

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Desenvolvimento de Analisadores Automáticos em Fluxo
para o Monitoramento de Analitos de Interesse
Farmacêutico Utilizando Microdispositivo LTCC e um
Minifotômetro *Lab-made*”**

Osmundo Dantas Pessoa Neto*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

*** bolsista CAPES**

**São Carlos – SP
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

P475da

Pessoa Neto, Osmundo Dantas.

Desenvolvimento de analisadores automáticos em fluxo para o monitoramento de analitos de interesse farmacêutico utilizando microdispositivo LTCC e um minifotômetro *Lab-made* / Osmundo Dantas Pessoa Neto. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

120 f.

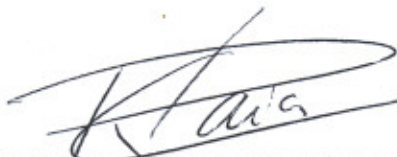
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Química analítica. 2. LTCC. 3. Fármacos. 4. Sistema em fluxo. I. Título.

CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado do candidato **Osmundo Dantas Pessoa Neto**, realizada em 14 de julho de 2011:*



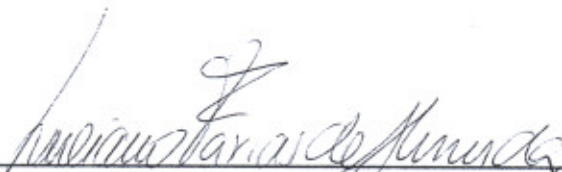
Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria



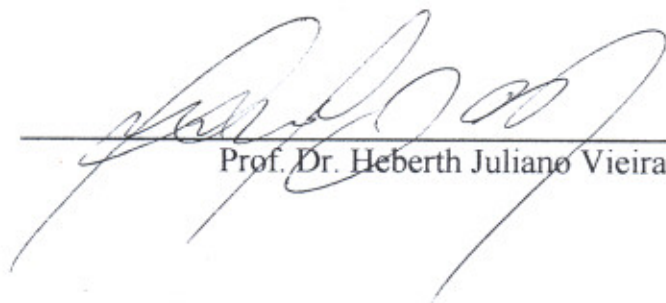
Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira



Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro



Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida



Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira

Dedico este trabalho,

*a Deus, alfa e o ômega, pelo dom da vida;
aos meus amados pais, Osmundo e Vânia Pessoa por
todo amor, carinho, dedicação ensinando-me
os bons valores da vida.*

*aos meus irmãos Maria do Céu (Mana) e Victor Rodrigues
pelo apoio e amizade durante estes anos.*

*“Coisa Linda, muito prazer! Hoje você vai ser minha
esse corpo me pertence eu vou pegar você!”*

“Eu sou o samba

Tenho certeza que você vai se amarrar

Eu sou o samba

Tenho certeza que você vai se entregar pra mim”

Eu Sou o Samba, Alexandre Pires.

Agradeço,

Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria pela valiosa orientação e confiança durante todo o doutorado.

Ao Dr. Julian Alonso por conceder às cerâmicas que foram utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho por, gentilmente, seus equipamentos para a realização de alguns experimentos e pela atenção.

À Amália Pessoa pelo companheirismo, atenção e carinho durante todos estes anos.

Aos amigos Amália, Vagner Bezerra e Thiago Guerreiro (Guerreiro do Pará) pela amizade, atenção, por tudo que vocês fizeram para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho. Muito obrigado!

Ao Pr. Marinho, irmã Ester, e todos da Igreja Batista Peniel que nos acolheu de forma fraterna em São Carlos. Deus os abençoe!

Aos amigos Josué e família, Luciene e família pelo carinho e dedicação.

Ao amigo Willian Toito Suarez, por por depois eu digo!

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear pela grande amizade que fizemos.

Aos meus amigos Jorge (irmão da Colômbia), Francisco Gambarra (Chicão-BOMBA) e a sua digníssima esposa Wanessa Gambarra por fazerem parte de minha família, assim como Vagner e Thayrla Bezerra e Thiago Guerreiro (está faltando a sua digníssima!).

Aos amigos Caio, Fernanda, Thiago Almeida e Vanessa, pela valiosa amizade que construímos aqui durante estes anos.

Às funcionárias da secretaria do Programa de Pós-graduação em Química.

À CAPES pela bolsa de estudo.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1. Propriedades físicas e elétricas da cerâmica Dupont 951AX	45
TABELA 5.1. Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de NAC e CAP	73
TABELA 5.2. Estudo dos possíveis interferentes na determinação de captopril em amostras comerciais empregando o sistema FIA proposto.....	74
TABELA 5.3. Estudo dos possíveis interferentes na determinação de N-acetilcisteína em amostras comerciais empregando o sistema FIA proposto.....	74
TABELA 5.4. Resultados do estudo de adição e recuperação de NAC adicionada a cinco amostras comerciais empregando o sistema em fluxo ($n = 3$).....	76
TABELA 5.5. Resultados do estudo de recuperação de CAP adicionada a cinco amostras comerciais ($n = 3$)	77
TABELA 5.6. Determinação de CAP em formulações farmacêuticas empregando o sistema FIA proposto e o método referência ⁹⁸ ($n = 3$).....	82
TABELA 5.7. Determinação de NAC em formulações farmacêuticas empregando o sistema FIA proposto e o método comparativo ($n = 3$).....	83
TABELA 5.8. Estudos dos possíveis interferentes na determinação fotométrica de AAc em formulações farmacêuticas	89
TABELA 5.9. Teste de adição e recuperação de AAc nas amostras analisadas ($n = 3$).....	90
TABELA 5.10. Resumos com os parâmetros de desempenho para a determinação de AAc.....	93
TABELA 5.11. Determinação de ácido ascórbico em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema FIA proposto e o método iodimétrico utilizado como referência ⁸⁴	94
TABELA 5.12. Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de adrenalina e dopamina empregando o sistema FIA proposto	99

TABELA 5.13. Teste de adição e recuperação de Adrenalina nas amostras analisadas ($n = 3$).....	100
TABELA 5.14. Teste de adição e recuperação de Dopamina nas amostras analisadas ($n = 3$).....	100
TABELA 5.15. Parâmetros de desempenho para a determinação das catecolaminas (ADN e DPN) utilizando o sistema proposto.....	101
TABELA 5.16. Determinação de tartarato de adrenalina em formulações farmacêuticas comerciais pelo método proposto e pelo método da farmacopéia brasileira ⁸⁴ , nível de confiança de 95%, ($n = 3$).....	102
TABELA 5.17. Determinação de cloridrato de dopamina em formulações farmacêuticas comerciais pelo método proposto e pelo método da farmacopéia americana ⁹⁸ , nível de confiança de 95%, ($n = 3$).....	102

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 Representação dos analisadores em fluxo, segundo a IUPAC.	5
FIGURA 2.2. Esquema com algumas posições dos RFS em sistemas de análises por injeção em fluxo. A, amostra; B, bobina reacional; L, alça de amostragem; T, solução transportadora; RFS, reator em fase sólida; x, ponto de confluência; IP, injetor proporcional; D, detector e W, descarte.	10
FIGURA 2.3. Estrutura molecular da <i>N</i> -acetilcisteína.	20
FIGURA 2.4. Fórmula estrutural do captopril.	22
FIGURA 2.5. Fórmula estrutural do ácido <i>L</i> -ascórbico.	24
FIGURA 2.6. Fórmula estrutural da adrenalina.	26
FIGURA 2.7. Fórmula estrutural da dopamina.	28
FIGURA 4.1. Os comprimentos de onda de máxima emissão ($\lambda_{max.}$) foram 472 nm, 525 nm e 640 nm, respectivamente. As larguras de banda ($\lambda_{1/2}$) foram de 20 nm, 30 nm e 20 nm respectivamente.	35
FIGURA 4.2. Curva de resposta do sensor em função do comprimento de onda do feixe de radiação incidente para uma série de sensores da família TSL. O sensor TSLB257 é aquele que foi empregado neste trabalho, pois os comprimentos de onda empregados foram em 470 e 525 nm ¹¹³	36
FIGURA 4.3. Representação do sensor utilizado. Com 1 = GND, 2 = Vcc (5 V) e 3 = saída.	36
FIGURA 4.4. Layout do circuito elétrico do fotômetro desenvolvido. GND = terra, RGB-LED = LED tricolor com emissão de radiação na região do vermelho (RED), verde (Green) e azul (Blue).	37
FIGURA 4.5. Circuito impresso do fotômetro desenvolvido. IF = interface, F = fonte de alimentação, GND = terra, R = red, G = green, B = blue, OP = amplificador operacional, e ganho é o potenciômetro necessário para amplificar o sinal de potencial (V) gerado. As dimensões do minifotômetro são: 4,0 x 4,0 cm.	37

FIGURA 4.6. Diagrama esquemático do sistema de análise proposto. SF = sistema em fluxo, PD (fotodiodo), AO = amplificador operacional, MC = microcomputador, IF = interface.	38
FIGURA 4.7. Circuito eletrônico do acionador de válvulas solenóides.....	39
FIGURA 4.8. Acionador de válvulas com 4 destas sendo acionadas simultaneamente. Um total de 7 válvulas podem ser acionadas.....	40
FIGURA 4.9. Interface gráfica do programa desenvolvido.	41
FIGURA 4.10. Fotografia do sistema completo.	42
FIGURA 4.11. Fotografia do minifotômetro desenvolvido. O circuito eletrônico do minifotômetro foi acondicionado em uma caixa, contendo o LED, o fotodiodo, o LTCC e os tubos de entrada e saída dos fluídos.	43
FIGURA 4.12. Equipamento a laser para o corte das cerâmicas verdes.	44
FIGURA 4.13. Prensa hidráulica para a laminação das cerâmicas.....	46
FIGURA 4.14. Rampa de aquecimento e resfriamento utilizada para a sinterização das cerâmicas verdes e construção do LTCC.....	47
FIGURA 4.15. Diagrama esquemático da sobreposição das camadas de cerâmicas. (a, b e c), entradas das soluções (amostra e reagentes), (d) saída. (A, B, C, D e E), camadas de cerâmicas. k, cavidade para suporte de vidro.....	48
FIGURA 4.16. Microsistema analítico sinterizado sem os conectores e os vidros. .	49
FIGURA 4.17. a) Diagrama esquemático do analisador em fluxo em posição de amostragem para a determinação de NAC e CAP. IP, injetor proporcional, A, <i>N</i> -acetilcisteína ou captopril; R ₁ nitrato de ferro(III) e R ₂ , 1,10-fenantrolina; C, carregador (tampão); D, descarte; L ₁ e L ₂ , alça da amostra e; x, y, z, entradas das soluções e d, saída da solução; k, caminho óptico do LTCC (0,5 mm) e w, w', ponto de confluência.	51
FIGURA 4.18. b) Diagrama esquemático do analisador em fluxo em posição de injeção para a determinação de NAC e CAP. IP, injetor proporcional, A, <i>N</i> -acetilcisteína ou captopril; R ₁ e R ₂ , hexacianoferrato e 1,10-fenantrolina; C,	

carregador (tampão); D, descarte; L_1 e L_2 , alça da amostra e R_2 ; x, y, z, entradas das soluções e d, saída da solução; k, caminho óptico do LTCC (0,5 mm) e w,w', ponto de confluência.....51

FIGURA 4.19. Diagrama Esquemático do analisador em Fluxo para a determinação de adrenalina e dopamina. Legenda: v_1 = válvula dos padrões ou amostras (ADN e DPN); v_2 = válvula da solução tampão; T, solução tampão; R_1 = água deionizada; RSF = reator em fase sólida (I_3^- imobilizado em resina aniônica); x, y e d são respectivamente as conexões com o LTCC (entradas e saída); z, ponto de confluência; D = descarte e k = caminho óptico do LTCC.....55

FIGURA 4.20. Reação de oxidação da adrenalina por triiodeto a adrenocromo ($\lambda = 472$ nm).....56

FIGURA 4.21. Reação de oxidação da dopamina por triiodeto a dopacromo.....56

FIGURA 4.22. Fluxograma do software para o controle do módulo de análise.....58

FIGURA 4.23. Procedimento utilizado no preparo do reator em fase sólida, ($Cu_3(PO_4)_2$).....60

FIGURA 4.24. Fotografia do reator em fase sólida.60

FIGURA 4.25. Diagrama esquemático do analisador em fluxo multicomutado para a determinação de ácido ascórbico utilizando reator em fase sólida, microssistema analítico (LTCC) e minifotômetro lab-made. A = amostra/padrão; T = solução transportadora (água deionizada) R_1 = batocupruína ($1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} – 30 mm \times 1,5 mm d.i.), respectivamente; V_1 , V_2 e V_3 = válvulas da amostra/padrão, água deionizada e batocupruína, respectivamente; RFS = reator em fase sólida, $Cu_3(PO_4)_2$; x, y = entradas das soluções no microssistema e d = saída; z = ponto de confluência; k = caminho óptico (0,5 mm); D = descarte.....61

FIGURA 4.26. Diagrama esquemático dos tempos de acionamentos das válvulas v_1 , v_2 e v_3 , relativas às adições de amostra/padrão, água e batocupruína, respectivamente em função do tempo nas etapas de medida do sinal analítico e limpeza.....62

- FIGURA 5.1. Estudo do tempo de resposta do detector com um potencial ajustado de até 5 V.....64
- FIGURA 5.2. Estudo da concentração do Fe(III) sobre o sinal analítico ($n = 3$) para uma concentração de NAC $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de 1,10-fenantrolina de $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; alças de amostragem de 60 cm; vazões do Fe(III) e da solução transportadora (tampão acetato pH 5,7) de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e $2,2 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente ($\lambda = 525\text{nm}$).....68
- FIGURA 5.3. Avaliação da concentração do Fe(III) sobre o sinal analítico ($n = 3$) para uma concentração de CAP $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de 1,10-fenantrolina de $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; alças de amostragem de 60 cm; vazões do Fe(III) e da solução transportadora (tampão acetato pH = 4,5) de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e $2,2 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente ($\lambda = 525\text{nm}$).....68
- FIGURA 5.4. Estudo da concentração do reagente 1,10-Fenantrolina sobre o sinal analítico ($n = 3$) para uma concentração de NAC de $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de Fe(III) de $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, alças de amostragem de 60 cm, vazões do Fe(III) e da solução transportadora (tampão pH = 5,7) de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e $2,2 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente.....69
- FIGURA 5.5. Estudo dos volumes das alças L_1 (amostra) e L_2 (reagente) sobre o sinal analítico ($n = 3$) para uma concentração de CAP $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $[\text{Fe(III)}] = 3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Fen}] = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; solução transportadora = tampão acetato pH = 5,7.....70
- FIGURA 5.6. Estudo da vazão do carregador (tampão acetato, pH 5,7) sobre o sinal analítico ($n = 3$) para uma concentração de NAC $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Volumes das alças L_1 (amostra) e L_2 (reagente) 60 cm; $[\text{Fe(III)}] = 3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Phen}] = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$71
- FIGURA 5.7. Estudo da vazão da Fen sobre o sinal analítico para uma concentração de NAC $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Fe(III)}] = 3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Fen}] = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, alças L_1 e $L_2 = 60 \text{ cm}$, solução carregadora = tampão acetato (pH = 5,65) e vazão da solução transportadora $1,9 \text{ mL min}^{-1}$72
- FIGURA 5.8. Estudo da repetibilidade para soluções de referência de NAC nas concentrações de (a) $5,0 \times 10^{-4}$ e (b) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 10$), $\lambda = 525\text{nm}$78

FIGURA 5.9. Estudo da repetibilidade para soluções de referência de CAP nas concentrações de (a) $5,0 \times 10^{-4}$ e (b) $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ ($n = 10$), $\lambda = 525\text{nm}$	78
FIGURA 5.10. Curva analítica para a determinação de CAP.	79
FIGURA 5.11. Curva analítica para a determinação de NAC.	80
FIGURA 5.12. Sinais transientes obtidos na determinação das soluções padrão de 1 a 7 ($1,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹) e amostras de CAP (a – f).	81
FIGURA 5.13. Sinais transientes obtidos na determinação das soluções padrão de 1 a 7 ($1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹) e amostras de NAC (a – g).	81
FIGURA 5.14. Estudo da proporção sal $\text{Cu}_3(\text{PO})_4$ /poliuretana para uma solução padrão de AAc $5,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ e batocuproína $1,5 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ . Reator em fase sólida (RFS) com dimensões: 50 mm x 1,8 mm d.i.. Tamanho de partícula entre 250-350 μm	84
FIGURA 5.15. Estudo do tamanho das partículas do reator em fase sólida (RFS). Soluções padrões empregadas: AAc $5,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ e batocuproína $1,5 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ . RFS (1:3, sal/resina) e dimensões: 50 mm x 1,8 mm d.i..	85
FIGURA 5.16. Estudo do comprimento do RFS. Soluções padrão empregadas: AAc $5,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ e batocuproína $1,5 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ . RFS (1:3, sal/resina). Tamanho de partícula entre 106-250 μm	86
FIGURA 5.17. Estudo do tempo de acionamento da válvula v1 (amostra ou padrão). Soluções padrões empregadas: AAc $5,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ e batocuproína $1,5 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ . RFS (1:3, sal:resina) e dimensões: 70 mm x 1,8 mm d.i.. Tamanho de partícula entre 106-250 μm	87
FIGURA 5.18. Efeito da variação da concentração da batocuproína: $[\text{AAc}] = 1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ . RFS (1:3, sal/resina) e dimensões: 70 mm x 1,8 mm d.i.. Tamanho de partícula entre 106-250 μm	88
FIGURA 5.19. Curva analítica para a determinação de AAc. Medidas realizadas em 472 nm. Batocuproína = $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ . RFS (1:3, sal/resina) e dimensões: 70 mm x 1,8 mm d.i.. Tamanho de partícula entre 106-250 μm	91

- FIGURA 5.20. Estudo da repetibilidade da solução de AAc $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Medidas realizadas em 472 nm. Batocuproína = $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. RFS (1;3, sal/resina) e dimensões: 70 mm x 1,8 mm d.i.. Tamanho de partícula entre 106-250 μ m ($n = 10$).....92
- FIGURA 5.21. Estudo da vazão da solução transportadora (solução de tampão fosfato pH = 7,0). Concentração do padrão de ADN = $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Dimensões do reator em fase sólida (RFS): 50 mm x 1,5 mm d.i.....95
- FIGURA 5.22. Estudo da vazão da solução transportadora (solução de tampão fosfato pH = 7,0). Concentração do padrão de DPN = $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Dimensões do reator em fase sólida (RFS): 50 mm x 1,5 mm d.i.....95
- FIGURA 5.23. Avaliação do comprimento do reator em fase sólida. Solução transportadora (solução de tampão fosfato pH = 7,0). Concentração do padrão de ADN = $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Vazão da solução transportadora = 1,6 mL min⁻¹.96
- FIGURA 5.24. Avaliação do comprimento do reator. Solução transportadora (solução de tampão fosfato pH = 7,0). Concentração do padrão de DPN = $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Dimensões do RFS.97
- FIGURA 5.25. Curva analítica obtida para a determinação de ADN. Condições utilizadas: Solução transportadora (tampão fosfato pH = 7,0). Dimensões do RFS: 30 mm x 1,5 mm d.i.....98
- FIGURA 5.26. Curva analítica obtida para a determinação de DPN. Condições utilizadas: Solução transportadora (tampão fosfato pH = 7,0). Dimensões do RFS: 30 mm x 1,5 mm d.i.....98

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE ANALISADORES EM FLUXO PARA A DETERMINAÇÃO DE ANALITOS DE INTERESSE FARMACÊUTICO UTILIZANDO MICRODISPOSITIVO LTCC E UM MINIFOTÔMETRO COMO SISTEMA DE DETECÇÃO. O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de analisadores automáticos em fluxo para a determinação de analitos de interesses farmacêutico utilizando um micro-dispositivo LTCC (*Low Temperature Co-fired Ceramics*) e um minifotômetro como sistema de detecção. Para tal, foram desenvolvidos os seguintes componentes: 1) minifotômetro a base de LED-RGB (*Light Emitting Diode – Red Green Blue*) cujos comprimentos de onda de máxima emissão são 472, 525 e 640 nm respectivamente como fonte de radiação e um fotodiodo (FD) como detector; 2) uma célula óptica para análise em fluxo baseada em LTCC. Um software foi criado em linguagem gráfica LabView® 7.0, para controle e aquisição de dados do sistema analítico. O minifotômetro para análise em fluxo e o software foram desenvolvidos para a determinação de *N*-acetilcisteína (NAC), captopril (CAP), adrenalina (ADN), dopamina (DPN) e ácido ascórbico (AAc) em formulações farmacêuticas. Primeiramente foi desenvolvido um minifotômetro baseado em LED-RGB como detector fotométrico. Em seguida, foi construído um acionador de válvulas (AV), o qual foi utilizado para controlar o tempo de acionamento das válvulas solenóides. Este controle foi executado utilizando um programa desenvolvido em Labview o qual foi acoplado a uma interface de aquisição de dados, USB 6008 da *National Instruments*, acoplada a um microcomputador. Com esta interface foi possível controlar também o minifotômetro construído bem como a aquisição e tratamento dos sinais gerados no LTCC*. Em todos os casos, o minifotômetro, o LTCC e o sistema em fluxo com multicomutação empregando válvulas solenóides de três vias (*Thee-way*) e reatores em fase sólida foram utilizados, exceto para a determinação de NAC e CAP onde um analisador com injetor comutador manual foi empregado. Os resultados obtidos com o sistema desenvolvido foram sempre comparado com métodos de referência ou validados na literatura, e não houve uma diferença significativa a um nível de confiança de 95%. Além disso, um baixo volume de reagentes e amostras utilizados (devido ao uso do LTCC), juntamente com um sistema de caráter universal (apto a ser aplicado em

qualquer outra aplicação em fluxo) foram outros diferenciais deste trabalho. O minifotômetro desenvolvido, de apenas 4 x 4 cm apresentou uma boa estabilidade e corroborou para os bons resultados obtidos neste trabalho.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF FLOW ANALYZERS FOR THE DETERMINATION OF PHARMACEUTICAL ANALYTES USING A LTCC MICRO-DEVICE AND A MINI-PHOTOMETER USED AS DETECTION SYSTEM. The objective of this study was to develop automatic flow analyzers for the determination of pharmaceutical analytes using a micro-device based on LTCC (Low Temperature Co-fired Ceramics) and a mini-photometer as the detection system. To perform this task, the following devices were developed: 1) A mini-photometer based on RGB-LED (Red Green Blue- Light Emitting Diode) which wavelengths of maximum emission are 465, 525, and 640 nm, respectively, was used as the radiation source. A photodiode (PD) was used as a detector; 2) An optical cell for flowing analysis. A software was developed in graphic language using LabView[®] 7.0 in order to control and acquire analytical data. The mini-photometer for flowing analysis and software were developed for the determination of *N*-acetylcysteine (NAC), captopril (CAP), adrenaline (DNA), dopamine (DPN) and ascorbic acid (AAc) in pharmaceutical formulations. First, the mini-photometer was developed and used as a photometric detector. Then, a lab-made valve actuator (VA) connected to a computer interface for data acquisition (National Instruments USB 6008) was used to switch on/off the solenoid valves. This interface also enabled to control the mini-photometer as well as the acquisition and processing of transient signals generated in the LTCC. In all determinations, the mini-photometer, the LTCC and the flow system with multicommutation employing three-way solenoid valves were used, except for NAC and CAP where an analyzer with manual injector was used. Solid-phase reactors were also used due to lower reagents consumption. The results from the developed system were compared with reference and validated methods (found in the literature) and there were no significant differences at 95% confidence level. The developed system with LTCC employs low volume of reagents and samples and can be used to determine several analytes in different matrices. applied in any other used (due to), along with a system of universal (able to be applied in any other application in flow) were other good features of this developed system. The good stability and sensibility of the developed mini-photometer (4 x 4 cm) enabled an adequate performance during the determinations.

