

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE VITAMINA B₂ (RIBOFLAVINA) EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS EMPREGANDO SISTEMA DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO**Clezio Aniceto, Larissa de Souza Canaes, Orlando Fatibello-Filho***

Departamento de Química - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - Universidade Federal de São Carlos - CP 676 - 13560-970 - São Carlos - SP

Carla C. S. Cavalheiro

Departamento de Físico-Química - Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo - São Carlos - SP

Recebido em 16/9/99; aceito em 12/1/00

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF VITAMIN B₂ (RIBOFLAVIN) IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS USING FLOW INJECTION ANALYSIS. A flow injection spectrophotometric procedure exploiting merging zones is proposed for determining vitamin B₂ (riboflavin) in pharmaceutical preparations. The determination is based on the red-colored complex formation between vitamin B₂ and silver(I) which was measured at 520 nm. Vitamin B₂ was determined in four pharmaceutical preparations in the 1.0 to 50.0 mg L⁻¹ concentration range, with a detection limit of 0.5 mg L⁻¹. The recovery from three samples ranged from 98.0 to 104.0 %. The analytical frequency was 42 h⁻¹ and r.s.d. were lower than 1% for solutions containing 10.0, 30.0 and 50.0 mg L⁻¹ vitamin B₂ (n= 10). The results obtained in commercial formulations using the FIA procedure were in good agreement with those obtained by using a conventional fluorimetric procedure (r=0.9998) and also with the label values (r= 0.9997).

Keywords: vitamin B₂; flow injection spectrophotometry; pharmaceutical preparations.

INTRODUÇÃO

Vitaminas são substâncias essenciais ao metabolismo dos seres vivos, sendo requeridas em quantidades diminutas e não são sintetizadas pelos mesmos. A ausência de vitamina B₂ (riboflavina) no organismo pode causar queda de cabelo, lesões na pele, olhos, lábios, boca, órgãos genitais entre outras^{1,2}.

Dependendo da solubilidade, as vitaminas são classificadas em hidrossolúveis e lipossolúveis¹. As vitaminas hidrossolúveis são aquelas que se dissolvem em água, mas não em lipídios; algumas delas, porém, são levemente solúveis em certos solventes orgânicos. Dentre as vitaminas hidrossolúveis tem-se o ácido ascórbico (vitamina C), ácido nicotínico, riboflavina (vitamina B₂), tiamina (vitamina B₁), piridoxina (vitamina B₆), ácido pantotênico, biotina, ácido fólico e cianocobalamina (vitamina B₁₂).

A carência dessas vitaminas pode ser originada tanto pela falta de alimentos (caso de populações pobres) ou de uma dieta mal equilibrada. No caso dos países ditos desenvolvidos uma grande maioria também padece deste mal devido à alimentação inadequada provocada, dentre outros fatores, pelo ritmo estressante da vida moderna e também devido à ingestão de doses excessivas de medicamentos que inibem a ação das vitaminas no organismo^{1,2}.

Riboflavina (7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitol) isoaloxazina)² é um pó cristalino amarelo-alaranjado, de sabor amargo e odor leve. No estado anidro, é estável à luz, entretanto, em soluções alcalinas, decompõe-se rapidamente. Na presença de oxigênio, a riboflavina é transformada irreversivelmente pela luz em lumiflavina, lumiocromo e compostos de menor importância. Ela é levemente solúvel em água e em álcool, e insolúvel em éter etílico e clorofórmio, sendo seu ponto de fusão igual a 285°C³.

A riboflavina é abundantemente distribuída em gêneros alimentícios animais e vegetais, tais como fígado, leite, rim, carne, ovos, ostras, germe de trigo, nabos, beterraba e farelo de arroz¹.

A Farmacopéia Americana (USP-23)⁴ e a A.O.A.C.⁵ recomendam o método fluorimétrico para a determinação de vitamina B₂,

com excitação em comprimento de onda de 444 nm e medida da intensidade de fluorescência em 530 nm.

