

APLICAÇÃO E AVANÇOS DA ESPECTROSCOPIA DE LUMINESCÊNCIA EM ANÁLISES FARMACÊUTICAS

Maria D. P. T. Sotomayor

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 14801-970 Araraquara – SP, Brasil

Iara Lúcia T. Dias* e Marcos R. V. Lanza

Curso de Farmácia, Universidade São Francisco, 12916-900 Bragança Paulista – SP, Brasil

Altair B. Moreira

Departamento de Química e Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista, 15054-000 São José do Rio Preto – SP, Brasil

Lauro T. Kubota

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 20/10/06; aceito em 30/11/07; publicado na web em 4/9/08

APPLICATION AND ADVANCES IN THE LUMINESCENCE SPECTROSCOPY IN PHARMACEUTICAL ANALYSES. This paper provides a review on the latest advances and applications of the luminescence spectroscopy for the development of pharmaceuticals analyses methods, basically based on the photo- and chemiluminescence. The different forms of the drugs determination on pharmaceuticals through the fluorescence and chemiluminescence are discussed. The analyses include the drugs native fluorescence (liquid and solid-phases); the fluorescence from the oxidizing or reducing forms of the drug; the fluorescence from the chemical derivatization and their photochemistry and hydrolysis reactions. The quenching of luminescence and chemiluminescence generation for the pharmaceutical quantification are also shown. Finally, the trends and future perspectives of the luminescence spectroscopy in the field of the pharmaceutical research are discussed.

Keywords: luminescence spectroscopy; drugs; cosmetics analysis;

INTRODUÇÃO

Devido ao progresso contínuo em técnicas e instrumentos, a indústria farmacêutica busca o emprego de metodologias que ofereçam maior sensibilidade, seletividade, robustez, precisão, exatidão e rapidez. Neste sentido, um grande número de equipamentos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com diversos tipos de detecção domina este ramo industrial. Contudo, o advento da sofisticação de instrumentação automatizada de espectrômetros de luminescência poderá resultar em um substancial aumento de aplicações desta técnica instrumental na indústria farmacêutica, principalmente, no que se refere à análise diretamente na matriz do medicamento.

A espectroscopia de luminescência é uma ferramenta analítica extremamente sensível e tem sido amplamente aplicada na resolução de problemas que requerem baixos limites de detecção, podendo ser facilmente encontrados na literatura muitos trabalhos mostrando análises ao nível de traços.¹⁻⁶ A sensibilidade inerente a esta técnica é consideravelmente maior em comparação a outras metodologias, entre elas a espectrofotometria UV/visível, apresentando limites de detecção de até três ordens de grandeza menores, os quais normalmente se encontram na faixa de ng mL^{-1} , sendo consequência do baixo sinal de fundo que as medidas fluorescentes apresentam. Diferentemente do que ocorre no fenômeno da luminescência, nas medidas de absorbância o sinal está associado à atenuação da intensidade de um feixe de radiação por uma espécie absorvente. Nos casos onde a quantidade da espécie é pequena, esta atenuação é menor, tornando assim a detecção da espécie difícil. Outra característica importante da luminescência diz respeito à seletividade, porque espécies com rendimentos quânticos de fluorescência apreciáveis são menos co-

muns do que substâncias cuja fluorescência não pode ser detectada. Desta forma, moléculas fluorescentes apresentam comprimento de onda característico de excitação e/ou emissão. Adicionalmente, o comprimento de onda de excitação de moléculas fluorescentes está localizado em uma faixa de comprimento de onda diferente do espectro de emissão.⁷

Outra vantagem que apresenta os métodos luminescentes é sua ampla faixa linear de resposta. Além disso, a sensibilidade e seletividade oferecidas pela espectroscopia de luminescência têm encontrado amplo uso na análise de numerosos compostos de interesse farmacêutico, biológico, ambiental e industrial.⁸⁻¹⁰ A estas características devem ser adicionadas a simplicidade instrumental e o baixo custo de manutenção e análise, quando comparados com outros métodos analíticos.

Desta forma, medidas da intensidade luminescente têm permitido a determinação quantitativa seletiva e sensível de uma variedade de princípios ativos de uso farmacêutico. Contudo, apesar de todas as vantagens oferecidas pelos métodos luminescentes, somente certas classes de substâncias exibem luminescência nativa, como consequência dos processos de desativação que ocorrem em uma molécula,¹¹ além disso, devem ser considerados os efeitos de espalhamento e reabsorção. Isto tem limitado o uso dos métodos luminescentes quando comparados a outros métodos analíticos, como cromatografia e espectrometria UV/visível. Apesar disso, é muitas vezes possível converter moléculas não-fluorescentes em derivados fluorescentes usando reagentes específicos, ou aproveitar a fluorescência de compostos que reagem quantitativamente com o analito de interesse, de tal forma que a quantificação indireta do analito é possível.¹²⁻¹⁷

Por outro lado, é possível aproveitar a versatilidade nos modos de amostragem e de softwares com mais recursos, oferecidos pelos atuais instrumentos disponíveis no mercado, com os quais podem ser avaliadas novas técnicas que antes eram difíceis de serem aplicadas,

*e-mail: iaratescarollo@terra.com.br

tais como a espectroscopia de fluorescência sincronizada de ângulo variável para soluções diluídas; observação da fluorescência frontal de soluções turvas; análise de amostras sólidas, géis, filmes e pulverizadas, e até adaptada para o uso de fibras ópticas¹⁸⁻²² para amostras fluorescentes contidas em lâminas de cromatografia de camada delgada ou em placas contendo pequenas cavidades empregadas em testes imuno-enzimáticos.^{8,23,24}

Considerando-se a potencialidade de aplicação da espectroscopia de luminescência na área farmacêutica, este artigo visa descrever os principais avanços alcançados, nos últimos anos, na determinação de fármacos, principalmente em formulações comerciais, no intuito de demonstrar o desenvolvimento e potencial que esta metodologia apresenta.

PRINCÍPIOS BÁSICOS DA ESPECTROSCOPIA DE LUMINESCÊNCIA

A luminescência envolve vários tipos de fenômenos ópticos; os mais difundidos referem-se à fluorescência molecular, à fosforescência e à quimiluminescência.¹¹ Contudo, cabe ressaltar que ainda existem a sonoluminescência,²⁵⁻²⁸ a mecano- ou triboluminescência,²⁹⁻³⁴ a radioluminescência,³⁵⁻³⁸ a termoluminescência,^{34,39,40} a bioluminescência,⁴¹ entre outros. Nesta revisão, serão abordados trabalhos envolvendo a determinação de fármacos baseados em fenômenos fotoluminescentes e quimiluminescentes.

Os métodos baseados em fluorescência e fosforescência são aqueles nos quais a excitação da molécula é conduzida pela absorção de fótons. Como consequência, os dois fenômenos são muitas vezes referidos e/ou classificados como métodos fotoluminescentes. Neste caso, a molécula é inicialmente excitada e promovida para um estado eletrônico de maior energia, cujo retorno ao estado fundamental é acompanhado pela emissão de radiação eletromagnética (Figura 1S – material suplementar). Contudo, é importante salientar que a absorção do fóton em fluorescência e fosforescência envolve transições eletrônicas diferentes.

Como observado na Figura 1S, do material suplementar, a energia eletrônica responsável pela transição fluorescente não envolve uma mudança no número quântico do spin do elétron, e passa do nível $S_0 \rightarrow S_1$, emitindo radiação desde o nível excitado S_1 para algum dos níveis vibracionais do estado eletrônico S_0 . Como consequência, a fluorescência possui tempos de vida extremamente curtos, com a luminescência cessando quase que imediatamente, por volta de 10^{-9} a 10^{-6} s (ns a μ s). A fluorescência é emitida em comprimentos de onda maiores àqueles de excitação, deslocando-se entre 50 e 150 nm, quando comparado ao comprimento de onda da luz usado para a excitação da molécula.^{11,42,43}

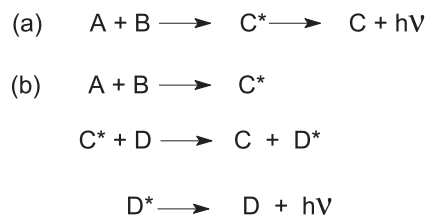
Por outro lado, uma mudança no número quântico de spin do elétron acompanha as emissões fosforescentes, envolvendo transições proibidas de elétrons provenientes de um estado excitado tripleto (com spin diferente ao original) para um estado fundamental singleto ($T_1 \rightarrow S_0$). Como consequência, a radiação existe por um tempo no qual pode ser facilmente detectável após o término da irradiação, entre 10^{-4} e 10 s. Contudo, este tipo de transição é menos provável que a transição envolvendo dois estados singletos (fluorescência), já que processos paralelos de desativação como a conversão interna e externa, e o relaxamento vibracional, podem competir com ela (Figura 1S). Desta forma, a emissão de transições fosforescentes tem sido comumente observada apenas em baixas temperaturas, em meios altamente viscosos ou em moléculas adsorvidas em superfícies sólidas para introduzir rigidez ao sistema.

Apesar das vantagens que possam ser enxergadas neste tipo de fotoluminescência, não se deve esquecer a supressão da fosforescência originada pelo oxigênio molecular, o qual em seu estado fundamental

é um tripleto ($^3\Sigma$) possuindo dois estados singletos conhecidos como oxigênio $^1\Delta$ e oxigênio $^1\Sigma$, cujas energias de excitação são de aproximadamente 23 e 38 kcal mol⁻¹, respectivamente.¹¹ Assim, moléculas excitadas, que possuam energia menor ou igual a 23 kcal mol⁻¹, podem ter sua luminescência suprimida através da transferência de energia para o oxigênio tripleto, produzindo o oxigênio singleto ($^1\Delta$). Contudo, apesar deste fenômeno de supressão ser muitas vezes indesejado, diversas técnicas de supressão têm sido usadas como ferramentas para aplicações nas áreas de bioquímica e médica.^{41,44}

O terceiro tipo de luminescência, a quimiluminescência (Esquema 1), está baseada na emissão de luz de uma espécie excitada que é gerada no curso de uma reação química, ao contrário dos processos fotoluminescentes acima citados, onde a molécula emite luz após absorção de fótons. Desde que a emissão é gerada sem luz, nenhuma fonte será usada durante a medida do sinal. Desta forma, quando usado um espectrômetro fluorescente convencional (Figura 1) a fonte de luz será desligada durante a etapa de medida, para não interferir com o sinal de interesse.

A quimiluminescência é caracterizada por sua alta sensibilidade, ampla faixa linear de resposta, ausência de efeitos de espalhamento e simplicidade de instrumentação, tendo sido empregada na determinação de vários fármacos importantes e de amplo uso.^{3,29}



Esquema 1. Representação esquemática da geração de quimiluminescência mostrando a emissão direta (a) onde a molécula excitada C^* pode decair para o estado fundamental emitindo luz, e a emissão indireta (b) na qual a espécie excitada C^* transfere energia para um aceptor D adequado, a partir do qual se origina a emissão. Na quimiluminescência o processo de emissão de luz ocorre porque uma molécula excitada (aquela que emitirá luz) é formada em uma reação química

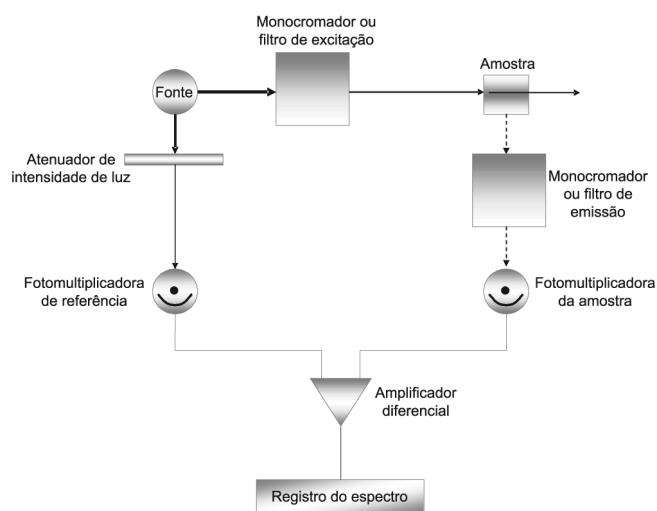
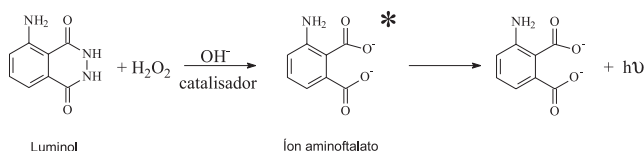


Figura 1. Representação esquemática de um luminômetro típico. A fluorescência proveniente da amostra é propagada em todas as direções, porém é mais convenientemente observada em ângulos retos ao feixe de excitação, empregando arranjo óptico adequado de lentes e espelhos. Para uso em quimiluminescência a fonte é desligada e o sistema comporta-se basicamente como um fotômetro

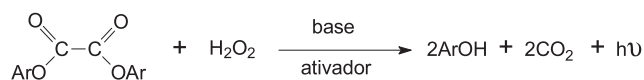
Sistemas quimiluminescentes como luminol,⁴⁴⁻⁴⁷ métodos quimiluminescentes baseados no sistema peróxi-oxalato⁴⁷⁻⁴⁹ e acridina,⁵⁰ têm sido empregados na determinação de fármacos. O mecanismo da quimiluminescência promovida pelo luminol é mostrado no Esquema 2. Neste caso, o luminol (5-amino-2,3-diidroftalazina-1,4-diona) reage com peróxido de hidrogênio na presença de íons hidroxila e um catalisador para formar um intermediário rico em energia (íon aminofalato excitado) com subsequente emissão de luz.⁵⁰



Esquema 2. Representação esquemática da geração de quimiluminescência do luminol na presença de peróxido de hidrogênio em meio básico

O sistema pode ser aplicado na quantificação de luminol e seus derivados, peróxido de hidrogênio ou algum catalisador da reação, como metais,⁵¹ fármacos⁵² ou enzimas.

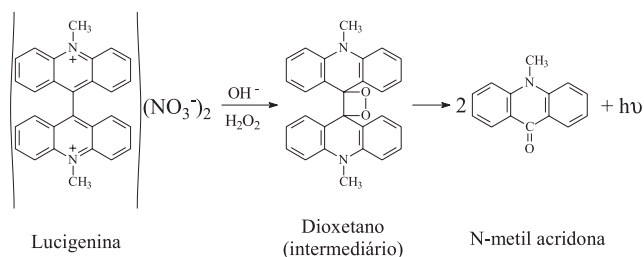
Métodos quimiluminescentes baseados no sistema peróxi-oxalato⁴⁸ são considerados até o momento os processos não-enzimáticos com maior eficiência quântica.^{47,48,53} O mecanismo pode ser explicado através da luminescência quimicamente iniciada por intercâmbio de elétrons ou CIEEL (*chemically initiated electron exchange luminescence*).⁴⁷ Uma reação típica baseada neste tipo de quimiluminescência é mostrada no Esquema 3.