SUMÁRIO

1. Introdução	2
2. Analisadores automáticos	4
2.1. Analisadores automáticos discretos ou em batelada	4
2.2. Analisadores automáticos robotizados.....	5
2.3. Analisadores automáticos em fluxo.....	5
2.3.1. Análise em fluxo segmentado	6
2.3.2. Análise em fluxo monosegmentado	6
2.3.3. Análise por injeção em fluxo	7
2.3.4. Análise por injeção sequencial	7
2.3.5. Análise em fluxo multicomutado	8
2.3.6. Análise em fluxo-batelada.....	8
2.4. Reatores em fase sólida ³⁸⁻⁴⁰	9
2.4.1. Configurações de RFS em analisadores por injeção em fluxo	9
2.5. Low temperature co-fired ceramics – LTCC.....	12
2.5.1. Desenho do microssistema em um programa CAD	12
2.5.2. Corte das cerâmicas	13
2.5.3. Laminação	13
2.5.4. Sinterização	13
2.6. Miniaturização de sistemas analíticos.....	14
2.7. Instrumentação para espectrofotometria UV-Vis.....	15
2.7.1. Fontes de radiação	16
2.7.2. Seletor de comprimento de onda.....	17
2.7.3. Células de amostragem (cubetas)	17
2.7.4. Principais características dos fotodetectores.....	17
2.8. Fotômetros a base de LED	18

2.9. Fármacos estudados.....	19
2.9.1. <i>N</i> -acetilcisteína	19
2.9.2. Captopril	21
2.9.3. Ácido Ascórbico (AAc)	24
2.9.4. Adrenalina.....	26
2.9.5. Dopamina	27
3. Objetivos	31
3.1. Objetivo geral	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. Parte Experimental	33
4.1. Soluções padrão, reagentes e amostras.....	33
4.2. Materiais e Equipamentos.....	33
4.2.1. Balança Analítica	33
4.2.2. pHmetro	33
4.2.3. Bomba peristáltica	33
4.2.4. Injetor comutador	34
4.2.5. Espectrofotômetro.....	34
4.2.6. Minifotômetro em fluxo a base de LED tricolor	34
4.2.7. Construção do acionador de válvulas	39
4.2.8. Construção do software de aquisição de dados e controle.....	40
4.2.9. Configuração do analisador em fluxo desenvolvido.....	42
4.2.10. Construção do microssistema construído com tecnologia LTCC.....	43
4.3. Determinação fotométrica de <i>N</i> -acetilcisteína (NAC) e captopril (CAP) em formulações farmacêuticas utilizando um microssistema construído com tecnologia LTCC.....	49
4.3.1. Soluções padrão, reagentes e amostras	49
4.3.2. Procedimento Experimental.....	50
4.3.3. Métodos de Referências	52

4.4. Determinação espectrofotométrica de adrenalina e dopamina utilizando reator em fase Sólida	53
4.4.1. Soluções padrão, reagentes e amostras	53
4.5.2. Preparação e Imobilização do triiodeto I_3^-	53
4.5.3. Método de Referência.....	54
4.5.4. Procedimento Experimental.....	54
4.6. Determinação espectrofotométrica de ácido <i>L</i> -ascórbico em amostras comerciais.....	58
4.6.1. Reagentes e soluções	58
4.6.2. Preparação e imobilização do reator em fase sólida	59
4.6.3. Método de referência	61
4.6.4. Procedimento experimental	61
5. Resultados	64
5.1. Minifotômetro desenvolvido	64
5.2. Determinação fotométrica de <i>N</i> -acetilcisteína e captopril utilizando minifotômetro <i>lab-made</i> e LTCC em formulações farmacêuticas	66
5.2.1. Estudo dos parâmetros químicos do sistema FIA.....	66
5.2.2. Estudo dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA.....	70
5.2.3. Estudo de potenciais interferentes.....	73
5.2.4. Adição e Recuperação.....	75
5.2.5. Estudo da repetibilidade dos sinais analíticos e frequência de amostragem	78
5.2.6. Curva Analítica.....	79
5.2.7. Determinação da concentração dos analitos nas amostras.....	82
5.3. Determinação fotométrica de ácido <i>L</i> -ascórbico utilizando minifotômetro <i>lab-made</i> e LTCC em formulações farmacêuticas	83
5.3.1. Estudos preliminares: avaliação da degradação de AAc	83
5.3.2. Estudo dos parâmetros do reator em fase sólida	84
5.3.3. Estudos dos parâmetros em fluxo.....	86

5.3.4. Efeito da concentração da batocuproína	88
5.3.5. Interferentes em potencial e teste de recuperação	88
5.3.6. Curva analítica	91
5.3.7. Estudo da repetibilidade dos sinais analíticos e frequência de amostragem	92
5.3.8. Aplicações	93
5.4. Determinação fotométrica de adrenalina e dopamina utilizando minifotômetro <i>lab-made</i> e LTCC em formulações farmacêuticas	94
5.4.1. Estudos de interferentes em potencial e testes de recuperação empregando o microsistema analítico.....	99
5.4.2. Estudo da repetibilidade dos sinais analíticos e frequência de amostragem	101
5.4.3. Parâmetros de desempenho.....	101
5.4.4. Aplicações	102
6. Considerações Finais	105
7. Atividades Futuras.....	108
8. Referências bibliográficas	110

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I

1. Introdução

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é crescente o número de falsificação de fármacos. No período de janeiro a setembro de 2010 foram apreendidas 53.575 unidades farmacêuticas falsificadas e contrabandeadas no Brasil além de 62,9 toneladas de medicamentos sem registro¹.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) constatou que “somente nos quatros primeiros meses deste ano foram apreendidas 171 toneladas de medicamentos fora da lei” o que corresponde a oito vezes e meia a mais do que no ano passado².

Levando em consideração o que foi exposto, é notória a necessidade do controle de qualidade de fármacos, visto que, sua adulteração pode gerar danos materiais no tocante à sonegação de impostos e danos à saúde que muitas vezes são irreversíveis, podendo levar o indivíduo a morte.

Os métodos utilizados para o controle de qualidade dos fármacos são, em geral, laboriosos, apresentam elevado consumo de reagentes e amostras, baixa frequência analítica e alto custo por análise. Esses inconvenientes vem sendo superados quando esses métodos são realizados por analisadores automáticos.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2. Analisadores automáticos

Os analisadores automáticos estão divididos em três grandes grupos, a saber:

- ✓ *Analisadores Automáticos Discretos ou em Batelada (Batch);*
- ✓ *Analisadores Automáticos Robotizados;*
- ✓ *Analisadores Automáticos em Fluxo (Flow).*

2.1. Analisadores automáticos discretos ou em batelada

São caracterizados pelo uso de recipientes individuais para cada amostra que é transportada para o sistema de detecção através de um sistema mecânico. Normalmente, a realização das medidas é feita após estabelecimento do equilíbrio químico e físico entre analito e os reagentes, objetivando alcançar a máxima sensibilidade.

Embora os analisadores automáticos em batelada possibilitem análises com boa precisão e exatidão, a cada amostra analisada o seu recipiente deve ser esvaziado e lavado ou substituído e isto, conseqüentemente, prejudica a velocidade analítica. Além do mais, estes analisadores são, em geral, complexos, envolvendo muitas partes móveis tornando-os pouco versáteis³.

2.2. Analisadores automáticos robotizados

Os analisadores automáticos robotizados são caracterizados por apresentar um braço mecânico (um robô) para execução de operações analíticas. A complexidade mecânica e o custo elevado fazem com que esses sistemas possuam diversas limitações para realização de análises automáticas. No entanto, eles desempenham um importante papel em etapas preliminares do procedimento analítico, como em tarefas que envolvam, por exemplo, a manipulação de materiais tóxicos ou explosivos. Entretanto, seu elevado custo de manutenção e aquisição, complexidade mecânica e baixa velocidade analítica são limitações que os tornam pouco atraentes para realização de análises automáticas, principalmente para análises de rotina².

2.3. Analisadores automáticos em fluxo

Os analisadores automáticos em fluxo são classificados, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada³ (*International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC*) de acordo com o processamento da amostras e/ou reagentes em (FIGURA 2.1):

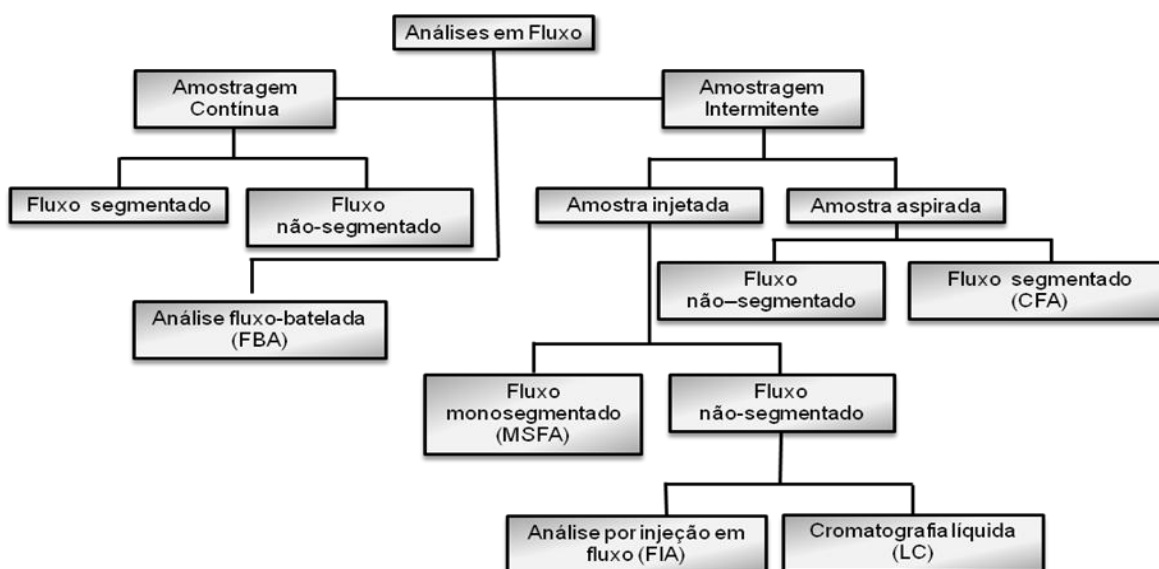


FIGURA 2.1 Representação dos analisadores em fluxo, segundo a IUPAC.

Os analisadores por injeção em fluxo (*Flow Injection Analysis – FIA*) e o em fluxo comutado (*Multicommutation in Flow Analysis – MFA*) serão descritos nas próximas seções por serem utilizados neste trabalho.

2.3.1. Análise em fluxo segmentado

SKEEGS⁴ desenvolveu o primeiro analisador em fluxo contínuo (*Continuous Flow Analysis – CFA*). Os CFAs apresentavam como característica a intersecção da zona de amostras por várias bolhas de ar. Atualmente estes sistemas são conhecidos como analisador em fluxo segmentado (*Segmented Flow Analysis – SFA*)^{3,5}. Nestes sistemas a amostra e reagentes são transportados em direção ao sistema de detecção na forma de um bombeamento em fluxo contínuo, sem segmentação por bolhas de ar.

2.3.2. Análise em fluxo monosegmentado

Os analisadores em fluxo monosegmentado têm como característica o confinamento da zona da amostra entre duas bolhas de ar o que permite a minimização da dispersão da zona de amostra no fluido carregador, além de impedir a intercontaminação das amostras.

PASQUINI e OLIVEIRA⁶ desenvolveram o primeiro trabalho empregando esta técnica, o qual recebeu o nome de análise em fluxo monosegmentado (*Monosegmented Flow Analysis – MSFA*). São características destes analisadores: boa reprodutibilidade e exatidão, alta velocidade analítica, versatilidade, baixo consumo de reagentes e amostra e baixo custo por análise (características dos FIA), alta sensibilidade e menor intercontaminação com maior tempo de residência (características dos SFA).

Comparando com os analisadores FIA, os analisadores MSFA apresentam uma maior frequência analítica em metodologias envolvendo reações lentas porque eles permitem um maior tempo de residência da amostra, com baixa perda de sinal analítico devido à dispersão e com desprezível intercontaminação.

Por exemplo, velocidades analíticas de 120 determinações por hora foram obtidas usando tempos de residência de 5 minutos⁶. Os analisadores MSFA têm sido usados em análise por extrações líquido-líquido⁷, em determinação do teor de analitos gasosos em amostras gasosas^{8,9}, em análise clínica^{10,11} e em procedimentos de adições de analito¹² e titulações¹²⁻¹⁵, entre outras aplicações.

2.3.3. Análise por injeção em fluxo

RUZICKA e HANSEN² propuseram um sistema de análise por injeção em fluxo, com o acrônimo, FIA (*Flow Injection Analysis* – FIA), cujas características são as seguintes: injeção da amostra em um fluido carregador que transporta esta amostra em direção ao detector sem a intersecção de bolhas de ar.

Durante o percurso da amostra em direção ao sistema de detecção a amostra sofre dispersão e o equilíbrio químico e físico não são atingidos, fazendo com que estes analisadores, em geral, apresentem baixa sensibilidade frente aos analisadores em batelada¹⁶.

Os FIA têm sido usados para implementarem diversos procedimentos analíticos, tais como: adições de padrão¹⁷⁻²⁰, titulações^{21,22}, exploração de gradientes de concentração¹⁸⁻²², extrações por solvente²³, adição de reagentes por confluência²⁴, zonas coalescentes (*merging zones*)²⁵, de fluxo intermitente (*intermittent flows*)^{26,27}, de reamostragem de zonas (*zone-sampling*)²⁸, de armazenamento de zonas (*zone-trapping*)²⁹, de multilocalização de detectores (*multisite ou leaping detector*)^{30,31}.

2.3.4. Análise por injeção sequencial

RUZICKA e MARSHALL³² propuseram os analisadores por injeção sequencial (*Sequential Injection Analysis* – SIA). Estes, por sua vez, são caracterizados pelo uso de válvulas *mult-port*, conhecidas como válvulas SIA que são responsáveis pela introdução das soluções (amostras, reagentes, tampões, etc) que são inicialmente aspiradas para um reator (câmara reacional) e em seguida

bombeados para o sistema de detecção.

Os analisadores SIA são robustos, devido às diferentes formas de combinar reagentes e amostras de forma flexível. A principal desvantagem é a baixa velocidade analítica quando comparados com outros analisadores automáticos em fluxo desenvolvidos para o mesmo propósito analítico. Os analisadores SIA, devido as suas características de multitarefa, têm sido usados para as mais diversas aplicações analíticas³³.

2.3.5. Análise em fluxo multicomutado

Os analisadores em fluxo multicomutado (*Multicommutation in Flow Analysis – MFA*), proposto por REIS *et al.*³⁴, são caracterizados pelo uso de válvulas solenóides de três vias (*Three Way*) para inserção de amostras, reagentes e do fluido carregador de forma multicomutada. Os volumes das soluções são definidos pelo tempo de acionamento das válvulas que atuam como comutador individual durante o processo analítico. Nestes analisadores, a pulsação da bomba peristáltica pode influenciar na precisão dos volumes amostrados.

Em revisões anteriores^{35,36}, os autores apresentam várias aplicações dos analisadores MFA, usando diferentes procedimentos analíticos.

2.3.6. Análise em fluxo-batelada

Os analisadores em fluxo-batelada, ou analisadores *flow-batch*, (*Flow-Batch Analyser – FBA*) foram desenvolvidos por HONORATO *et. al.*³⁷. Os analisadores FBA são caracterizados, principalmente, pelo uso de válvulas solenóides e de uma câmara de mistura aberta ou fechada. São características destes analisadores: alta precisão e exatidão, alta velocidade analítica, baixo custo por análise, baixo consumo, menor manipulação e contaminação de reagentes e amostras, geração de pouco resíduo para o meio ambiente, etc. Isto se dá pelo fato de serem aliadas a eles as características individuais dos analisadores em fluxo e em batelada.

Os analisadores em fluxo são bastante versáteis, visto que à eles podem ser incorporados diversos dispositivos com intuito de obter maior desempenho analítico. Exemplos desses dispositivos são: colunas de pré-concentração, termostatizador, múltiplos detectores, colunas de separação, reatores em fase sólida (RFS), microdispositivo em fluxo (LTCC) entre outros. Dentre estes dispositivos serão apresentados os RFS e LTCC.

2.4. Reatores em fase sólida³⁸⁻⁴⁰

Os reatores em fase sólida (RFS) são caracterizados pelo confinamento de reagentes sólidos em suportes implementados em analisadores em fluxo com objetivo de pré-concentração de analitos, remoção de possíveis interferentes, ou ainda para conversão de um analito em uma espécie detectável.

A utilização de RFS em analisadores em fluxo apresenta vantagens, tais como:

- ✓ simplificação do sistema em fluxo, visto que a sua utilização dispensa um canal adicional por onde deveria ser conduzido o reagente;
- ✓ minimização do efeito de dispersão que propiciando uma maior amplitude do sinal analítico o que possibilita a diminuição do volume de amostra;
- ✓ possibilidade de miniaturização do sistema em fluxo, visto que o RFS pode ser acoplado diretamente na célula de fluxo de um detector óptico;
- ✓ economia de reagentes por consequência das pequenas quantidades requeridas e
- ✓ aplicado quando o reagente utilizado não existe na forma solúvel como resinas de troca iônica.

2.4.1. Configurações de RFS em analisadores por injeção em fluxo

Na FIGURA 2.2 pode ser visualizado algumas diferentes configurações de analisadores em fluxo utilizando RFS⁴¹:

- a) pré-tratamento do reagente. Nesta posição, o reator pode tanto remover impurezas do reagente como liberar ou gerar reagentes instáveis;
- b) na alça de amostragem, com o propósito de conversão da amostra, podendo-se fazer também pré-concentração da amostra e multi-determinação;
- c) antes do sistema de injeção, com a finalidade de pré-tratamento da amostra;
- d) como optossensor, ou seja, reagente imobilizado no sistema de detecção. A finalidade é explorar as vantagens desse tipo de configuração como o aumento da sensibilidade, seletividade e miniaturização;
- e) entre o injetor e o detector, servindo assim para a conversão da amostra. É a posição mais utilizada para o posicionamento dos reatores no sistema em fluxo.

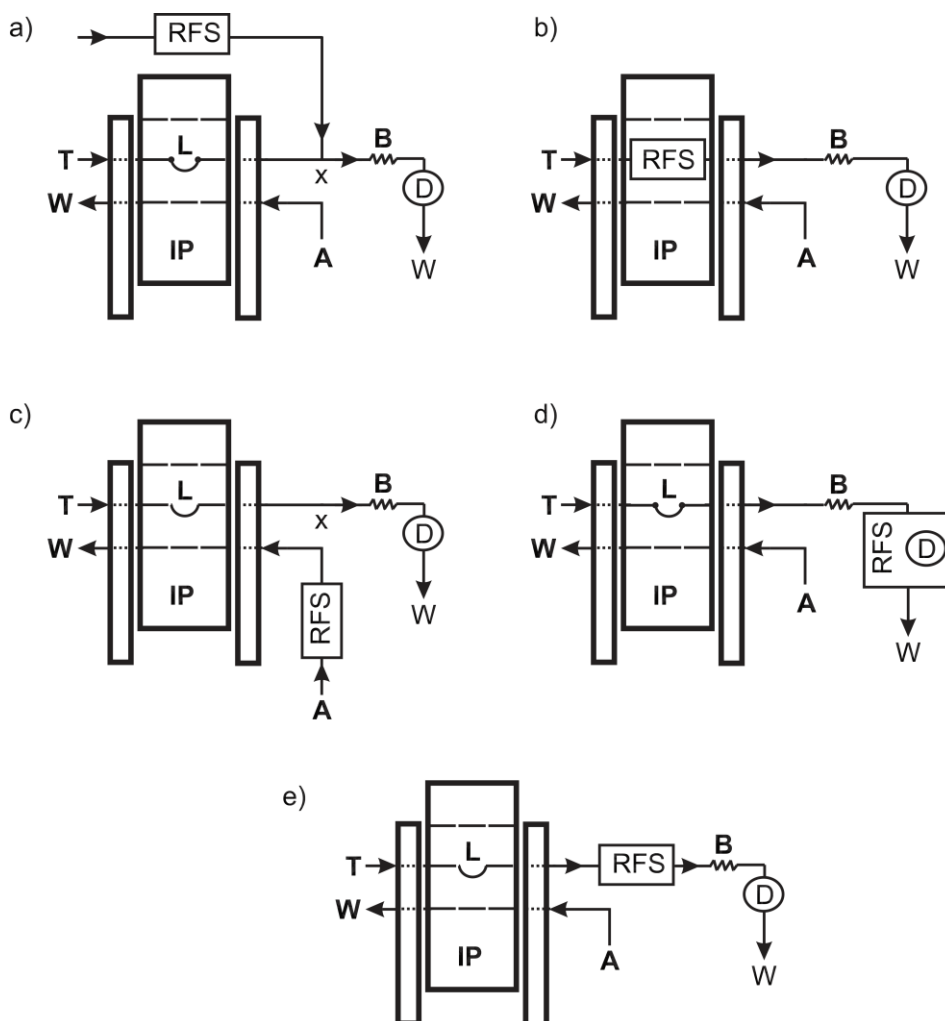


FIGURA 2.2. Esquema com algumas posições dos RFS em sistemas de análises por injeção em fluxo. A, amostra; B, bobina reacional; L, alça de amostragem; T, solução transportadora; RFS, reator em fase sólida; x, ponto de confluência; IP, injetor proporcional; D, detector e W, descarte.

