



Espectrofotometria derivada: uma contribuição prática para o desenvolvimento de métodos

Donato, E.M.^{1*}; Canedo, N.A.P.¹; Adams, A.I.H.²; Fröhlich, P.E.¹; Bergold, A.M.¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Campus Universitário – Santa Maria, RS, Brasil.

Recebido 15/12/2009 / Aceito 11/05/2010

RESUMO

A espectrofotometria derivada (ED) tem sido utilizada como uma importante ferramenta no controle de qualidade de medicamentos para a determinação simultânea de fármacos em sistemas multicomponentes. Esta técnica oferece uma alternativa para melhorar a sensibilidade e a seletividade na análise de misturas e está acessível à maioria dos laboratórios. O procedimento é simples, rápido e não necessita extração prévia da amostra. Este trabalho tem como objetivo fornecer subsídios para o desenvolvimento de método por espectrofotometria derivada, utilizando a técnica do ponto de anulação, visando utilizá-la como um método alternativo no controle de qualidade de fármacos associados e, em especial, nos estudos de dissolução. Muitos subsídios foram retirados da literatura, outros de experiências vivenciadas no laboratório durante o desenvolvimento do método por ED aplicado na análise de dois inibidores da protease do vírus da imunodeficiência humana. Várias ordens de derivadas, diferentes valores de lambda delta ($\Delta\lambda$) e diferentes velocidades de varredura foram avaliados.

Palavras chaves: Análise de misturas binárias. Espectrofotometria derivada. Método *zero-crossing*.

INTRODUÇÃO

A sobreposição das bandas de transição eletrônica da espectrofotometria convencional na região do ultravioleta reduz de forma significativa o uso desta ferramenta na análise de associação de fármacos sem a prévia separação dos constituintes. Com o intuito de aumentar a área de abrangência nesta região e contornar o problema da sobreposição de espectros, a espectrofotometria derivada (ED) vem conquistando cada vez mais espaço.

Com o aumento do poder de resolução dos equipamentos analíticos e o fácil acesso aos microcomputadores com programas adequados, os quais permitem a geração quase instantânea dos espectros derivados, o uso da ED tornou-se mais prático. Essas facilidades têm permitido a análise de substâncias ativas em misturas de multicomponentes, com sobreposição de bandas de transição eletrônica (El-Sayed & El-Salem, 2005). O método não requer a separação prévia dos componentes, está acessível à grande maioria dos laboratórios de análise e pesquisa, é de baixo custo, fácil execução e constitui uma alternativa menos dispendiosa se comparada ao método por cromatografia líquida de alta eficiência (Paschoal et al., 2003).

Além dessas vantagens, a ED apresenta maior seletividade que a espectrofotometria clássica, devido à separação das bandas espectrais sobrepostas e a melhor detectabilidade dos pequenos traços espectrais (Ojeda & Rojas, 2004). Além disso, torna as bandas largas mais finas, individualizando melhor os constituintes da mistura e eliminando a interferência de produtos indesejáveis, como excipientes e produtos de degradação (Paschoal et al., 2003).

Este trabalho tem por objetivo fornecer subsídios para o desenvolvimento de métodos por espectrofotometria derivada, utilizando a técnica do ponto de anulação ou *zero crossing* e incentivar os profissionais e pesquisadores no uso da ED como um método alternativo no controle de qualidade de misturas, principalmente formulações multicomponentes, e em especial nos estudos de dissolução. Muitos subsídios foram retirados da literatura, outros, vivenciados no laboratório durante o trabalho com a associação lopinavir/ritonavir (133,33/33,33 mg), inibidores da protease do vírus da imunodeficiência humana, na forma farmacêutica de cápsulas moles.