Esquema 3. Reagentes e produtos do sistema peróxi-oxalato, usando um éster fenólico do ácido oxálico e peróxido de hidrogênio, na presença de um ativador em meio básico^{48,54}

O Esquema 3 mostra a quimiluminescência obtida a partir de um éster fenólico de ácido oxálico e peróxido de hidrogênio, catalisada por base na presença de uma substância com rendimento quântico alto a qual é chamada, neste tipo de reações, de ativador. Estas reações são acompanhadas por uma forte emissão de luz, a qual é oriunda da fluorescência do ativador,^{48,54} resultando em sistemas luminescentes que superam aqueles baseados em luminol, e apresentam-se como ferramentas em potencial para serem aplicados na determinação de fármacos.⁴⁹

Outros sistemas quimiluminescentes que eventualmente também podem ser empregados na determinação de fármacos incluem aqueles baseados nos derivados da acridina, tal como a lucigenina, cuja reação quimiluminescente é mostrada no Esquema 4.



Esquema 4. Reação quimiluminescente para a lucigenina na presença de peróxido de hidrogênio e em meio alcalino. Mostram-se o intermediário chave e o produto da reação⁴⁷

Analogamente ao luminol, derivados da acridina reagem com peróxido de hidrogênio em soluções alcalinas, produzindo intermediários excitados, seguidos por luminescência. Embora aplicações na determinação de fármacos ainda não tenham sido devidamente exploradas, este tipo de reações abre uma nova alternativa de aplicação.

Em termos gerais, as medidas da intensidade fotoluminescente ou quimiluminescente permitem a determinação quantitativa seletiva e sensível de uma variedade de espécies orgânicas e inorgânicas importantes, tais como princípios ativos de medicamentos e cosméticos, inclusive em níveis abaixo de 10^{-9} mol L⁻¹. Atualmente, como é esperado, o número de métodos fluorimétricos descritos na literatura é significativamente superior ao número de aplicações de procedimentos fosforescentes e quimiluminescentes, próprio das características de cada um dos fenômenos luminescentes.

APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE LUMINESCÊNCIA NO CAMPO FARMACÊUTICO

A importância do controle químico de produtos farmacêuticos como resultado do impacto na saúde pública e socioeconômica demanda métodos analíticos sensíveis e confiáveis. Adicionalmente a estas exigências juntam-se aquelas que implicam o acompanhamento das análises em larga escala com altas velocidades de amostragem. Nos últimos anos, muitos grupos de pesquisas têm se dedicado ao desenvolvimento de novos métodos analíticos baseados na emissão de luminescência, dentre eles a quimiluminescência^{16,39,45,55-57} e fluorescência,^{12-17,19-22,58-135} no intuito de determinar diferentes fármacos em diversos tipos de preparações farmacêuticas.

As metodologias variam desde o aproveitamento da fluorescência nativa de alguns fármacos^{19,20,58-74,80,110-115,118-122,124,125,129,133-135} até o uso da quimiluminescência induzida por diversos reagentes.^{16,39,45,55-57}

Determinação de medicamentos baseada na fluorescência do princípio ativo

A fluorescência nativa tem sido explorada para a quantificação de fármacos em medicamentos; com base nisto, muitos trabalhos têm sido descritos na literatura.^{19,20,58-74,80,110-115,118-122,124,125,129,133-135} A Tabela 1 mostra os principais fármacos determinados através da fluorescência nativa em solução.

A literatura destaca inúmeras variações das metodologias de análise que repercutem no aumento da intensidade fluorescente da molécula do fármaco, dentre elas destacam-se o uso de meio orgânico,^{69,71,119,120} ácido,^{65,68,69,72-74,122,124} básico,⁵⁹⁻⁶¹ e até meios micelares usando tensoativos.^{66,67} Por exemplo, Manzoori e colaboradores⁶⁷ reportaram a determinação de piroxicam em medicamentos, em soro sanguíneo e urina, a partir do aumento da intensidade de fluorescência nativa do fármaco em presença do surfactante dodecilsulfato de sódio (fase micelar) em meio ácido. Outros autores também têm relatado o emprego de tensoativos na determinação fluorescente de diversos fármacos.^{89,92,100,130}

O uso da calibração multivariada^{62,114,118-125} para resolução de sinais superpostos de misturas de fármacos fluorescentes também tem sido empregada. São relatados desde os métodos multivariados mais simples como PLS (*partial least-squares regression*),^{62,114,118,119,121-123,125} PARAFAC (*parallel factor analysis*) e BLLS (*Bilinear Least-Squares*),¹²⁴ até o uso de redes neurais mais sofisticadas como as redes de Kohonen¹²⁰ (Tabela 1), cujo objetivo é conferir maior seletividade à metodologia, visando determinação dos fármacos em amostras complexas, como soro e urina.

Determinação de fármacos em fase sólida

Uma técnica recentemente explorada para determinação de fármacos

Tabela 1. Determinação de fármacos com fluorescência nativa

| Princípio ativo | Classificação | Metodologia empregada para gerar luminescência | Faixa de análise | Limite de detecção | Marca (forma farmacêutica) e Fabricante | Ref. |
|------------------------|-----------------------------|---|---------------------------------|--------------------------|---|------|
| Ácido acetilsalicílico | Analgésico Antipirético | Fluorescência nativa do fármaco. $\lambda_{exc} = 220$ nm; $\lambda_{em} = 408$ nm. | 0,40 – 5,2 mg L ⁻¹ | 0,11 mg L ⁻¹ | Não determinado | 118 |
| Ácido acetilsalicílico | Analgésico Antipirético | Fluorescência nativa do fármaco em solução de clorofórmio contendo ácido acético a 1%. $\lambda_{exc} = 220$ nm; $\lambda_{em} = 330$ nm. Usando calibração multivariada. | 2,0 – 12 µg mL ⁻¹ | Não reportado | Aspirina® (comprimido), Bayer | 119 |
| Ácido flufenâmico | Antiinflamatório | Fluorescência nativa do fármaco em clorofórmio. $\lambda_{exc} = 352$ nm; $\lambda_{em} = 422$ nm. Usando redes neurais artificiais de Kohonen. | 0,25 – 1,0 µg mL ⁻¹ | Não informado | Movisilin® (não informado), Sankyo Pharma | 120 |
| Ácido mefenâmico | Antiinflamatório | Fluorescência nativa do fármaco em clorofórmio. $\lambda_{exc} = 352$ nm; $\lambda_{em} = 449$ nm. Usando redes neurais artificiais de Kohonen. | 1,0 – 4,0 µg mL ⁻¹ | Não informado | Coslan® (cápsula), Parke-Davis | 120 |
| Ácido meclofenâmico | Antiinflamatório | Fluorescência nativa do fármaco em clorofórmio. $\lambda_{exc} = 352$ nm; $\lambda_{em} = 405$ nm. Usando redes neurais artificiais de Kohonen. | 0,25 – 1,0 µg mL ⁻¹ | Não informado | Meclofen® (cápsula), Parke-Davis | 120 |
| Acrivastina | Antialérgico | Fluorescência nativa do fármaco em tampão acetato (pH 6,5). $\lambda_{exc} = 230$ nm; $\lambda_{em} = 380$ nm. | 58 – 2000 ng mL ⁻¹ | 23 ng mL ⁻¹ | Semprex-D® (cápsulas), Glaxo-Wellcome | 58 |
| Bromazepan | Ansiolítico | Fluorescência nativa do fármaco em solução metanólica de hidróxido de potássio. $\lambda_{exc} = 260$ nm; $\lambda_{em} = 570$ nm. | 0,03 – 0,32 µg mL ⁻¹ | 5,7 ng mL ⁻¹ | Calmepan® (comprimido), não informado | 59 |
| Bumetanida | Diurético | Fluorescência nativa do fármaco em NaOH 0,001 mol L ⁻¹ , empregando sistema de injeção em fluxo. $\lambda_{exc} = 314$ nm; $\lambda_{em} = 370$ nm. | 0,05 – 10,0 µg mL ⁻¹ | 0,01 µg mL ⁻¹ | Burinex® (comprimido), LEO Pharmaceutical Product Burinex® (injeção), LEO Pharmaceutical Product | 60 |
| Cetoconazol | Antimicótico | Fluorescência nativa do fármaco em solução tampão de Teorrel e Stenhagen (pH 10,0). $\lambda_{exc} = 288$ nm; $\lambda_{em} = 375$ nm. | 49,7 – 800 ng mL ⁻¹ | 14,9 ng mL ⁻¹ | Cetoconazol (pó), Janseen Pharmaceutical Cetoconazol (creme), Janseen Pharmaceutical | 61 |
| Ciprofloxacina | Antibiótico | Fluorescência nativa em meio ácido (pH 4,0). Emprego de métodos de calibração multivariada (PARAFAC e BLLS). | 0 – 200 µg L ⁻¹ | 2 µg L ⁻¹ | Aplicado em análise de urina. | 124 |
| Clonazepam | Sedativo Anticonvulsivo | Fluorescência nativa do fármaco em solução metanólica de hidróxido de potássio. $\lambda_{exc} = 368$ nm; $\lambda_{em} = 425$ nm. | 0,03 – 0,38 µg mL ⁻¹ | 16,5 ng mL ⁻¹ | Rivotril® (comprimido), não informado | 59 |
| Codeína | Antitussígeno Analgésico | Fluorescência nativa do fármaco. $\lambda_{exc} = 220$ nm; $\lambda_{em} = 350$ nm. | 0,05 – 0,25 mg L ⁻¹ | 0,04 mg L ⁻¹ | Não determinado | 118 |
| Codeína | Antitussígeno Analgésico | Fluorescência nativa do fármaco em tampão fosfato pH 7,0. $\lambda_{exc} = 220$ nm; $\lambda_{em} = 350$ nm. Usando calibração multivariada. | 0,25 – 3,0 mg L ⁻¹ | Não reportado | Codeisán® (comprimido), não informado Codeína Perduretas® (comprimido), não informado | 121 |

Tabela 1. continuação

| Princípio ativo | Classificação | Metodologia empregada para gerar luminescência | Faixa de análise | Limite de detecção | Marca (forma farmacêutica) e Fabricante | Ref. |
|---------------------|--|--|------------------------------------|----------------------------|---|------|
| Diazepam | Ansiolítico | Fluorescência nativa em solução metanólica de hidróxido de potássio. $\lambda_{exc} = 380$ nm; $\lambda_{em} = 454$ nm. | 0,03 – 0,34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 7,1 ng mL ⁻¹ | Valium® (comprimido), não informado | 59 |
| Efedrina | Descongestionante nasal e tratamento de asma | Fluorescência nativa do fármaco. $\lambda_{exc} = 220$ nm; $\lambda_{em} = 287$ nm. | 0,80 – 8,0 mg L ⁻¹ | 0,33 mg L ⁻¹ | Não determinado | 118 |
| α -Estradiol | Estrógeno | Fluorescência nativa do fármaco. $\lambda_{exc} = 285$ nm; $\lambda_{em} = 310$ nm. | 1,5 – 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Não determinado | 134 |
| Fenilefrina | Descongestionante nasal | Aproveitamento da fluorescência nativa, $\lambda_{exc} = 277$ nm; $\lambda_{em} = 300$ nm. Emprego de calibração multivariada. | 0,8 – 2,0 mg L ⁻¹ | 0,08 mg L ⁻¹ | Wagner® (comprimido), não informado Tabein® (comprimido), não informado Dristan® (comprimido), não informado Wilpan® (comprimido), não informado | 62 |
| Furosemida | Diurético | Emprego da espectrometria de fluorescência de varredura de ângulo variável em mistura de vários diuréticos, aproveitando a fluorescência nativa do fármaco. | 10 – 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Não relatado | Seguril® (comprimido), Hoechst | 129 |
| Furosemida | Diurético | Fluorescência nativa do fármaco em tampão tartrato (pH 2,5). $\lambda_{exc} = 270$ nm; $\lambda_{em} = 410$ nm. Aplicando calibração multivariada. | 0,212 – 1,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Não informado | Salidur® (comprimido), não informado Seguril® (comprimido), não informado | 122 |
| Ibuprofeno | Antiinflamatório Antipirético Analgésico | Fluorescência nativa do fármaco em hidróxido de sódio 0,05 mol L ⁻¹ . $\lambda_{exc} = 224$ nm; $\lambda_{em} = 290$ nm. | 0,4 – 2,4 mg L ⁻¹ | 0,2 mg L ⁻¹ | Ibuprofeno (comprimido), não informado | 63 |
| Isoxsuprina | Vasodilatador | Fluorescência nativa do fármaco em água destilada. $\lambda_{exc} = 270$ nm; $\lambda_{em} = 305$ nm. | 0,4 – 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Duvadilan® (comprimido), Solvay Duphar B.V. | 64 |
| Mivacurio | Agente bloqueador neuromuscular | Fluorescência nativa do fármaco em solução tampão acetato (pH 5,5) $\lambda_{exc} = 230$ nm; $\lambda_{em} = 324$ nm. | 5 – 500 ng mL ⁻¹ | 0,93 ng mL ⁻¹ | Mivacrom® (injeção), Glaxo-Wellcome | 65 |
| Moxifloxacina | Antibiótico | Fluorescência nativa do fármaco em tampão fosfato (pH 8,3). $\lambda_{exc} = 287$ nm; $\lambda_{em} = 465$ nm. | 30 – 300 ng mL ⁻¹ | 10 ng mL ⁻¹ | Octegra® (comprimido), não informado Actira® (comprimido), não informado Proflox® (comprimido), não informado | 66 |
| Naproxeno | Antiinflamatório | Fluorescência nativa do fármaco em solução de clorofórmio contendo ácido acético a 1% (v/v). $\lambda_{exc} = 220$ nm; $\lambda_{em} = 360$ nm. Usando calibração multivariada. | 0,1 – 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Não reportado | Naproxin® (comprimido), Roche S.A. | 119 |
| Naproxeno | Antiinflamatório Analgésico | Fluorescência nativa do fármaco em hidróxido de sódio 0,05 mol L ⁻¹ . $\lambda_{exc} = 230$ nm; $\lambda_{em} = 355$ nm. | 5,0 – 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Naprosyn® (comprimido), não informado | 63 |