O desempenho do acoplamento do RFS com analisadores em fluxo pode ser afetado por alguns fatores, a saber:

- ✓ partículas de dimensões muito pequenas podem aumentar a pressão hidrodinâmica do sistema em fluxo, por isso, devem ser selecionadas partículas de dimensões que permitam a passagem livre das soluções;
- ✓ a reação deve ser rápida, de modo que permita uma máxima conversão do analito, além de que as soluções que passem através do RFS devem ser quimicamente inertes aumentando assim sua vida útil;
- ✓ as partículas do RFS devem estar empacotadas de maneira que esse seja mecanicamente resistente ao fluxo. Isto faz com que não existam lacunas no RFS que possam favorecer o fenômeno de dispersão diminuindo assim a magnitude do sinal analítico.

O confinamento de reagentes em um RFS pode ser alcançado pela utilização de reagentes de baixa solubilidade nas soluções que fluem através do reator, conhecida como imobilização natural, ou pela retenção dos reagentes em suportes sólidos imobilizados como polímeros ou em resinas de troca-iônica, mecanismo químico e físico, respectivamente.

Na imobilização são utilizados reagentes sólidos de baixa solubilidade, resinas de troca-iônica e enzimas, células, tecidos e bactéria, por exemplo. Portanto, algumas limitações podem ser observadas, como por exemplo, o aumento da pressão hidrodinâmica do sistema em fluxo, decorrente do tamanho reduzido da partícula e a reatividade química (solubilidade no meio reacional).

Na imobilização de polímeros em suportes sólidos é misturado o reagente de interesse a uma solução de monômero de poliéster seguido da solidificação do mesmo. O reagente fica confinado em um bloco rígido podendo assim ser manipulado a fim de se obterem partículas granulométricas adequadas ao sistema em fluxo⁴²⁻⁴⁴.

A imobilização de reagentes em suportes sólidos pode envolver o confinamento dos reagentes em membranas microporosas, resinas de troca-iônica através de ligações eletrostáticas, como também ligações covalentes entre carbono

ou esferas de vidro de porosidade controladas após a silanização (e.g. imobilização de enzimas)⁴². As resinas de troca-iônica são bastante utilizadas como suporte de reagentes na preparação de RFS.

2.5. Low temperature co-fired ceramics – LTCC

Consiste na tecnologia de sobrepor camadas de cerâmicas previamente alinhadas antes do processo de sinterização. Em si são feitas através de substratos compostos por vidro, solventes orgânicos e cerâmicas, sendo mais comumente utilizada a alumina. Essa tecnologia permite a fabricação de microdispositivos com configurações tridimensionais complexas, permitindo assim ao usuário a implementação de diferentes tipos de detectores, como por exemplo, eletroquímicos^{45,46} e ópticos^{47,48} como também inserir diferentes etapas analíticas (pré-concentração⁴⁹, mistura de reagentes⁴⁸, separação⁵⁰, etc.). Outro atrativo é a não necessidade de se trabalhar em condições estritamente controladas, como por exemplo, “salas limpas”, além do baixo custo na fabricação quando produzido em larga escala.

O processo de fabricação destes microdispositivos basicamente envolve 4 etapas, as quais serão descritas com maiores detalhes nas secções seguintes.

- ✓ planejamento e desenho do microssistema analítico;
- ✓ corte das cerâmicas;
- ✓ laminação;
- ✓ sinterização.

2.5.1. Desenho do microssistema em um programa CAD

Esta etapa consiste na configuração estrutural do microssistema analítico para cada camada de cerâmica em forma sequencial de modo a se obter a forma final desejada. Geralmente é utilizado um programa em linguagem de programação

CAD que permite o analista gerenciar a configuração fluídica do microdispositivo.

2.5.2. Corte das cerâmicas

Os cortes das cerâmicas podem ser realizados através do uso de microfresadoras, equipamentos a laser, perfuração, jato de vapor de erosão ou através de máquinas de controle numérico de usinagem. Devido à sua acessibilidade, as máquinas de controle numérico têm sido amplamente utilizadas. Os equipamentos a laser são alternativas para atingir características menores em tempos mais curtos.

2.5.3. Laminação

O processo de laminação é uma das etapas mais críticas para a construção dos microssistemas analíticos. Esta etapa requer do analista uma maior atenção para evitar que se introduzam deformações na estrutura do microdispositivo, as quais podem acarretar perdas de líquidos durante as medidas. Durante a etapa de laminação as camadas de cerâmicas devem estar perfeitamente alinhadas.

2.5.4. Sinterização

A sinterização é o processo ao qual a cerâmica passa a ter uma estrutura rígida. Nesta etapa ocorre a volatilização total dos compostos orgânicos presentes na cerâmica a uma temperatura de aproximadamente 350°C durante 30 minutos. Em seguida, a temperatura é elevada a 850°C para que ocorra a interpenetração da alumina entre as camadas. Por fim ocorre o resfriamento da cerâmica a 5°C min⁻¹ e a eliminação do excesso de material cerâmico.

2.6. Miniaturização de sistemas analíticos

A miniaturização de sistemas analíticos, bem como em diversas outras áreas, se deu através da revolução dos componentes eletrônicos e na informática que ocorreu na década de 60. Exemplos de avanços tecnológicos podem ser vistos facilmente nas televisões, rádios, computadores, discos rígido, etc. que estão comumente inseridos em nosso cotidiano. A miniaturização tem despertado o interesse em diversas áreas, principalmente a química.

TERRY *et al.*⁵¹ desenvolveram o primeiro dispositivo analítico minaturizado. Neste trabalho foi desenvolvido um microcromatógrafo construído em lâmina circular constituída de silício de 5 cm. A ele foi inserido uma válvula de injeção e uma coluna de separação de 1,5 m de comprimento. Apesar de terem obtido bons resultados, esse microcromatógrafo não foi bem aceito pela comunidade científica, devido à falta de experiência tecnológica em métodos de separação. Isto fez com que as pesquisas relacionadas em miniaturização ficassem limitadas na década de 80 ao desenvolvimento de outros componentes, como por exemplo, microbombas, sensores e microválvulas⁵².

Um microssistema para cromatografia em fase líquida foi apresentado na década de 90 por MANZ *et al.*⁵³ e à esse microssistemas foi dado o nome de microssistemas para análises totais (μ TAS)⁵⁴. Nesse trabalho foi fabricado um cromatógrafo confeccionado em substrato de silício, com dimensões de 5x5 cm contendo uma coluna tubular aberta com detecção condutimétrica e conexões externas para uma bomba de cromatografia líquida.

Com o desenvolvimento dos μ TAS e dos componentes eletrônicos, tornou-se possível integrar ao sistema diversas etapas analíticas, a saber: pré-tratamento da amostra, reações químicas e técnica de separação em um único dispositivo^{53,55}. A idéia de inserir diversas etapas em um único dispositivo tornou estes microdispositivos conhecidos como laboratório em um chip (*Lab-On-Chip* – LOC)⁵⁶.

Estes dispositivos apresentam, em geral, características como baixo consumo de reagentes e/ou amostras, facilidade de automação de procedimentos analíticos, integração de sensores ópticos e/ou elétricos tornando-os ainda mais atrativos pela sua portabilidade, podendo assim ser utilizados para análises em

campo.

São relatados e descritos na literatura diversas técnicas e materiais utilizados no processo de microfabricação de dispositivos de análise química. Estas técnicas baseiam-se em métodos alternativos ou convencionais. Os métodos que utilizam tecnologias convencionais necessitam de uma fonte energética para fazer a transferência da imagem dos microcanais para o substrato⁵².

Os processos que envolvem este tipo de microfabricação são os mais utilizados por apresentarem microestruturas com excelentes resoluções e definições. Portanto, o custo de implementação em um laboratório é bastante elevado, isto se dá pelo fato da necessidade de um ambiente quimicamente limpo, chapas de aquecimento, estação fotolitográfica⁵⁷ (por raios-X, feixes de elétrons ou com radiação ultra violeta são as mais utilizadas), além de materiais de consumo tais como, substrato de vidro, silício, fotorresiste e quartzo.

Dentre os materiais utilizados no processo de microfabricação, os substratos de silício e silicatos, estão entre os materiais mais utilizados. Isto se deve a algumas características encontradas nesses substratos, como por exemplo, às suas propriedades físico-químicas. Porém os polímeros vêm se tornando um atrativo para a microfabricação devido ao seu baixo custo⁵⁸.

No Brasil uma infra-estrutura desse tipo pode ser encontrada em um Laboratório de Microfabricação (LMF) que está localizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) vinculado ao Ministério de Ciência e Tecnologia/CNPq em Campinas/SP⁵⁹.

Uma alternativa de processos de microfabricação consiste na utilização de “cerâmicas verdes”, assim denominadas por serem utilizadas em estado não sinterizado, denominado “em verde”. Isto faz com que nesse estado sejam maleáveis, podendo ser moldadas através de um simples corte com uma tesoura.

2.7. Instrumentação para espectrofotometria UV-Vis

As medidas espectrofotométricas UV-Vis consistem na medida de absorção molecular da radiação eletromagnética na região de 180-700 nm. Os principais componentes de um espectrofotômetro são: fonte de radiação, sistema

seletor de comprimento de onda, detector e indicador de sinal, esses serão mais detalhados nas próximas seções.

2.7.1. Fontes de radiação

A variação na intensidade da radiação eletromagnética (REM) pode acarretar erros significativos e prejudicar a confiabilidade dos resultados, por isso, faz-se necessário uma fonte de radiação estabilizada. A fonte de radiação deve ter também potência suficiente para garantir satisfatória luminosidade sobre a superfície do detector.

As fontes de REM podem ser classificadas em: contínuas (lâmpada de tungstênio) e as fontes de linhas que são aquelas que emitem em comprimentos de onda específicos⁶⁰. Além dessas, existem fontes alternativas de radiação desenvolvidas com alta tecnologia como, por exemplo, o LASER (*Ligth Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) e diodos emissores de luz (*Ligth Emmiting Diodes*) para a região do visível e infravermelho.

Estas fontes de radiação podem ser operadas em dois módulos, pulsado ou contínuo por meio de um sincronizador adequado. Será enfatizado as fontes de radiação a base de LED como fontes de REM por serem utilizados na construção do equipamento proposto neste trabalho de doutorado.

2.7.1.1. Diodos emissores de luz

Os diodos emissores de luz (LEDs) são dispositivos semicondutores eletroluminescentes usualmente adaptados em fotômetros portáteis como fonte de radiação. Os LEDs são caracterizados por possuírem uma junção *p-n*, onde *p*, excesso e *n*, falta de elétrons na camada de valência.

Os LEDs apresentam REM praticamente monocromáticas, portanto com larguras de banda de aproximadamente 20 nm, isto faz com que eles possam ser utilizados como fonte de radiação em fotômetros dispensando assim a utilização de seletores de comprimento de onda. Outro atrativo são os tipos de LEDs que podem

ser encontrados no comércio com altas intensidades de REM e em diversos comprimentos de onda (região ultravioleta ao infravermelho). Baixo custo, facilidade de aquisição e manuseio são outras características desses dispositivos.

2.7.2. Seletor de comprimento de onda

As fontes de radiação supracitadas, para serem utilizadas em fotômetros ou espectrofotômetros, geralmente, necessitam ser a mais monocromática possível, para evitar desvios da Lei de Lambert Beer. Para tal, sistemas seletores de comprimento de onda a base de filtros ou monocromadores podem ser utilizados. Dentre os seletores mais utilizados, pode-se destacar os monocromadores, que podem ser a base de grades de difração, prismas ou redes holográficas. Contudo, são os principais responsáveis por encarecer diversos equipamentos comerciais.

2.7.3. Células de amostragem (cubetas)

Geralmente podem ser fabricados em materiais como, quartzo, vidro ou plásticos transparentes, uma vez que as análises espectrofotométricas na região UV-Vis convencionais são realizadas no intervalo de comprimento de onda de 180-700 nm. Normalmente são encontrados dois tipos de cubetas, as em fluxo e as em bateladas

2.7.4. Principais características dos fotodetectores

Como dito anteriormente, antes da REM chegar ao sistema de detecção é necessário que se passe por um sistema seletor de comprimento de onda. Portanto, no caso de fontes REM que utilizam LASER ou LED não há a necessidade de tal dispositivo seletor, visto que essas fontes de radiação serem praticamente monocromáticas.

Atualmente existem diversos tipos de fotodetector ou fotossensor, a saber: dispositivo foto-emissivo (fototubos e fotomultiplicadoras); dispositivos de junção *p-n*

(fotodiodos e fototransistores); células foto-condutivas; células fotovoltaicas e transdutores de transferência de carga CCD (*Charge Injection Device*).

A radiação emitida pela fonte REM interage com a amostra e atinge a superfície foto-sensível dos fototransdutores produzindo assim uma corrente no canal emissor⁶¹. Para terem aplicações analíticas, o foto-sensor deve apresentar uma relação linear entre a intensidade da REM incidente sobre a sua superfície de resposta e a corrente gerada no canal emissor do detector.

Outra característica importante é a sensibilidade do foto-sensor. O mesmo deve apresentar respostas rápidas, facilidade de amplificação.

2.8. Fotômetros a base de LED

Existem na literatura diversos trabalhos que utilizam diodos emissores de luz como fonte de radiação⁶²⁻⁶⁷. A utilização de LED e fotodiodos ou fototransistores possibilitam a miniaturização do sistema de detecção.

da SILVA *et al.*⁶² desenvolveram uma instrumentação para a determinação fotométrica do fluxo eletrosmótico em um dispositivo microfluídico. O sistema proposto consiste em um microscópio trinocular acoplado a um fotodiodo integrado OPT101 e um LED de alta intensidade como fonte de radiação.

FERNANDES *et al.*⁶⁴ desenvolveram um procedimento em fluxo para a determinação de selênio em águas completamente mecanizado empregando um fotômetro construído a base de LED e mini-bombas como unidade de propulsão fluídica. O sistema proposto baseia-se na reação do selênio com iodeto de potássio em meio ácido para liberar iodo. O iodo formado oxida a azul de variamina formando um complexo violeta que apresenta máxima absorção em 530 nm. A curva analítica apresentou uma faixa linear de 0,010 a 0,500 mg L⁻¹. Um limite de detecção de 0,004 mg L⁻¹, desvios padrão relativo menor que 1,8% ($n = 4$) e frequência de amostragem de 23 determinações por hora foram obtidos.

GAIÃO *et al.*⁶⁵ desenvolveram um fotômetro a base de LED microcontrolado para análises “*screening*” de gasolina. Nesse trabalho foi utilizado

um LED infravermelho como fonte de radiação e um fotoresistor de PbSe como detector.

Um fotômetro *multi-LED* microcontrolado, portátil e de baixo custo foi proposto por GAIÃO *et al.*⁶⁸. O fotômetro desenvolvido era composto por seis LEDs (violeta, azul, verde, amarelo, laranja, e vermelho) como fonte de radiação e um fototransistor, com boa relação sinal/ruído, para aquisição dos sinais gerados. Os parâmetros de desempenho do fotômetro foram avaliados na determinação de xaropes ferrosos e análises bioquímicas.

A utilização de fotômetros que empregam LEDs como fonte de radiação e fototransistores ou fotodiodos como sistema de detecção acoplada a analisadores em fluxo apresentam, em geral, as seguintes características: miniaturização do sistema, baixo custo, elevada frequência de amostragem, boa estabilidade e precisões nas medidas.

2.9. Fármacos estudados

Para este trabalho foram escolhidos cinco fármacos com o objetivo de se avaliar o desempenho analítico do minifotômetro acoplado ao microsistema analítico (LTCC) utilizando reatores em fase sólida e sistemas em fluxo proposto nesse trabalho de doutorado. Os fármacos estudados foram: *N*-acetilcisteína (NAC), captopril (CAP), ácido ascórbico (AAc), adrenalina (ADN) e dopamina (DPN).

2.9.1. *N*-acetilcisteína

A *N*-acetilcisteína (NAC) e captopril (CAP) são compostos tiolíticos amplamente utilizados em formulações farmacêuticas, que possuem em suas estruturas um grupo tiol. Os grupos tióis encontrados nestes fármacos desempenham funções importantes nos sistemas biológicos^{69,70}.

A NAC, FIGURA 2.3, é um agente mucolítico aplicado em doenças obstrutivas e congestivas pulmonares, além de um poderoso antioxidante^{69,70}.

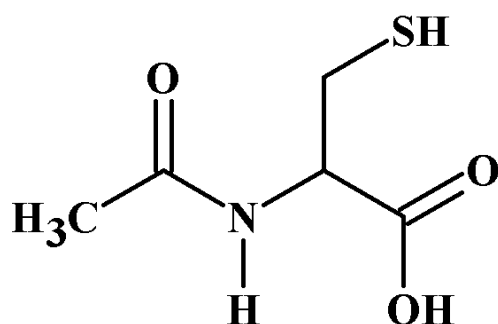


FIGURA 2.3. Estrutura molecular da *N*-acetilcisteína.

Existe na literatura diversos procedimentos analíticos para a determinação de NAC em formulações farmacêuticas que utilizam diferentes técnicas de detecção, dentre elas podem-se destacar: potenciométricas^{71,72}, condutimétricas^{73,74}, voltamétricas^{69,75,76}, turbidimétricas⁷⁷, espectrofotométricas⁷⁸⁻⁸⁰, cromatográficas de alta eficiência⁸¹.

O uso de analisadores em fluxo associado a estas técnicas são amplamente utilizados, com a intenção de superar algumas limitações tais como: baixa frequência de amostragem, elevados consumos de amostras e/ou reagentes entre outros.

Existem na literatura poucos trabalhos que utilizam procedimentos espectrofotométricos em fluxo para a determinação deste analito. A seguir serão relatados alguns trabalhos que utilizam técnicas espectrofotométricas e analisadores em fluxo para a determinação de NAC.

SUAREZ *et al.*⁷⁷ propuseram um procedimento analítico para a determinação espectrofotométrica de NAC utilizando um reator em fase sólida. Nesse trabalho uma alíquota de 400 μL de NAC, dissolvida em água, foi injetada em uma solução transportadora (borato de sódio $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e em seguida transportada em direção a um RFS (7,0 cm de comprimento por 2,0 cm de diâmetro) contendo fosfato de zinco imobilizado em uma resina de poliéster. Essa reação libera íons zinco (II) que complexa com a NAC e o produto formado foi monitorado espectrofotometricamente em 540 nm. Uma faixa linear de trabalho de $3,0 \times 10^{-5}$ a $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com limite de detecção de $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e desvio padrão relativo menores que 0,5% ($n=10$) foram obtidos. Com esse analisador em fluxo foi

possível determinar 60 amostras por hora a um nível de confiança de 95%.

VIEIRA e FATIBELLO-FILHO⁷⁰ desenvolveram um procedimento indireto para a determinação de NAC em formulações farmacêuticas. O método baseou-se na oxidação da NAC pelo Cério (IV). A solução de Cério (IV) age como um reagente oxidante e a solução de ferroína como reagente cromogênico. Com esse analisador uma faixa linear de trabalho de $6,5 \times 10^{-6}$ a $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, limite de detecção de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e uma frequência de amostragem de 60 determinações por hora foram obtidos.

Um procedimento em fluxo para a determinação de N-acetil-L-cisteína e captopril em formulações farmacêuticas foi desenvolvido por CHAGAS *et al.*⁸². O procedimento proposto consiste na reação com radical iminoquinona produzido pela oxidação de *N,N*-dimetil-*p*-fenilenodiamina em meio ácido. A faixa linear de trabalho de 2,5 a 90 e 5,0 a 50 mg L⁻¹ para NAC e CAP, respectivamente. Os limites de detecção alcançados foram de 0,2 e 1,8 mg L⁻¹ e desvios padrão relativos (n=10) obtidos formam inferiores a 2,0%. O procedimento foi aplicado a amostras comerciais de NAC e CAP e os resultados obtidos foram concordantes com os métodos de referência para 95% de confiabilidade.

2.9.1.1. Métodos de Referência

A cromatografia líquida de alta eficiência é recomendada pela Farmacopéia Americana⁸³. Nessa técnica uma solução de bissulfito de sódio é utilizado como padrão interno e a determinação de NAC é medida espectrofotometricamente em 214 nm.

A Farmacopéia Brasileira⁸⁴ recomenda a titulação potenciométrica utilizando nitrato de mercúrio (II) como titulante, um eletrodo indicador de ouro e um eletrodo de calomelano como eletrodo de referência.

2.9.2. Captopril

O captopril é um inibidor da enzima conversora de angiotensina,

amplamente utilizada para tratar doenças de hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva⁸⁵. A fórmula estrutural do captopril é apresentada na FIGURA 2.4.