Espectrofotometria derivada

A espectrofotometria derivada consiste na transformação do espectro normal por derivação. Os espectros derivados são obtidos utilizando apenas as informações contidas no espectro clássico ou de ordem

Autor correspondente: Eliane Maria Donato - Laboratório de Produção de Padrões Secundários - Faculdade de Farmácia - UFRGS - Av. Ipiranga, 2752, sala 304 - Porto Alegre - RS - CEP:90610-000 - telefone/fax:(51)3308-5313 e-mail:elianemd@terra.com.br

zero. Deste modo, a derivação não aumenta o conteúdo de informações, entretanto, ela individualiza melhor os constituintes pelo aumento do número de bandas de absorção, permitindo a eliminação de bandas largas e melhorando a detectabilidade das pequenas características espectrais, como os “ombros” (Paschoal et al., 2003; Ojeda & Rojas, 2004; Watson, 2005). Esta técnica analítica tem sido empregada com bons resultados na determinação simultânea de misturas de fármacos.

A ED apresenta maior sensibilidade e maior seletividade quando comparada à espectrofotometria convencional. O aumento da seletividade deve-se a separação das bandas sobrepostas, enquanto que o aumento da sensibilidade é devido à amplificação do sinal da derivada e a diminuição do ruído. Seu uso está baseado no fato de que o sinal obtido, numa determinada faixa de concentração, é proporcional à concentração da substância, ou seja, segue a lei de Beer-Lambert (Rocha & Teixeira, 2004; Ojeda & Rojas, 2004; Watson, 2005).

Os espectros derivados podem ser obtidos por métodos ópticos, eletrônicos ou matemáticos. O método matemático, atualmente, é o mais utilizado pela sua versatilidade, pois permite que os espectros sejam facilmente calculados e recalculados utilizando diferentes parâmetros, além de permitir o uso de técnicas de *smoothing* (suavização) para melhorar a relação sinal ruído. O requisito instrumental na ED é similar ao utilizado na espectroscopia de absorção no UV convencional, entretanto, a reprodutibilidade e a relação sinal ruído têm sua importância aumentada. O aumento da resolução no espectro derivado exige maior reprodutibilidade no comprimento de onda do espectrofotômetro (Torral et al., 2001; Ojeda & Rojas, 2004; Rojas & Ojeda, 2009).

A ordem da derivada, o incremento do delta lambda ($\Delta\lambda$) na qual a derivada é obtida e a suavização são os principais parâmetros instrumentais que afetam o espectro derivado. Eles precisam ser otimizados para uma boa resolução da banda espectral e uma boa seletividade e sensibilidade do método (El-Gindy et al., 2001). Outro

importante parâmetro a ser considerado é a velocidade de varredura na obtenção do espectro de ordem zero. A seleção dos λ para quantificação dos compostos utilizando a técnica do ponto de anulação ou *zero crossing* é outro fator que deve ser considerado na ED.

Ordem da derivada

A escolha da ordem de derivada depende das características do espectro de ordem zero dos constituintes da mistura e dos interferentes. A primeira derivada é a razão entre a variação da absorvância (dA) versus variação do comprimento de onda ($d\lambda$). Assim, plotando-se $dA/d\lambda$ versus λ obtém-se o espectro de absorção de primeira derivada onde a anulação ocorre no ponto referente ao comprimento de onda máximo do espectro de absorção de ordem zero. É negativo onde a absorção decresce e positivo onde a absorção aumenta (Paschoal et al, 2003, Ojeda & Rojas, 2004; Watson, 2005).

A principal característica do espectro de segunda derivada, ($d^2A/d\lambda^2$) é uma banda de valor negativo sendo o mínimo de absorção no mesmo comprimento de onda do máximo da banda de ordem zero. Apresenta também duas pequenas bandas positivas uma em cada lado da banda principal, apresentando assim, dois pontos de anulação. Os espectros de ordens superiores são obtidos a partir da diferenciação do espectro de ordem zero (Watson, 2005). A Figura 1 mostra os espectros de primeira ($dA/d\lambda$), segunda ($d^2A/d\lambda^2$), terceira ($d^3A/d\lambda^3$) e quarta derivadas ($d^4A/d\lambda^4$) de uma banda de absorção Gaussiana. A presença da banda forte positiva ou negativa no mesmo comprimento de onda do espectro clássico é uma característica de todas as ordens de derivada e o número de bandas observadas é igual ao número da ordem da derivada mais um (Paschoal et al., 2003; Ojeda & Rojas, 2004).