Tabela 1. continuação

| Princípio ativo | Classificação | Metodologia empregada para gerar luminescência | Faixa de análise | Limite de detecção | Marca (forma farmacêutica) e Fabricante | Ref. |
|------------------------|--|---|-------------------------------------|-----------------------------|--|------|
| Piretamida | Diurético | Emprego da espectrometria de fluorescência de varredura de ângulo variável em mistura de vários diuréticos, aproveitando a fluorescência nativa do fármaco. | 1,0 – 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Não relatado | Perbilen® (cápsulas), Hoechst | 129 |
| Piridoxina | Vitamina B | Fluorescência nativa do fármaco em tampão fosfato pH 7,0. $\lambda_{\text{exc}} = 220 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$. Usando calibração multivariada. | 0,10 – 2,0 mg L^{-1} | Não relatado | Benadom® (comprimido), não informado | 121 |
| Piroxicam | Antiinflamatório | Fluorescência nativa do fármaco aumentada na presença do surfactante dodecil sulfato de sódio em meio ácido. $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$. | 0,05 – 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,015 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Não informado (cápsulas), não informado (gel), não informado | 67 |
| Piroxicam | Antiinflamatório | Fluorescência nativa do fármaco em meio de HNO_3 0,5 mol L^{-1} . $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$. | 0,01 – 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Não relatado | Não informado (cápsula), não informado | 68 |
| Piroxicam | Antiinflamatório | Fluorescência nativa do fármaco em meio de H_2SO_4 0,05 mol L^{-1} . $\lambda_{\text{exc}} = 345 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$. | 0,20 – 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,113 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Feldene® (injeção), Pfizer-Egypt | 69 |
| Piroxicam | Antiinflamatório | Fluorescência nativa do fármaco em meio orgânico de dioxano. $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$. | 0,20 – 1,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Feldene® (comprimido), Pfizer-Egypt | 69 |
| Ritrodina | Agente simpatomimético | Fluorescência nativa do fármaco. $\lambda_{\text{exc}} = 278 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 308 \text{ nm}$. | 4,0 – 9,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Yutopar® (comprimido), não informado Ritodrina® (ampolas), Pharco Pharmaceuticals | 80 |
| Salicilato | Antiinflamatório, analgésico, antipirético | Fluorescência nativa do fármaco. $\lambda_{\text{exc}} = 297 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$. | 0,010 – 0,250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 3 ng mL^{-1} | Aplicado em análise de soro. | 70 |
| Salicilato | Antiinflamatório, analgésico, antipirético | Fluorescência nativa do fármaco em solução de clorofórmio contendo ácido acético a 1%. $\lambda_{\text{exc}} = 220 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$. Usando calibração multivariada. | 0,5 – 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Não relatado | Não informado | 119 |
| Salsalato | Antiinflamatório | Fluorescência nativa do fármaco em meio orgânico de clorofórmio e pirrolidina. $\lambda_{\text{exc}} = 299 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$. | 0,10 – 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,017 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Umbradol® (pó), não informado Não informado (cápsulas), não informado | 71 |
| Tacrina | Tratamento de carcinoma | Fluorescência nativa do fármaco em tampão acetato (pH 5,6). $\lambda_{\text{exc}} = 242 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 362 \text{ nm}$. | 1 – 70 ng mL^{-1} | 0,24 ng mL^{-1} | Cognex® (cápsula), não informado | 72 |
| Tartrato de ergotamina | Sedativo | Fluorescência nativa do fármaco em ácido clorídrico 0,1 mol L^{-1} , em sistema de fluxo seqüencial. $\lambda_{\text{exc}} = 236 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$. | 0,03 – 0,61 mg L^{-1} | 0,01 mg L^{-1} | Bellaspon® (comprimido), Leciva A.S. | 73 |
| Tenoxicam | Antiinflamatório Analgésico | Fluorescência nativa do fármaco em ácido nítrico 0,5 mol L^{-1} . $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$. | 40 – 200 ng mL^{-1} | 11 ng mL^{-1} | Epicotil® (comprimido), não informado Epicotil® (supositório), não informado Epicotil® (pó liofilizado), não informado | 74 |

Tabela 1. continuação

| Princípio ativo | Classificação | Metodologia empregada para gerar luminescência | Faixa de análise | Limite de detecção | Marca (forma farmacêutica) e Fabricante | Ref. |
|-----------------|--------------------------------|---|--------------------------------------|-----------------------------|--|------|
| Tenoxicam | Antiinflamatório Analgésico | Fluorescência nativa do fármaco em meio orgânico de dioxano. $\lambda_{exc} = 360$ nm; $\lambda_{em} = 480$ nm. | 0,3 – 2,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,137 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Epicotil® (comprimido), IPICO Epicotil® (pó liofilizado), IPICO | 69 |
| Triamtereno | Diurético | Emprego da espectrometria de fluorescência de varredura de ângulo variável em mistura de vários diuréticos, aproveitando a fluorescência nativa do fármaco. | 50 – 150 ng mL^{-1} | Não relatado | Triniagar® (comprimido), Farmasimes | 129 |
| Triamtereno | Diurético | Fluorescência nativa do fármaco em tampão tartrato (pH 2,5). $\lambda_{exc} = 360$ nm; $\lambda_{em} = 438$ nm. Aplicando calibração multivariada. | 0,0204 – 0,143 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Não informado | Salidur® (comprimido), não informado | 122 |

cos em medicamentos tem sido a quantificação da fluorescência em fase sólida (Tabela 2). Esta técnica tem demonstrado vantagens na redução do consumo de reagentes e geração de resíduos. Outra vantagem é o ganho obtido na intensidade de luminescência, uma vez que em fase sólida a molécula se encontra com uma estrutura mais rígida quando comparada em solução, evitando com isto perdas da intensidade luminescente por processos paralelos de desativação (Figura 1S).

A espectroscopia de luminescência em fase sólida para compostos que possuem fluorescência nativa ainda tem sido muito pouco explorada,^{19,20,70,112–115,125,133,135} apesar das várias vantagens que este tipo de aplicação pode oferecer. Adicionalmente, podem ser realizadas análises não-destrutivas, seguindo a tendência atual em direção à Química Limpa, bem como análises on-line e/ou *in situ*. Outra vantagem ao induzir luminescência diretamente na matriz da amostra diz respeito à eliminação de reações paralelas capazes de suprimir a luminescência, as quais comumente podem ocorrer em solução, e têm limitado a aplicação da espectroscopia de fluorescência na determinação de muitos analitos.

Recentemente, trabalhos empregando a quantificação de luminescência diretamente nas amostras sólidas, tal como comercializadas (comprimidos e cápsulas sob a forma de partículas sólidas finamente pulverizadas), têm sido descritos na literatura por Moreira e colaboradores^{19,20,125,133} (Tabela 2); os mesmos demonstraram a viabilidade e vantagens inerentes que este tipo de análise oferece, tais como simplicidade, rapidez, nenhuma geração de resíduos, nenhum preparo de soluções, nem pré-tratamento de amostra. Essas características tornam a espectrofluorimetria em fase sólida uma ferramenta bastante promissora para o controle de qualidade, quantificação e identificação de medicamentos com baixa solubilidade, como o ibuprofeno,^{97,136} possibilitando ainda avaliar interações reais entre o princípio ativo e os excipientes diretamente na matriz oriunda do fármaco.

Uma contribuição extremamente importante dos trabalhos descritos por Moreira e colaboradores é o fato de terem encontrado propriedades luminescentes em moléculas quando em estado sólido, as quais em solução aparentemente não apresentavam luminescência.²⁰ Este fato abre um precedente para investigar as propriedades luminescentes de fármacos em fase sólida, que até agora, em solução, não apresentavam luminescência.

Complexos fluorescentes de fármacos

No intuito de obter um sinal fluorescente, a formação de complexos entre o fármaco e outras espécies tem sido bastante explorada

por muitos grupos de pesquisa^{15,74,78,94–110,117,132} (Tabela 3).

Muitos artigos têm demonstrado que a inclusão do fármaco dentro da cavidade de ciclodextrinas pode induzir a emissão de várias moléculas.^{94–99,102,117} Este fato é explicado principalmente pela rigidez adicional à qual a molécula de fármaco é submetida. Outra vantagem deste tipo de complexos é que podem ser determinados fármacos que são insolúveis em meio aquoso, pois as ciclodextrinas fornecem simultaneamente sítios de ligação hidrofílicos e hidrofóbicos, estes últimos servindo para inclusão da molécula de fármaco, formando complexos do tipo hóspede-hospedeiro, como são conhecidos.

Complexos ternários formados na presença de íon térbio (III), o fármaco, e moléculas de óxido de trioctilfosfina¹⁰⁰ ou moléculas de tris-hidroxi metilaminoetano (TRIS),¹⁰¹ ou EDTA em meio alcalino¹⁰³ também oferecem uma forma de quantificar alguns fármacos em formulações comerciais.

A capacidade que possuem alguns fármacos derivados de quinolonas e quinolinas para formar com metais de transição complexos fluorescentes tem sido explorada na determinação desses reagentes fluorogênicos (fármacos). Assim, quelatos desta família de fármacos com diversos metais de transição como zircônio, molibdênio, vanádio, tungstênio¹⁰⁴ e alumínio^{107,108} têm sido descritos na literatura.

É bastante conhecido que quelatos orgânicos de íons lantanídeos exibem propriedades espectroscópicas bastantes peculiares. Enquanto seus espectros de absorção apresentam o perfil esperado para os respectivos complexos orgânicos, seus espectros de emissão são bandas extremamente estreitas características das transições *4f* dentro dos íons lantanídeos.^{106,132} Este fenômeno conhecido como luminescência sensibilizada por lantanídeos^{5,130–132,137} pode ser explicado como sendo devido à transferência de energia intramolecular desde o nível tripleto mais baixo do complexo para um nível *4f* do íon, resultando em uma mudança notória de espectros de bandas largas de excitação para uma banda estreita de emissão.¹³² Isto tem sido bastante utilizado para determinação de fármacos em preparações farmacêuticas.^{5,78,105,106,130–132} Nestes casos o íon mais empregado é o Eu(III), e baseia-se no comportamento espectroscópico do complexo Fármaco-Eu(III), no qual o fármaco, após absorver fortemente radiação eletromagnética a um comprimento de onda característico, transfere esta radiação para o íon Eu(III), resultando em um pico de emissão atômica estreito e intenso, característico da emissão do íon lantanídeo a 615 nm. Deste modo, o pico de emissão atômico do Eu(III) aparece em uma região espectral distante da possível interferência da matriz.¹³⁷ Adicionalmente, pesquisas demonstraram que a intensidade da fluorescência em meios micelares de tensoativos não-iônicos é grandemente amplificada,^{5,130}

Tabela 2. Determinação de fármacos com fluorescência nativa em fase sólida

| Princípio ativo | Classificação | Metodologia empregada para gerar luminescência | Faixa de análise | Limite de detecção | Marca (forma farmacêutica) e Fabricante | Ref. |
|--|--|--|--|------------------------------|---|------|
| Ácido acetilsalicílico | Antipirético Analgésico | Fluorescência nativa do fármaco diretamente em fase sólida. $\lambda_{exc} = 288$ nm; $\lambda_{em} = 318$ nm. | 50 – 170 mg g ⁻¹ | 2,2 mg g ⁻¹ | Amostras magistrais (comprimido), não informados | 19 |
| Ácido acetilsalicílico | Antipirético Analgésico | Fluorescência nativa do fármaco diretamente em fase sólida. $\lambda_{exc} = 288$ nm; $\lambda_{em} = 318$ nm. Empregando calibração multivariada. | 50 – 170 mg g ⁻¹ | Não informado | Amostras preparadas em laboratório (comprimido) | 125 |
| Ácido acetilsalicílico | Antipirético Analgésico | Fluorescência nativa do fármaco impregnado em papel de filtro quantitativo. $\lambda_{exc} = 298$ nm; $\lambda_{em} = 411$ nm. | 10 – 400 μ mol L ⁻¹ | 4 μ mol L ⁻¹ | Aspirina® (comprimido), Bayer; AAS® (comprimido), não informado | 135 |
| Ácido 2-fenil-benzimidazol-5-sulfônico | Filtro solar | Fluorescência nativa do fármaco retido em SAX (cloreto de trimetilaminopropil), empregando sistema de fluxo seqüencial. $\lambda_{exc} = 301$ nm; $\lambda_{em} = 681$ nm. | 0,001 – 2,5 μ g mL ⁻¹ | 12 ng mL ⁻¹ | Não analisa amostras farmacêuticas | 112 |
| Amilorida | Diurético | Fluorescência nativa do fármaco retido em Sephadex SP-C25, empregando sistema por injeção em fluxo. $\lambda_{exc} = 291$ nm; $\lambda_{em} = 419$ nm. | 10 – 600 μ g L ⁻¹ | 0,92 μ g L ⁻¹ | Ameride® (comprimido), Dupont PharmaKalten® (comprimido), Zeneca Farma | 113 |
| Carbamazepina | Anticonvulsivo | Fluorescência em estado sólido do fármaco suportado em membranas de nylon, empregando calibração multivariada. | Não informado | Não informado | Carbamazepina (comprimido), Denver Farma; Tegretol® (comprimido), Novartis; Tegretol® (suspensão oral), Novartis | 114 |
| Cloroquina (fosfato) | Antimalárico Antireumático | Fluorescência nativa do fármaco diretamente em fase sólida. $\lambda_{exc} = 290$ nm; $\lambda_{em} = 413$ nm. | 300 – 700 mg g ⁻¹ | 90 mg g ⁻¹ | Amostras magistrais (cápsulas) | 133 |
| Naproxeno | Antiinflamatório, analgésico, antipirético | Fármaco extraído em membrana de fase reversa, medindo a fluorescência nativa do naproxeno diretamente na superfície sólida. $\lambda_{exc} = 272$ nm; $\lambda_{em} = 350$ nm. | 0,014 – 0,250 μ g mL ⁻¹ | 5 ng mL ⁻¹ | Aplicado em análise de soro | 70 |
| Paracetamol | Antipirético Analgésico | Fluorescência nativa do fármaco diretamente em fase sólida. $\lambda_{exc} = 333$ nm; $\lambda_{em} = 382$ nm. | 100 – 400 mg g ⁻¹ | 13 mg g ⁻¹ | Amostras preparadas em laboratório (comprimido) | 20 |
| Triamtereno | Diurético | Fluorescência nativa do fármaco retido em Sephadex SP-C25, empregando sistema por injeção em fluxo. $\lambda_{exc} = 240$ nm; $\lambda_{em} = 440$ nm. | 10 – 400 ng mL ⁻¹ | 0,95 ng mL ⁻¹ | Triniagar® (comprimido), não informado Salidur® (comprimido), não informado | 115 |

permitindo a determinação de alguns fármacos em matrizes onde se encontram a níveis de traços, como em alimentos.⁵

Complexos formados entre fármacos e compostos orgânicos como 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol e 4-cloro-7-nitrobenzofurazan para determinar gentamicina¹⁰⁹ e nortriptilina,¹¹⁰ respectivamente, permitiram a quantificação destes fármacos a níveis de μ g mL⁻¹.