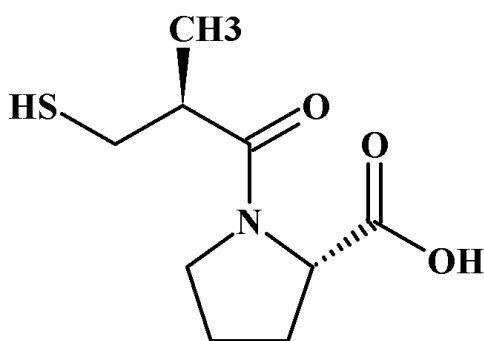


FIGURA 2.4. Fórmula estrutural do captopril.

Existem na literatura diversos métodos para a determinação de captopril em diferentes matrizes. Dentre estes métodos podem se destacar os espectrofotométrico⁸⁶⁻⁸⁹, quimiluminescência^{90,91}, amperométrico⁹², cromatográficos⁹³, condutométrico⁹⁴, entre outros.

A seguir serão relatados alguns trabalhos desenvolvidos para a determinação espectrofotométrica de captopril utilizando analisadores em fluxo.

SANCHEZ *et al.*⁹⁵ desenvolveram um procedimento analítico utilizando um analisador em fluxo multicomutado para a determinação de captopril em formulações farmacêuticas. O método proposto consiste na redução do Cu (II) a Cu (I) pela ação do fármaco e posterior complexação do Cu(I) com 4,4-dicarboxi-2,2-biquinolina e o produto dessa reação foi monitorado em 562 nm. O método apresentou uma faixa linear de $25,0-300,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para captopril com limite de detecção $7,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com 99,7% de confiança. Uma frequência de amostragem de 47 determinações por hora foi alcançada com um desvio padrão relativo nas medições de 2,2% a um nível de confiança de 95%.

SUAREZ *et al.*⁸⁷ desenvolveram um analisador por injeção em fluxo, simples e rápido, para a determinação espectrofotométrica de captopril em produtos farmacêuticos utilizando um reator em fase sólida contendo cloranilato de prata imobilizada em uma resina de poliéster. Esse método explora a formação de um sal insolúvel formado da reação Ag (I) e captopril no reator em fase sólida liberando o ânion cloranilato na solução. Esses ânions ao reagirem com os íons férricos

produzem um complexo que possui máxima absorção em 528 nm. O método proposto apresentou os seguintes parâmetros de desempenho analítico: faixa linear de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com limite de detecção $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, desvio padrão relativo de 0,35% ($n=10$) e uma frequência analítica de 70 determinações por hora. O método então foi aplicado na determinação do analito em formulações farmacêuticas e os resultados obtidos foram comparados com o método potenciométrico.

Um analisador por injeção em fluxo simples, rápido e de baixo custo foi proposto por SCHMIDT JR. *et al.*⁹⁶. O procedimento baseia-se na formação de triiodeto o qual é consumido na presença do analito e o produto formado medido espectrofotometricamente em 350 nm. O método apresentou uma faixa linear de $5,0$ a $200,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. O coeficiente de variação ($n = 20$) de 1,2% e uma frequência de 72 determinações por hora foi obtido e os resultados mostraram-se concordantes quando comparado com o método indicado pela Farmacopéia Americana a um nível de confiança de 95%. O consumo de reagentes foi estimado em 18 µg KMnO₄ e 10 mg de KI para cada determinação, estimando-se assim um custo de US\$ 2,50 para 1000 determinações.

TZANAVARAS *et al.*⁹⁷ desenvolveram dois analisadores por injeção em fluxo e por injeção sequencial para a determinação espectrofotométrica de captopril baseado na oxidação do Fe(III) pelo reagente 2,2-dipiridil-2-piridilhidrazona em meio ácido. O produto dessa reação é medido espectrofotometricamente em 535 nm. Uma faixa linear de trabalho de $7,0$ a 1000 mg L⁻¹, limite de detecção $4,0$ e $70,0$ mg L⁻¹ para os analisadores FIA e SIA, respectivamente, foram obtidos. Um desvio padrão de 0,8 e 1,2% e 120 e 60 determinações por hora em ambos analisadores foi alcançado e o método proposto foi aplicado em amostras farmacêuticas e os resultados foram concordantes quando comparados com o método de referência (HPLC).

2.9.2.1. Método de Referência

O método de referência para a determinação de captopril, segundo a Farmacopéia Americana⁹⁸ é o método iodimétrico.

2.9.3. Ácido Ascórbico (AAc)

O ácido *L*-ascórbico (vitamina C) é um importante antioxidante solúvel em água presente em sistemas químicos e biológicos. Está presente em frutas e vegetais e é uma vitamina indispensável para a saúde humana. A deficiência desta vitamina no organismo humano pode ocasionar: inflamação das gengivas, dores nas articulações e problemas com cicatrização.

O AAc é comumente utilizado como complemento em dietas com deficiência dessa vitamina. A FIGURA 2.5 apresenta a fórmula estrutural do ácido *L*-ascórbico.

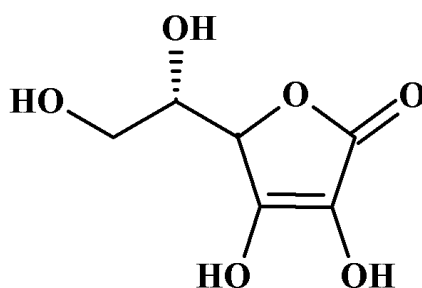


FIGURA 2.5. Fórmula estrutural do ácido *L*-ascórbico.

Além disso, ácido *L*-ascórbico tem um papel essencial como cofator enzimático para a síntese de moléculas biologicamente importantes, como o colágeno, catecolaminas, mielina e peptídeos neuroendócrinos, e funciona como um destruidor de radicais livres em sistemas biológicos por hidrogênio transferência de átomo.

PAIM *et al.*⁹⁹ propuseram um método automatizado para determinação espectrofotométrica de ácido ascórbico em fármacos empregando sistema de amostragem binária. A reação é baseada na destruição do complexo tiocianato de ferro (III) pelo ácido ascórbico, a viabilidade do método foi verificada empregando uma faixa de massa de amostra de 0,0018 até 0,0180 g. Os resultados obtidos foram concordantes com o método de referência, com um desvio padrão de 1,5% (n=7) e uma frequência analítica de 120 determinações por hora.

PEREIRA *et al.*¹⁰⁰, desenvolveram um procedimento para determinação espectrofotométrica de ácido ascórbico em formulações farmacêuticas empregando

um sistema por injeção em fluxo. Os autores realizaram um estudo de estabilidade e reprodutibilidade empregando um reator de fase sólida contendo fosfato de cobre (II) imobilizado em uma resina de poliéster. A determinação foi realizada pela redução do íon Cu (II) a Cu (I), e o transporte da fase líquida se deu com uma solução de tampão acetato (pH 4,5) e detecção foi realizada do produto da reação entre Cu (I) e batocuproína em 480 nm. A faixa linear do trabalho foi de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $3,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e uma frequência analítica de 80 determinações por hora.

MONAKHOVA *et al.*¹⁰¹ aplicaram o algoritmo de análises de componentes independentes para determinação de vitaminas em misturas complexas. A análise era baseada na decomposição do espectro na região ultravioleta. Os autores realizaram uma comparação entre o algoritmo empregado neste trabalho com outros já estabelecidos na literatura como MCR-ALS, SIMPLISMA entre outros e observaram que os resultados indicaram que o algoritmo proposto pode ser comparável com os outros. Estudaram também a influência de vários fatores como: abundância do composto, ruído entre outros, e o método proposto foi aplicado para análise de mistura modelo e amostras reais tais como: bebidas energéticas, suplementos alimentares e drogas multivitamínicas.

CHEN *et al.*¹⁰² desenvolveram um procedimento para determinação quimiluminescente de ácido ascórbico em soro humano com base no sistema peróxido de hidrogênio-carbonato de sódio. Foram realizadas algumas otimizações de alguns parâmetros como: vazão do fluxo, pH e tamanho de partículas. A faixa linear de trabalho foi de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $6,7 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e as recuperações em amostras reais variaram de 83 a 111%.

2.9.3.1. Método de Referência

O método de referência para a determinação de AAc preconizado pela Farmacopéia Americana USP⁸³. Baseia-se na titulação do fármaco com uma solução de iodo.

2.9.4. Adrenalina

A adrenalina (ADN) é um hormônio derivado da modificação de um aminoácido aromático (tirosina) e desempenha um papel importante na fisiologia como um neurotransmissor do sistema nervoso central¹⁰³. A FIGURA 2.6 mostra sua fórmula estrutural.

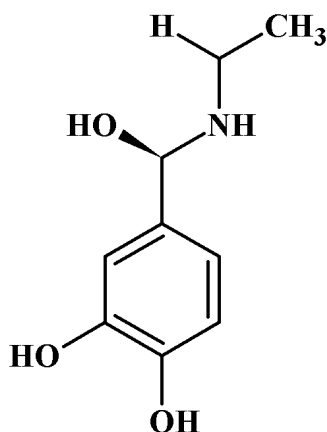


FIGURA 2.6. Fórmula estrutural da adrenalina.

NEVADO *et al.*¹⁰⁴, desenvolveram um método de injeção em fluxo para determinação espectrofotométrica de adrenalina e dopamina, empregando uma solução de hidróxido de sódio. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em 390 nm, com limite de quantificação de $2,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para dopamina e $3,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para adrenalina, apresentando uma frequência analítica de 130 determinações por hora.

TEIXEIRA *et al.*¹⁰⁵ propuseram um método de injeção em fluxo para determinação espectrofotométrica de adrenalina em formulações farmacêuticas, empregando um reator em fase sólida contendo dióxido de chumbo (IV) imobilizado em uma resina de poliéster. A adrenalina em tampão fosfato reagia com o reator em fase sólida contendo chumbo (PbO₂), gerando adrenocromo como produto que foi monitorado continuamente em 416 nm. A faixa linear de trabalho foi de 0,1 a 0,8 mmol L⁻¹ com a obtenção de um limite de detecção de 8×10^{-3} mmol L⁻¹ e uma recuperação de 96,5 – 105%, apresentando uma frequência analítica de 130 determinações por hora.

PALOP *et al.*¹⁰⁶ desenvolveram um sistema em fluxo para determinação simultânea de adrenalina e noradrenalina em amostras sintéticas, utilizando oxigênio molecular para oxidação dos fármacos, e posterior determinação fluorimétrica. A oxidação de adrenalina resulta na formação de um composto com estrutura indefinida, e apresenta uma reação complexa. O monitoramento da adrenalina foi em 450 nm e a quantidade de ambas as espécies em 520 nm, verificaram que a temperatura influenciava e por isso foi fixada em 55°C, através de uma imersão do loop da amostra em um banho-maria. A faixa linear de trabalho para adrenalina foi de 0,5 a 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com limite de detecção de 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambas as espécies.

ABDULRAHMAN *et al.*¹⁰⁷ propuseram um método de injeção em fluxo para determinação espectrofotométrica de algumas catecolaminas, entre elas a adrenalina. A reação do método se baseava na oxidação das catecolaminas com p-toluidina e periodato de sódio, formando um produto de coloração alaranjada solúvel em água com absorvância máxima em 480 nm. A faixa linear de trabalho foi de 5 a 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com limite de detecção de 0,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando também uma boa precisão e exatidão na determinação das catecolaminas.

2.9.4.1. Método de Referência

Dois métodos de referência são propostos pela Farmacopéia Americana USP⁹⁸ (volumétrico e espectrofotométrico) para a determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas. O método utilizado como de referência neste trabalho foi o espectrofotométrico.

2.9.5. Dopamina

A dopamina é um neurotransmissor, precursor natural da adrenalina e da noradrenalina, tem como principal função a atividade estimulante do sistema nervoso central. A deficiência deste neurotransmissor está associada ao Mal de Parkinson¹⁰⁸. A sua fórmula estrutural é representada na Figura 2.9.5.

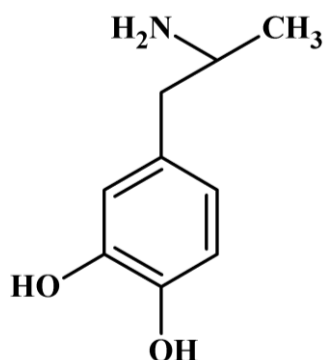


FIGURA 2.7. Fórmula estrutural da dopamina.

XU *et al.*¹⁰⁹ propuseram um método direto de análises por injeção em fluxo quimioluminescente para a determinação de dopamina em fármacos. O método baseia-se na intensificação da reação da dopamina com Ag(III) em solução alcalina. O sistema proposto apresentou faixa linear de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, limite de detecção de $3,0 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹ e um desvio padrão relativo de 2,3% ($n = 13$) para uma concentração $1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de dopamina.

LUPETTI *et al.*¹¹⁰ desenvolveram um sistema FIA com zonas coalescentes para determinação de dopamina empregando um extrato vegetal como fonte enzimática de polifenol oxidase. Neste sistema, a amostra era injetada simultaneamente com a polifenol oxidase ocorrendo a formação de dopaminaquinona que foi monitorada espectrofotometricamente em 466 nm.

NALEWAJKO *et al.*¹¹¹ propuseram um método por injeção em fluxo para determinação de dopamina baseada na inibição da intensidade quimioluminescente com luminol-hexacianoferrato (III) em meio básico. Os autores obtiveram duas faixas linear de trabalho que foram de 30 a 100 µg L⁻¹ e 400 a 3000 µg L⁻¹, com um desvio padrão relativo de 2,32 % para 70 µg L⁻¹ e 1,22% para 1500 µg L⁻¹ de dopamina ($n=20$). O limite de detecção foi de 5 µg L⁻¹ apresentando uma frequência analítica de 135 amostras por hora.

MOGHADAM *et al.*¹¹² desenvolveram um método espectrofotométrico para determinação simultânea de ácido ascórbico, ácido úrico e dopamina em amostras de soro e urina. O método baseava-se na diferença cinética da reação dos analitos com o agente oxidante (tris 1,10 – fenantrolina) e complexo com ferro (II)

$[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ em pH 4.4. Os dados obtidos foram tratados por métodos quimiométricos como mínimos quadrados parciais e rede neural, a seleção do melhor método quimiométrico foi realizada através da predição, teste t randomizado, validação cruzada e randomização Y. Os resultados mostraram que o método de rede neural foi mais eficiente do que os outros métodos quimiométricos. Todos os fatores que afetam as condições experimentais foram investigados e melhor faixa de trabalho para ácido ascórbico, ácido úrico e dopamina foram 4,3 a 74,1, 4,3 – 78,3, e 2,0 – 33,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

2.9.5.1. Método de Referência

A Farmacopéia Americana USP⁹⁸ indica a determinação de dopamina em soluções injetáveis por cromatografia líquida com detecção espectrofotométrica em 280 nm utilizando uma coluna de aço inoxidável empacotada com octilsilano ligado a partículas de sílica porosa.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Desenvolver um minifotômetro *lab-made* a base de LED-RGB como fonte de radiação monocromática e fotodiodo como sistema de detecção acoplado a um microssistema analítico construído com tecnologia LTCC e de métodos automatizados de análises utilizando reatores em fase sólida para determinar analitos de interesse farmacêutico.

3.2. Objetivos específicos

- *Construir um minifotômetro com uma célula de fluxo baseada em um dispositivo LTCC acoplado a um LED-RGB como fonte de radiação e um fotodiodo (FD) como detector. Permitindo medidas fotométricas com máximos de emissão em 472, 525 e 640 nm;*
- *Desenvolver um software de controle do sistema, aquisição e tratamento dos dados gerados pelo detector;*
- *Desenvolver um acionador de válvulas para controle de abertura e fechamento das válvulas solenóides;*

CAPÍTULO IV

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO IV

4. Parte Experimental

4.1. Soluções padrão, reagentes e amostras

Para o preparo das soluções padrão e amostras foram utilizados reagentes químicos de grau analítico das marcas MERCK, SIGMA, SYNTH, QUEMIS e BAYER. A água utilizada nos preparos dessas soluções foi sempre destilada e purificada em sistema *Mili-Q* da Millipore® com resistividade maior ou igual a 18 MΩ cm.

4.2. Materiais e Equipamentos

4.2.1. Balança Analítica

As medidas de massas foram realizadas através de uma balança analítica Mettler, modelo H10 com precisão de $\pm 0,1$ mg.

4.2.2. pHmetro

As medidas de pH das soluções foram realizadas usando-se um pHmetro Orion modelo EA 940 com um eletrodo de vidro combinado a base de Ag/AgCl contendo uma solução de KCl 3,0 mol L⁻¹.

4.2.3. Bomba peristáltica

Uma bomba peristáltica (BP), da marca Ismatec®, modelo ISM 931 com 12 canais foi utilizada para propulsionar os fluidos no sistema analítico, com o

controle digital de direção e velocidade (RPM) sendo controlada através da porta serial RS232 do microcomputador por meio de um programa escrito em linguagem visual LabView[®] 7.0 da *National Instruments*. Foram empregados tubos e conexões de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm para confecção das alças de amostragem e linhas de condução dos fluidos.

4.2.4. Injetor comutador

O injetor comutador (IC), construído em acrílico, foi utilizado nas determinações de *N*-acetilcisteína (NAC) e captopril (CAP) como sistema de introdução das soluções de referência, amostras e reagentes no sistema em fluxo proposto. Os demais analitos foram determinados utilizando válvulas solenóides de três vias empregando um acionador de válvulas acoplado a uma interface USB-6008 e gerenciado pelo software escrito em LabView[®].

4.2.5. Espectrofotômetro

Um espectrofotômetro da Ocean-Optics, modelo USB 2000, foi utilizado para registrar os espectros de emissão dos LEDs.

4.2.6. Minifotômetro em fluxo a base de LED tricolor

O minifotômetro *Lab-made* proposto foi utilizando juntamente com o LTCC, diodo emissor de luz tricolor de alta intensidade (LED – RGB) como máximo de emissão nos comprimentos de onda 472, 525 e 640 nm como fonte de radiação e um fotodiodo como detector. Os comprimentos de onda de emissão do LED-RGB foram avaliados utilizando o espectrofotômetro comercial da Ocean Optics. Na FIGURA 4.1 são mostrados os espectros de emissão do LED-RGB utilizado neste trabalho.

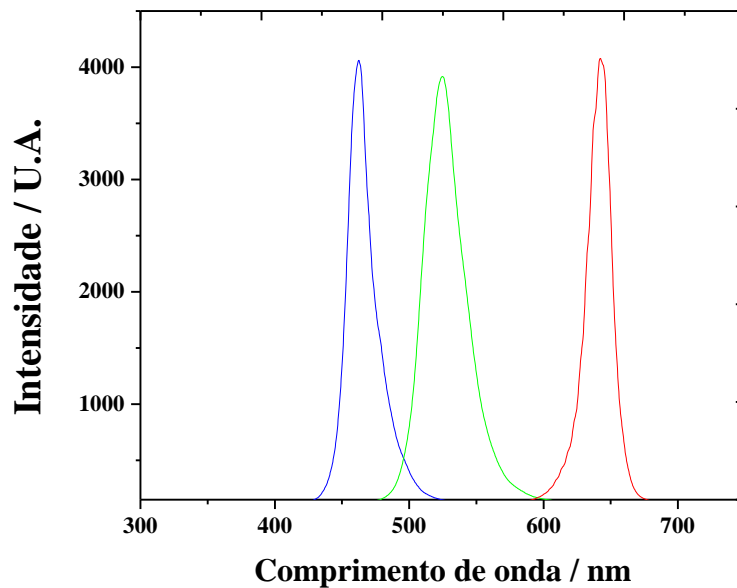


FIGURA 4.1. Os comprimentos de onda de máxima emissão ($\lambda_{max.}$) foram 472 nm, 525 nm e 640 nm, respectivamente. As larguras de banda ($\lambda_{1/2}$) foram de 20 nm, 30 nm e 20 nm respectivamente.

O sensor TSLB257 tem incorporado um fotodiodo e um amplificador de transimpedância em um único monolítico CMOS (*complementary metal-oxide semiconductor*). Este sensor apresenta uma ampla faixa de resposta na região de comprimento de onda entre 370 a 600 nm, com máxima sensibilidade em 470 nm. A FIGURA 4.2. apresenta as curvas de resposta para o sensor fornecidos pelo fabricante. O sensor TSLB257 foi utilizado, uma vez que os experimentos realizados nesse trabalho envolviam os comprimentos de onda de 470 nm e 525 nm. No caso de utilizar medidas em outros comprimentos de onda, os outros sensores da série podem ser utilizados e substituídos no fotômetro com facilidade. O TSLB257 tem um amplificador de transimpedância interno de 320 M Ω , fornecendo elevado ganho ao sensor, além de um baixo nível de ruído (4 mV) e um baixo consumo de corrente de 10 mA. O sensor e o LED foram conectados à interface, e a resposta analógica foi convertida para um sinal digital através do conversor A/D (analógico/ digital) com 10 bits de resolução, o que permite obter sinais com no mínimo 4,88 mV. Um desenho do sensor é mostrado na FIGURA 4.3.

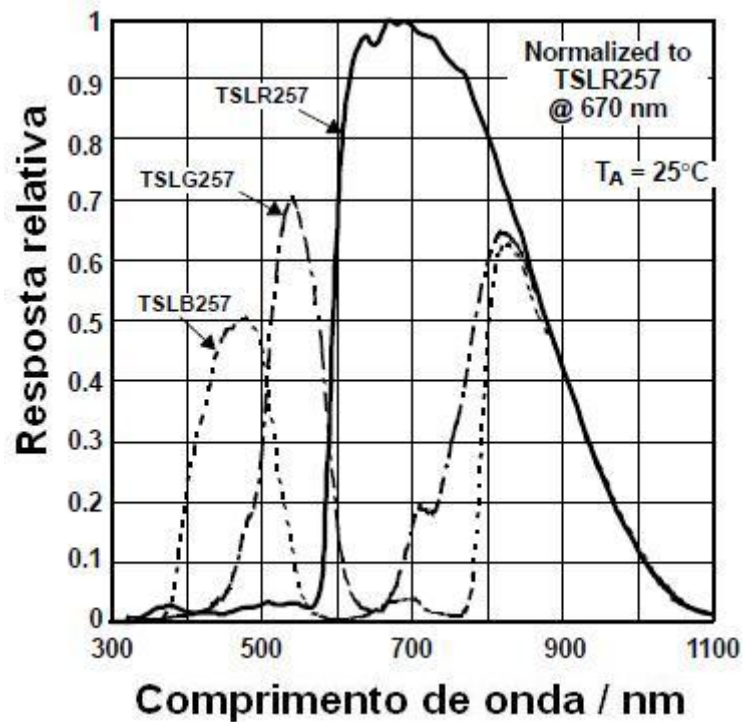


FIGURA 4.2. Curva de resposta do sensor em função do comprimento de onda do feixe de radiação incidente para uma série de sensores da família TSL. O sensor TSLB257 é aquele que foi empregado neste trabalho, pois os comprimentos de onda empregados foram em 470 e 525 nm¹¹³.