O aumento da ordem da derivada leva a uma maior resolução espectral, em contrapartida, diminui a

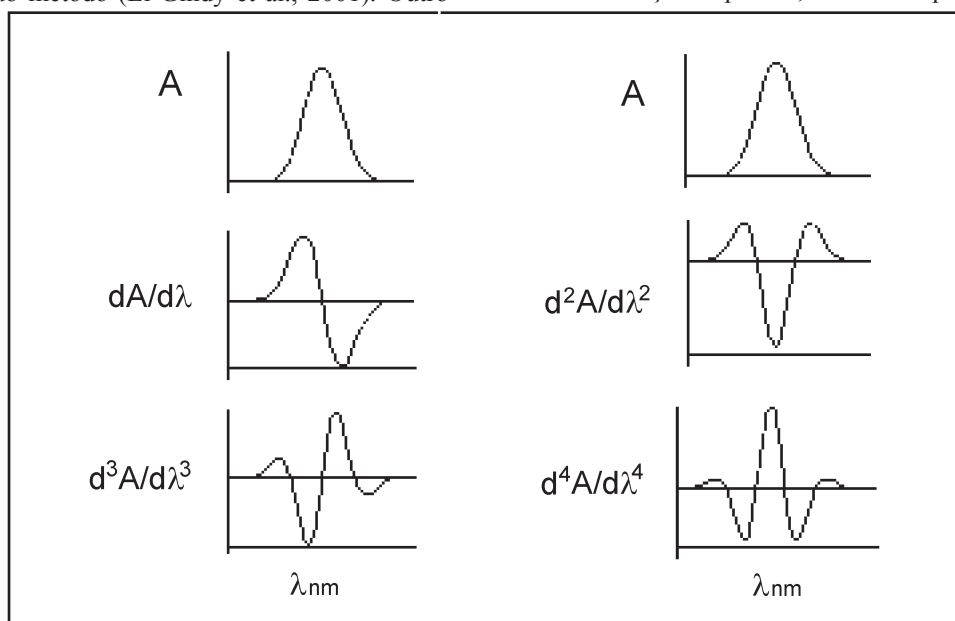


Figura 1 Banda de absorção de forma Gaussiana para primeira ($dA/d\lambda$), segunda ($d^2A/d\lambda^2$), terceira ($d^3A/d\lambda^3$) e quarta derivadas ($d^4A/d\lambda^4$). Adaptado de WATSON, (2005).

sensibilidade e pode aumentar o nível de ruído (Toral et al., 2002; Rocha & Teixeira, 2004). O aumento da resolução do espectro pode ser verificado na Figura 2, principalmente, da primeira para a segunda derivada. Apesar de o lopinavir ter apresentado boa resolução espectral na segunda e na terceira derivada (Figura 2C e 2D), resultados precisos, só foram obtidos com a segunda derivada aliada à velocidade média de varredura dos espectros de ordem zero. A falta de precisão do método utilizando a terceira derivada ($DPR \pm 6\%$) pode ser atribuída ao aumento da complexidade do espectro com o aumento da ordem da derivada, aliada a baixa absorvância deste composto na região próxima a 250 nm (Figura 2A).

Técnicas derivativas

Diversas técnicas ou métodos de derivadas são encontrados na literatura para determinação de fármacos associados: zero pico, ponto de anulação, derivada da razão do espectro, calibração multivariada, dentre outras (El-Sayed & El-Salem, 2005; Ojeda & Rojas, 2005; Martins et al, 2007, Sirajuddin et al, 2007, Sabnis et al, 2008). A técnica do ponto de anulação ou *zero crossing* é a técnica mais utilizada para a quantificação de misturas binárias de fármacos com sobreposição de espectros (El-Sayed & El-Salem, 2005), seguida da técnica da derivada da razão do espectro.