Fluorescência nativa de íons metálicos

A quantificação da intensidade fluorescente emitida por compostos

que possuem fluorescência nativa e que, por sua vez, reagem estequiometricamente com o fármaco de interesse tem sido amplamente utilizada na determinação de princípios ativos.^{64,75–77,81,123}

O íon cérico é um reagente oxidante bastante versátil que reage estequiometricamente com vários fármacos. Sua forma reduzida apresenta fluorescência a 357 nm em meio ácido, tendo sido empregado na análise em batelada e em fluxo de princípios ativos como os antibióticos amoxicilina¹²³ e aztreonam;⁷⁵ dipirona;⁷⁶ isoniazida (tuberculostático);⁷⁷ cloreto de isoxsuprina⁶⁴ (vasodi-lataador) e cloreto de ritodrina (simpatomimético).⁸¹

Tabela 3. Determinação de fármacos baseada na formação de complexos

| Princípio ativo | Classificação | Metodologia empregada para gerar luminescência | Faixa de análise | Limite de detecção | Marca (forma farmacêutica) e Fabricante | Ref. |
|---|--|--|--|---|--|------|
| Ácido nalidíxico | Antibiótico Quimioterápico | Fluorescência do complexo entre o fármaco e γ -ciclodextrina em pH 2,8. $\lambda_{exc} = 314$ nm; $\lambda_{em} = 357$ nm. | 0,1 – 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 14 ng mL ⁻¹ | Análise de urina | 102 |
| Dapsona | Antileprótico antimalárico | Fluorescência do complexo entre o fármaco e a β -ciclodextrina na presença de álcoois lineares (1-butanol ou 1-pentanol) a 1% (v/v). | 3,4 – 1,5x10 ³ ng mL ⁻¹ | 1,02 ng mL ⁻¹ | Balance® (comprimido), Pharmaceutical Factory Shangai Sunve® (comprimido), Shangai Pharmaceutical Co. Ltd. | 94 |
| Diclofenaco de sódio | Antiinflamatório | Fluorescência do complexo (1:1) formado pelo fármaco e a α -ciclodextrina em solução aquosa. | 0 – 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,07 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Damixa® (comprimido), Merck Dioxaflex® (comprimido), Bagó Vesalion® (comprimido), Argentia Voltarén® (comprimido), Novartis Prozac® (comprimido), não informado Adofen® (comprimido), não informado Reneuronl® (comprimido), não informado | 95 |
| Fluoxetina | Antidepressivo | Fluorescência do complexo (1:1) formado pelo fármaco (fluoxetina) e a metil- β -ciclodextrina. $\lambda_{exc} = 224$ nm; $\lambda_{em} = 294$ nm. | 40 – 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ | 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ | Prozac® (comprimido), não informado Adofen® (comprimido), não informado Reneuronl® (comprimido), não informado | 117 |
| Ibuprofeno | Antiinflamatório Antipirético Analgésico | Fluorescência do complexo (1:1) entre o fármaco e a β -ciclodextrina em hidróxido de sódio (10 > pH > 7). | 0,1 – 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Ibuprofeno (comprimido), Aria Ibuprofeno (comprimido), Rouzdarou | 96 |
| Ibuprofeno | Antiinflamatório Antipirético Analgésico | Fluorescência do complexo (1:1) fármaco – β -ciclodextrina em NH ₃ 0,02 mol L ⁻¹ , a 10 °C. | 4,7 – 58 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 1,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Druisel Ibuprofeno® (comprimido), Northia IBU-Buscapina® (comprimido), Boehringer Ingelheim Ibupirac Fem® (comprimido), Monsanto Ibupirac Migra® (comprimido), Monsanto Ibupirac Flex® (comprimido), Monsanto | 97 |
| Menadiona | Vitamina K ₃ Antitumoral | Fluorescência do complexo (1:1) menadiona – β -ciclodextrina em tampão citrato (pH 6,2). | 0,1 – 2,0 mg L ⁻¹ | 0,022 mg L ⁻¹ | Vitaencil CKP® (comprimido), Wassermann Lab. BIO-HUBBER® (comprimido), ICN Ibérica S.A. | 98 |
| Piroxicam | Antiinflamatório | Fluorescência do complexo (1:2) formado pelo fármaco (fluoxetina) e a β -ciclodextrina em pH ácido (3,5). $\lambda_{exc} = 320$ nm; $\lambda_{em} = 450$ nm. | 0,02 – 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Solocalm® (cápsulas), Microsules-Bernabo | 99 |
| Ácido Flufenâmico (derivado do ácido antranílico) | Antiinflamatório | Fluorescência do complexo ternário formado pelo fármaco, térbio (III) e óxido de trioctilfosfina em solução aquosa de Triton X-100. | 4x10 ⁻¹⁰ – 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ | 2x10 ⁻¹⁰ mol L ⁻¹ | Análise de soro | 100 |
| Ácido Mefenâmico (derivado do ácido antranílico) | Antiinflamatório | Fluorescência do complexo ternário formado pelo fármaco, térbio (III) e óxido de trioctilfosfina em solução aquosa de Triton X-100. | 4x10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ | 2x10 ⁻⁹ mol L ⁻¹ | Análise de soro | 100 |

Tabela 3. continuação

| Princípio ativo | Classificação | Metodologia empregada para gerar luminescência | Faixa de análise | Limite de detecção | Marca (forma farmacêutica) e Fabricante | Ref. |
|---|--|--|--|--|---|------|
| Ácido nalidíxico | Antibiótico Quimioterápico | Fluorescência do complexo formado pelo fármaco e o íon térbio (III) em tampão TRIS em pH 8,0. | 0,02 – 7,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | $6,0 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ | Análise de soro | 101 |
| Ácido <i>p</i> -amino-benzóico | Avalia indiretamente a função pancreática Componente de filtros solares | Fluorescência baseada na formação do complexo ternário formado pelo fármaco, térbio (III) e EDTA em meio básico de NaOH (pH 12,6). | 0,01 – 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | Análise de urina e soro | 103 |
| Ácido Tolfenâmico (derivado do ácido antranílico) | Antiinflamatório | Fluorescência do complexo ternário formado pelo fármaco, térbio (III) e óxido de trioctilfosfina em solução aquosa de Triton X-100. | $10^{-9} - 10^{-5} \text{mol L}^{-1}$ | $5 \times 10^{-10} \text{mol L}^{-1}$ | Análise de soro | 100 |
| Furosemida (derivado do ácido antranílico) | Diurético | Fluorescência do complexo ternário formado pelo fármaco, térbio (III) e óxido de trioctilfosfina em solução aquosa de Triton X-100. | $10^{-9} - 10^{-5} \text{mol L}^{-1}$ | $5 \times 10^{-10} \text{mol L}^{-1}$ | Análise de soro | 100 |
| Norfloxacina | Antibiótico | Fluorescência do complexo formado pelo fármaco e o íon térbio (III) em tampão TRIS em pH 8,0. | 0,4 – 9,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Análise de soro | 101 |
| Ácido nalidíxico | Antibiótico Quimioterápico | Fluorescência dos quelatos do fármaco-metal. Os quelatos foram obtidos com os seguintes metais: zircônio ^a ; molibdênio ^b ; vanádio ^c e tungstênio ^d | ^{a,b,c,d} 10 – 60 ng mL^{-1} | ^a 1,8 ng mL^{-1} ^b 1,7 ng mL^{-1} ^c 1,3 ng mL^{-1} ^d 1,8 ng mL^{-1} | Nalidixic® (comprimido), Elnasr Pharm. Chem. Co | 104 |
| Ciprofloxacina | Antibiótico | Fluorescência dos quelatos do fármaco-metal. Os quelatos foram obtidos com os seguintes metais: zircônio ^a ; molibdênio ^b ; vanádio ^c e tungstênio ^d | ^{a,b,c,d} 10 – 60 ng mL^{-1} | ^a 1,5 ng mL^{-1} ^b 1,4 ng mL^{-1} ^c 1,5 ng mL^{-1} ^d 1,8 ng mL^{-1} | Serviflox® (comprimido), Novartis Pharma Cipro otic® (gotas), Chemical Industries Development Ciprofloxacina® (injeção), Amriya Pharmaceuticals | 104 |
| Norfloxacina | Antibiótico | Fluorescência dos quelatos do fármaco-metal. Os quelatos foram obtidos com os seguintes metais: zircônio ^a ; molibdênio ^b ; vanádio ^c e tungstênio ^d | ^{a,b,c,d} 10 – 60 ng mL^{-1} | ^a 1,3 ng mL^{-1} ^b 1,5 ng mL^{-1} ^c 1,6 ng mL^{-1} ^d 1,7 ng mL^{-1} | Spectrama® (comprimido), Amoun Pharm. Ind. Co. Norbactin® (comprimido), RanbaxyOpto Q3 eye® (gotas), Chemical Industries Development | 104 |
| Ofloxacina | Antibiótico | Fluorescência dos quelatos do fármaco-metal. Os quelatos foram obtidos com os seguintes metais: zircônio ^a ; molibdênio ^b ; vanádio ^c e tungstênio ^d . | ^{a,b,c,d} 10 – 60 ng mL^{-1} | ^a 1,2 ng mL^{-1} ^b 1,5 ng mL^{-1} ^c 1,8 ng mL^{-1} ^d 1,5 ng mL^{-1} | Tarivid® (comprimido), Hoechst Ofloxacina® (comprimido), Sedico Pharm. Co. | 104 |
| Pefloxacina | Antibiótico | Fluorescência dos quelatos do fármaco-metal. Os quelatos foram obtidos com os seguintes metais: zircônio ^a ; molibdênio ^b ; vanádio ^c e tungstênio ^d . | ^{a,b,c,d} 10 – 60 ng mL^{-1} | ^a 1,5 ng mL^{-1} ^b 1,8 ng mL^{-1} ^c 1,7 ng mL^{-1} ^d 1,6 ng mL^{-1} | Peflacin® (ampola), Rhone-Poulenc Rorer | 104 |
| Amicasina | Antibiótico | Fluorescência do íon Eu^{3+} aumentada na presença do fármaco em pH 5,5. | 10 – 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 2,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Amikin® (ampola), Briston Co. | 78 |

Tabela 3. continuação

| Princípio ativo | Classificação | Metodologia empregada para gerar luminescência | Faixa de análise | Limite de detecção | Marca (forma farmacêutica) e Fabricante | Ref. |
|-------------------|--------------------------------|--|--|--|---|------|
| Clorotetraciclina | Antibiótico | Fluorescência íon Eu^{3+} aumentada na presença do fármaco. | Não informada | 2 ng mL^{-1} | Não reportada | 132 |
| Diclofenaco | Antiinflamatório | Fluorescência íon Eu^{3+} aumentada na presença do fármaco. | $10 - 200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ | Não reportado | Voltaren® (comprimido), Ciba Giegy Rheumafen® (cápsula), Apic Co. Voltaren® (ampola), Ciba Giegy Voltaren® (suspensão), Ciba Giegy Voltaren® (ungüento), Ciba Giegy | 105 |
| Doxiciclina | Antibiótico | Fluorescência íon Eu^{3+} aumentada na presença do fármaco. | Não informada | 3 ng mL^{-1} | Não reportada | 132 |
| Gentamicina | Antibiótico | Fluorescência do íon Eu^{3+} aumentada na presença do fármaco em pH 5,5. | $10 - 70 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ | $2,6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ | Gentamicina (ungüento), Memphis Co. Gentamicina (ampola), Memphis Co. | 78 |
| Kanamicina | Antibiótico | Fluorescência do íon Eu^{3+} aumentada na presença do fármaco em pH 5,5. | $10 - 70 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ | $2,2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ | Kanamicina (solução), não informado | 78 |
| Neomicina | Antibiótico | Fluorescência do íon Eu^{3+} aumentada na presença do fármaco em pH 5,5. | $20 - 100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ | $2,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ | Neomicina (comprimido), Memphis Co. | 78 |
| Piroxicam | Antiinflamatório | Fluorescência do íon Eu^{3+} aumentada na presença do fármaco em metanol e pH 9,0 (tampão TRIS). | $0,1 - 2,00 \text{ mg mL}^{-1}$ | $23,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ | Não relatada (comprimido), não informado Não relatada (cápsula), não informado | 106 |
| Tetraciclina | Antibiótico | Fluorescência do íon Eu^{3+} aumentada na presença do fármaco. | Não informada | 1 ng mL^{-1} | Não relatada | 132 |
| Tobramicina | Antibiótico | Fluorescência do íon Eu^{3+} aumentada na presença do fármaco em pH 5,5. | $10 - 70 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ | $2,6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ | Nebcin® (ampola), Lily França S.A. | 78 |
| Cloroxina | Antimicótico | Fluorescência do complexo fármaco - alumínio (III), em meio micelar de lauril sulfato de sódio, em estado estacionário ^a e em sistema por injeção em fluxo ^b . | ^a $0,02 - 51 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ^b $0,56 - 56 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ | ^a $5,0 \text{ nmol L}^{-1}$ ^b $0,13 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ | Não informado (comprimido), não informado Não informado (pílula), não informado | 107 |
| Norfloxacin | Antibiótico | Fluorescência do complexo fármaco - alumínio (III) em meio micelar de dodecil sulfato de sódio em pH 4.0 | $0,003 - 6,8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ | $0,4 \text{ ng mL}^{-1}$ | Senro® (cápsula), Biosart Espeden® (comprimido), Vita Vicasl® (comprimido), Semar Baccial® (comprimido), Pharmaceuticals S.A. Noroxin® (comprimido), Merk Sharp and Dohme S.A. Uroctal Norfloxacin® (comprimido), Funkk S.A. Amicrobin® (cápsula), Hosbon, S.A. Chibroxin® (solução), Merk Sharp and Dohme-Chibret | 108 |
| Tenoxicam | Antiinflamatório Analgésico | Fluorescência do complexo (1:1) fármaco-alumínio (III) em ácido nítrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. | $16 - 100 \text{ ng mL}^{-1}$ | $4,7 \text{ ng mL}^{-1}$ | Epicotil® (comprimido), não informado Epicotil® (supositório), não informado Epicotil® (pó liofilizado), não informado | 74 |

Tabela 3. continuação

| Princípio ativo | Classificação | Metodologia empregada para gerar luminescência | Faixa de análise | Limite de detecção | Marca (forma farmacêutica) e Fabricante | Ref. |
|-----------------|----------------|---|----------------------------------|----------------------------|--|------|
| Gentamicina | Antibiótico | Fluorescência do aduto formado pelo fármaco com 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, em solução 1:1 (v/v) de metanol e tampão fosfato em pH 7,2. | 0,56 – 2,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Gentam [®] (injeção), Spimaco Gentam [®] (gotas), Spimaco Gentamicin (ungüento), Schering-Plugh | 109 |
| Nortriptilina | Antidepressivo | Fluorescência do aduto formado pelo fármaco com 4-cloro-7-nitrobenzofurazan. | 0,6 – 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 0,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Martimil [®] (comprimido), Alonga S.A. Norfenazina [®] (comprimido), Alonga S.A. Paxtibi [®] (comprimido), Dista S.A. Tropargal [®] (comprimido), Alonga S.A. | 110 |
| Dopamina | Catecolamina | Fluorescência baseada na formação do complexo obtido da condensação de etilenodiamina com o produto de oxidação da dopamina com nitrato de mercúrio (II). | 0,02 – 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Não relatado | Amostras injetáveis, fabricante não informado | 15 |

O íon fluorescente TlCl_3^{2-} formado pela redução quantitativa do íon Tl^{3+} na presença do fármaco em meio de ácido clorídrico tem sido explorado na quantificação em fluxo de fármacos contendo grupos tióis como a tiopronina (*N*-2-mercaptopropionilglicina) e a penicilamina (3-mercapto-D-valina),⁷⁹ empregados no tratamento de doenças do fígado e pele, e na artrite reumatóide, respectivamente.

