

**DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM FÁRMACOS EMPREGANDO AMOSTRAGEM BINÁRIA EM FLUXO**

Ana Paula S. Paim, Eloisa Ap. M. Kronka e Boaventura F. Reis

Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo - Av. Centenário, 303 - CP 96 - 13400-970 - Piracicaba - SP

Mauro Korn

Centro de Ensino Técnico da Bahia - Universidade do Estado da Bahia

Recebido em 13/1/97; aceito em 5/5/97

**SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF ASCORBIC ACID IN DRUGS EMPLOYING BINARY SAMPLING IN FLOW SYSTEM.** A flow system procedure for spectrophotometric determination of ascorbic acid in drugs based on  $[\text{Fe}^{3+}(\text{SCN})_n]^{+3-n}$  complex decomposition by reduction is described. The flow network was constituted by a set of three-way solenoid valves, controlled by a microcomputer running a software wrote in QuickBasic 4.5 language. The feasibility of the procedure was ascertained by determining ascorbic acid in drug samples with mass ranging from 0.0018 up to 0.0180 g. The results showed an agreement of about 7% when compared with recommended method. Other profitable features such as a standard deviation of 1.5% ( $n = 7$ ) and a throughput of 120 determinations per hour was also achieved.

**Keywords:** ascorbic acid; flow analysis; binary sampling.

## 1. INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico é uma substância orgânica simples que tem despertado grande interesse, devido aos efeitos benéficos como vitamina, além de seu grande uso como reagente e como aditivo em alimentos. Em vista disso, pesquisas têm sido realizadas na tentativa de se propor novos métodos de determinação<sup>1-5</sup>.

No Brasil, para a quantificação de ácido ascórbico em medicamentos utiliza-se, como método oficial, a titulação com iodato de potássio<sup>6</sup>. Para sucos de frutas é mais utilizada a titulação pelo método de Tillmans<sup>6</sup>, que se baseia na redução do corante 2,6-diclorofenol indofenol por uma solução ácida de vitamina C. O titulante age como indicador e o ácido ascórbico pode ser determinado pela medida do excesso do reagente. Este método sofre interferência de ferro, estanho, cobre, sulfito e tiosulfato<sup>7</sup>. Além disso, apresenta como desvantagem a dificuldade de visualização do ponto final, quando se trabalha com amostras coloridas.

Encontram-se na literatura procedimentos analíticos utilizando como técnicas de detecção, espectrofotometria de absorção molecular<sup>1-3,8-12</sup>, amperometria<sup>13</sup>, quimiluminescência<sup>14</sup>, etc. Alguns destes trabalhos empregaram o processo de análise química em fluxo (FIA), que oferece como vantagem pouco uso de vidraria, diminuição das etapas de manuseio das amostras, baixo consumo de reagentes, além de ser um sistema fechado, o que diminui os riscos de contaminação<sup>1-3,8-14</sup>.

Os métodos espectrofotométricos<sup>1-3,8-12</sup> são os mais utilizados, e têm sido empregados para uma grande variedade de amostras (urina, sangue, alimentos, sucos de frutas e fármacos). A associação das técnicas amperométricas<sup>13</sup> e espectrofotométricas tem sido proposta para a determinação simultânea de ácido ascórbico e ácido úrico em urina<sup>15</sup>. Entretanto, apresenta como desvantagem baixa frequência de amostragem, além das dificuldades inerentes à associação de duas técnicas de detecção distintas.

Os métodos titulométricos empregando espectrofotometria de absorção molecular como técnica de detecção, baseados no processo de análise em fluxo (FIA), têm sido propostos para determinação de ácido ascórbico em sucos de frutas<sup>16,17</sup>. Apresentam como vantagens alta frequência de amostragem e baixo consumo de reagentes, em comparação com as técnicas

de titulações manuais<sup>18</sup>. A transição de cor do indicador é detectada por instrumentos e o operador não necessita manipular os reagentes, o que resulta em melhoria da precisão dos resultados.

O desenvolvimento do processo FIA ao longo destes 20 anos, resultou em mudanças significativas nos dispositivos empregados para a inserção da solução da amostra no percurso analítico. Os mesmos evoluíram das seringas hipodérmicas, passando pelo injetor manual<sup>19</sup>, o injetor automático<sup>20</sup>, válvulas de 6 e 8 vias<sup>21,22</sup> e recentemente, têm sido utilizadas válvulas solenóides de três vias<sup>23</sup>.