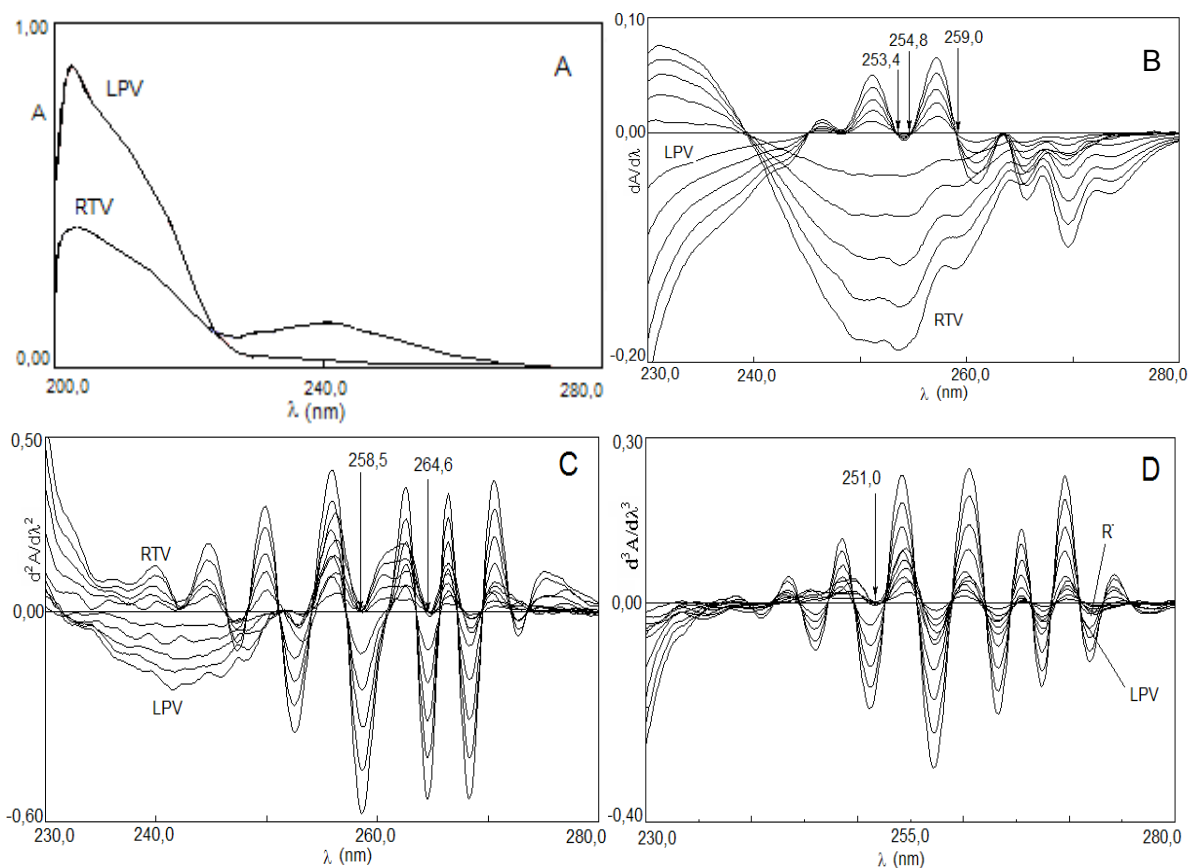


Figura 2 Espectros de absorção no ultravioleta de ordem zero do RTV $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ e do LPV $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ em metanol (A); espectros de absorção de primeira derivada para o RTV (5, 10, 15, 20 e $25 \mu\text{g ml}^{-1}$) e LPV (20, 40, 60, 80 e $100 \mu\text{g ml}^{-1}$), utilizando $\Delta\lambda = 2$ e fator de escala de 10, indicando três pontos de anulação do LPV para determinação do RTV (B); espectros de absorção de segunda derivada do RTV e do LPV, utilizando $\Delta\lambda = 2$ e fator de escala de 100, indicando dois λ referentes aos pontos de anulação do RTV, para a determinação do LPV(C); espectros de absorção de terceira derivada de ambos os fármacos, indicando o ponto de anulação do RTV, obtido utilizando $\Delta\lambda = 2$ e fator de escala de 100 (D).

A técnica do ponto de anulação ou *zero crossing* mede o valor absoluto da amplitude de absorção de um componente da mistura no comprimento de onda do ponto de anulação do outro componente, diminuindo o erro sistemático quando comparado à determinação gráfica. Apresenta como desvantagem a necessidade de efetuar a leitura da absorvância em comprimentos de onda, muitas vezes críticos, causando considerável perda da sensibilidade e precisão do método. Entretanto, pela

praticidade e simplicidade, a técnica do ponto de anulação deve ser a técnica de escolha, salvo quando houver perda de sensibilidade ou exatidão nos resultados (El-Sayed & El-Salem, 2005).

A Figura 2B mostra os espectros de primeira derivada indicando os comprimentos de onda (λ) que representam pontos de anulação do lopinavir (LPV), demonstrando as possibilidades de determinação do ritonavir (RTV). Pode-se verificar que nesta ordem de derivada, nenhum