Fluoróforos obtidos por derivatização do fármaco

Processos mais complexos, com a finalidade de converter o fármaco em um derivado fluorescente,^{15,82-84} permitindo aumentar ou gerar fluorescência a partir de compostos não fluorescentes, têm sido propostos.

Desta forma, o ácido ascórbico (vitamina C) tem sido quantificado em batelada e em fluxo em diferentes formulações comerciais, através da fluorescência da quinoxalina obtida pela reação de *o*-fenilendiamina com o ácido deidroascórbico (produto da oxidação aeróbia do fármaco).¹² O antihipertensivo captropil, foi quantificado a partir da fluorescência do ácido 1,2-diidroxi-naftaleno-4-sulfônico, produto da redução estequiométrica do ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico na presença do fármaco.¹³ A dopamina foi determinada através da fluorescência do produto de condensação da etilenodiamina com a DOPAquinona, produto de oxidação da dopamina com nitrato de mercúrio (II), permitindo analisar dopamina na faixa de concentração em níveis biológicos (ng mL^{-1}).¹⁵

Aly⁸² desenvolveu uma metodologia para a determinação de cloreto de prenalterol, agente simpatomimético, baseada na derivatização deste fármaco em duas etapas, na primeira, é realizada a derivatização para obter um nitro-derivado, e na segunda o fármaco nitrogenado reage com 2-cianoacetamida em meio amoniacal, obtendo-se um composto fluorescente.

O anestésico procaína foi determinado pelo composto fluorescente obtido da reação do fármaco com a fluorescamina em tampão citrato/fosfato em pH 4,0,⁸³ permitindo a determinação deste anestésico na faixa de concentração de ng mL^{-1} . Finalmente, a tiamina (vitamina B₁) foi quantificada através da fluorescência emitida pelo composto 1-alquil-tio-2-alquil-isoindol, obtido da derivatização do grupo amino primário da vitamina com o *o*-ftalaldeído na presença de 2-mercaptoetanol.

Quantificação de fármacos baseada em diversos tipos de reações

Determinação de fármacos baseada em reações fotoquímicas

A combinação de reações fotoquímicas com detecção fluorimétrica em sistemas hidrodinâmicos tem demonstrado ser uma estratégia versátil, simples, seletiva e sensível para a determinação de diversos fármacos em medicamentos.⁸⁸⁻⁹¹ Desta forma, o antiinflamatório diclofenaco tem sido quantificado sob diferentes apresentações comerciais (suspensão, comprimido, supositório), empregando análise por injeção seqüencial (SIA) após irradiação com radiação ultravioleta (279 nm) durante 30 s. Após este tempo a solução de diclofenaco apresenta uma nova banda de emissão em 420 nm, com uma intensidade 485 vezes maior quando comparada com a banda de fluorescência do diclofenaco em sua forma nativa em 310 nm.⁸⁸

A vitamina K₃ (menadiona) foi determinada através da quantificação de sua forma reduzida (diidronaftoquinona), fotoquimicamente obtida pela irradiação UV de uma solução do fármaco preparada em meio micelar de doceilsulfato de sódio (no qual é solúvel) e empregando análise por injeção em fluxo.⁸⁹

O antibiótico sulfametazina foi determinado em diferentes preparações comerciais (comprimido, pó, suspensão), através da fluorescência induzida fotoquimicamente a 287 nm, na presença de sulfíto de sódio e tampão borato (pH 8,8) empregando sistema por injeção em fluxo.⁹⁰ De forma similar, a fluorescência da tiamina tem sido induzida através da reação fotoquímica empregando radiação ultravioleta de 370 nm na presença de uma solução aquosa contendo 2% de NaOH e 0,4% de sulfíto de sódio.⁹¹

Determinação baseada na hidrólise de fármacos

Muitos fármacos apresentam fluorescência nativa fraca, contudo a intensidade da emissão pode aumentar após hidrólise ácida,⁹³ básica^{120,121} ou até ser promovida em meio orgânico e catalisada por íons metálicos.⁹² Neste sentido, Fernández e colaboradores descreveram um método para determinação de ampicilina em cápsula e suspensão, baseada na hidrólise ácida (pH 3,7) do fármaco, catalisada pelo íon cúprico em meio micelar de dodecilsulfato de sódio empregando sistema em fluxo.⁹²

A fluorescência nativa do salicilato (produto da hidrólise básica) foi aproveitada por Martos e colaboradores¹²¹ na quantificação de ácido acetilsalicílico em comprimidos e empregando calibração multivariada. Linares e colaboradores¹³⁵ também determinaram ácido acetilsalicílico a partir da quantificação da fluorescência em matriz sólida do salicilato em amostras de fármacos e de soro sanguíneo.

Por outro lado, os sedativos derivados das benzodiazepinas, diazepam, oxazepam e nitrazepam, foram quantificados após hidrólise em meio de ácido sulfúrico e etanol para os dois primeiros e em metanol para o último.⁹³

O antimicótico tolnaftato foi satisfatoriamente determinado após hidrólise em meio básico para formar o fluoróforo β -naftolato, em preparações comerciais na forma de creme e pó.⁶¹

Determinação baseada na cinética da reação luminescente de fármacos

Outros tipos de configurações menos exploradas, tais como a inibição da velocidade de oxidação¹ ou de redução¹¹¹ de compostos fluorescentes, na presença do fármaco têm sido descritos na literatura.

Feng e colaboradores¹ descreveram a determinação de ácido ascórbico ao nível de traços, baseada na inibição da velocidade de oxidação do fluoróforo pironina Y pelo nitrito na presença de ácido ascórbico. O método foi convenientemente empregado na determinação de ácido ascórbico em comprimidos, injeções, vegetais, frutas e bebidas.

Por outro lado, Pérez e colaboradores¹¹¹ descreveram um método em fluxo para a determinação do hipotensivo nitroprussida, baseado na inibição da velocidade de fotorredução do fluoróforo fluoxina (fluorescência rosa, $\lambda_{\text{emissão}} = 543$ nm) pelo EDTA na presença do fármaco. Quando uma solução contendo fluoxina e EDTA é irradiada na ausência de oxigênio com luz branca em um pH adequado, a fotorredução do fluoróforo ocorre e a cor rosa desaparece. Na presença de nitroprussida a velocidade da reação fotoquímica diminui grandemente e esta mudança pode ser quantificada pela intensidade de fluorescência da fluoxina. Esta inibição pode ser explicada pela interação entre a nitroprussida com o estado triplete da fluoxina, assim a redução da cor devido à reação com o EDTA é impedida. O método foi aplicado satisfatoriamente na determinação do fármaco em preparações farmacêuticas e em soro sanguíneo.

Fluorescência nativa da espécie oxidada ou reduzida do princípio ativo

A fluorescência inerente das espécies oxidadas e reduzidas de fármacos não fluorescentes tem sido aplicada na determinação de ácido fólico,¹³⁸ vitamina K₃⁸⁶ e prenalterol.⁸⁷ Zhang e Tang¹³⁸ descrevem a determinação de ácido fólico pela oxidação on line do fármaco com chumbo em um sistema em fluxo. A metodologia foi empregada na determinação em comprimidos e em teste de dissolução de medicamentos.

A vitamina K₃ foi determinada pela fluorescência inerente da espécie reduzida do fármaco, obtida pela reação com zinco metálico em meio de ácido clorídrico, empregado na forma de um reator de fase sólida em um sistema em fluxo. A metodologia foi empregada na determinação de vitamina K₃ em diferentes formulações comerciais (comprimidos, solução e injetáveis) com sucesso.

Finalmente, o agente simpatomimético prenalterol foi determinado a partir da quantificação da forma oxidada fluorescente do fármaco pela ação de hexacianoferrato de potássio em tampão borato a pH 9,2, sendo aplicada na determinação do fármaco em comprimidos e injetáveis.⁸⁷

Determinação de fármacos por métodos indiretos

A determinação indireta de fármacos tem sido aplicada para quantificação de anti-inflamatórios, antibióticos e vitaminas.^{14,16,17,85} Suárez e Díaz¹⁴ desenvolveram um método para determinar cloramfenicol através de um ensaio competitivo fluorescente realizado em fluxo e baseado na competição pelos sítios de reconhecimento em um polímero sintético com impressão molecular (MIP), ao qual estão ligadas moléculas de estrutura análoga ao fármaco marcadas com reagente fluorescente. De modo similar, Rachkov e colaboradores¹³⁹ descreveram um método para determinação de β -estradiol, baseado em um ensaio imuno-fluorescente acoplado à cromatografia líquida e MIPs.

Os fármacos piroxicam e propanolol foram quantificados indiretamente, através da medida da intensidade emitida pelo fluoróforo formado da reação entre a *N*-bromosuccinimida e cloreto de metildilazina.¹⁷ O método envolve a oxidação inicial dos fármacos com um excesso conhecido de *N*-bromosuccinimida, seguida da geração do fluoróforo pela reação da *N*-bromosuccinimida não consumida com cloreto de metildilazina.

A determinação indireta das vitaminas K₁ e K₃ também tem sido relatada na literatura.^{16,85} Pérez e colaboradores⁸⁵ desenvolveram um método para determinar vitamina K₁ em fluxo, através da medida da fluorescência do ácido hidroxibenzoico (fluoróforo), quantitativamente gerado pela oxidação do ácido benzoico com peróxido de hidrogênio e catalisada pelo íon ferroso. O peróxido de hidrogênio foi estequiometricamente gerado, pela oxidação fotoquímica com radiação UV, da glicose na presença da vitamina.

Determinação de fármacos baseada na supressão de fluorescência

Metodologias baseadas na supressão da fluorescência têm sido empregadas para determinação de diversos analitos de interesse em inúmeras áreas de pesquisa. A teoria da supressão fluorescente tem sido descrita na literatura¹⁴⁰⁻¹⁴⁹ e basicamente é governada pela Equação de Stern-Volmer (Equação 1):

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (1)$$

onde, I_0 e I são, respectivamente, a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do fármaco supressor de fluorescência, $[Q]$ a concentração do fármaco e K_{sv} é a constante de Stern-Volmer. Esta equação permitirá a quantificação do fármaco de interesse.

Baseado neste princípio, alguns grupos de pesquisa têm proposto metodologias de análise para antibióticos (derivados das cefaloporias, metronidazol e tetraciclina)^{21,22,126,128} e anti-micóticos.¹²⁷

Por exemplo, Bebawy e colaboradores¹²⁶ descreveram um método altamente sensível para quantificar cefoperazona de sódio, cefazolina de sódio, cefixima e ceftriaxona de sódio, todos antibióticos da família das cefalosporinas. O método baseia-se na supressão da fluorescência do íon térbio (III) em tampão TRIS quando o complexo ternário entre o Tb³⁺-TRIS-Fármaco é formado. Um pH de 10 permitiu a quantificação da cefoperazona de sódio, e um pH de 8 permitiu a determinação dos outros fármacos. A metodologia foi satisfatoriamente aplicada em formulações comerciais com diferentes apresentações, como soluções e cápsulas.

A determinação de formaldeído, que possui propriedades terapêuticas como anti-séptico e antimicótico, foi proposta através da supressão da fluorescência do bromato de acridina amarela pelo íon brometo, catalisada pelo fármaco (formaldeído) em meio ácido, empregando sistema por injeção em fluxo. A metodologia foi satisfatoriamente aplicada na determinação de preparação comercial (Vibero[®]) contendo 45 mg mL⁻¹ de fármaco, assim como na análise

de alimentos e ambiental.¹²⁷

Os antibióticos metronidazol e tetraciclina também foram quantificados através da supressão da fluorescência. Sulkowska¹²⁸ relatou a determinação de metronidazol a partir da supressão da fluorescência dos resíduos de triptofanil contidos na proteína de soro albumina na presença do fármaco. A metodologia foi aplicada na determinação de metronidazol em comprimidos. A determinação da tetraciclina foi realizada através de um sensor construído empregando como fase sensora uma membrana plastificada imobilizada na ponta de um feixe bifurcado de fibras ópticas. A membrana foi preparada imobilizando o fluoróforo 1,4-*bi*(5,5'-dimetilbenzoxazol-1',3'-il-2') benzeno em uma matriz polimérica de PVC e *bis*(2-etilhexil)sebacato (DOS). Na presença do fármaco a intensidade de fluorescência diminui e esta pode ser relacionada com a concentração de tetraciclina presente na amostra. A metodologia foi aplicada na determinação do fármaco em comprimidos.²²

Determinação de fármacos através de reações quimiluminescentes

A análise empregando quimiluminescência oferece alta sensibilidade, ampla faixa de resposta linear e instrumentação simples. A vitamina K₃ tem sido quantificada pela medida da quimiluminescência gerada pela reação entre luminol e peróxido de hidrogênio, catalisada por hematina.¹⁶ Neste caso, o peróxido de hidrogênio é estequiometricamente gerado pela oxidação fotoquímica, com radiação UV, de etanol na presença da vitamina.