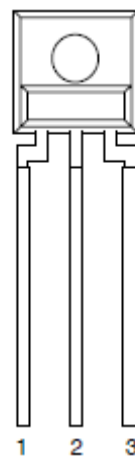


FIGURA 4.3. Representação do sensor utilizado. Com 1 = GND, 2 = Vcc (5 V) e 3 = saída.

Nas FIGURAS 4.4 e 4.5 são mostrados o layout do circuito elétrico do fotômetro controlado pela interface USB (chaves A, B e C) e a versão final do circuito impresso do fotômetro com a disposição física de seus componentes.

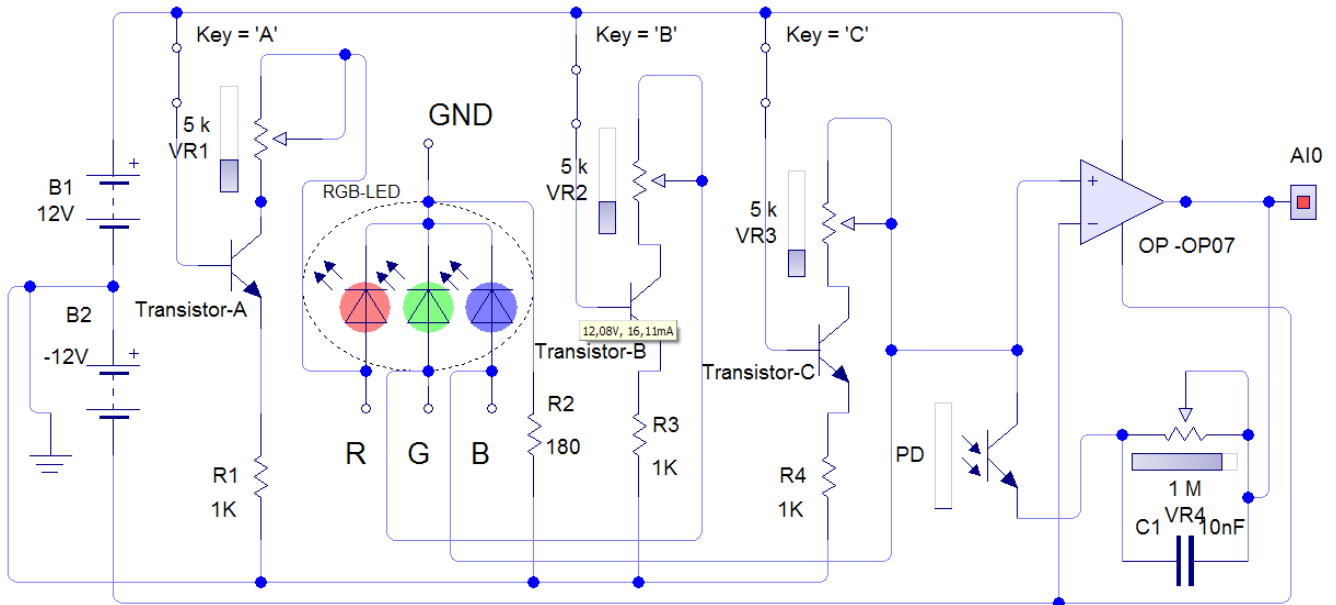


FIGURA 4.4. Layout do circuito elétrico do fotômetro desenvolvido. GND = terra, RGB-LED = LED tricolor com emissão de radiação na região do vermelho (RED), verde (Green) e azul (Blue).

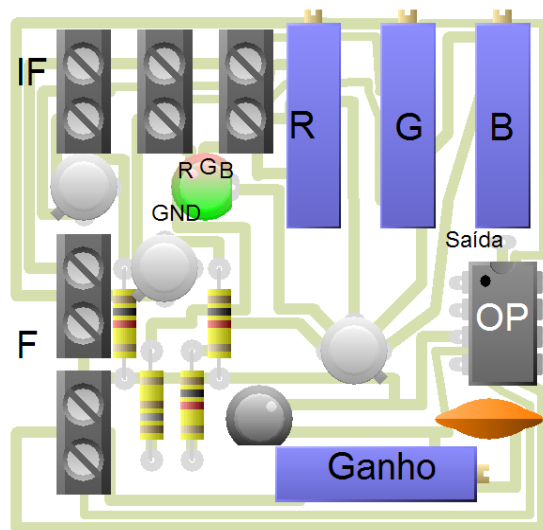


FIGURA 4.5. Circuito impresso do fotômetro desenvolvido. IF = interface, F = fonte de alimentação, GND = terra, R = red, G = green, B = blue, OP = amplificador operacional, e ganho é o potenciômetro necessário para amplificar o sinal de potencial (V) gerado. As dimensões do minifotômetro são: 4,0 x 4,0 cm.

Um filtro eletrônico (composto por resistores, um capacitor de 4,8 μF), um amplificador operacional (OP 07) e potenciômetros de 5 k Ω foram usados para controlar a intensidade do feixe de radiação emitida pelo LED. A alimentação do

LED foi realizada pela própria interface USB, com a aplicação de um potencial de 5 V e uma corrente elétrica de 7,2 mA (configuração padrão da interface).

Na FIGURA 4.6 é mostrado o acoplamento do LED ao LTCC e alguns outros detalhes do sistema em fluxo desenvolvido.

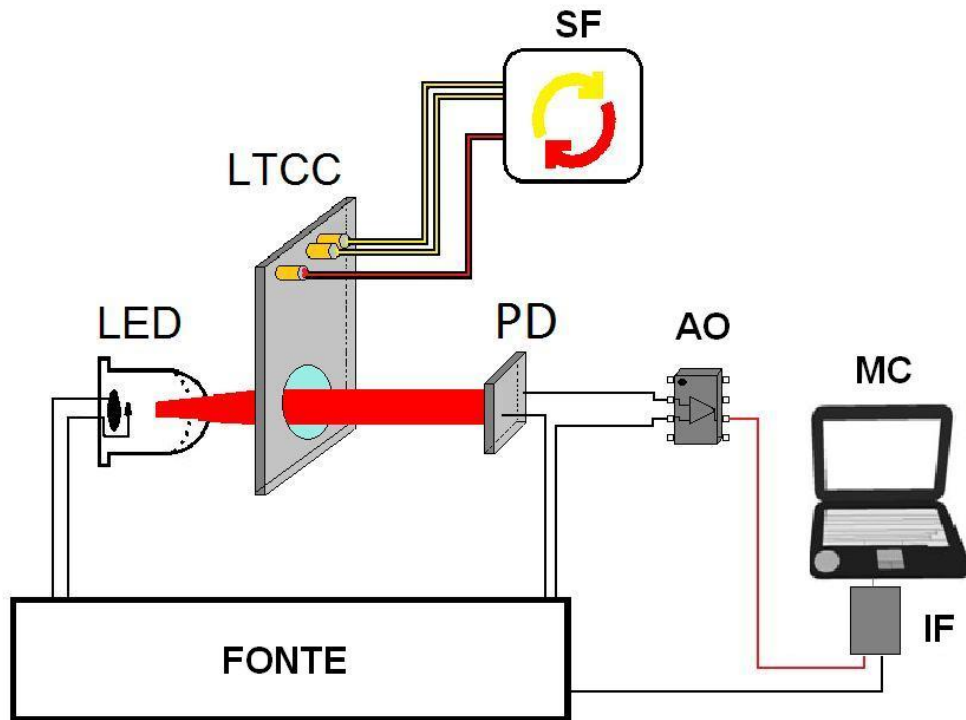


FIGURA 4.6. Diagrama esquemático do sistema de análise proposto. SF = sistema em fluxo, PD (fotodiodo), AO = amplificador operacional, MC = microcomputador, IF = interface.

A luz emitida pelo LED irá transpassar o caminho óptico do LTCC e incidirá sobre o fotodetector (FD). O sinal gerado pelo fotodiodo será registrado pela porta analógica/digital (A/D) da interface e o seu valor será apresentado na tela do computador. Ratificando que a interface acoplada ao microcomputador irá controlar o acionamento do sensor, os três canais do LED-RGB, além da aquisição e processamento do sinal analógico obtido, empregando o software desenvolvido em Labview®.

O LTCC atuará como dispositivo de amostragem de soluções. As soluções serão conduzidas até o LTCC com o auxílio de um sistema em fluxo. O sistema em fluxo é controlado pela interface, a qual envia determinados pulsos de tensão e corrente necessários para acionar as devidas válvulas solenóides. Dessa

forma, enviando amostras e reagentes no percurso analítico conforme a ilustração da FIGURA 4.6.

4.2.7. Construção do acionador de válvulas

Um acionador de válvulas (AV), que funciona como um driver de corrente foi desenvolvido para o controle de abertura e fechamento das válvulas solenóides através de um sinal digital enviado por um programa desenvolvido para este fim. As válvulas solenóides são acionadas a partir do nível lógico (I/O) de um dos bits enviados pela interface através do programa. O circuito de acionamento é ativado ao receber um bit em suas entradas, este bit ativa o driver de corrente enviando um pulso elétrico de 12 V. O programa de controle escrito em Labview®, permite tanto o acionamento das válvulas quanto a aquisição e tratamento dos dados gerados pelo sistema óptico descrito anteriormente. A mesma interface comercial NI USB-6008 foi utilizada para os fins citados acima. A FIGURA 4.7 mostra o circuito eletrônico do acionador de válvulas desenvolvido.

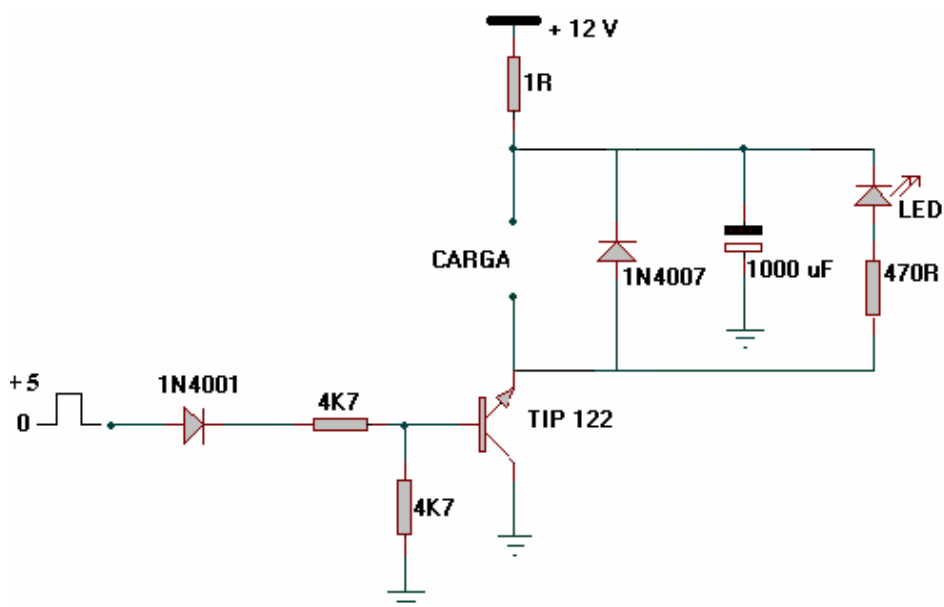


FIGURA 4.7. Circuito eletrônico do acionador de válvulas solenóides.

Uma fotografia do acionador de válvula em pleno funcionamento é apresentado na FIGURA 4.8.



FIGURA 4.8. Acionador de válvulas com 4 destas sendo acionadas simultaneamente. Um total de 7 válvulas podem ser acionadas.

4.2.8. Construção do software de aquisição de dados e controle

Para controle e aquisição dos sinais analíticos, um software escrito em linguagem gráfica visual LabView® foi desenvolvido. Este software apresenta uma interface amigável, como pode ser observado na FIGURA 4.9.

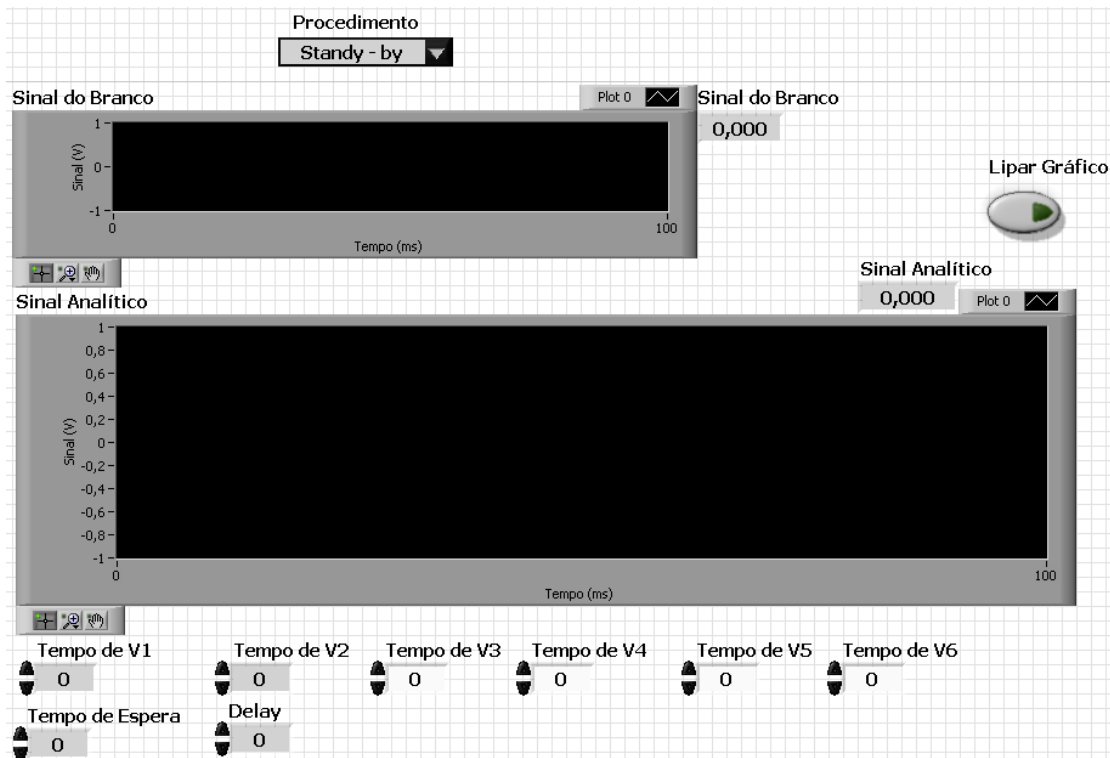


FIGURA 4.9. Interface gráfica do programa desenvolvido.

O software foi desenvolvido para controlar as etapas operacionais do sistema desenvolvido, tais como: tempo de abertura e fechamento das válvulas, aquisição dos dados através da interface e tratamento dos sinais. Além disso, um filtro virtual foi desenvolvido para remover qualquer espécie de ruído oriundo do circuito eletrônico do fotômetro e/ou da interface USB.

Através do painel principal o analista pode receber orientações e acompanhar todo o processo da análise por meio de caixas de diálogo, além de poder controlar todos os parâmetros do sistema, facilitando as etapas de otimização. Os dados são visualizados por meio de gráficos e são armazenados na forma de arquivos de texto (.txt). Ao acessar o painel principal do software, Figura 4.9, o analista escolhe as válvulas e o tempo de abertura para cada uma delas.

Como os volumes adicionados na câmara de mistura são diretamente proporcionais ao tempo de abertura das válvulas, e estes volumes variam de acordo com a vazão utilizada em cada canal, todo o procedimento do analisador automatizado será descrito aplicando o tempo de acionamento das respectivas válvulas ao invés de volume. Como o programa é robusto, este foi empregado em todas as aplicações desenvolvidas neste trabalho e nos demais projetos do grupo.

4.2.9. Configuração do analisador em fluxo desenvolvido

O analisador utilizado neste projeto é composto por: bomba peristáltica; tubos e conexões; injetor comutador ou válvulas solenóides; acionador de válvulas; câmara de mistura; minifotômetro. A configuração do analisador pode ser observada no diagrama das FIGURAS 4.10 e 4.11.



FIGURA 4.10. Fotografia do sistema completo.

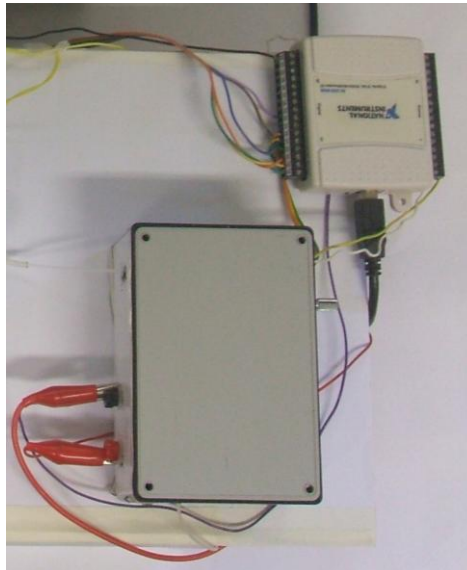


FIGURA 4.11. Fotografia do minifotômetro desenvolvido. O circuito eletrônico do minifotômetro foi acondicionado em uma caixa, contendo o LED, o fotodiodo, o LTCC e os tubos de entrada e saída dos fluídos.

4.2.10. Construção do microsistema construído com tecnologia LTCC

A tecnologia LTCC^{46,52,114} é empregada atualmente como uma alternativa a outros tipos de substratos para a construção de microdispositivos analíticos. O processo de fabricação envolve o uso de cerâmicas, denominadas verdes, pelo fato de estarem não sinterizadas, como principal matéria-prima. Nesta fase, são maleáveis podendo assim, serem cortadas com uma tesoura ou estilete em uma etapa que pode facilmente ser automatizada.

As lâminas podem ser sobrepostas em camadas de forma a produzir estruturas tridimensionais com os mais diferentes tipos de arranjos internos o que faz com que esta tecnologia possibilite a construção de estruturas complexas dando ao analista mais flexibilidade na construção dos microsistemas analíticos. São basicamente quatro etapas envolvidas no processo de fabricação: *desenho do microsistema analítico; corte; laminação e sinterização das cerâmicas*. Estas etapas foram desenvolvidas na Universidade Autônoma de Barcelona (UAB) no Grupo de Sensors & Biosensors coordenado pelo Prof. Dr. Julian Alonso. As descrições das etapas serão melhores descritas a seguir.

Desenho do microssistema analítico

Neste trabalho optou-se pelo software AUTOCAD para o desenho das camadas. Como o processo de fabricação consiste na sobreposição de camadas de cerâmicas faz-se necessário que um desenho específico para cada camada de modo que ao serem sobrepostas sigam a ordem adequada para se obter a configuração final do microssistema analítico proposto.

Corte das cerâmicas¹¹⁵

Após o desenho das camadas no programa CAD, foram realizados os cortes das cerâmicas utilizando-se um equipamento a laser (Protolaser®) representado na FIGURA 4.12.



FIGURA 4.12. Equipamento a laser para o corte das cerâmicas verdes.

As cerâmicas utilizadas na construção do microssistema analítico foram a Dupont 951AX que são compostas de 45% de Al_2O_3 (alumina), 40% de vidro e 15% de compostos orgânicos (solventes, *plasticizer* e *binder*). Algumas características desta cerâmicas estão representadas na TABELA 4.1.

TABELA 4.1. Propriedades físicas e elétricas da cerâmica Dupont 951AX

Densidade	3,1 g/cm ³
Condutividade térmica	3,3 W/mK
Rugosidade superficial	< 0,34 μm
Resistência de isolamento (100VDC)	> 10 ¹² Ω
Espessura	254 ± 13 μm
Encolhimento no eixo x-y	12,7 ± 0,3 %
Encolhimento no eixo z	15 ± 0,5 %

Laminação das cerâmicas¹¹⁵

A etapa de laminação é uma das etapas mais importantes no desenvolvimento do microsistema analítico. Durante esta etapa as camadas de cerâmicas são sobrepostas umas sobre as outras de forma que fiquem perfeitamente alinhadas evitando assim possíveis falhas que possam vir a provocar a má formação dos microcanais internos podendo ocasionar perdas das soluções por vazamento, etc.

Foi utilizada, neste trabalho, uma prensa hidráulica, FIGURA 4.13, (*Talleres Francisco Camps, S.A., Granollers, Espanha*) com dois pratos de aquecimento feitos de 250 mm x 150 mm que permitem aplicar ao sistema uma pressão de até 420 kg/cm².



FIGURA 4.13. Prensa hidráulica para a laminação das cerâmicas.

A técnica utilizada na laminação do microssistema analítico está baseada em aplicar uma pressão no microssistema, através da prensa hidráulica, a uma temperatura de 100°C durante 1 minuto. Esta técnica é conhecida como termocompressão e tempos maiores podem levar a deformação no microssistema.

Sinterização das cerâmicas¹¹⁵

Depois que a cerâmica é laminada e prensada retira-se o excesso de material cerâmico para um melhor acabamento do microssistema antes de levá-lo a etapa de sinterização. A retirada do excesso do material pode ser realizada através de uma fresadora ou até mesmo com lixas.

Para a sinterização foi utilizado um forno (Carbolite CBCWF11/23P16) com atmosfera de ar que pode chegar a temperaturas de até 1100°C.

A rampa de aquecimento utilizada na sinterização do microssistema analítico proposto está ilustrada na FIGURA 4.14.