A maioria dos métodos de determinação de vitamina B₂ encontrados na literatura, são por cromatografia líquida de alta eficiência⁶, fluorimetria⁷, amperometria⁸, quimioluminescência⁹, espectrofotometria¹⁰ e microbiológico¹¹.

A análise, o conhecimento e a distribuição de vitaminas em produtos farmacêuticos tem-se constituído em um dos principais problemas desde que iniciou-se a investigação destes compostos. O maior interesse nestas análises está centrado nos produtos naturais, na necessidade destes compostos em seres humanos e seu emprego na indústria farmacêutica.

O desenvolvimento de novos métodos de análise para fármacos, especialmente aqueles que apresentam em suas formulações vitaminas, se deve ao fato de seu crescente uso na indústria farmacêutica, sendo de extrema necessidade o desenvolvimento de procedimentos rápidos, de baixo custo, precisos e seletivos para a determinação destas vitaminas nesses produtos, seja na forma livre ou na presença de outras substâncias, devido ao crescimento exagerado da demanda destes produtos, ocasionado pelo aumento populacional em países em desenvolvimento e também os modismos de consumo registrados atualmente, principalmente no caso das vitaminas que são tidas como rejuvenescedoras e eliminadoras de certos males. Assim, já foram desenvolvidos procedimentos em fluxo para determinação das vitaminas B₁^{12,13} e B₆¹⁴ em preparações farmacêuticas.

Desenvolveu-se neste trabalho um sistema de análises em fluxo, com zonas coalescentes, para a determinação espectrofotométrica de vitamina B₂ (riboflavina) em complexos multivitamínicos e fármacos.

PARTE EXPERIMENTAL**Instrumentação**

Todas as medidas espectrofotométricas foram feitas em um espectrofotômetro Femto, modelo 435 com uma célula de quartzo

e-mail: bello@dq.ufscar.br

(caminho óptico 1,0 cm) conectado a um registrador Cole Parmer (Niles, IL, USA) modelo 12020000 de dois canais. O estudo do efeito da temperatura na reação de complexação da riboflavina-Ag(I) foi realizado usando-se um banho termostático Tecnal, modelo TE 184. Para a propulsão das soluções de referência, reagentes e amostras utilizou-se uma bomba peristáltica Ismatec (Zurich, Suíça) modelo 7618-40 e tubos de bombeamento de Tygon de 0,8 mm de diâmetro interno. As amostras e soluções de referência foram introduzidas no sistema FIA, utilizando-se um comutador automático Micronal modelo B352. Tubos de polietileno e conectores de acrílico foram utilizados na montagem do módulo de análises.

As medidas de fluorescência¹⁵ (método comparativo) foram feitas com um espectrofluorímetro Hitachi, modelo F 4500 (Japão), utilizando-se $\lambda_{exc} = 444$ nm e $\lambda_{med} = 530$ nm.

Reagentes e soluções

Riboflavina (vitamina B₂), cloridrato de tiamina (vitamina B₁), cloridrato de piridoxina (vitamina B₆) e cianocobalamina (vitamina B₁₂) reagentes de grau bioquímico, foram utilizados para preparação de soluções de referência e interferentes. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e água de um sistema Milli-Q da Millipore (Redford, MA, USA-Modelo UV Plus Ultra-baixo teor de solventes orgânicos dissolvidos) foi usada na preparação das soluções. Sacarose, glicose, lactose, ácido cítrico, ácido ascórbico e amido foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Solução estoque de riboflavina 50 mg L⁻¹ foi preparada em KNO₃ 0,1 mol L⁻¹. Soluções de referência de vitamina B₂ de 1,0 a 40,0 mg L⁻¹ foram preparadas diariamente em KNO₃ 0,1 mol L⁻¹ por diluição da solução estoque. As soluções de riboflavina preparadas foram protegidas da luz, sendo assim acondicionadas em frascos de cor âmbar. Preparou-se semanalmente solução de nitrato de prata 0,25 mol L⁻¹, abrigoando-a da luz por acondicionamento em frasco âmbar.