O emprego de válvulas solenóides possibilitou o desenvolvimento de módulos de análise mais versáteis, dando origem ao conceito de multicomutação e amostragem binária<sup>24,25</sup>. Este conceito baseia-se na inserção das alíquotas da solução da amostra no percurso analítico, separadas entre si por alíquotas da solução do reagente. O módulo de análise é controlado por microcomputador, o que permite atuar sobre as variáveis do processo analítico: volumes das alíquotas das soluções da amostra e dos reagentes; sequência de inserção dos mesmos no percurso analítico; vazão de bombeamento; sincronização do início de cada etapa de amostragem com a pulsação da bomba peristáltica; e aquisição de dados<sup>24</sup>.

Considerando-se as facilidades oferecidas pelo processo de amostragem binária, neste trabalho, pretende-se desenvolver um procedimento automatizado para determinação espectrofotométrica de ácido ascórbico em fármacos. A reação será baseada na destruição do complexo  $[\text{Fe}(\text{SCN})_n]^{(+3-n)}$  pelo ácido ascórbico.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Soluções de reagentes e amostras

Em todas as soluções foram usados reagentes de grau analítico e água destilada e deionizada.

Solução de KCl (pH 2,2) foi preparada partindo-se de uma solução 0,20 mol L<sup>-1</sup> KCl e adicionando-se, sob agitação, uma solução 0,10 mol L<sup>-1</sup> HCl, e monitorando-se com um pHmetro. Esta solução foi usada para preparar as soluções dos padrões e dos reagentes.

Solução 2,2 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> Fe<sup>3+</sup> foi preparada a partir da

diluição de uma solução padrão de  $0,018 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{3+}$  com a solução de KCl.

Solução padrão  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de ácido L-ascórbico foi preparada pesando-se  $0,11 \text{ g}$  de ácido ascórbico e dissolvendo-se em  $250 \text{ mL}$  da solução de KCl, pH 2,2. As soluções padrão  $1,0 \times 10^{-3}$ ;  $7,5 \times 10^{-4}$ ;  $5,0 \times 10^{-4}$ ;  $2,5 \times 10^{-4}$ ;  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  foram obtidas a partir da diluição com a mesma solução de KCl.

As amostras de fármacos, na forma de comprimidos, foram pulverizadas em cápsula de porcelana. A massa de interesse foi pesada empregando-se balança analítica e dissolvendo-se em  $100 \text{ mL}$  da solução de KCl.

A solução do reagente cromogênico  $0,015 \text{ mol L}^{-1}$  KSCN foi preparada, dissolvendo-se  $0,36 \text{ g}$  em  $250 \text{ mL}$  de água.

## 2.2. Equipamentos e acessórios

Espectrofotômetro Micronal modelo B342II equipado com cela de fluxo de vidro com volume interno  $180 \mu\text{L}$  e percurso ótico de  $12 \text{ mm}$ ; registrador potenciométrico Micronal modelo B292; bomba peristáltica Ismatec modelo IPN-2, provida com tubo de "tygon"; microcomputador 386 equipado com interface eletrônica da American Advantech Co., PCL 711S; e interfaces eletrônicas para controlar a velocidade da bomba peristáltica e acionar as válvulas solenóides<sup>24</sup>.

Módulo de análise constituído por válvulas solenóides de 3 vias; tubos de polietileno com diâmetro interno de  $0,8 \text{ mm}$ ; amortecedor de pulsos; sincronizador; e junções de acrílico do tipo T<sup>26</sup>.

## 2.3. Descrição do diagrama de fluxo e investigação das variáveis do processo

O módulo de análise para executar o processo de amostragem binária foi projetado levando-se em conta as características das reações envolvidas e o diagrama de fluxo é mostrado na figura 1. O programa para controlar a rotação da bomba peristáltica, acionar as válvulas solenóides e realizar a aquisição de dados, foi escrito em linguagem QuickBasic 4.5. Quando o mesmo é executado, são introduzidos os valores das seguintes variáveis de controle: número de ciclos de amostragem; duração