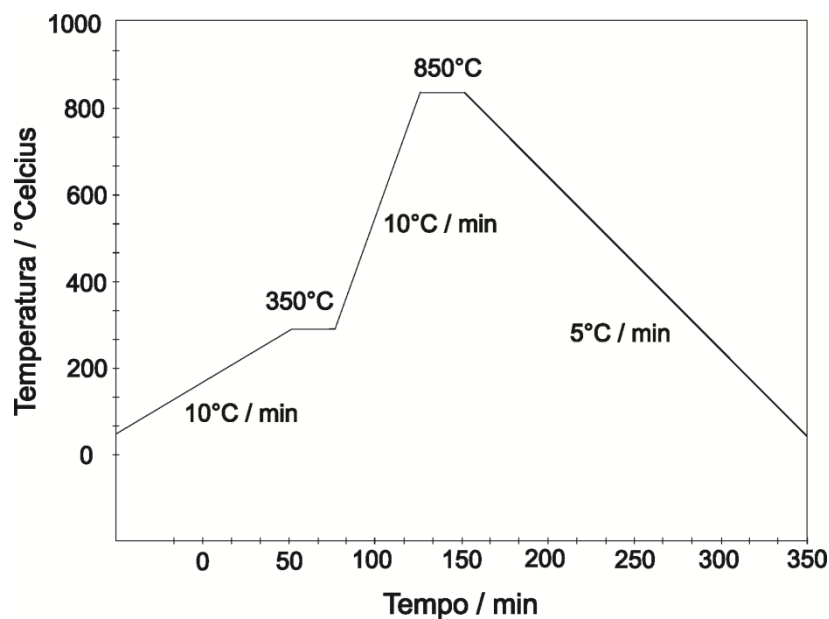


FIGURA 4.14. Rampa de aquecimento e resfriamento utilizada para a sinterização das cerâmicas verdes e construção do LTCC.

O processo de sinterização ocorre basicamente em três etapas. Primeiramente a temperatura do sistema é elevada à uma taxa de 10°C/min até atingir a temperatura de 350°C, permanecendo assim constante durante 30 minutos. Nesta etapa ocorre a volatilização dos compostos orgânicos contidos na cerâmica. Em seguida a temperatura do sistema é elevada a 850°C durante 30 minutos para que ocorra a interpenetração da alumina entre as camadas da cerâmica. Por fim o sistema é resfriado a 5°C/min obtendo-se assim o microsistema analítico sinterizado.

A FIGURA 4.15 ilustra as cinco camadas de cerâmicas utilizada na confecção do microsistema analítico utilizado neste trabalho. A camada (A), parte superior de microsistema analítico, é composto de três entradas (a, b e c) e uma saída (d) dos líquidos. A cavidade (d) é o local para a colação de um vidro esférico de 1,0 cm de diâmetro que também foi colocado na camada (E) para vedação da solução e formação do compartimento (cubeta) de caminho óptico de 0,6 mm. As cavidades (a, b, c e d) foram coladas conectores de latão, fixados em resina epóxi, para entrada e saída de soluções. Estas camadas (A) cavidades a, b, c e possuem diâmetro (3,0 mm) maiores, visto que essas são ajustadas para as entradas das soluções no microcanais das camadas (B) e (C) que determinam a forma e as medidas dos microcanais.

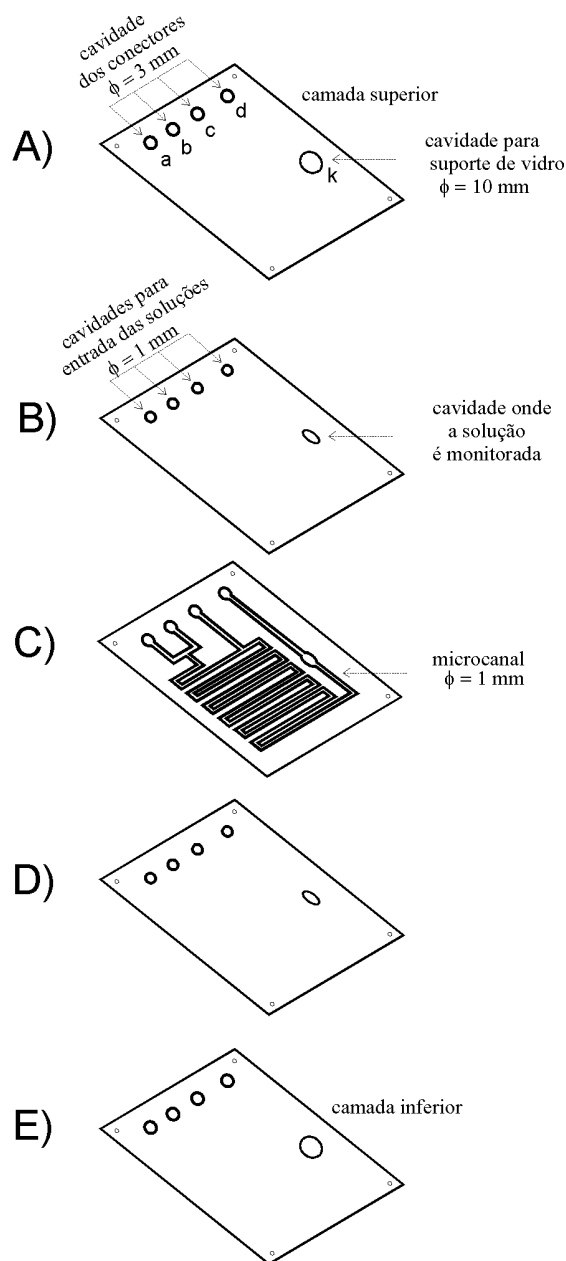


FIGURA 4.15. Diagrama esquemático da sobreposição das camadas de cerâmicas. (a, b e c), entradas das soluções (amostra e reagentes), (d) saída. (A, B, C, D e E), camadas de cerâmicas. k, cavidade para suporte de vidro.

A forma de serpentina dos microcanais fluidicos da camada (C) foi escolhida para melhor homogeneização entre os reagentes e os analítos.

Na camada (B) e (D) pode-se observar um cavidade de formato côncavo onde o produto da reação passa e onde é realizada a leitura das medidas, pois nesta direção estão posicionados a fonte de radiação (LED-RGB) e o detector (fotodiodo). Este formato foi escolhido no intuito de diminuir o volume morto e eventuais bolhas que podem ficar no caminho óptico dificultando as análises.

Nas extremidades de cada camada estão localizadas as cavidades que servem para facilitar o alinhamento das cerâmicas para que elas fiquem perfeitamente sobrepostas para a etapa de laminação. A FIGURA 4.16 mostra o microssistema analítico já sinterizado.



FIGURA 4.16. Microssistema analítico sinterizado sem os conectores e os vidros.

4.3. Determinação fotométrica de *N*-acetilcisteína (NAC) e captopril (CAP) em formulações farmacêuticas utilizando um microssistema construído com tecnologia LTCC

4.3.1. Soluções padrão, reagentes e amostras

A solução padrão de *N*-acetilcisteína $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diariamente dissolvendo uma massa de 12,2 mg de *N*-acetilcisteína em um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com água.

Sete amostras comerciais contendo *N*-acetilcisteína adquiridas no comércio local (100 e 200 mg por envelope) na forma granulada foram analisadas neste procedimento.

Para a análise cada dos produtos farmacêuticos, dez envelopes de um mesmo produto foram pesados e o pó obtido foi macerado e homogeneizados com ajuda de um almofariz e pistilo. Uma massa correspondente a 129,6 mg da mistura foi transferida para um balão volumétrico de 200 mL, e adicionou-se água até completar esse volume. Em seguida 1,26 mL dessa solução foi transferida para um

balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água deionizada. Alíquotas de 400 µL dessa solução foram injetadas utilizando um injetor manual. O teor de *N*-acetilcisteína nessas amostras foi determinado usando uma curva analítica obtida empregando soluções de referência de *N*-acetilcisteína.

Uma solução estoque de captopril de concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diariamente, dissolvendo-se em água 108,2 mg de captopril em um balão volumétrico de 100 mL. Soluções contendo entre $1,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de captopril foram preparadas por diluição da solução estoque em água deionizada em balões volumétricos de 25 mL.

A solução de nitrato de ferro (III) de concentração $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diariamente dissolvendo-se 80,70 mg do sal em solução ácida utilizando-se um balão volumétrico de 250 mL. Uma alíquota de ácido nítrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ era adicionada ao balão volumétrico para a obtenção de uma concentração final de ácido de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para evitar a hidrólise do Fe (III).

Para a análise de seis amostras contendo captopril que foram adquiridas no comércio local, dez comprimidos de cada amostra foram triturados com auxílio de um almofariz até a obtenção de um pó fino. Massas apropriadas foram transferidas para béqueres de 100 mL e dissolvidas em água. Eventuais excipientes insolúveis (amido) contidos na amostra foram removidos por filtração simples por gravidade e o filtrado transferido para balões volumétricos de 100 mL, sendo seus volumes completados com água deionizada, obtendo-se uma concentração teórica de captopril de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Uma solução estoque de 1,10-fenantrolina $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir de cloridrato de 1,10-fenantrolina sob aquecimento. Este foi utilizado como agente quelante.

4.3.2. Procedimento Experimental

As FIGURAS 4.17 e 4.18 mostram o diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo proposto para determinação fotométrica de NAC e CAP em formulações farmacêuticas na posição de amostragem e de injeção, respectivamente.

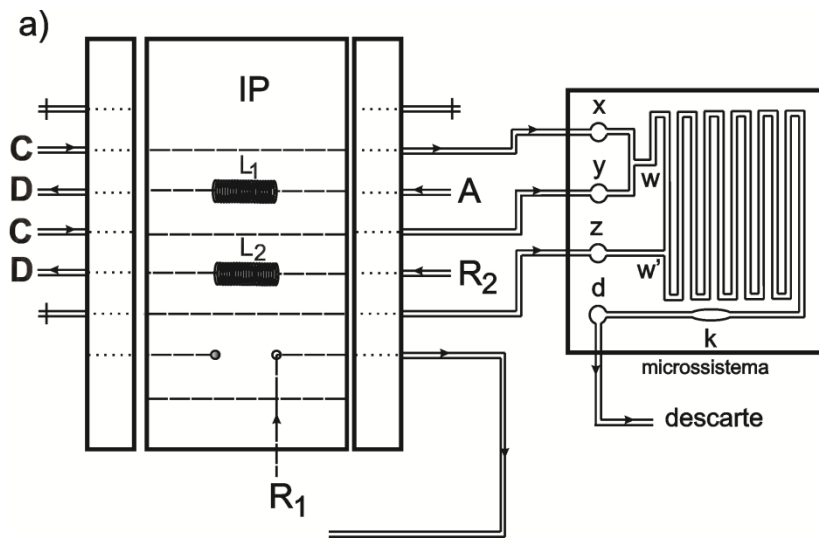


FIGURA 4.17. a) Diagrama esquemático do analisador em fluxo em posição de amostragem para a determinação de NAC e CAP. IP, injetor proporcional, A, *N*-acetilcisteína ou captopril; R₁ nitrato de ferro(III) e R₂, 1,10-fenantrolina; C, carregador (tampão); D, descarte; L₁ e L₂, alça da amostra e; x, y, z, entradas das soluções e d, saída da solução; k, caminho óptico do LTCC (0,5 mm) e w, w', ponto de confluência.

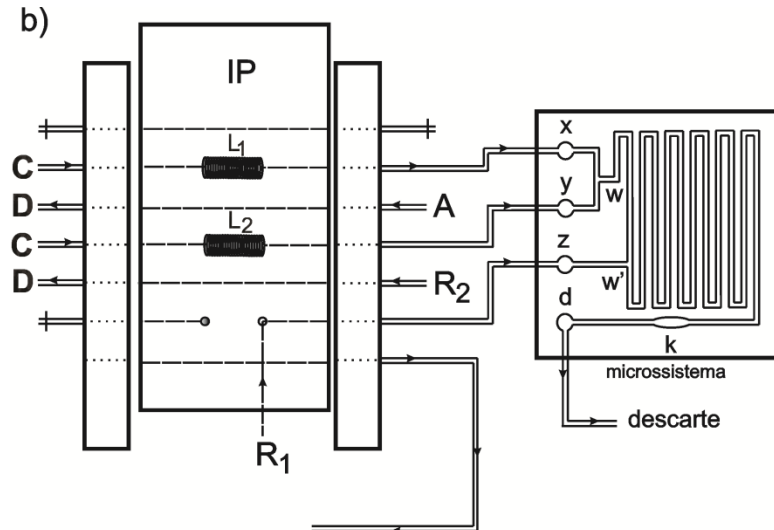
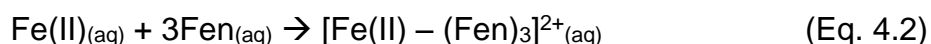
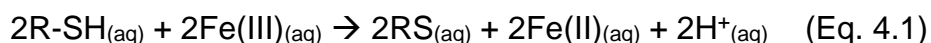


FIGURA 4.18. b) Diagrama esquemático do analisador em fluxo em posição de injeção para a determinação de NAC e CAP. IP, injetor proporcional, A, *N*-acetilcisteína ou captopril; R₁ e R₂, hexacianoferrato e 1,10-fenantrolina; C, carregador (tampão); D, descarte; L₁ e L₂, alça da amostra e R₂; x, y, z, entradas das soluções e d, saída da solução; k, caminho óptico do LTCC (0,5 mm) e w, w', ponto de confluência.

Este sistema é baseado na reação que envolve duas etapas: primeiramente a oxidação dos analitos (NAC ou CAP) pelo ferro (III) produzindo ferro (II) em seguida o ferro(II) será complexado por 1,10-fenantrolina (Fen) e o produto formado monitorado espectrofotometricamente em 525 nm conforme as EQUAÇÕES 4.1 e 4.2.



Neste sistema, as amostras (NAC ou CAP) ou solução de referência (L₁) e o reagente R₁ (L₂) são introduzidos simultaneamente com o auxílio de um injetor comutador (I) em uma solução transportadora. As zonas de amostras e do reagente R₁, [Fe(III)] = 3,0 × 10⁻³ mol L⁻¹, percorrem as mesmas distâncias até a entrada x e y do microdispositivo e se confluem no ponto w. Neste ponto ocorre a oxidação dos analitos (NAC ou CAP) pelo Fe (III) produzindo íons Fe (II) que em seguida reage com Fen formando um complexo com absorbância máxima em λ = 525 nm. A absorbância do complexo formado, Fe(II) - (Fen)₃²⁺_(aq), é proporcional a concentração de NAC ou CAP injetado no sistema analítico.

4.3.3. Métodos de Referências

O método utilizado para avaliar a exatidão do procedimento em fluxo proposto para a determinação de NAC foi o método potenciométrico conforme preconiza a Farmacopéia Brasileira⁸⁴. Este método é baseado na titulação potenciométrica da solução da amostra com uma solução padrão de nitrato de mercúrio(II) 1,0 × 10⁻¹ mol L⁻¹ empregando-se eletrodos de fio de ouro como eletrodo de trabalho e de calomelano saturado como eletrodo de referência.

A determinação de CAP foi avaliada utilizando-se um método comparativo empregando titulação potenciométrica com NaOH proposto por Ribeiro

*et al.*¹¹⁶. Este método baseia-se na titulação da solução de CAP com uma solução padrão de iodo com detecção espectrofotométrica UV-Vis.

4.4. Determinação espectrofotométrica de adrenalina e dopamina utilizando reator em fase Sólida

4.4.1. Soluções padrão, reagentes e amostras

Uma solução padrão de adrenalina $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo 46 mg de cloridrato de adrenalina (Sigma) em 5,0 mL de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ completando o seu volume final para 50 mL com uma solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,0). A partir desta foram preparadas soluções padrão com concentrações variando entre $3,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ por diluições apropriadas. Todas as soluções foram previamente desaeradas através do borbulhamento de nitrogênio de alta pureza para evitar possível oxidação da adrenalina.

Foram adquiridas no comércio da região três ampolas contendo bitartarato de adrenalina (Ariston, São Paulo) e analisadas pelo método proposto. As amostras contendo adrenalina foram preparadas transferindo-se 250 μL das amostras para balões volumétricos de 25 mL e o volume aferido com uma solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

Foram preparados três sistemas tamponantes distintos em diferentes faixas de pH, são eles: tampão acetato na faixa de 4,1 a 5,8; fosfato de pH 6,0 e 8,0 e tris na faixa de pH entre 7,0 e 9,0.

4.5.2. Preparação e Imobilização do triodeto I_3^-

A resina selecionada para imobilização do ânion I_3^- , foi feita utilizando um copolímero de estireno-divinilbenzeno, uma resina de troca aniônica (Lewatit M500, Bayer) contendo uma amina quaternária do tipo I ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) tendo como contra-íon o cloreto.

O reator em fase sólida (RFS) foi preparado adicionando-se 10 mL da resina de troca aniônica em uma bureta convencional empregada em titulação com volume de 25 mL contendo lã de vidro na parte inferior. Em seguida, visando uma efetiva troca dos íons, percolou-se um volume de 200 mL de NaOH $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para trocar íons cloreto por hidroxila, pois a resina aniônica selecionada apresenta melhor seletividade pelos íons OH^- . Para uma efetiva troca dos ânions OH^- por IO_3^- percolou-se 60 mL de solução KIO_3 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$.

Após a troca destes ânions, lavou-se a coluna com água deionizada até a remoção completa dos ânions iodato não imobilizados. O controle da capacidade de troca foi feito através da titulação potenciométrica dos íons cloreto com uma solução padrão de AgNO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

4.5.3. Método de Referência

Os resultados obtidos através do procedimento proposto foram comparado com o método que indica a farmacopéia brasileira⁸⁴. O método baseia-se na medida espectrofotométrica de adrenalina e presença de uma solução padrão de HCl $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ no comprimento de onda de 280 nm.

4.5.4. Procedimento Experimental

A FIGURA 4.19 mostra o diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo para determinação espectrofotométrica de ADN e DPN em formulações farmacêuticas empregando um dispositivo construído com tecnologia LTCC, reator em fase sólida (RFS) e minifotômetro.

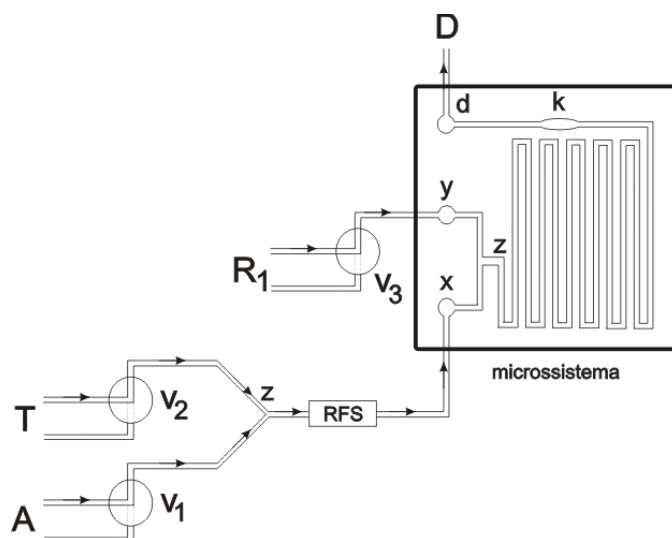


FIGURA 4.19. Diagrama Esquemático do analisador em Fluxo para a determinação de adrenalina e dopamina. Legenda: v_1 = válvula dos padrões ou amostras (ADN e DPN); v_2 = válvula da solução tampão; T, solução tampão; R_1 = água deionizada; RFS = reator em fase sólida (I_3^- imobilizado em resina aniônica); x, y e d são respectivamente as conexões com o LTCC (entradas e saída); z, ponto de confluência; D = descarte e k = caminho óptico do LTCC.

As soluções contendo ADN e DPN foram injetadas em um fluido carregador e os mesmos transportados ao RFS onde ocorre a reação de oxidação de adrenalina a adrenocromo e dopamina a dopacromo conforme as FIGURAS 4.20 e 4.21 O produto formado foi monitorado ($\lambda = 472 \text{ nm}$) através do minifotômetro construído.

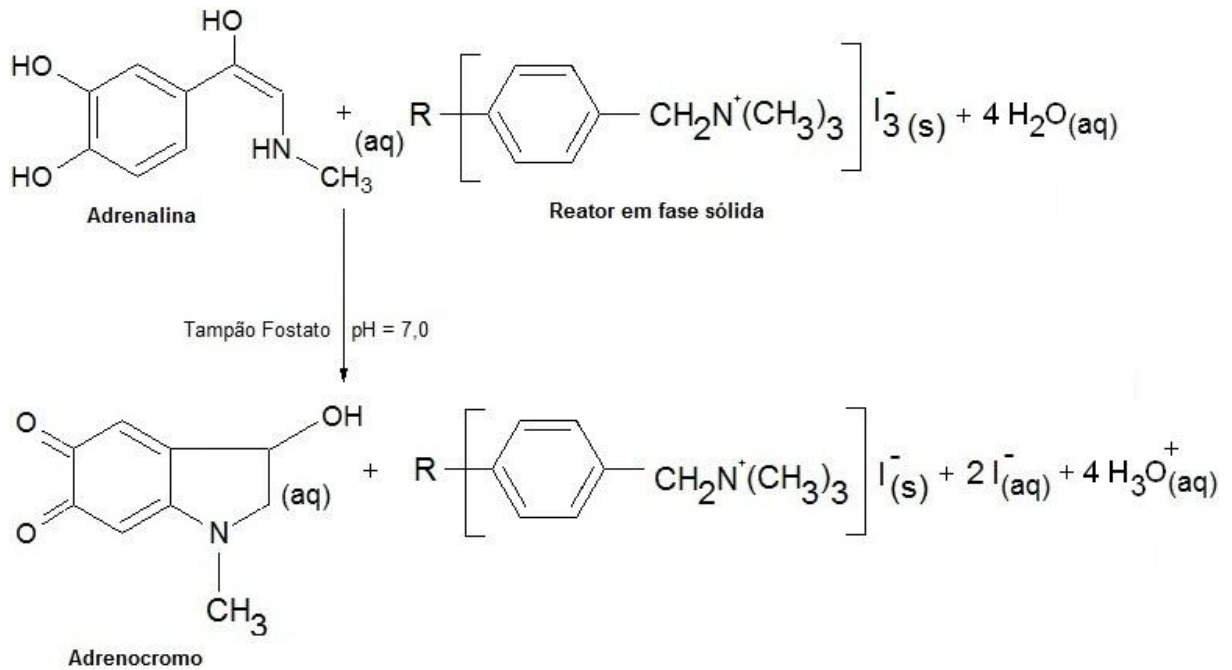


FIGURA 4.20. Rea\u00e7\u00e3o de oxida\u00e7\u00e3o da adrenalina por triiodeto a adrenocromo ($\lambda = 472 \text{ nm}$).