Preparação das amostras

Vitamina B₂ foi determinada em amostras de comprimidos adquiridos em farmácias locais, comercializadas como Complexo B (Roche Químicos e Farmacêuticos SA, Rio de Janeiro, RJ), Complexo B cristália injetável (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP), Clusivol (Laboratórios Wyeth-Whitehall Ltda, São Paulo, SP) e Dayvit (Aché Laboratórios Farmacêuticos S. A, Guarulhos, SP).

No caso de amostras sólidas (drágeas), dez comprimidos de cada amostra foram macerados, e uma massa entre 100 a 300 mg foi transferida para um béquer de 100 mL contendo 25 mL de KNO₃ 0,1 mol L⁻¹ e agitado a seguir até completa dissolução da amostra. As soluções foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 1, o filtrado foi transferido para um balão de 50 mL e o volume completado com KNO₃ 0,1 mol L⁻¹.

No caso de amostras líquidas (injetáveis), uma alíquota de 300 µL da amostra foi transferida para um balão de 25 mL e o volume foi completado com KNO₃ 0,1 mol L⁻¹.

O procedimento fluorimétrico proposto pela Farmacopéia Brasileira¹⁵ foi empregado para a determinação dos teores de vitamina B₂ nas quatro amostras comerciais.

Sistema de análises por injeção em fluxo

A Figura 1 mostra o esquema do sistema de análises por injeção em fluxo com zonas coalescentes utilizado. Na posição de injeção, a amostra (L₁, 250 µL) e o reagente (L₂, 250 µL; AgNO₃ 0,25 mol L⁻¹) foram injetados simultaneamente no transportador KNO₃ 0,1 mol L⁻¹ a uma vazão de 4,4 mL min⁻¹ em cada canal, confluindo no ponto X. O complexo riboflavina-Ag(I) formado no reator B (0,8 mm de di e 100 cm de comprimento)

foi transportado à célula de fluxo e a absorbância foi monitorada espectrofotometricamente a 520 nm.

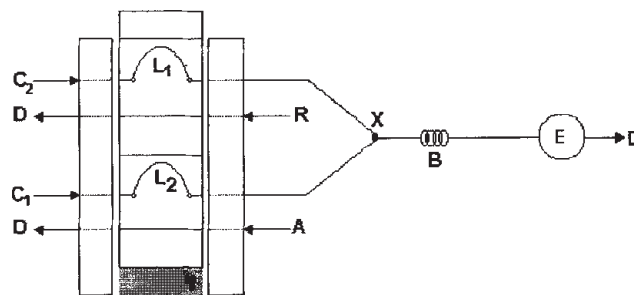


Figura 1. Diagrama de fluxos do sistema para determinação espectrofotométrica de riboflavina (vitamina B₂). As três peças retangulares representam injetador comutador automático, onde: A, soluções de referência ou de amostra; L₁, alça de amostragem (50 cm, 250 µL); L₂, R reagente (AgNO₃ 0,25 mol L⁻¹) alça (50 cm; 250 µL); C₁ e C₂, transportador da amostra e reagente (KNO₃ 0,1 mol L⁻¹) com vazão de 4,4 mL min⁻¹; E, espectrofotômetro a 520 nm; X, confluência; B, reator helicoidal (100 cm, 0,8 mm d.i.); D, descarte.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A riboflavina reage com íons Ag⁺(aq) produzindo um complexo vermelho¹⁶ com forte absorção em 520 nm ($\epsilon = 5550$ L mol⁻¹ cm⁻¹) no intervalo de pH entre 6,5 e 7,1. Esse complexo 1:1 formado nessas condições de pH e a 20°C possui uma constante de estabilidade da ordem de 10⁸, indicando uma alta afinidade dessa vitamina pelo cátion prata¹⁶, sendo assim essa reação explorada no presente trabalho.