ponto de anulação significativo foi observado para o RTV, impossibilitando, portanto, a determinação do LPV.

A segunda derivada (Figura 2C) mostra os dois pontos de anulação do ritonavir, λ de 258,5 e de 264,6 nm, utilizados para a determinação do lopinavir. Embora outros pontos de anulação possam ser utilizados, deve-se selecionar aquele que apresenta melhor resultado em termos de exatidão e precisão. Observa-se que estes pontos de anulação, correspondem aos máximos de absorção do lopinavir, ideal para efetuar a quantificação, devido maior sensibilidade, fato não comum para esta técnica.

A terceira derivada mostra um único ponto de anulação do ritonavir para a determinação do lopinavir (Figura 2D). Esta ordem foi descartada para a determinação do lopinavir, devido aos altos DPRs obtidos durante os estudos de precisão do método ($\pm 6\%$). Em conformidade com a literatura, o aumento da ordem da derivada aumenta a complexidade do espectro.

Fator de escala

O fator de escala altera apenas a amplitude da onda. Segundo Toral et al. (2002) o valor do fator de escala deve ser avaliado a fim de evitar o efeito de distorção no espectro. A Figura 3B mostra o espectro de segunda derivada, para a solução metanólica de lopinavir contendo $60 \mu\text{g ml}^{-1}$, utilizando três diferentes valores de fator de escala e mantendo o $\Delta\lambda$ constante. No caso do ritonavir, utilizou-se o fator de escala de 10, enquanto que para o lopinavir foi utilizado o fator de escala de 100, devido à sua baixa absorvidade nos λ possíveis de determiná-lo. O valor do fator de escala deve ser selecionado de forma que o espectro não apresente efeitos de distorções. É um parâmetro mais visual, entretanto, uma vez selecionado, deve ser mantido constante em todas as análises.

