

DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE CUMARINA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Priscila Afonso Martins (IC)¹, Clarissa R. G. de Lima (IC)¹, Mirian Marcolan (PG)¹, Maira R. R. Magini (PQ)¹, Hueder P. M. De Oliveria (PQ)¹, Lucia Codognoto (PQ)^{1*}

¹Universidade do Vale do Paraíba / Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP: 12244-000, São José dos Campos – SP, Brasil, *codognoto@univap.br

Resumo - A cumarina (1,2-benzopirona) é encontrada como princípio ativo em medicamentos e possui atividades antibióticas, anticoagulante e analgésica. A espectroscopia de fluorescência foi utilizada para o desenvolvimento de uma metodologia para a determinação de cumarina em formulações farmacêuticas. A cumarina possui máximos de excitação e emissão em 310 nm e 390 nm, respectivamente. Foi observado um comportamento linear para o sinal da cumarina no intervalo de concentração de $2,5 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com linearidade de 0,998 e sensibilidade de $2,9 \times 10^{10}$ u.a. /mol L⁻¹. O método foi utilizado para a determinação de cumarina em formulações farmacêuticas (drágeas) e mostrou-se de fácil aplicação, sem a necessidade de tratamentos laboriosos da amostra. A quantificação de cumarina foi realizada utilizando-se adição de padrão e calibração externa, pôde-se observar que os resultados obtidos corroboram ($P < 0,05$), indicando que a matriz não foi um interferente na determinação de cumarina por espectroscopia de fluorescência.

Palavras-chave: cumarina, fluorescência, espectroscopia, medicamentos.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra (Química).

Introdução

A cumarina 1,2-benzopirona (Figura 1) é um cristal branco à temperatura ambiente, de aroma semelhante ao da baunilha, com ponto de fusão entre 68 e 70°C, massa molecular de 146,15 g/mol, ponto de ebulição entre 297 °C – 299 °C, densidade aparente de 0,7 g/mL. A cumarina possui boa solubilidade em etanol, clorofórmio, éter dietílico, óleos, sendo pouco solúvel em água (COHEN et al. 1979).

É um princípio ativo natural existente em diversas plantas como o guaco, a emburana, o agrião, a ipeca, o cumaru, o carapiá, a canela, a chicória, entre outras, e em frutas como o morango, a cereja, a framboesa e o damasco. É utilizada como fixador de perfumes, aditivo em tintas e spray, aromatizantes de alimentos, além de possuir propriedades antibióticas, bronco dilatadora, fungicida, anticoagulante, analgésica e também ser utilizada em tratamentos contra o câncer. A maioria das cumarinas possui propriedades farmacológicas, sendo utilizadas em diversas áreas da medicina (RODRIGUES et al. 2005; OLDENBURG, et al., 2008).

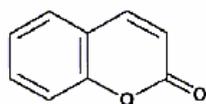


Figura 1: Fórmula estrutural da cumarina

Atualmente, mais de 1.300 cumarinas já foram identificadas de fontes naturais, especialmente de plantas verdes. As propriedades farmacológicas, bioquímicas e aplicações terapêuticas da cumarina simples dependem de seus padrões de substituição (HOULT; PAYÁ, 1996.).

Assim, a cumarina e seus derivados naturais e sintéticos são muito explorados devido às suas propriedades biológicas, químicas e físicas.

O intenso uso de cumarina nos últimos anos tem requerido o desenvolvimento de métodos de análise, não somente destinados para o controle de qualidade nas preparações farmacêuticas, mas também para fluidos biológicos e em cosméticos. (JIN-FANG, et al., 2008) A análise de medicamentos a base de cumarina surge para atender às necessidades tanto clínicas quanto toxicológicas.

Muitos dos métodos relatados na literatura para a análise de medicamentos consomem tempo e envolvem procedimentos elaborados e com baixa sensibilidade. Em técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o excipiente da formulação exige prévia filtração, e em métodos colorimétricos, um elemento de erro é introduzido devido ao mascaramento da cor por agentes coloridos. Na análise em material biológico, os métodos envolvendo cromatografia gasosa necessitam de prévia derivatização, e muito dos detectores empregados para HPLC empregam baixa vazão, consumindo tempo, além de serem caros (MOTHES, et al., 2003, MORZYCKA, B., 2002, RATERS, MATISSEK, 2008, AHN et al. 2008).