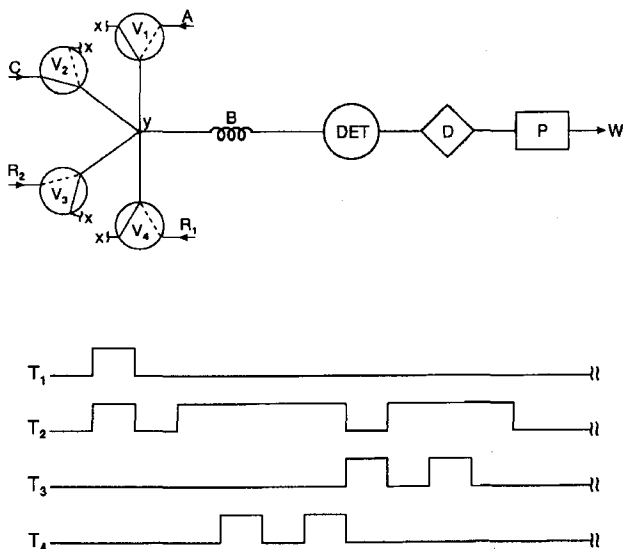


Figura 1. Diagrama de fluxo do módulo de análise. DET = espectrofotômetro a  $480 \text{ nm}$ ; B = bobina de reação com  $60 \text{ cm}$ ; D = amortecedor de pulsos; P = bomba peristáltica; W = descarte; C = carregador a  $1,8 \text{ mL min}^{-1}$ ; A = amostra; R<sub>1</sub> = solução de  $\text{Fe}^{3+}$ ; R<sub>2</sub> = solução de SCN<sup>-</sup>; V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, V<sub>3</sub> e V<sub>4</sub> = válvulas solenóides 3 vias; T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> = tempo de acionamento das válvulas V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, V<sub>3</sub> e V<sub>4</sub>, respectivamente.

do intervalo de tempo de acionamento das válvulas; número de replicatas; e intervalo de tempo de espera para a leitura do sinal. Após o fornecimento destes dados, o microcomputador assume o controle do processo analítico, sem necessidade de supervisão do operador.

No diagrama de fluxo da figura 1, as válvulas estão desligadas e somente a solução carregadora (C<sub>1</sub>) está fluindo através do percurso analítico. O microcomputador foi programado para acionar as válvulas solenóides na sequência indicada no diagrama de tempo. Acionando-se as válvulas V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, V<sub>3</sub> e V<sub>4</sub>, alíquotas da solução da amostra são inseridas no percurso analítico, separadas entre si por alíquotas das soluções dos reagentes. Durante esta etapa, o fluxo da solução carregadora é interrompido. Ao completar o ciclo de amostragem, as válvulas são desligadas e o fluxo da solução carregadora é restabelecido no percurso analítico.

Um dos pré-requisitos para esse sistema é ter-se uma válvula para cada solução. O volume de cada alíquota inserida no percurso analítico, é função do intervalo de tempo de acionamento da respectiva válvula e da vazão de aspiração, a qual foi fixada em  $1,8 \text{ mL min}^{-1}$ .

Neste módulo de análise, um ciclo de amostragem é constituído por uma sequência de acionamento das válvulas, sendo que um volume  $v = \theta(\Delta T1 + \Delta T2 + \Delta T3)$  das soluções, é inserido no percurso analítico em cada ciclo ( $\theta$  = vazão em  $\text{mL min}^{-1}$ ). Assim, repetindo-se o ciclo  $n$  vezes, aumenta-se o volume das soluções da amostra e dos reagentes inseridos em cada análise. A magnitude do sinal analítico e a precisão dos resultados podem ser afetados pelo volume de cada fração da amostra inserida no percurso analítico e pelo volume total da alíquota. Para estudar este efeito foram variados: o intervalo de tempo de acionamento das válvulas de  $0,10$  a  $0,50 \text{ s}$  em intervalos de  $0,10 \text{ s}$ ; e o número de ciclos de amostragem de  $2$  a  $10 \text{ s}$  em intervalos de  $2 \text{ s}$ . A partir destes experimentos estabeleceu-se os valores ótimos das variáveis estudadas. Para averiguar o desempenho do sistema proposto, determinou-se ácido ascórbico em um conjunto de amostras de fármacos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em um módulo de análise com amostragem binária, as alíquotas das soluções da amostra e do reagente são introduzidas sequencialmente no percurso analítico. A mistura entre as soluções ocorre por dispersão a partir das interfaces de contato das mesmas<sup>24,27</sup>. Em vista disso, o volume das alíquotas e o comprimento do percurso analítico exercem um efeito marcante na homogeneização das soluções. O pH da solução carregadora foi fixado em  $2,2$  para evitar a formação de hidróxido de ferro, o que poderia interferir na formação do complexo ferro-tiocianato. Para não haver gradientes de acidez, todas as soluções foram preparadas com a mesma solução usada como carregador.