Efeito da concentração de AgNO₃

Estudou-se a influência da concentração de nitrato de prata nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,15; 0,20; 0,25 e 0,30 mol L⁻¹ sobre o sinal analítico, nas condições experimentais descritas na Figura 1. As melhores sensibilidade e estabilidade da linha base foram obtidas em AgNO₃ 0,25 mol L⁻¹. Assim, em todo esse trabalho utilizou-se esse reagente nessa concentração.

Efeito do comprimento da alça de amostragem

Estudou-se o efeito do comprimento da alça de amostragem de 25 a 150 cm (volumes de 125 a 750 µL) para soluções de referência de vitamina B₂ de 20, 30 e 40 mg L⁻¹ e vazão constante de 4,4 mL min⁻¹ e concentração de AgNO₃ 0,25 mol L⁻¹. Observaram-se que os sinais analíticos obtidos aumentaram para alças de até 50 cm (250 µL), permanecendo constante para as alças de amostragem com volumes superiores. Assim selecionou-se essa alça de amostragem para o desenvolvimento desse trabalho, afim de não diminuir a frequência analítica do procedimento FIA.

Efeito da vazão do transportador

Estudou-se o efeito da vazão de 1,4; 2,5; 3,6; 4,4 e 5,0 mL min⁻¹ da solução transportadora de nitrato de potássio 0,1 mol L⁻¹ em cada canal. O sinal analítico aumentou até a vazão de 4,4 mL min⁻¹, permanecendo constante nas vazões maiores. Sendo assim, fixou-se uma vazão de 4,4 mL min⁻¹ para a solução transportadora de KNO₃ 0,1 mol L⁻¹. Estudo preliminar do efeito da concentração do transportador KNO₃ variando de 0,02 a 1,0 mol L⁻¹, mostrou que a melhor concentração de KNO₃ foi a de 0,1 mol L⁻¹. Concentrações menores de 0,1 mol L⁻¹, levaram a um aumento da instabilidade da linha base e concentrações superiores, a um aumento do efeito Schlieren.

Efeito do comprimento da bobina reacional

Estudou-se o efeito do comprimento da bobina de reação de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 cm sobre o sinal analítico. Observou-se que para os comprimentos de 100, 150 e 200 cm os sinais transientes obtidos foram praticamente constantes não havendo perda significativa da absorbância (sinal analítico). Para os comprimentos de 50, 250 e 300 cm os sinais transientes obtidos foram inferiores aos sinais analítico obtidos com a bobina reacional de 100 cm. Assim, selecionou-se a bobina de reação de 100 cm de comprimento. Nos comprimentos menores que 100 cm, o rendimento da reação de complexação foi muito inferior aquele obtido no comprimento de reator de 100 cm. Por outro lado, comprimentos de 250 e 300 cm, levaram a um aumento acentuado da dispersão da zona de amostra.

Curva analítica

A curva analítica foi obtida por injeções sucessivas em triplicata de volumes de soluções de referência de riboflavina nas concentrações de 1,0 a 50,0 mg L⁻¹ em nitrato de potássio 0,1 mol L⁻¹, vazão de 4,4 mL min⁻¹ da solução transportadora (nitrato de potássio 0,1 mol L⁻¹), alça de amostragem de 50 cm (250 µL) e bobina de reação de 100 cm. A curva analítica obtida pode ser descrita pela equação: $A = -0,0013 + 6,23 \times 10^{-3} [B_2]$, onde A é a absorbância e [B₂] a concentração de riboflavina em mg L⁻¹, apresentou uma linearidade no intervalo de concentração dessa vitamina de 1,0 a 50,0 mg L⁻¹ e um limite de detecção de 0,5 mg L⁻¹ (três vezes o sinal do branco/inclinação da curva analítica). A frequência analítica foi 42 h⁻¹ e os sinais transientes em triplicata obtidos para as soluções de referência de riboflavina e aqueles em triplicata para as soluções de amostras são apresentados na Figura 2.