A cumarina e seus derivados exibem fluorescência, o que as tornam apropriadas para uso como cromóforos ópticos não lineares (KOVAC; NOVAC, 2002). Suas propriedades fluorescentes as tornam amplamente exploradas em ciências da vida.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de cumarina em medicamentos sintéticos (drágeas) utilizando espectroscopia de fluorescência.

Materiais e métodos

As medidas foram realizadas utilizando espectrofluorímetro Jobin-Yvon Spex fluoromax-2 com varredura de 200 a 800 nm, com cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

As soluções de cumarina padrão (Adrich 99%) foram obtidas a partir de uma solução estoque $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila. Os solventes utilizados para os estudos foram água Milli-Q, etanol, dioxano e acetonitrila.

O estudo da influência do pH do meio no comportamento espectroscópico da cumarina foi realizado em meio aquoso no intervalo de pH de 2,00 a 10,0.

A curva analítica para a cumarina foi obtida em meio aquoso, no intervalo de concentração de $2,5 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Após a obtenção da curva analítica e dos parâmetros de validação, a metodologia foi avaliada na determinação de cumarina em formulações farmacêuticas (drágeas). As amostras foram utilizadas sem pré-tratamentos, sendo somente diluídas com acetonitrila (solução estoque). Foram maceradas cinco drágeas do medicamento e 0,0102 g foi dissolvida em um balão volumétrico de 5 mL com acetonitrila. Desta solução foi retirada uma alíquota de 80,0 μL e diluída para 2,00 mL e esta solução foi adicionada a cubeta para a análise por espectroscopia de fluorescência. Para quantificação da cumarina na amostra foi utilizado o método de adição de padrão e calibração externa.

Resultados e Discussão

Inicialmente foram obtidos os espectros de excitação e emissão para a cumarina. Na Figura 2 encontram-se os espectros de fluorescência (excitação e emissão) obtidos para a cumarina, onde observa-se que os máximos de excitação e emissão são em 310 nm e 390 nm, respectivamente. Desta forma, o valor de 310 nm foi comprimento de onda de excitação utilizado para a obtenção dos espectros de emissão.

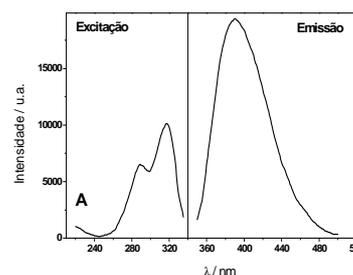


Figura 2: Espectro de excitação e emissão para a cumarina ($4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em meio aquoso.

O efeito, dos solventes, água, acetonitrila, dioxano e etanol, na intensidade do sinal de fluorescência da cumarina, foi avaliado buscando as condições onde se obtém melhor sinal analítico.

Os resultados obtidos indicaram que a cumarina apresenta maior sinal de fluorescência quando água é utilizada como solvente (Figura 3). Esse dado indica que há uma maior interação entre as moléculas de água com a da cumarina via processo de solvatação tanto do estado fundamental da mesma quanto do estado excitado (MARTINS, et al. 2008).

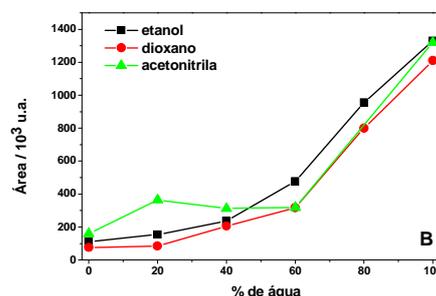


Figura 3: Variação da intensidade do sinal de fluorescência ($\lambda_{\text{emissão}} = 390 \text{ nm}$) para cumarina em diferentes solventes ($\lambda_{\text{excitação}} = 310 \text{ nm}$, concentração de cumarina $4,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

A influência do pH do meio na intensidade do sinal de fluorescência da cumarina também foi avaliado e não foram observadas diferenças significativas para fins analíticos. Adicionalmente, a utilização de soluções salinas (soro fisiológico) como solvente não influenciaram no perfil espectroscópico da cumarina. Isto indica que para o caso da cumarina, a força iônica do meio não tem influência sobre os estados excitados da mesma. Assim, para a obtenção da curva analítica foi utilizado como solvente somente água Milli-Q.