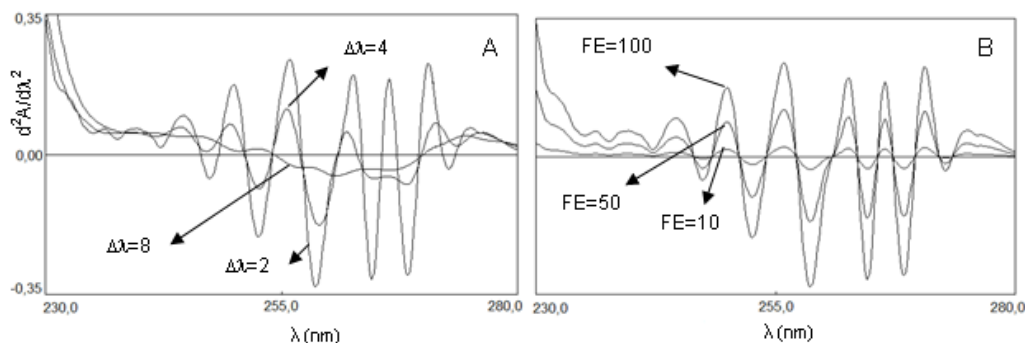


Figura 3 Diferenças na forma do espectro de absorção no ultravioleta de segunda derivada para uma solução metanólica de lopinavir contendo $60 \mu\text{g ml}^{-1}$, utilizando fator de escala de 100 e três diferentes valores de $\Delta\lambda$ (A) e três diferentes valores do fator de escala mantendo o $\Delta\lambda=2$ (B).

Delta Lambda ($\Delta\lambda$)

A variação do comprimento de onda ($\Delta\lambda$) é o principal parâmetro instrumental que afeta a forma do espectro da derivada. Este parâmetro precisa ser experimentalmente otimizado para dar uma melhor seletividade, alta sensibilidade e adequada relação sinal ruído (Morelli, 2003). O valor de $\Delta\lambda$ dependerá da largura da banda espectral, da largura da banda instrumental e do equipamento utilizado para o processamento dos dados (Ojeda & Rojas, 2004). Normalmente, o nível de ruído decresce com o aumento do valor de $\Delta\lambda$, entretanto, altos valores de $\Delta\lambda$ podem levar a

uma pobre resolução espectral (El-Gindy et al., 2001; Toral et al., 2001; Toral et al., 2002; Ojeda & Rojas, 2004). A Figura 3A mostra as alterações na forma do espectro de segunda derivada obtidas pelas variações dos valores de $\Delta\lambda$, para uma solução metanólica de lopinavir contendo $60 \mu\text{g ml}^{-1}$, evidenciando a baixa resolução espectral quando o valor de $\Delta\lambda = 2$ foi aumentado para $\Delta\lambda = 4$. Com o aumento do valor de $\Delta\lambda$, diminuiu a frequência de onda e conseqüentemente os pontos de anulação do ritonavir, conforme pode ser observado na Figura 4.

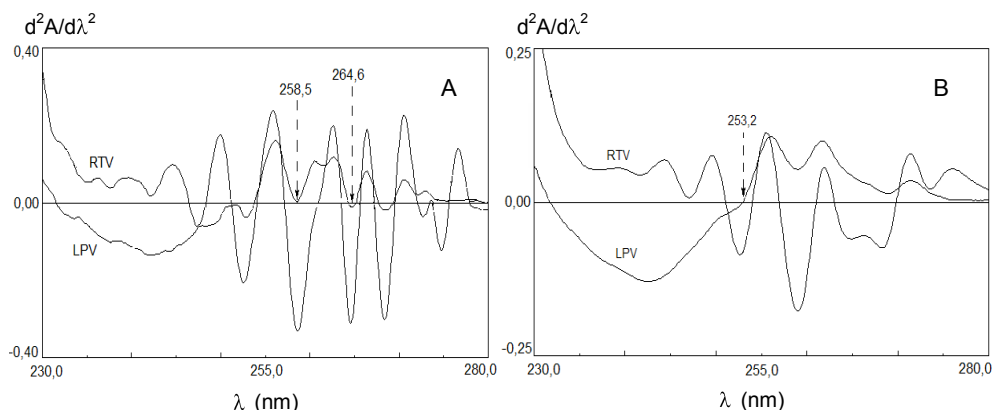


Figura 4 Espectros de absorção no ultravioleta de segunda derivada das soluções metanólicas de LPV $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ e RTV $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ obtidos utilizando fator de escala de 100 e $\Delta\lambda = 2$ (A) e $\Delta\lambda = 4$ (B).