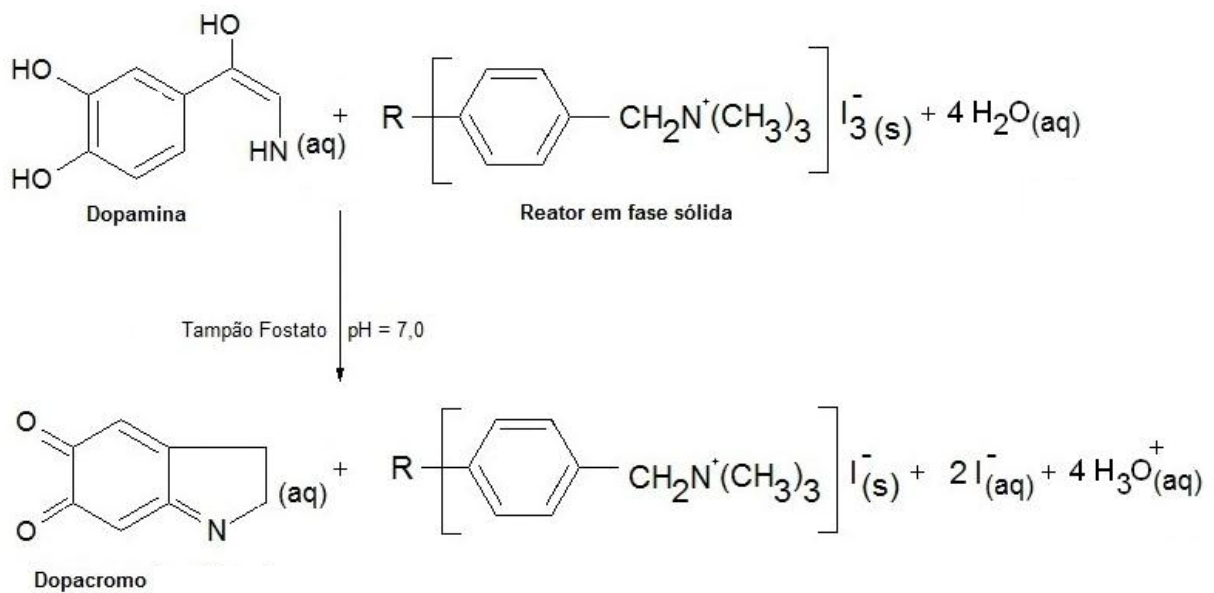


FIGURA 4.21. Rea\u00e7\u00e3o de oxida\u00e7\u00e3o da dopamina por triiodeto a dopacromo.

O m\u00f3dulo de an\u00e1lise do sistema proposto foi desenvolvido em tr\u00eas etapas, de acordo com as caracter\u00edsticas da rea\u00e7\u00e3o qu\u00edmica envolvida: 1) medida do sinal do branco; 2) medida do sinal anal\u00edtico e 3) limpeza do sistema.

Medida do sinal do branco

Na primeira etapa, a válvula v_1 é acionada durante 10 s, inserindo no sistema uma solução tampão. Em seguida, a válvula v_2 é acionada durante 30 s para o transporte da solução tampão até o ponto k para a aquisição do sinal do branco. Os volumes injetados serão descritos na seção de resultados.

Medida do sinal analítico

Para a aquisição do sinal analítico a válvula v_1 é acionada durante 10 s, inserindo no sistema um determinado volume de amostras (ADN ou DPN). Em seguida a válvula v_2 (tampão) é acionada durante 30 s para o transporte da amostra até o ponto k. Durante este percurso ocorre a oxidação dos analitos e o produto formado é medido no minifotômetro em 472 nm.

Como no caso anterior, os volumes injetados serão descritos na seção de resultados.

Limpeza do sistema

Finalmente é realizada a etapa de limpeza com o acionamento da válvula v_3 durante 40 s para a limpeza dos microcanais do microsistema. Dessa maneira, uma nova inserção da amostra pode ser efetuada para se iniciar um novo ciclo de análise.

Um programa dedicado a executar esse processo foi escrito em Labview® 7.0. Através do painel frontal do programa foram selecionadas as etapas envolvidas no processo analítico: medida do sinal do branco, medida do sinal analítico e limpeza do sistema. Além das variáveis de controle: tempo de acionamentos das válvulas; número de replicatas e o intervalo de tempo para a aquisição do sinal analítico. Uma vez fornecidos esses dados, o microcomputador assume o controle do processo analítico efetuando a sequência de acionamentos das válvulas de acordo com o fluxograma mostrado na FIGURA 4.22.

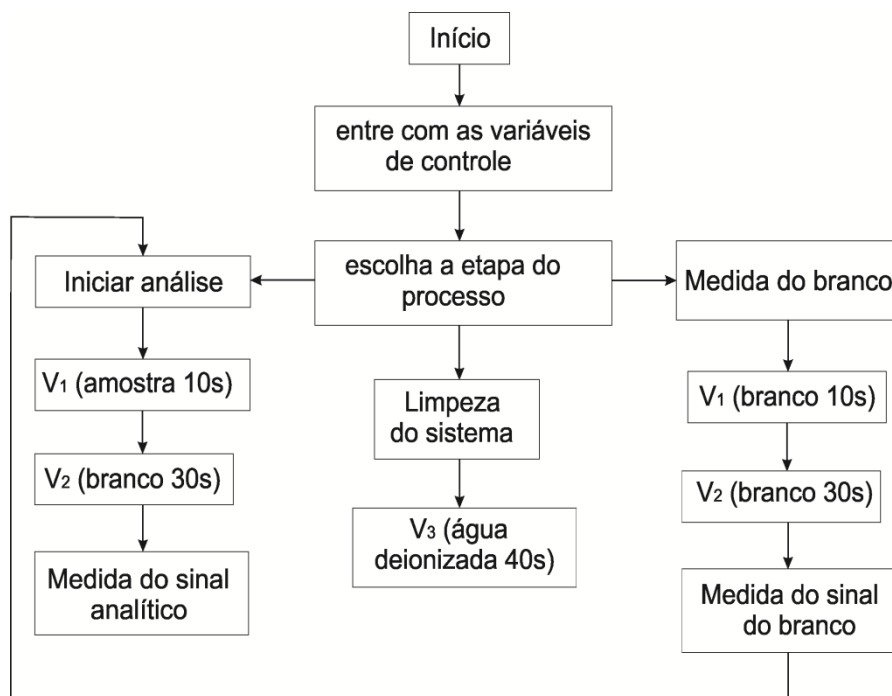


FIGURA 4.22. Fluxograma do software para o controle do módulo de análise.

Essa mesma seqüência (medida do branco, sinal analítico e limpeza) deverá ser adotada para os demais analitos, salvo as devidas exceções e modificações necessárias para cada método. Para NAC e CAP este procedimento não foi realizado, pois não utilizou-se o sistema automático desenvolvido e sim um sistema com comutador manual.

4.6. Determinação espectrofotométrica de ácido *L*-ascórbico em amostras comerciais

4.6.1. Reagentes e soluções

A solução tampão acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5 foi preparada misturando-se quantidades apropriadas de acetato de sódio e ácido acético 1 mol L^{-1} em um balão de 500 mL.

A solução padrão de batocupruína $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diariamente dissolvendo-se 0,0872 g do sal dissódico do ácido dissulfônico de batocupruína (Sigma) em 100 mL de água deionizada.

Foi preparada uma solução estoque de ácido *L*-ascórbico (AAc) $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, sempre antes de realizar-se as medidas, dissolvendo-se 0,9 g de ácido *L*-ascórbico (Merk) em 100 mL de tampão acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5 previamente desaerada com nitrogênio, para evitar a oxidação. Soluções de referência foram preparadas a partir desta solução estoque por diluições apropriadas contendo entre $1,0 \times 10^{-6} - 7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido *L*-ascórbico.

Para o preparo do reator em fase sólida (RFS) contendo fosfato de cobre(II), ($\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$) foi utilizada uma solução do respectivo sal e uma resina de poliuretana.

4.6.2. Preparação e imobilização do reator em fase sólida

A preparação do RFS, $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$, foi realizada dissolvendo-se 17,5 g de $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ com 8,0 mL de ácido fosfórico concentrado. Em seguida, o sólido azul ($\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$) foi lavado com água deionizada e seco em estufa a 110°C por aproximadamente 3 horas.

A partir deste foram preparadas misturas de resina poliuretana e fosfato de cobre nas proporções 3:1, 5:1 e 7:1 (m/m), As misturas foram mantidas em frascos de polietileno e mantidas a temperatura ambiente por aproximadamente 4 horas. O sólido formado foi então fragmentado com o auxílio de um martelo e levado a um moinho de lâminas (modelo TE-631 da Tecnal) para serem triturados. Depois de triturados foi feita a seleção dos diâmetros das partículas através de peneiras granulométricas na faixa de 100-500 μm . A Figura 4.23 ilustra o procedimento geral para a fabricação do RFS.

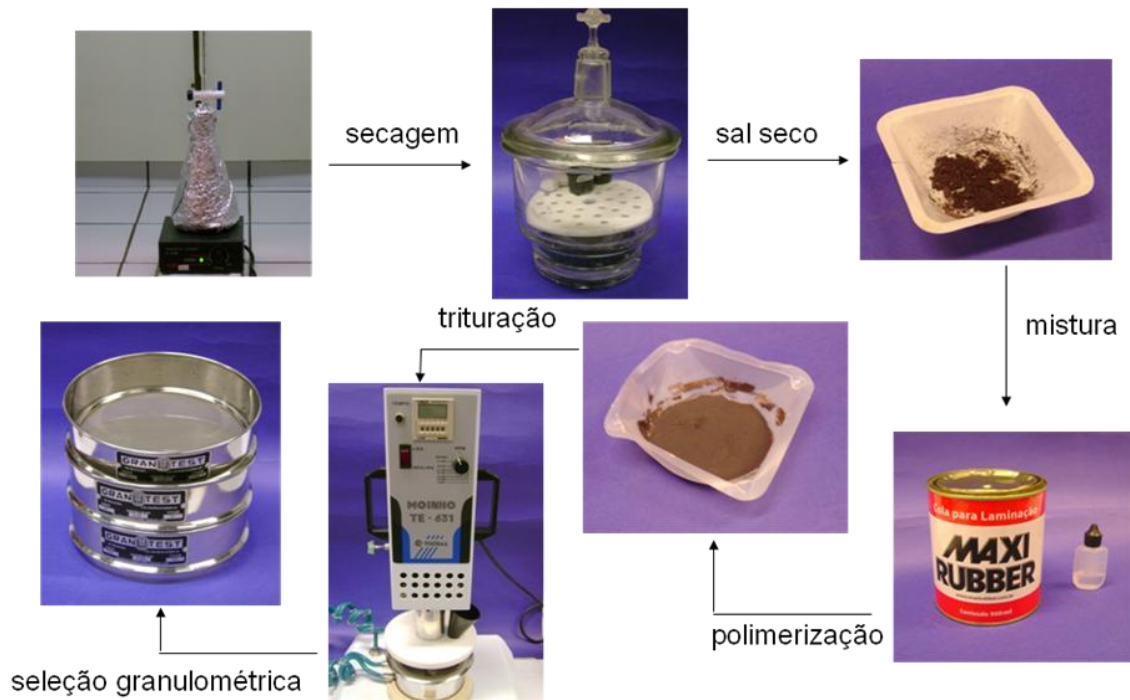


FIGURA 4.23. Procedimento utilizado no preparo do reator em fase sólida, $(\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2)^{115}$.

Após a imobilização do $(\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2)$ e separação granulométrica do sólido obtido com diâmetros de partículas entre 10-350 μm , cerca de 100 mg das partículas foram introduzidas em tubos de polipropileno de 30 mm de comprimento x 1,5 mm de diâmetro interno) por aspiração com o auxílio de uma seringa. Para isto, uma das extremidades do tubo foi vedada com um pedaço de lã de vidro para prevenir a saída das partículas da coluna.

Depois do preenchimento total do reator com as partículas de $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ a outra extremidade também foi vedada com lã de vidro e assim o reator finalizado foi então acoplado ao sistema em fluxo proposto. A FIGURA 4.24 apresenta uma imagem do reator construído.



FIGURA 4.24. Fotografia do reator em fase sólida¹¹⁵.

4.6.3. Método de referência

O método de referência empregado para a determinação de *L*-ácido ascórbico está baseado na titulação iodimétrica, conforme descrito na Farmacopéia Americana⁸³. Para isto, uma massa correspondente a 200 mg de AAc foi dissolvidos em uma mistura de 50 mL de ácido sulfúrico 1,0 mol L⁻¹ e 12,5 mL de água em um erlenmeyer de 250 mL. Titulou-se então esta solução com uma solução de iodo 0,05 mol L⁻¹ adicionando como indicador uma solução de amido 1,0% (m/v) até a solução apresentar a coloração azul (ponto final de titulação).

4.6.4. Procedimento experimental

O diagrama esquemático do analisador em fluxo multicomutado utilizando microssistema analítico LTCC, minifotômetro em fluxo e reator em fase sólida para a determinação de ácido *L*-ascórbico em amostras comerciais é mostrado na FIGURA 4.25.

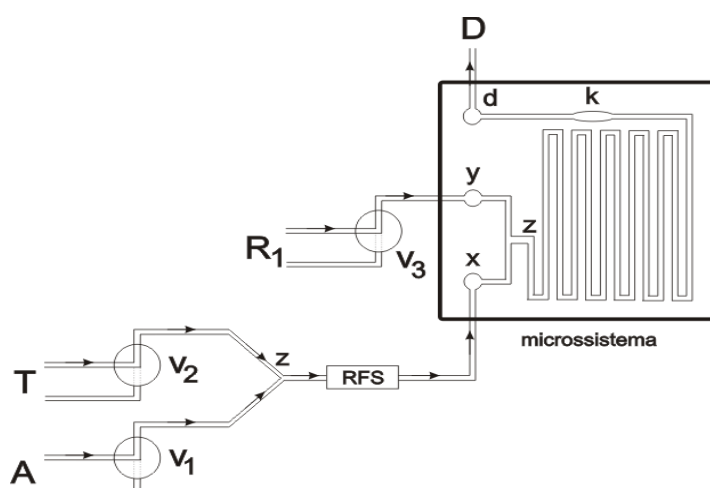


FIGURA 4.25. Diagrama esquemático do analisador em fluxo multicomutado para a determinação de ácido ascórbico utilizando reator em fase sólida, microssistema analítico (LTCC) e minifotômetro lab-made. A = amostra/padrão; T = solução transportadora (água deionizada) R₁ = batocupruína (1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ – 30 mm x 1,5 mm d.i.), respectivamente; V₁, V₂ e V₃ = válvulas da amostra/padrão, água deionizada e batocupruína, respectivamente; RFS = reator em fase sólida, Cu₃(PO₄)₂; x, y = entradas das soluções no microssistema e d = saída; z = ponto de confluência; k = caminho óptico (0,5 mm); D = descarte.

O módulo de análise do sistema desenvolvido envolve três etapas, de acordo com as características da reação química envolvida: 1) medida do sinal do branco; 2) medida do sinal analítico; e 3) limpeza do sistema. A FIGURA 4.26 ilustra de forma esquemática as etapas de limpeza e medida do sinal analítico em função dos tempos de acionamento das válvulas solenóides para a determinação de AAc em formulações farmacêuticas.

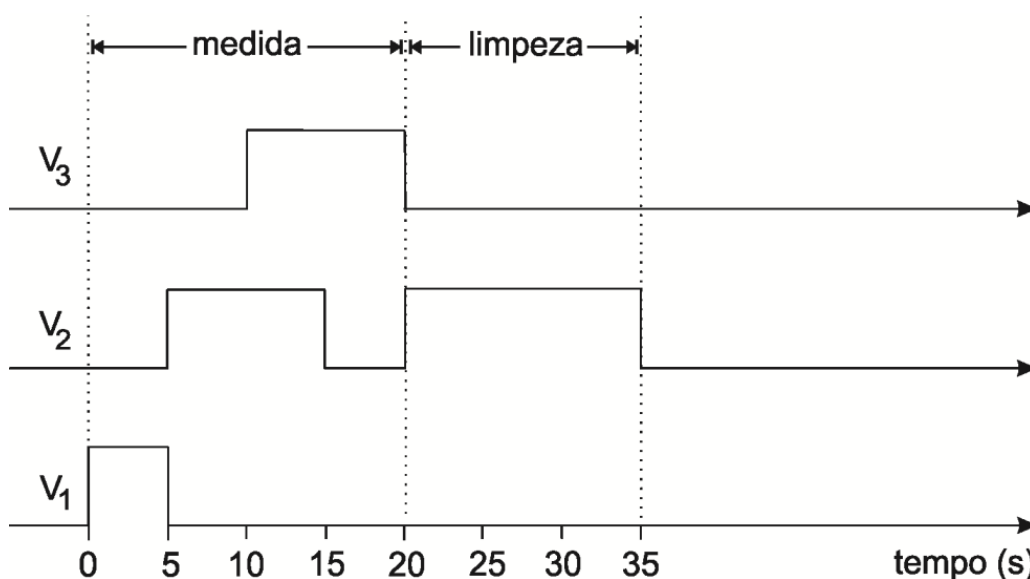


FIGURA 4.26. Diagrama esquemático dos tempos de acionamentos das válvulas v_1 , v_2 e v_3 , relativas às adições de amostra/padrão, água e batocupruína, respectivamente em função do tempo nas etapas de medida do sinal analítico e limpeza.

Durante a etapa de medida do sinal analítico, a válvula v_1 é acionada durante 5 s, alíquotas da amostra ou padrão de AAc. Em seguida as válvulas v_2 e v_3 são acionadas simultaneamente durante 15 s para o transporte da amostra até o ponto k. Durante este percurso o AAc é oxidado a ácido deidroascórbico e o Cu(II) reduzido a Cu(I). O Cu(I) formado reage com batocupruína formando um complexo, $\text{Cu}(\text{batocupruína})^{2+}$ monitorado espectrofotometricamente em 472 nm.

Na etapa de limpeza, a válvula v_2 é acionada durante 20 s para a limpeza dos microcanais do microsistema analítico. Dessa maneira, uma nova inserção da amostra pode ser efetuada para se iniciar um novo ciclo de análise.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. Resultados

5.1. Minifotômetro desenvolvido

Os resultados são abordados, principalmente, pelo tempo de resposta do detector, estabilidade e relação sinal/ruído e serão discutidos nas próximas seções.

Tempo de resposta do sensor

O tempo de resposta do sensor foi estudado e o resultado é apresentado na FIGURA 5.1.

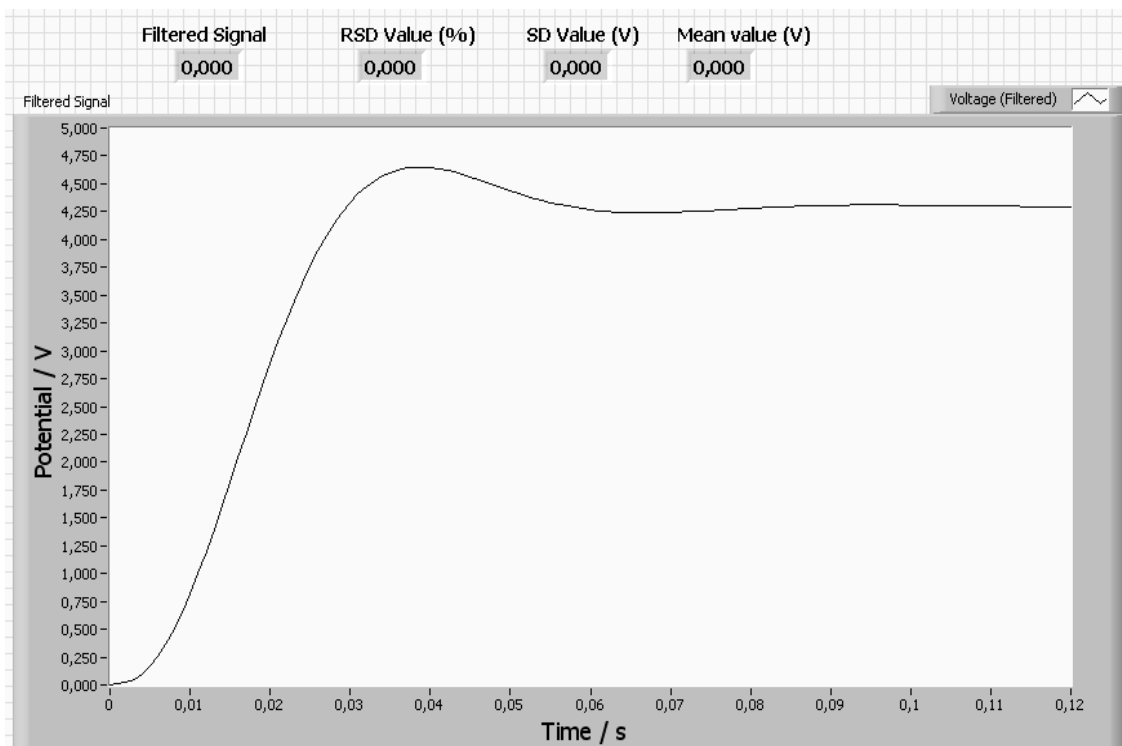


FIGURA 5.1. Estudo do tempo de resposta do detector com um potencial ajustado de até 5 V.

Neste estudo um potencial máximo obtido foi de 5 V, controlado pelo potenciômetro de amplificação presente no minifotômetro. Este potenciômetro de 1 M Ω permite uma ganho de até 100.000 vezes do sinal analítico obtido.