Após a otimização dos parâmetros experimentais a curva analítica foi obtida, em meio aquoso, e foi observado um aumento linear da intensidade relativa do sinal com a concentração

de cumarina no intervalo de $2,5 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Figura 3).

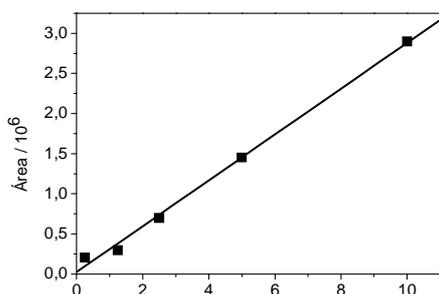


Figura 4: Curva Analítica obtida para a cumarina ($\lambda_{\text{excitação}}$ de 310 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ de 390).

A validação do método proposto, para determinação de cumarina em medicamentos, foi avaliada mediante alguns parâmetros. Para tal utilizou-se como referência o guia para validação de métodos analíticos da ANVISA e as recomendações de Shabir (SHABIR, 2003), que reúne as informações do FDA (*US Food and Drug Administration*), da USP (*US Pharmacopoeia*) e do ICH (*International Conference on Harmonization*). Os parâmetros avaliados foram: faixa linear, linearidade, sensibilidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). Os resultados obtidos encontram-se reunidos na Tabela 1.

Os valores de sensibilidade, faixa linear e linearidade foram obtidos da curva analítica (Figura 3). O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados, também a partir da curva analítica, pelas seguintes expressões:

$$LOD = 3 \frac{S_{y/x}}{b} \quad \text{e} \quad LOQ = 10 \frac{S_{y/x}}{b}$$

onde $S_{y/x}$ é a estimativa do desvio padrão da curva analítica e b o coeficiente angular da curva analítica.

Tabela 1: Resultados obtidos para a cumarina, utilizando espectroscopia de fluorescência.

Parâmetros	Resultados
Linearidade (r)	0,998
Sensibilidade (b) / (u.a. / mol L ⁻¹)	$2,9 \times 10^{10}$
*LOD / (10^{-6} mol L ⁻¹)	0,3
*LOQ / (10^{-6} mol L ⁻¹)	1,0

A repetibilidade, para a concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (n = 10), foi de 1,1%.

Após a obtenção dos parâmetros analíticos a metodologia proposta foi utilizada na determinação de cumarina em quatro amostras de medicamentos (drágeas). Foram utilizadas

amostras de medicamentos a base de cumarina, cuja composição principal era de 15 mg de cumarina (princípio ativo), 90 mg de troxerrutina e excipientes.

As quantidades de cumarina nos medicamentos foram obtidas utilizando-se o método de adição de padrão e calibração externa. As medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra. Os resultados encontrados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Resultados obtidos para a determinação de cumarina em drágeas. (Valor nominal de cumarina nas amostras, igual a 15 mg/drágea).

Amostra	Adição de Padrão		Calibração Externa	
	Cumarina (mg)	s* (mg)	Cumarina (mg)	s* (mg)
1	14,2	1,1	14,1	1,0
2	13,7	0,6	13,9	0,5
3	15,3	1,0	14,8	0,9
4	15,1	0,9	15,2	1,0

*estimativa desvio padrão absoluto (n=3)

O efeito matriz pode ser avaliado pela comparação dos valores obtidos para as amostras analisadas utilizando-se os dois métodos (calibração externa e adição de padrão). Pode-se verificar que não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os resultados obtidos pelos dois métodos, indicando que a matriz não é um interferente na determinação de cumarina em formulações farmacêuticas (drágeas) por espectroscopia de fluorescência.