O efeito do comprimento do percurso analítico (Fig. 1) foi verificado empregando-se bobinas de reação de  $25$ ;  $50$ ;  $60$ ;  $100$  e  $150 \text{ cm}$  e os resultados são mostrados na figura 2. Tomando-se como referência o percurso de  $25 \text{ cm}$ , observa-se que as curvas a e b apresentam atenuações de  $50$  e  $60\%$  para os percursos de  $100$  e  $150 \text{ cm}$ , respectivamente, enquanto que para a curva c, o efeito foi mais acentuado ( $70$  e  $85\%$ ). Estes resultados demonstram que o comprimento do percurso analítico deve ser estabelecido, considerando-se a faixa de concentrações que se deseja trabalhar.

As curvas mostradas na figura 3, foram obtidas variando-se a vazão de amostragem, e observa-se que a resposta apresenta uma tendência linear. O intervalo de tempo de amostragem foi mantido constante ( $0,20 \text{ s}$ ), portanto para cada ciclo, o volume das alíquotas da amostra variou de  $3,0$  a  $8,0 \mu\text{L}$  em função da variação da vazão. Convém salientar que comportamento semelhante foi também observado em trabalho anterior<sup>27</sup>.

A eficiência de mistura entre as soluções da amostra e dos

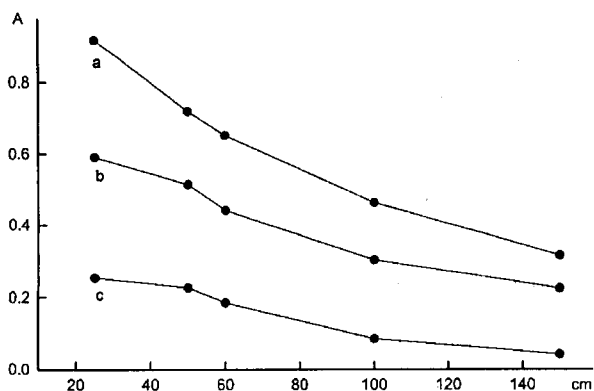


Figura 2. Efeito do comprimento da bobina de reação. A = absorvância; as curvas a, b e c correspondem às concentrações de 0,10; 0,50 e 1,00 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, respectivamente.

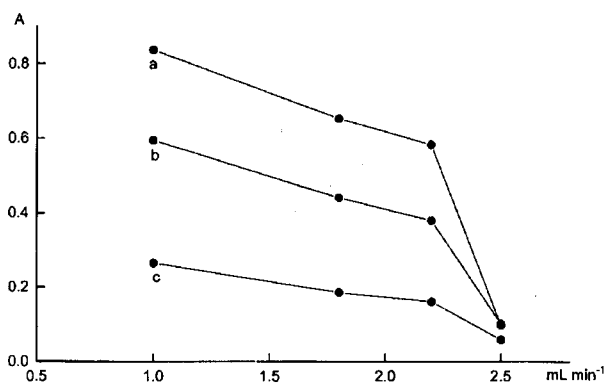


Figura 3. Efeito da vazão de amostragem. A = absorvância; as curvas a, b e c correspondem às concentrações de 0,10; 0,50 e 1,00 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, respectivamente.

reagentes, além das características físico-químicas das mesmas, depende do volume de cada alíquota. O diâmetro interno da bobina de reação era de 0,8 mm, assim o volume de 1 µL de solução ocupava um espaço de 2 mm no interior do tubo. Na otimização das variáveis procurou-se estabelecer um compromisso entre os volumes das alíquotas inseridas e o comprimento do percurso analítico, visando obter uma boa mistura. Nos experimentos realizados para traçar as curvas das figuras 2 e 3, observou-se que os registros dos sinais analíticos em função do tempo, não apresentavam ondulações, o que indicava boa homogeneização. Esta condição foi obtida com percursos analíticos a partir de 60 cm e volumes das alíquotas das soluções entre 4 e 8 µL. Então, baseando-se nestas observações, fixou-se para os experimentos adicionais, percurso analítico de 60 cm, vazão de bombeamento de 1800 µL min<sup>-1</sup> e tempo de amostragem de 0,20 s (6,0 µL). O método de determinação foi baseado na destruição do complexo [Fe<sup>3+</sup>(SCN<sup>-</sup>)<sub>n</sub>]<sup>3-n</sup> pela redução do Fe<sup>3+</sup> com ácido ascórbico, sendo necessário manter um excesso do reagente cromogênico (SCN<sup>-</sup>) em toda extensão da zona da amostra. Esta condição foi alcançada, inserindo-se volumes iguais das soluções de Fe<sup>3+</sup> e SCN<sup>-</sup>, sendo as concentrações fixadas em 2,2 x 10<sup>-3</sup> e 1,5 x 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. A vazão foi fixada em 30 µL s<sup>-1</sup>, e o intervalo de tempo de acionamento das válvulas V<sub>1</sub>, V<sub>3</sub> e V<sub>4</sub> (Fig. 1) em 0,20 s. Assim, o volume inserido no percurso analítico em cada ciclo de amostragem era de 18 µL (6 µL para cada solução). Deste modo, para ajustar a magnitude do sinal analítico à faixa operacional do espectrofotômetro, bastava programar o microcomputador para repetir o número de ciclos de amostragem quantas vezes fosse necessário.

