *Química Nova*, v. 25, n. 6, p. 1003-1011, 2002.
- [12] GODINHO, M. S. et al. Classificação de refrigerantes através de análise de imagens e análises de componentes principais. *Química Nova*, v. 31, n. 6, p. 1485-1489, 2008.
- [13] KOROKOLVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. *Química Farmacêutica*. São Paulo, 1982.
- [14] MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 1, ed. 1-6, p. 244-248, 1990.
- [15] MEREDITH, T. J.; GOULDING, R. *Paracetamol*. *Postgraduate Medical Journal*, 1980.
- [16] MOURA, H. S. R. P. Image-based luminescence detection for quantitative determinations in continuous flow analysis microsystems. Royal society of chemistry, 2018.

- [17] OLIVEIRA, G. G. et al. Determinação de paracetamol pela inibição da reação quimiluminescente do luminol-hipoclorito de sódio em um sistema de análise em fluxo empregando o conceito de multicomutação. *Química Nova*, v. 32, n. 7, p. 1755-1759, 2009
- [18] SAMPAIO, T. R. Desenvolvimento de microssistemas de análise por injeção em fluxo à base de uretana-acrilato para determinações por quimiluminescência, 2013. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Universidade de Brasília.
- [19] SOUZA, F. R. et al. Avaliação de dispositivos de captura de imagens digitais para detecção colorimétrica em microzonas impressas. *Química Nova*, v. 37, n. 7, p. 1171-1176, 2014.
- [20] SUAREZ, W. T.; VIEIRA, H. J.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos empregando um sistema de análise por injeção em fluxo com geração de ácido nitroso. *Eclética Química*, v. 30, 2005