Quando acoplada a sistemas em fluxo, a quimiluminescência fornece uma metodologia de baixo custo, rápida, simples e altamente reprodutível para a quantificação, com sucesso, de fármacos como cefmetazol,⁴⁶ gentamicina,⁴⁹ dipirona,^{3,55,56} cloranfenicol,⁵² antibióticos derivados da fluoroquinolona⁴⁵ e filtros solares.⁵⁷

Fukutsu e colaboradores⁴⁶ determinaram cefmetazol, um derivado semi-sintético do antibiótico cefamicina, em um sistema por injeção em fluxo. Neste sistema a quimiluminescência entre o antibiótico e o luminol foi induzida pela oxidação do luminol com a espécie superóxido, gerada da decomposição do grupo β-lactâmico do antibiótico em meio alcalino.¹⁵⁰ Esta metodologia permitiu a determinação de traços deste fármaco em águas de limpeza de equipamentos industriais, como reatores, centrífugas, filtros, pulverizadores e tanques da indústria farmacêutica Sankyo Co. Ltd.⁴⁶

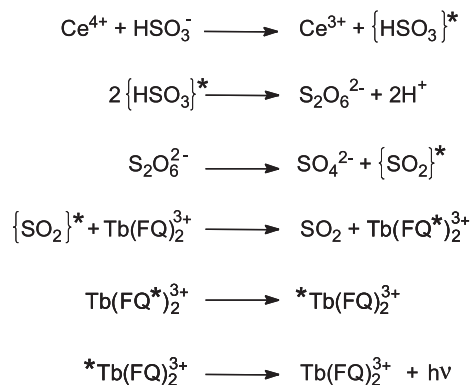
O antibiótico gentamicina tem sido quantificado empregando análise em fluxo e a quimiluminescência do complexo peróxi-oxalato.⁴⁹ Neste caso, o fármaco foi previamente derivatizado com *o*-ftalaldeído, com a finalidade de obter o ativador necessário para a reação. O catalisador usado foi o imidazol e a reação quimiluminescente foi realizada empregando dodecilsulfato de sódio (meio micelar) como carregador para evitar a degradação do peróxi-oxalato. A metodologia permitiu a determinação de gentamicina em várias formulações oftálmicas comerciais, permitindo análises na faixa de concentrações entre 4 e 30 µg mL⁻¹.

A determinação da dipirona foi realizada pela geração da luminescência após a oxidação do grupo sulfito da analgina (SO₃²⁻) pelo MnO₂ em meio ácido para formar dióxido de enxofre excitado (SO₂^{*}). Para aumentar a intensidade luminescente foi adicionada Rodamina B (fluoróforo) que gera uma luminescência mais intensa, após sua reação com o SO₂^{*}, uma vez que a energia adicional do sulfito pode ser facilmente transferida a um fluoróforo intencionalmente adicionado ao sistema. Esta metodologia foi aplicada na determinação do fármaco em comprimidos como Dipirona[®], Novalgina[®] e Metamizol[®] e em testes de dissolução.⁵⁵ Huang e colaboradores⁵⁶ determinaram dipirona pela auto-oxidação do grupo sulfito em meio de ácido sulfúrico contendo 0,1% de Tween 80 (meio micelar) e empregando

Rodamina 6G para aumentar a sensibilidade do método.

A determinação do cloranfenicol, um nitro composto, foi realizada pela geração química da luminescência da reação entre os produtos da fotólise em solução aquosa do cloranfenicol, luminol e cobalto(II). A fotólise foi realizada empregando lâmpada de mercúrio de baixa pressão como fonte de irradiação. Neste processo os produtos da fotólise (4-nitrobenzaldeído em maior proporção) oxidam o luminol, sendo catalisado pelo íon Co²⁺. A metodologia foi empregada para a determinação do fármaco em diversas marcas comerciais de colírios, assim como em outros fármacos nitro-derivados como nitrofurantoina, metronidazol e nitroprussida.⁵²

Fármacos derivados da fluoroquinolona (FQ) foram quantificados pela luminescência gerada na reação entre a fluoroquinolona complexada com íons lantanídeos e a molécula de SO₂^{*}, que é o produto da reação entre sulfito e íon cérico. Foram avaliadas as respostas para levofloxacina, moxifloxacina e trovafloxacina. Os íons lantanídeos empregados para complexar cada fármaco foram Eu³⁺ para os dois primeiros e Tb³⁺ para a trovafloxacina. O Esquema 5 mostra o mecanismo de determinação de trovafloxacina.⁴⁵



Esquema 5. Mecanismo global da formação de luminescência química na determinação de trovafloxacina. $\text{Tb}(\text{FQ})_2^{3+}$: complexo Têrbio (III) e fluoroquinolona (FQ)

É conhecido que nos últimos anos tem crescido enormemente o consumo e a produção de filtros solares, como consequência dos efeitos adversos que a irradiação UV pode causar à pele. Neste sentido, Townshend e colaboradores⁵⁷ relataram a quantificação de octil-dimetil-PABA, um filtro solar de grande absorvidade na região UV-B, através da quimiluminescência do fármaco induzida pelo íon MnO₄⁻ em meio ácido. Esta metodologia foi eficientemente empregada na determinação do filtro solar em cremes comercialmente disponíveis, permitindo identificar o composto em concentrações na ordem de ng mL⁻¹.

TENDÊNCIAS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Emprego de técnicas fluorimétricas não convencionais

No intuito de aumentar a sensibilidade e seletividade na determinação de compostos com fluorescência nativa outras técnicas fluorimétricas têm sido descritas. Dentre elas incluem-se a espectroscopia fluorescente sincronizada convencional,¹⁵¹ a espectroscopia sincronizada derivada,^{108,152,153,157} a espectroscopia fluorescente sincronizada de ângulo variável^{129,154,155} e a espectroscopia sincronizada isotopotencial.^{155,156}

Sabe-se que a fluorescência convencional envolve a obtenção de um espectro de emissão pela varredura em uma determinada faixa de comprimentos de onda (λ_{em}) quando uma amostra é irradiada com um

comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) fixo. De maneira similar, um espectro de excitação é obtido pela varredura nos diferentes comprimentos de onda de excitação enquanto se registra o sinal de emissão em um único comprimento de onda. Contudo, existe a possibilidade de variar simultaneamente λ_{exc} e λ_{em} , e dependendo da velocidade de varredura dos dois monocromadores é possível obter os diferentes formatos da técnica fluorimétrica conhecida como espectroscopia de fluorescência sincronizada.

Assim, se a velocidade de varredura é constante para os dois monocromadores, será gerado conseqüentemente um intervalo de comprimentos de onda ($\Delta\lambda$) constante entre λ_{exc} e λ_{em} e neste caso obtém-se a técnica conhecida como espectroscopia de fluorescência sincronizada convencional, a qual foi introduzida por Lloyd há mais de três décadas,¹⁵¹ sendo esta amplamente empregada. Nos casos em que a fluorescência de um composto é mascarada pelo espalhamento de Rayleigh, esta técnica permite uma melhora nas medidas em relação ao método convencional, desde que os $\Delta\lambda$ sejam apropriadamente selecionados, os quais podem ser rápida e convenientemente determinados a partir de gráficos tridimensionais.

Se os comprimentos de onda de excitação e emissão são variados simultaneamente, porém a diferentes velocidades, a técnica é conhecida como espectroscopia de fluorescência sincronizada de ângulo variável.^{129,155} Essas diferentes velocidades permitem a construção de planos em ângulos entre $+90^\circ$ e -90° ao eixo X de excitação em toda a extensão do espectro completo. Esta técnica é mais seletiva e foi proposta por Kubic em 1980,¹⁵⁴ e tem sido aplicada à determinação simultânea das vitaminas B₂ e B₆,¹⁵⁸ na determinação simultânea dos diuréticos, furosemida, triamteno e piretamida,¹²⁹ assim como em amostras ambientais de hidro-carbonetos aromáticos policíclicos.¹⁵⁹

Quando o ângulo da trajetória da varredura é variado continuamente para descrever algum caminho desejado, a técnica é conhecida como espectroscopia de fluorescência sincronizada de ângulo variável não-linear.¹⁵⁵ Esta técnica tem sido empregada na determinação seletiva de cloropromazina na presença de seu produto de degradação sulfóxido de cloropromazina e de oxitetraciclina na presença de aditivos colocados nas formulações farmacêuticas comerciais (vitamina C, tiamina, riboflavina, entre outros).¹⁶⁰

A introdução de artifícios matemáticos, como o emprego da derivada de primeira e segunda ordem em combinação com a fluorimetria sincronizada, tem sido empregada para aumentar as características espectrais minoritárias e para conseguir uma identificação mais confiável. Já a segunda derivada do espectro sincronizado pode ser útil para resolver bandas muito próximas nos casos de análise de misturas. As principais características desta técnica são a seletividade, sensibilidade, rapidez, simplicidade e baixo custo.¹⁵² A técnica tem sido empregada para determinar simultaneamente metilina e naftilina¹⁵³ e norfloxacin na presença de ácido nalidíxico, ambas aplicando-se a primeira derivada do espectro sincronizado. A norfloxacin foi determinada em urina empregando-se a segunda derivada do espectro sincronizado.¹⁰⁸ De la Pena e colaboradores¹⁵⁷ descreveram um método para determinação simultânea dos ácidos salicílico e salicílico na análise de urina, através da espectroscopia sincronizada com a primeira derivada.

Finalmente, em 1996 Pulgarin e Molina¹⁵⁵ reportaram uma nova técnica fluorimétrica chamada de espectroscopia de fluorescência sincronizada de matriz, isotopotencial, onde um programa computacional obtém uma trajetória juntando pontos com a mesma intensidade (trajetória isotopotencial) do espectro tridimensional completo. Esta técnica é especialmente útil para remover o sinal de fundo proveniente da matriz permitindo a determinação seletiva de algum composto em amostras complexas e tem sido satisfatoriamente aplicada na determinação de ácido gentsílico¹⁵⁵ e ácido nalidíxico¹⁵⁶ em urina.

Emprego de técnicas de separação com detecção fluorimétrica

As Tabelas 4 e 5 relacionam os fármacos que têm sido quantificados empregando métodos de separação como CLAE¹⁶¹⁻¹⁷⁷ (Tabela 4) e eletroforese capilar^{50,178-181} (Tabela 5) na análise de amostras complexas, como plasma e urina, ou na quantificação de misturas de fármacos e em estudos relacionados com bioequivalência, farmacocinética e biodisponibilidade. Desta forma, estas técnicas apresentam grande potencialidade de uso em situações específicas onde a matriz da amostra seja muito complexa.

A espectroscopia de luminescência exhibe inúmeras características vantajosas quando comparada com métodos já existentes e bem estabelecidos, pois compostos que aparentemente não apresentam fluorescência nativa poderão ser detectados através de técnicas fluorescentes não-convencionais. As técnicas não-convencionais conferem maior sensibilidade e seletividade à metodologia, uma vez que não é necessário realizar etapas prévias de separação, como ocorre nos métodos cromatográficos. Ressalta-se ainda que a implementação em análise de rotina destas técnicas não-convencionais não acarretará custo adicional de instrumentação, apenas dependerá de um treinamento e um software adequados para a execução dos experimentos e para o tratamento de dados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

O controle da qualidade de produtos farmacêuticos é um ramo da química analítica que tem um grande impacto econômico, social e principalmente na saúde pública, de forma tal que o desenvolvimento de metodologias analíticas confiáveis, rápidas e precisas para determinação de seus princípios ativos ainda é bem-vindo. Neste contexto, a espectroscopia de luminescência apresenta-se como uma técnica adequada e promissora para esses objetivos.

A literatura relata uma ampla gama de metodologias analíticas empregadas para a determinação fluorescente de fármacos, que vão desde a modificação do ambiente químico ao redor do analito para promover fluorescência em solução; derivatização ou complexação da molécula alvo com outras, para gerar uma espécie fluorescente; determinação da fluorescência em fase sólida, até o emprego de técnicas fluorimétricas mais sofisticadas, como espectroscopia sincronizada, espectroscopia sincronizada derivada e fluorescência de varredura de ângulo variável. As vantagens das análises por fluorescência incluem economia, redução no tempo de análise e na quantidade de rejeitos lançados ao meio ambiente, quando comparada com análises que empregam técnicas de separação acopladas com detecção fluorimétrica, visto que pode ser dispensado, em alguns casos, o pré-tratamento de amostra, e até o preparo de soluções nos casos da determinação fluorimétrica em fase sólida.

A versatilidade das técnicas de amostragem dos novos espectrômetros de luminescência, como o acoplamento de fibras ópticas, análise em fluxo e monitoramento em fase sólida, aliada às inúmeras possibilidades para obter compostos fluorescentes, poderá implementar novas metodologias baseadas em luminescência para determinação de substâncias de relevância terapêutica. Assim, a quantificação luminescente de analitos, como filtros solares orgânicos, ácido *p*-metocinâmico, 2-etil-metil-*p*-metoxicinamato¹⁸² e derivados da benzofenona,¹⁸³⁻¹⁹¹ substâncias estrogênicas, como os derivados do estradiol; e anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) como a indometacina, acetaminofeno, ibuprofeno, e muitos outros fármacos, será plausível dependendo apenas da habilidade do pesquisador para investigar e/ou explorar novas rotas alternativas que permitam quantificar esses analitos através da espectroscopia de luminescência.