Verificou-se que para soluções de amostras na faixa de concentrações de 1,0 x 10<sup>-4</sup> a 1,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, utilizando-se alíquotas de solução da amostra de 48 µL, obtinha-se uma curva analítica linear. Este volume era obtido efetuando-se oito ciclos de amostragem, portanto, inicialmente a zona de amostra tinha um volume de 144 µL, que correspondia aproximadamente a 50% do volume do percurso analítico. Observou-se que o intervalo de tempo necessário para que toda zona da amostra passasse pelo detector era 30 s. Considerando-se que o intervalo de tempo de amostragem era 4,8 s (8 ciclos de 0,6 s), então, poderíamos prever que uma velocidade analítica de 100 determinações por hora seria alcançada. Experimentos prévios indicaram que, programando-se o microcomputador para iniciar o novo ciclo de amostragem 25 s após o término do anterior não haveria superposição (carry over) entre as duas zonas de amostra. Este recurso possibilitou aumentar a frequência de amostragem e deduz-se a partir da figura 4, que uma velocidade analítica de 120 determinações por hora foi alcançada.

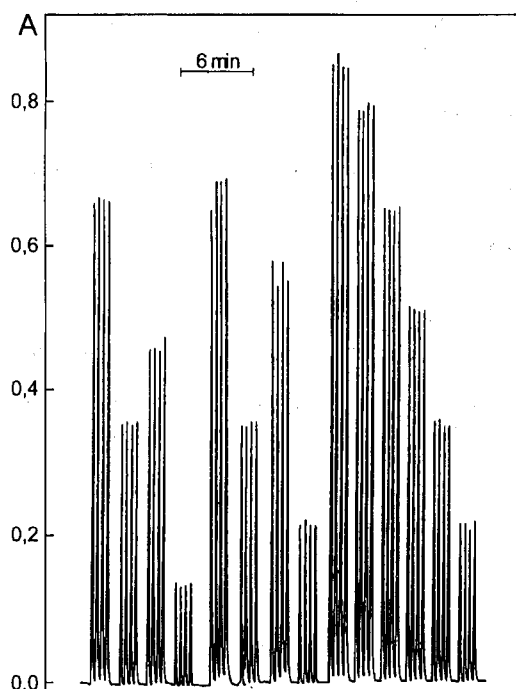


Figura 4. Registros dos sinais gerados pelo espectrofotômetro. A = absorvância. Da direita para a esquerda: padrões de 1,0; 0,75; 0,50; 0,25; 0,10; 0,00 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico seguidos de 8 amostras.

Os registros mostrados na figura 4 indicam boa estabilidade do sistema com o decorrer do tempo e boa repetibilidade. A exatidão foi averiguada empregando-se o método baseado na titulação com iodato<sup>6</sup>, os resultados são mostrados na tabela 1 e indicam boa concordância. As amostras de comprimidos efervescentes apresentaram resultados discordantes, talvez causados pela presença de ácido cítrico, geralmente utilizado como aditivo para conferir sabor ácido em algumas formulações<sup>28</sup>. Conforme mostra os resultados desta tabela, este efeito foi minimizado empregando-se a técnica de adição de padrão.

Outras características analíticas importantes tais como, consumo de reagente de 58 µL SCN<sup>-</sup>, desvio padrão relativo de 1,5% (n = 7), faixa de resposta linear de 0,10 a 1,00 mmol L<sup>-1</sup> e limite de detecção de 0,06 mmol L<sup>-1</sup> (3 x σ) foram obtidas. Além disso, o procedimento possibilita que as determinações sejam efetuadas dissolvendo-se os comprimidos em água, não requerendo nenhum tratamento prévio à análise.