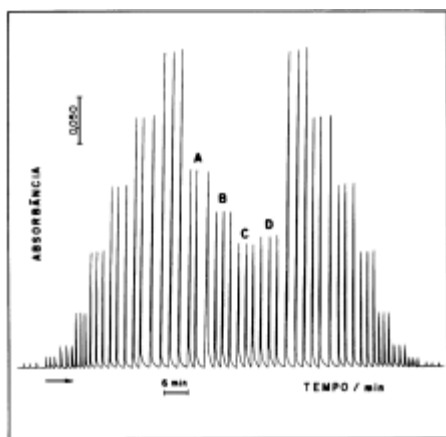


Figura 2. Sinais transientes obtidos em triplicata. Soluções de referência de riboflavina nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg L⁻¹, soluções de amostras em triplicata (A, Complexo B injetável (Cristália); B, Complexo B (Roche); C, Clusivol (Wyeth-Whitehall) e D, Dayvit (Aché)) e soluções de referência em triplicata.

Estudo da repetibilidade

Estudou-se a repetibilidade do procedimento proposto para concentrações de 10, 30 e 50 mg L⁻¹ de vitamina B₂, obtendo-se desvios padrão relativos menores que 1% para as concentrações estudadas (n=10).

Estudo da seletividade e de adição/recuperação da riboflavina em amostras comerciais

Estudou-se o efeito da adição de algumas substâncias geralmente presentes nas amostras comerciais como sacarose,

glicose, lactose, ácido cítrico, ácido ascórbico, amido e as vitaminas B₁ (cloridrato de tiamina), B₆ (cloridrato de piridoxina) e B₁₂ (cianocobalamina) sobre o sinal analítico do procedimento FIA proposto. Desses compostos investigados nas razões de concentrações de 10:1; 1:1 e 1:10, somente o ácido ascórbico causou alguma interferência negativa em concentrações iguais ou superiores daquela da vitamina B₂. No entanto, a concentração de ácido ascórbico nos produtos farmacêuticos analisados estavam sempre numa concentração inferior àquela de vitamina B₂, não interferindo assim nas determinações quantitativas.

A Tabela 1 apresenta os resultados encontrados de adição e recuperação de soluções de referência de riboflavina (vitamina B₂) em formulações farmacêuticas nas concentrações de 10,0; 20,0 e 30,0 mg L⁻¹. A recuperação de vitamina B₂ variou de 98,0 a 104,0 %, indicando assim ausência de interferência das matrizes dessas amostras ensaiadas. Esses resultados são confirmados com os teores de vitamina B₂ concordantes encontrados utilizando-se o procedimento fluorimétrico e o proposto.

Tabela 1. Testes de adição e recuperação da riboflavina (vitamina B₂) em amostras de complexos multivitamínicos para três diferentes concentrações.

Amostra	Riboflavina (mg L ⁻¹)		
	Adicionado	Recuperado	Recuperação (%) (n = 5)
Complexo B (Cristália)*	10,0	10,0	100,0
	20,0	19,8	99,0
	30,0	29,9	99,6
Complexo B (Roche)	10,0	9,8	98,0
	20,0	19,7	98,5
	30,0	29,9	99,6
Clusivol	10,0	10,4	104,0
	20,0	20,5	102,5
	30,0	30,4	101,3
Dayvit	10,0	10,3	103,0
	20,0	20,8	104,0
	30,0	31,1	103,6

Aplicações

A Tabela 2 apresenta os teores de vitamina B₂ encontrados em quatro formulações farmacêuticas comerciais empregando-se um método oficial¹⁵, o procedimento proposto e também os valores rotulados.