Por outro lado, a análise fluorescente diretamente na matriz da amostra pode se tornar uma realidade, visto a excelente resposta

Tabela 4. Determinação de fármacos empregando CLAE e detecção fluorimétrica

| Princípio Ativo | Classificação | Amostra analisada | Ref. |
|--|---|---|------|
| Alcalóides derivados da efedrina{(-) – norefedrina, (+) – norpseudofedrina, (-) –efedrina, (+) –pseudo-efedrina, (-) – <i>N</i> -metilefedrina, (+) – <i>N</i> -metilpseudo-efedrina}e (±) – sinefrina | Estimulantes simpatomiméticos para perda de apetite e aumento muscular. | Comprimidos, cápsulas e pó | 161 |
| Ácido oxolínico | Antibiótico | Na planta <i>Fontinalis antipyretica</i> | 162 |
| Captopril | Antihipertensivo | Plasma, para estudos farmacocinéticos. | 163 |
| Derivados do ácido quinolónico (ácido nalidíxico, ácido 7-hidroxi-metilnalidíxico, ácido oxolínico, ácido piromídico, ácido pipemídico) e do ácido | Quimioterápicos Antibióticos | Urina, para monitoramento de 6 ácidos derivados de ácido quinolónico e cinolónico. cinolónico (cinoxacina) | 164 |
| Derivados das quinolonas (ciprofloxacina, danofloxacina, difloxacina, enrofloxacina, flumequina, marbofloxacina, ácido nalidíxico, ácido oxolínico e sarafloxacina) | Antibióticos | Carnes de frango, porco, bovino, ovino e peixe. | 165 |
| Derivados da tetraciclina (clorotetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina e tetraciclina) | Antibióticos | Comprimidos contendo cada fármaco individualmente. | 166 |
| Digoxina | Tratamento de falência cardíaca | Soluções de digoxina e seus metabólitos (digoxigenina, digoxigenina monodigitoxosida, digoxigenina bisdigitoxosida, dihidrodigoxina. Combina imuno-ensaio com HPLC. | 167 |
| Digoxina | Tratamento de falência cardíaca | Soro e plasma, para estudos farmacocinéticos. | 168 |
| Derivados das quinolonas (ácido nalidíxico, ácido oxolínico, ácido pipemídico, cinoxacina, ciprofloxacina, danofloxacina, difloxacina, flumequina e norfloxacina). | Antibióticos | Carnes de gado e porco. | 169 |
| Diuréticos (amilorida, bendroflumetiazida, bimetanida, furosemida, hidroflumetiazida, piretanida e triamtereno) | Diuréticos | Urina de voluntários sadios. | 170 |
| Estrógenos (17β-estradiol, 17α-etinilestradiol) | Anticoncepcionais | Amostras sintéticas de água contendo níveis de estrogênios na faixa de concentração de ng L ⁻¹ . | 171 |
| Estrógenos (estriol, 17α-estradiol, 17β-estradiol, 17α-etinilestradiol, 4-nonilfenol, bisfenol A) | Anticoncepcionais | Urina proveniente de voluntários de ambos os sexos. | 172 |
| Furosemida | Diurético | Leite de vaca na presença de outros diuréticos, drogas e antibióticos usadas na dieta do gado | 173 |
| Gliburida | Hipoglicêmico | Plasma, para realizar estudos farmacocinéticos, biodisponibilidade e bioequivalência. | 174 |
| Itraconazol | Antimicótico | Plasma, para monitoramento em níveis terapêuticos em pacientes com transplante de medula óssea. | 175 |
| α-Metildopa | Antihipertensivo | Plasma, para estudos de bioequivalência. | 176 |
| Triamtereno | Diurético | Urina, para monitoramento de 17 diuréticos. Apenas o triamtereno foi monitorado por fluorescência. | 177 |

que a determinação de medicamentos diretamente em fase sólida tem apresentado. Isto abre a possibilidade de desenvolvimento de metodologias de análise para quantificar princípios ativos em outros tipos de formulações como cremes, géis e unguentos, além das amostras sólidas (comprimidos pulverizados e cápsulas) que já têm sido propostas na literatura.

A quimiluminescência como ferramenta analítica também pode oferecer muitas vantagens, principalmente em sistemas que possuem boa eficiência quântica, como luminol e peroxi-oxalato. Contudo, pesquisas que elucidem reação quimiluminescente de fármacos (derivatizados ou não) têm sido muito pouco exploradas, o que torna esta uma área de pesquisa bastante interessante. As

Tabela 5. Determinação de fármacos empregando electroforese capilar e detecção fluorimétrica

| Princípio Ativo | Classificação | Amostra analisada | Ref. |
|--|---------------|---|------|
| Digoxina e gentamicina | Antibiótico | Soluções padrão dos fármacos. Medidas realizadas através de eletroforese capilar acoplada a um ensaio imuno-fluorescente. | 178 |
| Diuréticos (amilorida, bendroflumetiazida, bumetanida e triamtereno) | Diuréticos | Urina, para testes de <i>dopping</i> , através eletroforese capilar de zona (CZE). | 179 |
| Furosemida | Diurético | Urina, através eletroforese capilar de zona (CZE) e cromatografia capilar de eletrocinética miscelar (MECC). | 180 |
| Vancomicina | Antibiótico | Plasma, através de eletroforese capilar acoplada a um ensaio imuno-fluorescente. | 181 |

muitas inovações das técnicas de detecção quimiluminescente também podem ser uma ferramenta promissora na determinação de moléculas de importância biomédica e ambiental conforme destacado na literatura.¹⁹²

Desta forma, estudos relacionados com a utilização de métodos luminescentes em geral, na determinação de compostos farmacêuticos e cosméticos, ainda apresentam um grande campo de exploração e merecem ser incentivados.

MATERIAL SUPLEMENTAR

O diagrama de Jablonski (Figura 1S), mostrando os processos físicos que podem ocorrer após uma molécula absorver um fóton com energia da faixa ultravioleta ou visível, é apresentado como material suplementar (disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br> em forma de arquivo PDF, com acesso gratuito), pois pode ser encontrado em livro texto.⁴³

REFERÊNCIAS

- Feng, S.; Wang, J.; Chen, X.; Fan, J.; *Spectrochim. Acta, Part A* 2005, 61, 841.
- Paleologos, E. K.; Stalikas, C. D.; Tzouwara-Karayanni, S. M.; Karayannis, M. I.; *Anal. Chim. Acta* 2001, 436, 49.
- Song, Z. H.; Zhang, N.; *Talanta* 2003, 60, 161.
- Tang, Z.; Graefe, K.; March, C.; Karnes, H. T.; *Microchim. Acta* 2004, 144, 1.
- Chen, G.; Schneider, M. J.; Darwish, A. M.; Lehotay, S. J.; Freeman, D. W.; *Talanta* 2004, 64, 252.
- Schneider, M. J.; *J. Agric. Food Chem.* 2004, 54, 7809.
- Guilbault, G. G.; *Practical Fluorescence*, 2nd ed., Wiley: New York, 1990.
- Soper, S. A.; McGown, L. B.; Warner, I. M.; *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* 1994, 66, 428R.
- Murata, Y.; Matsui, H.; Hirano, K. I.; Kondo, Y.; Yanaka, A.; Nakahara, A.; Tanaka, N.; Muto, H.; *J. Gastroenterology* 2000, 35, 510.
- Arancibia, J. A.; Escandar, G. M.; *Talanta* 2003, 60, 1113.
- Turro, N. J.; *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Books: California, 1991.
- Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Fenol, J.; *Analyst (Cambridge, U. K.)* 2001, 126, 1436.
- Al-Ghannam, S. M.; El-Brashy, A. M.; Al-Farhan, B. S.; *Il Fármaco* 2002, 57, 625.
- Suárez-Rodríguez, J. L.; Díaz-García, M. E.; *Biosens. Bioelectron.* 2001, 16, 955.
- Wang, H. Y.; Hui, Q. S.; Xu, L. X.; Jiang, J. G.; Sun, Y.; *Anal. Chim. Acta* 2003, 497, 93.
- Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Martín, J.; *Analyst (Cambridge, U. K.)* 1999, 124, 197.
- Ramesh, K. C.; Gowda, B. G.; Seetharamappa, J.; Keshavaya, J.; *J. Anal. Chem.* 2003, 58, 933.
- Li, W.; Chen, J.; *Anal. Chim. Acta* 1996, 331, 103.
- Moreira, A. B.; Dias, I. L. T.; Oliveira-Neto, G.; Zagatto, E. A. G.; Kubota, L. T.; *Anal. Chim. Acta* 2004, 523, 49.
- Moreira, A. B.; Oliveira, H. P. M.; Atvars, T. D. Z.; Dias, I. L. T.; Oliveira-Neto, G.; Zagatto, E. A. G.; Kubota, L. T.; *Anal. Chim. Acta* 2005, 539, 257.
- Liu, W.; Wang, Y.; Tang, J.; Shen, G.; Yu, R.; *Anal. Sci.* 1998, 14, 547.
- Wang, Y.; Liu, W. H.; Wang, K. M.; Shen, G. L.; Yu, R. Q.; *Talanta* 1998, 47, 33.
- Warner, I. M.; McGown, L. B.; *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* 1992, 64, 343R.
- Warner, I. M.; McGown, L. B.; *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* 1988, 60, 162R.
- Flannigan, D. J.; Hopkins, S. D.; Suslick, K. S.; *J. Organomet. Chem.* 2005, 690, 3513.
- Yasui, Y.; Tuziuti, T.; Sivakumar, M.; Iida, Y.; *Appl. Spectrosc.* 2004, 39, 399.
- Brenner, M. P.; Hilgenfeldt, S.; Lohse, D.; *Rev. Mod. Phys.* 2002, 74, 425.
- Margulis, M. A.; Margulis, I. M.; *Ultrason. Sonochem.* 2002, 9, 1.
- Yuen, S.; Schreyer, M.; Finlay, W. H.; Lobengerg, R.; Moussa, W.; *Appl. Phys. Lett.* 2006, 88, 123901.
- Bukvetskii, B. V.; Mirochnik, A. G.; Zhikhareva, P. A.; Karasev, V. E.; *J. Struct. Chem.* 2006, 47, 575.
- Bulgakov, R. G.; Kuleshov, S. P.; Zuzlov, A. N.; Vafin, R. R.; *Russ. Chem. Bull.* 2004, 53, 2712.
- Eddingsaas, N. C.; Suslick, K. S.; *Nature (London, U. K.)* 2006, 444, 163.
- Jia, Y.; Yei, M.; Jia, W.; *Opt. Mater.* 2006, 28, 974.
- Kher, R. S.; Panigrahi, A. K.; Dhoble, S. J.; Khokhar, M. S. K.; *Radiat. Prot. Dosim.* 2006, 119, 66.
- Kabakov, D. V.; Kiselev, S. V.; Seregina, E. A.; Tikhonov, G. V.; *High Energy Chem.* 2007, 41, 71.
- Santana, G. C.; Mello, A. N.; Valerio, M. E. G.; Macedo, Z. S.; *J. Mater. Sci.* 2007, 42, 2231.
- Shimizu, N.; Mitamura, N.; Takeuchi, A.; Hashimoto, T.; *Radiat. Meas.* 2006, 41, 831.
- Kurk, K.; Mathur, V. K.; McKeever, S. W.; Townsend, P. D.; Valberg, L.; *Radiat. Prot. Dosim.* 2006, 119, 134.

39. Raffi, J.; Gelly, S.; Barral, L.; Burger, F.; Piccerelle, P.; Prinderre, P.; Baron, M.; Chamayou, A.; *Spectrochim. Acta, Part A* 2002, 58, 1313.
40. Furetta, C.; Kitis, G.; *J. Mater. Sci.* 2004, 39, 2277.
41. Dyke, K.; *Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications*, CRC Press, Inc.: Florida, 1985, vol. 2.
42. Lakowicz, J. R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed., Plenum Press: New York, 1998.
43. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; *Fundamentals of analytical Chemistry*, 7th ed., Saunders College Publishing: New York, 1996.
44. Waseem, A.; Yaqood, M.; Nabi, A.; *Luminescence* 2006, 21, 174.
45. Ocaña, J. A.; Barragán, F. J.; Callejón, M.; De La Rosa, F.; *Microchim. Acta* 2004, 144, 207.
46. Fukutsu, N.; Konse, T.; Kawasaki, T.; Saito, K.; Nakazawa, H.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 599.
47. Gundermann, K. D.; McCapra, F. Em *Chemiluminescence in Organic Chemistry*; Hafner, K.; Rees, C. W.; Trost, B. M., eds.; Springer-Verlag: Berlin, 1987, vol. 23.
48. Stevani, C. V.; Baader, W. J.; *Quim. Nova* 1999, 22, 715.
49. Fernández-Ramos, J. M.; García-Campaña, A. M.; Ales-Barrero, F.; Bosque-Sendra, J. M.; *Talanta* 2006, 69, 763.
50. Zhu, R.; Kok, W. T.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 17, 985.
51. Huang, B.; Li, J.; Zhang, L.; Cheng, J. K.; *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* 1996, 68, 2366.
52. David, V.; Saèz, R. M. M.; Mateo, J. V. G.; Calatayud, J. M.; *Analyst (Cambridge, U. K.)* 2000, 125, 1313.
53. Chandross, E. A.; *Tetrahedron Lett.* 1963, 761.
54. Baader, W. J.; Stevani, C. V.; Bastos, E. L. Em *The Chemistry of Peroxides*; Rappoport Z., ed.; John Wiley: New York, 2006, vol. 2, cap. 16.
55. Zhao, L.; Li, B.; Zhang, Z.; Lin, J. M.; *Sens. Actuators, B* 2004, 97, 266.
56. Huang, Y. M.; Zhang, C.; Zhang, X. R.; Zhang, Z. J.; *Fresenius J. Anal. Chem.* 1999, 365, 381.
57. Townshend, A.; Wheatley, R. A.; Chisvert, A.; Salvador, A.; *Anal. Chim. Acta* 2002, 462, 209.
58. Fernández, R.; Bello, M. A.; Callejón, M.; Jiménez, J. C.; Guiraúm, A.; *Talanta* 2002, 56, 571.
59. Salem, A. A.; Barsoum, B. N.; Izake, E. L.; *Spectrochim. Acta, Part A* 2004, 60, 771.
60. Solich, P.; Polydorou, C. K.; Koupparis, M. A.; Efstathiou, C. E.; *Anal. Chim. Acta* 2001, 438, 131.
61. Khashaba, P. Y.; El-Shabouri, S. R.; Mohamed, A. M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 22, 363.
62. Arancibia, J. A.; Nepote, A. J.; Escandar, G. M.; Olivieri, A. C.; *Anal. Chim. Acta* 2000, 419, 159.
63. Sádecká, J.; Cakrt, M.; Hercegová, A.; Polonský, J.; Skacáni, I.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 25, 881.
64. Alarfaj, N. A. A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 28, 331.
65. Fernández, R.; Bello, M. A.; Callejón, M.; Jiménez, J. C.; Guiraúm, A.; *Talanta* 1999, 49, 881.
66. Ocaña, J. A.; Barragán, F. J.; Callejón, M.; *Analyst (Cambridge, U. K.)* 2000, 125, 2322.
67. Manzoori, J. L.; Amjadi, M.; *Microchim. Acta* 2003, 143, 39.
68. Damiani, P. C.; Bearzotti, M.; Cabezón, M.; Olivieri, A. C.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 17, 233.
69. Barary, M. H.; Abdel-Hay, M. H.; Sabry, S. M.; Belal, T. S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 34, 221.
70. Ibañez, G. A.; Escandar, G. M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 37, 149.
71. Pulgarín, J. A. M.; Bermejo, L. F. G.; *Talanta* 2000, 51, 89.
72. Aparico, I.; Bello, M. A.; Callejón, M.; Jiménez, J. C.; Guiraúm, A.; *Analyst (Cambridge, U. K.)* 1998, 123, 1575.
73. Legnerová, Z.; Sklenářová, H.; Solich, P.; *Talanta* 2002, 58, 1151.
74. Mohamed, H. A.; Wadood, H. M. A.; Farghaly, O. A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 28, 819.
75. Mahgoub, H.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 31, 767.
76. Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Carpena, J.; *Microchem. J.* 1993, 47, 296.
77. Lapa, R. A. S.; Lima, J. L. F. C.; Santos, J. L. M.; *Anal. Chim. Acta* 2000, 419, 17.
78. Rizk, M.; El-Shabrawy, Y.; Zakhari, N. A.; Toubar, S. S.; Carreira, L. A.; *Talanta* 1995, 42, 1849.
79. Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Cardona, C. S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1996, 15, 33.
80. Sastry, C. S. P.; Mangala, D. S.; Rao, K. E.; *Analyst (Cambridge, U. K.)* 1986, 111, 323.
81. Razak, O. A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 18, 359.
82. Aly, F. A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999, 18, 993.
83. Carretero, A. S.; Cruces-Blanco, C.; Peinado, S. F.; El Bergmi, R.; Gutiérrez, A. F.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999, 21, 969.
84. Viñas, P.; López-Erroz, C.; Cerdán, F. J.; Campillo, N.; Hernández-Córdoba, M.; *Mikrochim. Acta* 2000, 134, 83.
85. Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Martín, J.; *Talanta* 1999, 50, 49.
86. Torró, I. G.; Mateo, J. V. G.; Calatayud, J. M.; *Analyst (Cambridge, U. K.)* 1997, 122, 139.
87. Aly, F. A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999, 21, 483.
88. Pimenta, A. M.; Araújo, A. N.; Montenegro, M. C. B. M.; *Anal. Chim. Acta* 2002, 470, 185.
89. Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Martín, J.; *Anal. Chim. Acta* 2004, 514, 259.
90. He, Q.; Chen, H.; Cao, X.; *Microchem. J.* 1999, 61, 125.
91. Chen, H.; Zhu, J.; Cao, X.; Fang, Q.; *Analyst (Cambridge, U. K.)* 1998, 123, 1017.
92. Fernández-González, A.; Badía, R.; Díaz-García, M. E.; *Anal. Chim. Acta* 2003, 484, 223.
93. Dolejšová, J.; Solich, P.; Polydorou, C. K.; Koupparis, M. A.; Efstathiou, C. E.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999, 20, 357.
94. Ma, L.; Tang, B.; Chu, C.; *Anal. Chim. Acta* 2002, 469, 273.
95. Arancibia, J. A.; Boldrini, M. A.; Escandar, G. M.; *Talanta* 2000, 52, 261.
96. Manzoori, J. L.; Amjadi, M.; *Spectrochim. Acta, Part A* 2003, 59, 909.
97. Hergert, L. A.; Escandar, G. M.; *Talanta* 2003, 60, 235.
98. Nevado, J. J. B.; Pulgarín, J. A. M.; Laguna, M. A. G.; *Talanta* 2000, 53, 951.
99. Escandar, G. M.; *Analyst (Cambridge, U. K.)* 1999, 124, 587.
100. Arnaud, N.; Georges, J.; *Anal. Chim. Acta* 2003, 476, 149.
101. Panadero, S.; Gómez-Hens, A.; Pérez-Bendito, D.; *Anal. Chim. Acta* 1995, 303, 39.
102. Merás, I. D.; De La Peña, A. M.; Cáceres, M. I. R.; López, F. S.; *Talanta* 1998, 45, 899.
103. Lianidou, E. S.; Ioannou, P.; *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* 1996, 42, 1659.
104. El-Kommos, M. E.; Saleh, G. A.; El-Gizawi, S. M.; Abou-Elwafa, M. A.; *Talanta* 2003, 60, 1033.
105. Carreira, L. A.; Rizk, M.; El-Shabrawy, Y.; Zakhari, N. A.; Toubar, S. S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1995, 13, 1331.
106. Al-Kindy, S. M. Z.; Al-Wishahi, A.; Suliman, F. E. O.; *Talanta* 2004, 64, 1343.
107. Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Carpena, J.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1996, 14, 1505.
108. Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Carpena, J.; *Analyst (Cambridge, U. K.)* 1997, 122, 705.
109. Al-Majed, A. A.; Belal, F.; Abounassif, M. A.; Khalil, N. Y.; *Microchim. Acta* 2003, 141, 1.
110. De La Peña, L.; Gómez-Hens, A.; Pérez-Bendito, D.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1995, 13, 199.

111. Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Val, O.; *Microchem. J.* 1995, 52, 33.
112. Vidal, M. T.; Chisvert A.; Salvador, A.; *Talanta* 2003, 59, 591.
113. Domínguez-Vidal, A.; Ortega-Battales, P.; Molina-Díaz, A.; *Talanta* 2002, 56, 1005.
114. Escandar, G. M.; Gómes, D. G.; Mansilla, A. E.; Peña A. M.; Goicoechea, H. C.; *Anal. Chim. Acta* 2004, 506, 161.
115. Domínguez-Vidal, A.; Ortega-Barrales, P.; Molina-Díaz, A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 28, 721.
116. Oliva, M. D. L. A.; Olsina, R. A.; Mais, A. N.; *Talanta* 2005, 66, 229.
117. Berzas, J. J.; Alañon, A.; Lázaro, J. A.; *Talanta* 2002, 58, 301.
118. Jiménez, R. D. B.; Abiznada, A. I. J.; Moreno, F. J.; León, J. J. A.; *Clin. Chim. Acta* 1996, 249, 21.
119. Navalón, A.; Blanc, R.; Olmo, M.; Vilchez, J. L.; *Talanta* 1999, 48, 469.
120. Capitán-Vallvey, L. F.; Navas, N.; Del Olmo, M.; Consonni, V.; Todeschini, R.; *Talanta* 2000, 52, 1069.
121. Martos, N. R.; Díaz, A. M.; Navalón, A.; Payá, I. D. O.; Vallvey, L. F. C.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 23, 837.
122. Luis, M. L.; Fraga, J. M. G.; Jiménez, A. I.; Jiménez, F.; Hernández, O.; Arias, J. J.; *Talanta* 2004, 62, 307.
123. Peña, A. M.; Acedo-Valenzuela, M. I.; Espinosa-Mansilla, A.; Sánchez-Maqueda, R.; *Talanta* 2002, 56, 635.
124. Damiani, P.; Nepote, A. J.; Bearsotti, M.; Olivieri, A. C.; *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* 2004, 76, 2798.
125. Moreira, A. B.; Dias, I. L. T.; Oliveira-Neto, G.; Zagatto, E. A. G.; Ferreira, M. M. C.; Kubota, L. T.; *Talanta* 2005, 67, 65.
126. Bebawy, L. I.; El-Kelani, K.; Fattah, L. A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 32, 219.
127. Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Fenoll, J.; *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 375, 661.
128. Sulkowska, A.; *J. Mol. Struct.* 1999, 480-481, 581.
129. Sánchez, F. G.; Gutierrez, A. F.; Blanco, C. C.; *Anal. Chim. Acta* 1995, 306, 313.
130. Shtykov, S. N.; Smirnova, T. D.; Bylinkin, Y. G.; Zhemerichkin, D. A.; *J. Anal. Chem.* 2005, 60, 24.
131. Polishchuk, A. V.; Karaseva, E. T.; Medkov, M. A.; Karasev, V. E.; *Russ. J. Coord. Chem.* 2004, 30, 828.
132. Hirschy, L. M.; Dose, E. V.; Winefordner, J. D.; *Anal. Chim. Acta* 1983, 147, 311.
133. Paredes, S. F.; Sant'Ana, P.; Moreira, A. B.; Kubota, L. T.; Sotomayor, M. D. P. T.; Lanza, M. R. V.; Dias, I. L. T.; *Resumos da 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, Brasil*, 2006.
134. Dias, I. L. T.; Sotomayor, M. D. P. T.; Moreira, A. B.; Kubota, L. T.; *Resumos do 13º Encontro Nacional de Química Analítica - 1º Congresso Ibero-Americano de Química Analítica, Niterói, Brasil*, 2005.
135. Linares, E. M.; Palermo, L. P.; Moreira, A. B.; Sotomayor, M. D. P. T.; Kubota L. T.; *Anal. Lett.* 2007, 40, 573.
136. Oh, I.; Lee, M. Y.; Lee, Y. B.; Shin, S. C.; Park, I.; *Int. J. Pharm.* 1998, 175, 215.
137. Perry, L. M.; Winefordner, J. D.; *Talanta* 1990, 37, 965.
138. Zhang, Z. Q.; Tang, Y.; *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 381, 932.
139. Rachkov, A.; McNiven, S.; El'skaya A.; Yano, K.; Karube, I.; *Anal. Chim. Acta* 2000, 405, 23.
140. Castro, B. D.; Gameiro, P.; Lima, J. L. F. C.; Matos, C.; Reis, S.; *Colloids Surf., A* 2001, 190, 205.
141. Blatt, E.; Sawyer, W. H.; *Biochim. Biophys. Acta* 1985, 822, 43.
142. Cabrini, G.; Verkman, A. S.; *Biochim. Biophys. Acta* 1986, 862, 285.
143. Chalpin, D. B.; Kleinfeld, A. M.; *Biochim. Biophys. Acta* 1983, 731, 465.
144. Fato, R.; Battino, M.; Esposti, M. D.; Castelli, G. P.; Lenaz, G.; *Biochemistry* 1986, 25, 3378.
145. Dupuo-Cèzanne, L.; Sautereau, A. M.; Tocanne, J. F.; *Eur. J. Biochem.* 1989, 181, 695.
146. Haigh, E. A.; Thulborn, K. R.; Sawyer, W. H.; *Biochemistry* 1979, 18, 3525.
147. Sikaris, K. A.; Sawyer, W. H.; *Biochem. Pharmacol.* 1982, 31, 2625.
148. Vermeir, M.; Boens, N.; *Biochim. Biophys. Acta* 1992, 1104, 63.
149. Blatt, E.; Ghiggino, K. P.; Sawyer, W. H.; *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 1981, 77, 2551.
150. Kubo, H.; Saitoh, M.; Murase, S.; Inomata, T.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H.; *Anal. Chim. Acta* 1999, 389, 89.
151. Lloyd, J. B. F.; *Nature* 1971, 64, 231.
152. John, P.; Soutar, I.; *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* 1976, 48, 520.
153. Murillo-Pulgarín, J. A.; Alañón-Molina, A.; *Talanta* 1994, 41, 21.
154. Kubic, T. A.; Lasher, C. M.; Dwyer, J. J.; *Forensic Sci. Soc.* 1983, 28, 186.
155. Murillo-Pulgarín, J. A.; Alañón-Molina, A.; *Anal. Chim. Acta* 1994, 296, 87.
156. Murillo-Pulgarín, J. A.; Alañón-Molina, A.; López, P. F.; *Talanta* 1996, 43, 431.
157. Peña, A. M.; Salinas, F.; Meras, I. D.; *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* 1988, 60, 2493.
158. Li, Y.; Huang, X.; Xu, J.; Chen, G.; *Fenxi Huaxue* 1991, 19, 538.
159. Oms, M. T.; Forteza, R.; Cerda, V.; García, F.; Ramos, A. L.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 1990, 42, 1.
160. Clark, B. J.; Fell, A. F.; Milne, K. T.; Pattie, D. M. G.; Williams, H.; *Anal. Chim. Acta* 1985, 170, 35.
161. Niemann, R. A.; Gay, M. L.; *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 5630.
162. Delépée, R.; Pouliquen, H.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002, 775, 89.
163. Arroyo, C.; López-Callul, C.; García-Capdevila, L.; Gich, I.; Barbanj, M.; Bonal, J.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1997, 688, 339.
164. Merás, I. D.; Díaz, T. G.; Cáceres, M. I. R.; López, F. S.; *J. Chromatogr., A* 1997, 787, 119.
165. Yorke, J. C.; Froc, P.; *J. Chromatogr., A* 2000, 882, 63.
166. Lu, H. T.; Jiang, Y.; Li, H. B.; Chen, F.; Wong, M. H.; *Chromatographia* 2004, 60, 259.
167. Graefe, K. A.; Tang, Z.; Karnes, T.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2000, 745, 305.
168. Belsner, K.; Buchele, B.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1996, 682, 95.
169. Pecorelli, I.; Galarini, R.; Bibi, R.; Floridi, A.; Casciarri, E.; Floridi, A.; *Anal. Chim. Acta* 2003, 483, 81.
170. Carda-Broch, S.; Esteve-Romero, J. S.; García-Alvarez-Coque, M. C.; *Anal. Chim. Acta* 1998, 375, 143.
171. Yoon, Y.; Westerhoff, P.; Snyder, S. A.; Esparza, M.; *Water Res.* 2003, 37, 3530.
172. Mao, L.; Sun, C.; Zhang, H.; Li Y.; Wu, D.; *Anal. Chim. Acta* 2004, 522, 241.
173. Shaikh, B.; *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 2117.
174. Khatri, J.; Qassim, S.; Abed, O.; Abraham, B.; Al-lami, A.; Masood, S.; *J. Pharm. Sci.* 2001, 4, 201.
175. Al-Rawithi, S.; Hussein, R.; Al-Moshen, I.; Raines, D.; *Ther. Drug Monit.* 2001, 23, 445.
176. Róna, K.; Ary, K.; Gachályi, B.; Klebovich, I.; *J. Chromatogr., A* 1996, 730, 125.
177. Guchelaar, H. J.; Chandhi, L.; Schouten, O.; Brand, W. A.; *Fresenius J. Anal. Chem.* 1999, 363, 700.
178. Wan, Q. H.; Le, X. C.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1999, 734, 31.
179. González, E.; Becerra, A.; Laserna, J. J.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1996, 687, 145.

180. Caslavská, J.; Thormann, W.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002, 770, 207.
181. Lam, M. T.; Le, X. C.; *Analyst (Cambridge, U. K.)* 2002, 127, 1633.
182. Smith, G. J.; Miller, I. J.; *J. Photochem. Photobiol., A* 1998, 118, 93.
183. Itoh, T.; *Spectrochim. Acta, Part A* 1999, 55, 273.
184. Nishiguchi, H.; Zhang, J. L.; Anpo, M.; *Langmuir* 2001, 17, 3958.
185. Turek, A. M.; Krishnamoorthy, G.; Phipps, K.; Saltiel, J.; *J. Phys. Chem. A* 2002, 106, 6044.
186. Holtzclaw, K. W.; Pratt, D. W.; *J. Chem. Phys.* 1986, 84, 4713.
187. Sun, Y. P.; Sears, D. F.; Saltiel, J.; *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 706.
188. Wada, S. I.; Matsushita, Y.; Obi, K.; *J. Phys. Chem. A* 1997, 101, 2423.
189. Kani, R.; Nakano, Y.; Yoshida, H.; Hayase, S.; *Macromolecules* 1998, 31, 8794.
190. Shield, S. R.; Harris, J. M.; *J. Phys. Chem. B* 2000, 104, 8527.
191. Nishiguchi, H.; Zhang, J. L.; Anpo, M.; Masuhara, H.; *J. Phys. Chem. B* 2001, 105, 3218.
192. Fletcher, K. A.; Fakayode, S. O.; Lowry, M.; Tucker, S. A.; Neal, S. L.; Kimaru, I. W.; McCarroll, M. E.; Patonay, G.; Oldham, P. B.; Rusin, O.; Strongin, R. M.; Warner, I. M.; *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* 2006, 78, 4047.