Os resultados encontrados (Tabela 2) indicam que a espectroscopia de fluorescência pode ser uma alternativa viável para a quantificação de cumarina em formulações farmacêuticas. Cabe destacar que as amostras foram somente diluídas nos solventes adequados e analisadas sem tratamentos prévios.

Adicionalmente, um número maior de amostras deverá ser analisado, inclusive medicamentos a base de cumarina na forma de comprimidos, géis e xaropes.

Conclusão

A cumarina apresentou máximos de excitação e emissão em 310 nm e 390 nm, respectivamente. A curva analítica apresentou linearidade no intervalo de concentração de $2,5 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Avaliando os parâmetros de validação, foi possível verificar que a metodologia desenvolvida pode ser aplicada na análise de formulações farmacêuticas, apresentando as vantagens de não necessitar de um trabalho laborioso de preparo de amostras, ser rápida e utilizar pequena quantidades de solventes orgânicos. Na análise da

formulação farmacêutica (drágeas) não houve interferência da matriz no método. Assim, a espectroscopia de fluorescência mostrou-se adequada para a quantificação de cumarina em formulações farmacêuticas (drágeas).

Referências

- AHN M. J.; LEE M. K.; KIM Y. C; SUNG S. H, The simultaneous determination of coumarins in Angelica gigas root by high performance liquid chromatography-diode array detector coupled with electrospray ionization/mass spectrometry **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 2, p. 258-266, 2008.
- COHEN, A. J. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. **Food and Chemical Toxicology** vol. 17, p. 277-289, 1979.
- HOULT, J.R.S.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.
- KOVAC, B.; NOVAK, I. Electronic structure of coumarins. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 58, p. 1483-1488, 2002.
- MOTHESS, S; POPP, P; WENNRICH, R; **Chromatographia**, v. 57, p. S249, 2003.
- MORZYCKA, B.; **Chemica Analytica**, v. 47, n. 4, p. 571, 2002.
- NIE, JIN-FANG, WU, HAI-LONG, ZHU, SHAO-HUA, HAN, QING-JUAN, FU, HAI-YAN, LI, SHU-FANG, YU, RU-QIN. Simultaneous determination of 6-methylcoumarin and 7-methoxycoumarin in cosmetics using three-dimensional excitation-emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration methods. **Talanta**, v. 75, p. 1260-1269, 2008.
- OLDENBURG, J, ROST, S, SEIDEL, H, WATZKA, M, MUELLER-REIBLE, C. R. Pharmacogenetics of oral anticoagulation therapy with coumarins. **Medizinische Genetik**, v. 20, p. 230-235, 2008.
- PEREIRA, B. M. R., GONÇALVES, L. C., PEREIRA, N. A., Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas III. Atividade antidermatogênica. Congresso Brasileiro de Plantas Mediciniais, Curitiba, 1992, Anais. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, pg. 1, 1992.
- MARTINS, A .P, MARCOLAN, M.; LIMA, A.; MAGINI, M. R. R.; OLIVEIRA, H. P. M.; CODOGNOTO, Propriedades Espectroscópicas e Análise do Efeito Solvente em Cumarinas Substituídas. 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ, Águas de Lindóia, 2008.
- RATERS, MARION, MATISSEK, REINHARD. Analysis of coumarin In Various Foods Using Liquid Chromatography With Tandem Mass Spectrometric Detection. **European Food Research And Technology**, v. 227, p. 637-642, 2008
- RODRIGUES, RAFAELLA DA FONSECA. Extração da cumarina a partir das sementes da emburana (*Torresea cearensis*) utilizando dióxido de carbono supercrítico / Rafaella da Fonseca Rodrigues --Campinas, SP: [s.n.], 2005. Disponível em:
<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000381835>
- SHABIR, G A. Validation of high-performance chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of The US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, 987, p. 57-66, 2003.