Os resultados encontrados utilizando-se o procedimento espectrofotométrico em FIA estão em boa concordância com aqueles resultados encontrados usando-se o método da farmacopéia brasileira¹⁵ (r=0,9998) ou o teor declarado pelo fabricante (r=0,9997) e dentro de um intervalo de erro relativo aceitável, mostrando assim a importância do procedimento FIA desenvolvido. Como mostrado, esse procedimento apresenta boa exatidão e precisão, alta frequência analítica e baixo consumo de reagentes, podendo assim ser adaptado em laboratórios de análise de rotina desses produtos farmacêuticos.

CONCLUSÕES

Os estudos realizados neste trabalho evidenciaram a viabilidade do emprego do método espectrofotométrico em fluxo para determinação da riboflavina após reação de complexação com a prata (Ag(I)) em nitrato de potássio 0,1 mol L⁻¹.

Os resultados obtidos empregando o método FIA proposto estão de acordo com os resultados obtidos usando o método recomendado da farmacopéia brasileira e também com os teores

Tabela 2. Determinação de riboflavina em complexos multivitamínicos usando o método fluorimétrico e espectrofotométrico por injeção em fluxo.

Amostra	Riboflavina (mg/g) (mg/mL)*			Erro Relativo(%)		CV (%)
	Rotulado	Fluorescência	FIA ♦	E ₁	E ₂	
Complexo B* (cristália)	2,00	1,99±0,07	2,05±0,02	+2,5	+3,0	1,1
Complexo B (Roche)	8,32	8,19±0,05	8,27±0,04	-0,6	+1,0	0,7
Clusivol	2,54	2,51±0,08	2,64±0,02	+3,9	+5,2	0,9
Dayvit	1,77	1,75±0,03	1,78±0,08	+0,6	+1,7	0,6

♦n=3, nível de confiança 95%

E₁ = erro relativo entre o método FIA e o valor rotulado;

E₂ = erro relativo aos métodos FIA e fluorescência

rotulados. Este método FIA apresentou precisão satisfatória com boa reprodutibilidade e sensibilidade e uma frequência analítica de 42 h⁻¹, empregando apenas um volume de 250 µL da solução de amostra.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro recebido do CNPq, CNPq/PADCT, FAPESP, FINEP, bem como a bolsa de doutorado do CNPq para CA e bolsa PIBIC para LSC.

REFERÊNCIAS

- Korolkovas, A.; Burckhalter, J. H.; *Química Farmacêutica*, Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1982, p. 655-667.
- Ruyter, M. G. M.; Dekker, M.; *Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins*, New York and Basel, New York, p. 414.
- Pharmacopée Française*, Codex Français; 8^a ed, 1965, p. 941-943.
- The United States Pharmacopeia-The National Formulary-USP-23, NF-18*, 1995, p. 1379-1381.
- Official Methods of Analysis of the AOAC*, 14^a ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, 1984, p. 868,869.
- Munoz, A.; Ortiz, R.; Murcia, M. A.; *Food Chem.* **1994**, *49*, 203.
- Greenway, G. M.; Kometa, N.; *Analyst* **1994**, *119*, 929.
- Hiratsuka, A.; Kawasaki, M.; Hasebe, K.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1995**, *36*, 157.
- Perez-Ruiz, T.; Martinez-Lozano, C.; Sanz, A. Tomas, V.; *Analyst* **1994**, *119*, 1825.
- Jung, M. Y.; Kim, S. K.; Kim, S. Y.; *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 360.
- Barna, E.; *Acta Aliment.* **1992**, *21*, 3.
- Costa-Neto, C. O.; Pereira, A. V.; Aniceto, C.; Fatibello-Filho, O.; *Talanta* **1999**, *48*, 659.
- Aniceto, C.; Pereira, A. V.; Neto, C. O. C., Fatibello-Filho, O.; *Lab. Rob. Autom.* **1999**, *11*, 45.
- Aniceto, C.; Fatibello-Filho, O.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 805.
- Farmacopéia Brasileira*, 3^a ed, Organização Andrei Editora S. A., São Paulo, 1977, pp. 694-696.
- Macpherson, A. M. D and Ottaway, J. M.; *Analyst* **1978**, *103*, 830.