Suavização

Apresenta como efeito a redução tanto do sinal quanto do ruído. Alguma técnica de *smoothing* ou suavização, às vezes, é necessária juntamente com a derivação, pois a diferenciação do espectro degrada a relação sinal ruído (S/R). A importância deste parâmetro aumenta com o aumento da ordem da derivada, pois a relação S/R diminui progressivamente com o aumento da ordem da derivada. O uso do *smoothing* adequado pode tornar insignificante a degradação da relação S/R em derivadas de ordem mais elevada, quando comparada com o espectro de ordem zero. Altos valores de *smoothing* não devem ser utilizados porque resulta em acentuada diminuição da amplitude da derivada e perda da resolução espectral. O valor do *smoothing*, caso necessário, deve ser otimizado na prática para obtenção de uma boa resolução e de uma adequada relação S/R (Ojeda & Rojas, 2004; Toral et al., 2001; Toral et al., 2002). No caso do lopinavir e do ritonavir, considerando que a relação S/R foi adequada, não foi necessário utilizar a atenuação.

Velocidade de varredura

O aumento da ordem da derivada, em concordância com a literatura, aumenta a complexidade do espectro e a velocidade de varredura deve ser diminuída para obtenção do espectro de ordem zero. Os espectros de ordem zero dos inibidores da protease foram traçados na velocidade média e rápida de varredura. Para a determinação do ritonavir utilizando a primeira derivada e velocidade rápida de varredura, os desvios padrão relativos dos estudos de precisão, ficaram abaixo dos 2%. Entretanto, para a determinação do lopinavir, empregando a segunda derivada, foi necessário diminuir a velocidade de varredura do espectro convencional para a velocidade média de varredura, devido aos altos valores dos DPRs obtidos no modo rápido de varredura, durante a realização dos estudos de precisão do método. A simples diminuição da velocidade de varredura diminuiu, significativamente o DPR, ficando dentro dos limites aceitáveis, porém, o tempo de análise aumentou.

Segundo O'Haver & Begley (1981) menores velocidades de varredura tanto para o espectro normal como para o derivado, levam a um maior tempo de análise, entretanto, melhoram a relação entre o sinal e o ruído do equipamento.

Seleção e ajuste do λ no ponto de anulação

Na técnica do ponto de anulação a leitura da amplitude do analito é efetuada no comprimento de onda em que os interferentes apresentam absorvância zero ($d^nA/d\lambda^n=0$) ou não significativa.

Importante ressaltar que os comprimentos de onda selecionados para a determinação do lopinavir na segunda e terceira derivadas (*zero crossing* do RTV) e os comprimentos de onda de primeira derivada selecionados para a determinação do ritonavir (*zero crossing* do LPV), foram selecionados, inicialmente, utilizando apenas uma solução metanólica contendo, respectivamente, 15 e 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RTV e LPV (Figura 2C). Contudo, os pontos de

anulação definitivos devem ser selecionados e ou ajustados utilizando as curvas-padrão dos fármacos de interesse sobrepostas, na ordem da derivada selecionada. No caso da determinação dos dois inibidores da protease, foi necessário efetuar pequenos ajustes nos λ inicialmente selecionados, na ordem de decimais, utilizando a sobreposição das curvas-padrão.

CONCLUSÕES

A espectrofotometria derivada constitui uma ferramenta de extrema importância para o laboratório de controle de qualidade, pois permite a quantificação de misturas de fármacos em sistemas multicomponentes sem tratamento prévio da amostras. Constitui, assim, um método alternativo ao CLAE, com a vantagem de oferecer resultados precisos, rápidos e de baixo custo. O uso da técnica do ponto de anulação ou *zero crossing* é rápida, simples e universalmente utilizada para resolver problemas de sobreposição de espectros em formulações multicomponentes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES pelo suporte financeiro e à Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo) pelo fornecimento das substâncias químicas de referência do ritonavir e do lopinavir.