**Tabela 1.** Comparação entre o método oficial e o método proposto.

Amostras	Método FIA (g)	Método Oficial (g)
1	0,55 ± 0,01	0,59 ± 0,01
2	0,51 ± 0,01	0,54 ± 0,01
3	0,52 ± 0,01	0,50 ± 0,01
4	1,12 ± 0,01	1,10 ± 0,01
5	1,10 ± 0,02	1,08 ± 0,02
6	1,05 ± 0,02	1,09 ± 0,02
7	0,98 ± 0,02	1,03 ± 0,02
8*	0,23 ± 0,01	0,24 ± 0,01
9*	0,50 ± 0,02	0,48 ± 0,03
10*	0,21 ± 0,01	0,25 ± 0,01
11*	0,87 ± 0,03	0,89 ± 0,04

\* Amostras contendo ácido cítrico, determinação efetuada com adição de padrão.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP, ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro recebido.

#### REFERÊNCIAS

- Sultan, S. M.; Abdennabe, A. M.; Suliman, F. E. O.; *Talanta* **1994**, *41*, 125.
- Jain, A.; Chaurasia, A.; Verma, K. K.; *Talanta* **1995**, *42*, 779.
- Nóbrega, J. A.; Lopes, G. S.; *Talanta* **1996**, *43*, 971.
- Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Losano, C.; Sanz, A.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *308*, 299.
- Huang, H.; Cai, R.; Du, Y.; Zeng, Y.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *309*, 271.
- Instituto Adolfo Lutz. *Livro de Normas Analíticas do*

- Instituto Adolfo Lutz*. 3.ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo (IMESP), 1985. 560 p.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14<sup>th</sup> edition. Arlington, 1984.
  - Hernandez, J.; Alonso, A.; Almendral, M. J.; Garcia, C.; *Anal. Chim. Acta* **1986**, *184*, 243.
  - Lazaro, F.; Rios, A.; Luque de Castro, M. D.; Valcarcel, M.; *Analyst* **1986**, *111*, 163.
  - Idem, *ibid*, **1986**, *111*, 167.
  - Qureshi, S. Z.; Saeed, A.; Haque, S.; Khan, M. A.; *Talanta* **1991**, *38*, 637.
  - Burns, D. T.; Chimpalee, N.; Chimpalee, D. Rattanariderom, S.; *Anal. Chim. Acta* **1991**, *243*, 187.
  - Fogg, A. G.; Summan, A. M.; Fernandez-Arciniega, M. A.; *Analyst* **1985**, *110*, 341.
  - Alwarthan, A. A.; *Analyst* **1993**, *118*, 639.
  - Almuaided, A. M.; Townshend, A.; *Talanta* **1992**, *39*, 1459.
  - Sultan, M.; *Talanta* **1993**, *40*, 593.
  - Alamo, J. M.; Maquieira, A.; Puchades, R.; Sagrado, S.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1993**, *347*, 293.
  - Rao, G. G.; Sastry, G.S.; *Anal.Chim. Acta* **1971**, *56*, 325.
  - Bergamin F<sup>o</sup>, H.; Medeiros, J. X.; Reis, B. F.; Zagatto, E.A.G.; *Anal. Chim. Acta* **1978**, *101*, 9.
  - Bergamin F<sup>o</sup>, H.; Reis, B. F.; Jacintho, A. O.; Zagatto, E. A. G.; *Anal. Chim. Acta* **1980**, *117*, 81.
  - Muraki, H.; Higuchi, K.; Sasaki, M.; Korenaga, T.; Tōei, K.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, *261*, 345.
  - Alonso-Chamarro, J.; Bartrolí, J.; Barber, R.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, *261*, 219.
  - Pasquini, C.; Faria, L. C.; *J. Autom. Chemistry* **1991**, *13*, 143.
  - Reis, B. F.; Giné, M.F.; Zagatto, E. A. G.; Costa Lima, J. L. F.; Lapa, R. A.; *Anal. Chim. Acta* **1994**, *293*, 129.
  - Martelli, P. B.; Reis, B.F.; Kronka, E. A. M.; Bergamin F<sup>o</sup>, H.; Korn, M.; Zagatto, E. A. G.; Costa Lima, J. L. F.; Araujo, A. N.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *308*, 397.
  - Korn, M.; Gouveia, L. F. B. P.; Oliveira, E.; Reis, B. F.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *308*, 397.
  - Kronka, E.A.M.; Reis, B.F.; Korn, M.; Bergamin F<sup>o</sup>, H.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *334*, 287.
  - FERMENTA. *Ácido cítrico e citratos*. São Paulo, s.d. 15p.