ABSTRACT

A contribution to the derivative spectrophotometry method

Derivative spectrophotometry has been successfully used as a quality control tool in pharmaceutical analysis for the simultaneous determination of drugs in multi-component formulations. This technique, accessible to most laboratories, offers an alternative means of enhancing the sensitivity and specificity in mixture analysis. The procedure is simple, rapid and does not require any preliminary separations or treatment of the samples. The aim of this study is to provide pointers for the development of methods of analysis by derivative spectrophotometry (DS), using the zero-crossing technique, and to encourage professionals and researchers to use DS as an alternative method for quality control of drug combinations, especially in the study of dissolution. Much information, extracted from the literature, has been assembled here, together with the laboratory experience gained while developing a DS method to analyze a combination of two human immunodeficiency virus protease inhibitors. Various orders of derivatives, values of delta lambda ($\Delta\lambda$) and scan speeds were tested.

Keywords: Analysis of binary mixtures. Derivative spectrophotometry. Derivative zero-crossing method.

REFERÊNCIAS

El-Gindy A, El-Zeany B, Awad T, Shabana MM. Spectrophotometric determination of trifluorperazine HCl

and isopropamide iodide in binary mixture using second derivative and second derivative of the ratio spectra methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;26:203-10.

El-Sayed AAY, El-Salem NA. Recent developments of derivative spectrophotometry and their analytical applications. *Anal Sci.* 2005;21(6):595-607.

Martins JD, Nery CGC, Pianetti GA, Viana-Júnior NS, Vianna-Soares CD. Determinação da glibenclamida por espectrofotometria derivada no ultravioleta para avaliação do teste ou perfil de dissolução de comprimidos. *Rev Bras Cienc Farm.* 2007;43(1):63-70.

Morelli B. Determination of binary mixtures of analgesic and spasmolytic drugs in pure and dosage forms by derivative spectrophotometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2003;33:423-33.

O'Haver TC, Begley T. Signal-to-noise ratio in higher order derivative spectrometry. *Anal Chem.* 1981; 53(12):1876-1878.

Ojeda CB, Rojas FS. Determination of rhodium: since the origins until today spectrophotometric methods. *Talanta* 2005;67(1):1-19.

Ojeda CB, Rojas FS. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. *Anal Chim Acta* 2004;518:1-24.

Paschoal LR, Ferreira WA, Prado MRD, Vilela APO. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. *Rev Bras Cienc Farm.* 2003;39(1):105-13.

Rocha FRP, Teixeira LSG. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria. *Quím Nova* 2004;27(5):807-12.

Rojas FS, Ojeda CB. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004–2008. *Anal Chim Acta* 2009;635:22-44.

Sabnis SS, Dhavale ND, Jadhav VY, Gandhi SV. Spectrophotometric simultaneous determination of Rabeprazole Sodium and Itopride Hydrochloride in capsule dosage form. *Spectrochim Acta A. Mol Biomol Spectrosc.* 2008;69:849–52.

Sirajuddin S, Khaskheli AR, Shah A, Bhanger MI, Niaz A, Mahesar S. Simpler spectrophotometric assay of paracetamol in tablets and urine samples. *Spectrochim Acta A. Mol Biomol Spectrosc.* 2007;68:747–51.

Toral MI, Pope S, Quintanilla S, Richter P. Simultaneous determination of amiloride and furosemide in pharmaceutical formulations by first digital derivative spectrophotometry. *Int J Pharm.* 2002;249:117-126.

Toral MI, Lara N, Gomez J, Richter P. Determinação de ferro em fase sólida por espectrofotometria derivada de segundo orden. *Bol Soc Chil Quim.* 2001;46(1):51-60.

Watson DG. Ultraviolet and visible spectroscopy. In: Watson DG. *Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists.* Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p.75-94