Como pode ser visto na FIGURA 5.1, o sinal de detector inicia em cerca de 5 ms e aumenta até 37 ms quando atinge 4,627 V. Após 60 ms, o sinal é estabilizado em 4,275 V. Esta ligeira diminuição do potencial no intervalo de 37 a 60 ms é devido ao emprego de um filtro passa-baixa, tipo *Butterworth* com polinômio de terceiro grau com uma frequência de corte de 20 Hz. Este filtro, desenvolvido em Labview, causou uma pequena redução no sinal do fotômetro, como esperado. Por outro lado com este filtro, um sinal mais estável e reproduzível foi obtido.

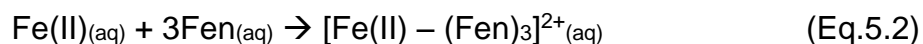
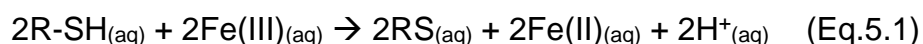
Com este mesmo programa foi avaliada a relação sinal/ruído do minifotômetro desenvolvido para este trabalho. Um nível de ruído 5,0 mV foi determinado sendo compatível com a tensão de offset do fotodiodo apresentados no manual do fabricante, normalmente entre 0 e 4 mV. Este teste foi monitorado com o LED desligado. Ao acionar o LED registrou-se o nível de sinal útil. Este sinal foi monitorada durante 5 h para avaliar a estabilidade do minifotômetro proposto e um potencial de $4,227 \pm 0,001$ V com um desvio padrão relativo (RSD) de 0,023% ($n = 60$) foi obtido. Este bom desempenho do minifotômetro *Lab-made* é importante para a aquisição de resultados satisfatórios. A relação sinal/ruído ($S/N = 1/RSD$) obtidos nesses teste foi de 4347, onde S é a média do sinal medido com o LED ligado e N é o desvio padrão obtido. Quanto maior a relação do sinal/ruído das medições, maior é o desempenho do equipamento o que permitirá obter maior sensibilidade.

Para as aplicações envolvendo absorção molecular utilizando o minifotômetro desenvolvido, a radiação emitida pelo LED deverá ser parcialmente absorvida pelo cromóforo presente no caminho óptico do LTCC, atingindo a superfície fotossensível do sensor (1 mm^2), gerando uma corrente elétrica que foi convertida em potencial e medida no canal de saída (pino 3 da Figura 4.3). Esse sinal produzido foi coletado pela interface USB (porta de entrada analógica) e convertido em absorbância pelo software aplicando a equação de Lambert-Beer.

5.2. Determinação fotométrica de *N*-acetilcisteína e captopril utilizando minifotômetro *lab-made* e LTCC em formulações farmacêuticas

Um sistema em fluxo de zonas coalescentes para a determinação de *N*-acetilcisteína (NAC) e captopril (CAP) em formulações farmacêuticas foi desenvolvido. Os parâmetros físicos e químicos foram otimizados de forma univariada com o intuito de se obter maior resposta analítica, boa precisão e exatidão e boa frequência analítica.

O método baseia-se em duas etapas: redução dos íons Fe(III) a Fe(II) empregando os fármacos (NAC ou CAP) com subsequente reação destes com 1,10-fenantrolina (Fen) cujo complexo formado apresenta absorção máxima no comprimento de onda $\lambda = 525$ nm, conforme as Equações 5.1 e 5.2.



Devido ambos analitos apresentarem uma estrutura química semelhante (grupo tiol, R-SH), a otimização dos parâmetros concentração de reagente Fe (III), complexante (Fen), tipo de solução transportadora, comprimento das alças de amostragem e estudo de vazão das soluções foram similares. Isso é verdade, uma vez que a otimização que favoreça um método é exatamente a mesma para o outro. Dessa forma, apenas alguns dados serão apresentados para um dos analitos, com o objetivo de evitar redundância e repetições dos resultados apresentados.

5.2.1. Estudo dos parâmetros químicos do sistema FIA

Em testes preliminares foi avaliada a influência da solução transportadora sobre o sinal analítico obtido na reação de complexação entre os

íons Fe(II) e os fármacos NAC e CAP. As soluções avaliadas foram: ácido sulfúrico utilizado no preparo da solução de Fe(II) ($5,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-2}$ e $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e tampão acetato utilizado na preparação das amostras (pH 3,1; 4,5 e 5,7). Lembrando que o meio deve ser mantido ácido para evitar a hidrólise dos íons ferrosos.

O uso da solução de ácido sulfúrico (fortemente ácido) como solução transportadora foi a que mais desfavoreceu a ocorrência da reação. De fato, a medida que sua concentração aumentava, um menor sinal analítico era obtido. Acredita-se que esta solução dificulta a liberação de íons H⁺ do hidrogênio ácido do grupo tiol (R-SH) presente nas moléculas de NAC e CAP, desfavorecendo a formação do complexo, como mostrado nas Equações 5.1 e 5.2. Dessa forma, a solução transportadora de tampão acetato pH 5,7 foi aquela que possibilitou a obtenção de um maior sinal analítico. Sendo então, utilizado para os trabalhos posteriores.

A influência da concentração dos íons Fe(III) para a determinação de ambos os analitos foi avaliada na faixa de concentração de 1,0 a 8,0 mmol L⁻¹.

Como pode ser observado na FIGURA 5.2, o sinal de absorvância aumentou significativamente até a concentração de $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Isso ocorre, pois existe uma maior disponibilidade de íons Fe(III) livres para a reação de redução e posterior formação do complexo [Fe(II)-(Fen)₃]²⁺. Contudo, para concentrações de Fe(III) maiores que $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ obteve-se uma diminuição do sinal de absorvância. Isso pode ocorrer devido a competição entre os íons Fe(III) em excesso e os íons Fe(II) presentes no complexo. Com base nestes resultados escolheu-se a concentração de Fe(III) de $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ por apresentar maior sinal analítico e menor desvio padrão nas medidas.

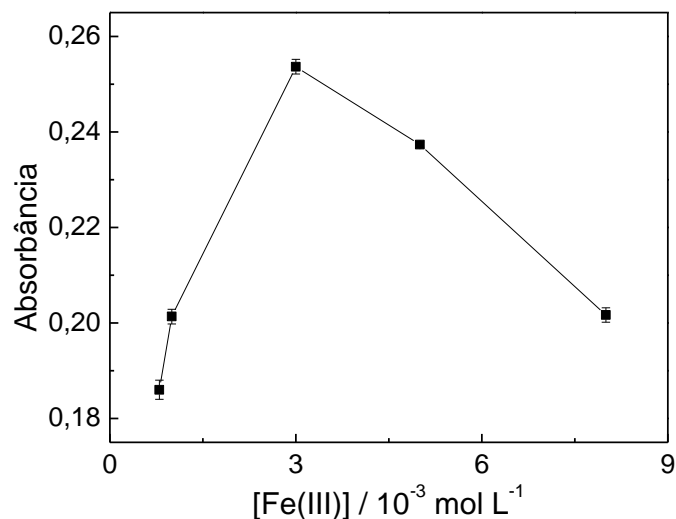


FIGURA 5.2. Estudo da concentração do Fe(III) sobre o sinal analítico ($n = 3$) para uma concentração de NAC $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de 1,10-fenantrolina de $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; alças de amostragem de 60 cm; vazões do Fe(III) e da solução transportadora (tampão acetato pH 5,7) de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e $2,2 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente ($\lambda = 525\text{nm}$).

Como discutido anteriormente um resultado semelhante foi obtido para a otimização envolvendo o captopril mantendo-se as mesmas condições experimentais empregadas para o procedimento envolvendo NAC, conforme pode ser observado na FIGURA 5.3.

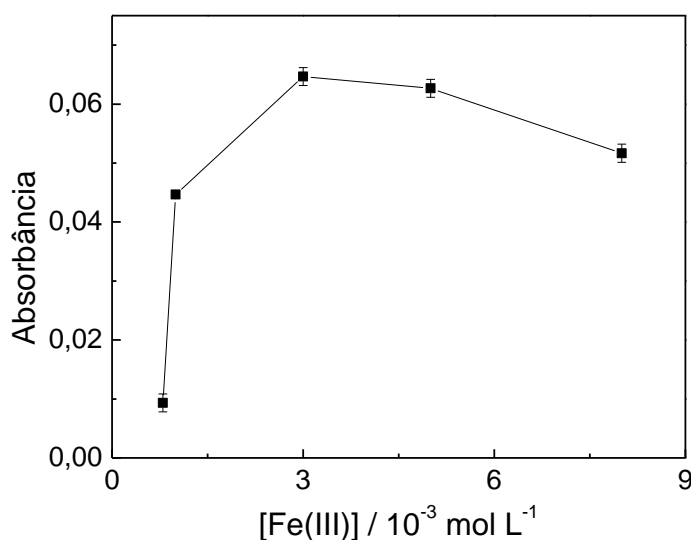


FIGURA 5.3. Avaliação da concentração do Fe(III) sobre o sinal analítico ($n = 3$) para uma concentração de CAP $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de 1,10-fenantrolina de

$2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; alças de amostragem de 60 cm; vazões do Fe(III) e da solução transportadora (tampão acetato pH = 4,5) de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e $2,2 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente ($\lambda = 525\text{nm}$).

Em ambos os casos, a concentração de Fe(III) $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi selecionada por propiciar maior magnitude do sinal analítico. Para os demais parâmetros estudados, apenas os resultados para NAC ou CAP serão apresentados.

De maneira semelhante foi avaliada a influência da concentração do agente complexante 1,10-fenantrolina (Fen). Este foi estudado para ambos analitos nas concentrações de $5,0 \times 10^{-3}$; $8,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-2}$; $2,0 \times 10^{-2}$ e $4,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Ratificando que apenas os dados de NAC serão apresentados, ver FIGURA 5.4.

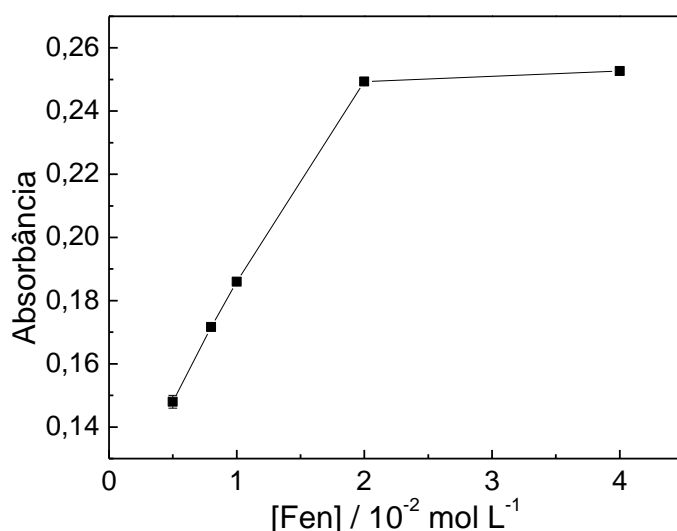


FIGURA 5.4. Estudo da concentração do reagente 1,10-Fenantrolina sobre o sinal analítico ($n = 3$) para uma concentração de NAC de $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, concentração de Fe(III) de $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, alças de amostragem de 60 cm, vazões do Fe(III) e da solução transportadora (tampão pH = 5,7) de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e $2,2 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente.

A FIGURA 5.4 ilustra a influência da concentração do reagente 1,10-fenantrolina (Fen) na magnitude do sinal analítico para a determinação de NAC. Como pode ser observado o sinal de absorbância aumenta até a $[\text{Fen}] = 2,0 \times 10^{-3}$

mol L⁻¹ e em concentração superior a este permanece praticamente constante, por isso a [Fen] = 2,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ foi selecionada para ambos os analitos.

5.2.2. Estudo dos Parâmetros Físicos do Sistema FIA

Os parâmetros físicos do sistema proposto foram avaliados da mesma forma que os parâmetros químicos anteriormente estudados. Mantendo-se a apresentação de apenas um dos resultados de NAC ou CAP.

O efeito da variação dos volumes das alças da amostra (L₁) e do reagente (L₂) foi estudado variando-se simultaneamente o comprimento das alças de 15 a 90 cm. O resultado obtido é apresentado na FIGURA 5.5.

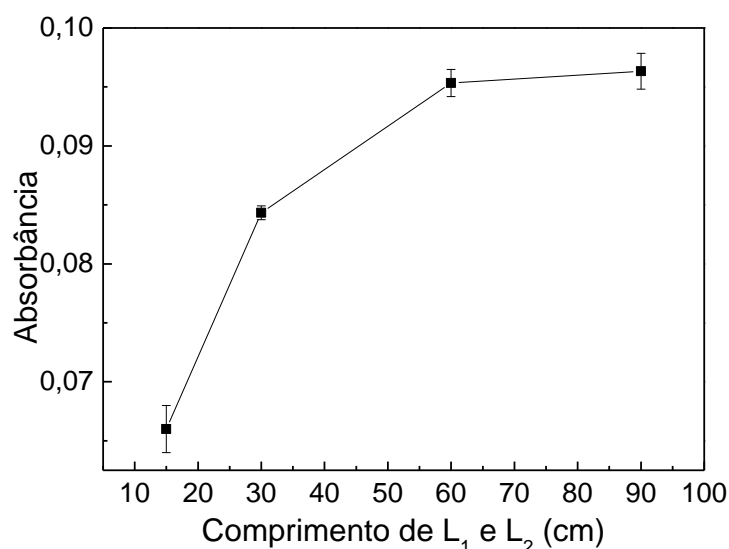


FIGURA 5.5. Estudo dos volumes das alças L₁ (amostra) e L₂ (reagente) sobre o sinal analítico (*n* = 3) para uma concentração de CAP 8,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹. [Fe(III)] = 3,0 × 10⁻³ mol L⁻¹; [Fen] = 2,0 × 10⁻² mol L⁻¹; solução transportadora = tampão acetato pH = 5,7.

De acordo com a FIGURA 5.5, a magnitude do sinal analítico aumentou consideravelmente à medida que houve um aumento dos comprimentos das alças até 60 cm. Apesar das alças de 90 cm promoverem maiores sinais de absorbância, estas não foram escolhidas, pois observou-se apenas um incremento no sinal de 1,04% em relação a de 60 cm. Além disso, uma menor repetibilidade foi obtida. Do mesmo modo, apenas um aumento de sinal de 1,7 % foi obtido para o procedimento

aplicado na determinação de NAC. Assim, alças de 60 cm foram empregadas para os estudos posteriores empregados nas determinações de NAC e CAP.

O estudo referente a vazão da solução transportadora (tampão acetato, pH = 5,7) avaliado na faixa de 1,5 a 2,6 mL min⁻¹ é apresentado na FIGURA 5.6.

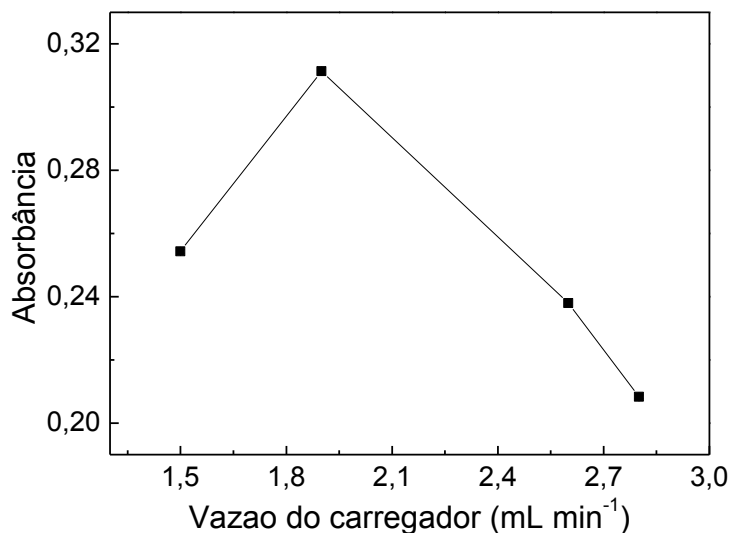


FIGURA 5.6. Estudo da vazão do carregador (tampão acetato, pH 5,7) sobre o sinal analítico ($n = 3$) para uma concentração de NAC $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Volumes das alças L₁ (amostra) e L₂ (reagente) 60 cm; [Fe(III)] = $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [Phen] = $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹.

Na FIGURA 5.6 pode-se observar que a vazão da solução transportadora apresentou maior magnitude do sinal analítico em 1,9 mL min⁻¹. Valores de vazão superiores a esse apresentaram menores sinais de absorbância, provavelmente devido a um mais acentuado fenômeno de dispersão da zona de amostragem do fluido transportador na amostra. Sendo assim, a vazão escolhida foi de 1,9 mL min⁻¹ para a determinação de NAC e CAP.

O efeito da vazão da solução 1,10-fenantrolina (Fen) foi estudado na faixa de 1,1 a 2,2 mL min⁻¹, conforme pode ser observado na FIGURA 5.7.

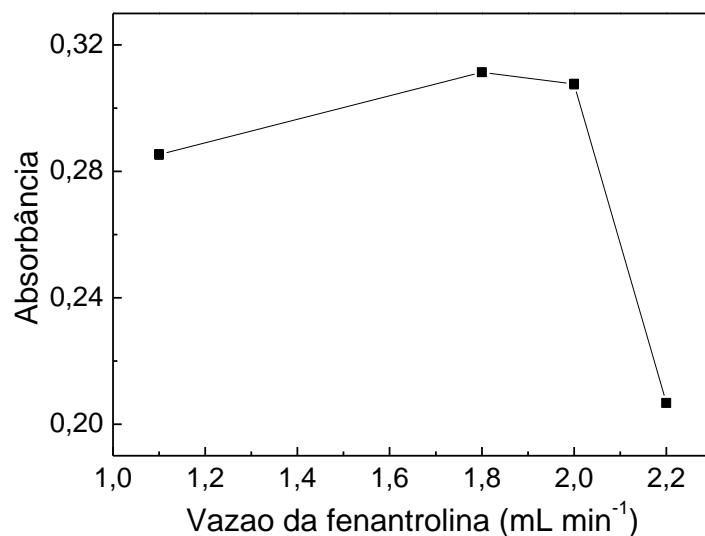


FIGURA 5.7. Estudo da vazão da Fen sobre o sinal analítico para uma concentração de NAC $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Fe(III)}] = 3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Fen}] = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, alças L_1 e $L_2 = 60 \text{ cm}$, solução carregadora = tampão acetato ($\text{pH} = 5,65$) e vazão da solução transportadora $1,9 \text{ mL min}^{-1}$.

Como pode ser observado na FIGURA 5.7 há uma diminuição do sinal analítico a partir da vazão $1,8 \text{ mL min}^{-1}$. Isto é próprio do efeito de dispersão existente sempre que existe um aumento de vazão, por isso a vazão de $1,8 \text{ mL min}^{-1}$ foi selecionada para ambos os analitos.

Uma síntese dos parâmetros estudados e selecionados na otimização de NAC e CAP foi realizada e os dados estão apresentados na TABELA 5.1.

TABELA 5.1. Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de NAC e CAP

Parâmetros	Faixa estudada	Selecionado
Solução transportadora	H ₂ SO ₄ / 10 ⁻²	Tampão acetato
	Tampão acetato*	pH = 5,65
[Fe(III)] / 10 ⁻² mol L ⁻¹	1 – 8	3
[Fen] / 10 ⁻² mol L ⁻¹	0,5 – 5	2
Alça de amostragem / cm	30 – 120	60
Vazão da solução transportadora mL min ⁻¹	1,5 – 2,7	1,9
Vazão do reagente (Fen) mL min ⁻¹	1,1 – 2,2	1,8

* [tampão acetato] = 5,0 x 10⁻² mol L⁻¹

5.2.3. Estudo de potenciais interferentes

O efeito de potenciais interferentes na determinação de captopril e *N*-acetilcisteína em formulações farmacêuticas foi avaliado em termos dos principais excipientes normalmente presentes em amostras comerciais (Tabela 5.2 e 5.3).

As substâncias avaliadas foram: estereato de magnésio, lactose, amido, sacarina e benzoato de sódio. O estudo foi realizado adicionando-se

concentrações de cada excipiente em uma solução contendo determinada concentração de padrão e o sinal obtido foi comparado antes e após a adição dos potenciais interferentes avaliados.

Nesses experimentos foram utilizadas soluções padrões de $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para ambos analitos e os potenciais interferentes em concentrações 10 vezes superiores. Os resultados obtidos estão apresentados nas TABELAS 5.2 e 5.3, para CAP e NAC, respectivamente.

TABELA 5.2. Estudo dos possíveis interferentes na determinação de captopril em amostras comerciais empregando o sistema FIA proposto

Excipiente	Razão de concentração (Excipiente:CAP*)	Interferência %
Estereato de magnésio	10:1	2,0
Lactose	10:1	3,0
Amido	10:1	2,0
Sacarina	10:1	2,0
Benzoato de sódio	10:1	5,0

*[captopril] = $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹

TABELA 5.3. Estudo dos possíveis interferentes na determinação de N-acetilcisteína em amostras comerciais empregando o sistema FIA proposto

Excipiente	Razão de concentração (Excipiente:NAC*)	Interferência %
Estereato de magnésio	10:1	5,0
Lactose	10:1	4,0
Amido	10:1	3,0
Sacarina	10:1	2,0
Benzoato de sódio	10:1	5,0

*[N-acetilcisteína] = $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹

Como pode ser observado nas TABELAS 5.2 e 5.3 nenhuma das substâncias investigadas causou uma interferência significativa na determinação destes analitos. Mesmo quando presentes em uma concentração dez vezes maior que a concentração dos fármacos, o maior percentual de interferência foi de apenas 5,0%.

5.2.4. Adição e Recuperação

Foram realizados testes de adição e recuperação empregando três distintos níveis de concentração de solução padrão ($1,0$, $5,0$ e $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) para ambos analitos em cinco amostras distintas de NAC e CAP, respectivamente. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando soluções padrão dos respectivos analitos na mesma concentração, TABELA 5.4 e 5.5.

TABELA 5.4. Resultados do estudo de adição e recuperação de NAC adicionada a cinco amostras comerciais empregando o sistema em fluxo ($n = 3$)

Amostras	NAC / 10^{-4} mol L ⁻¹		Recuperado / %
	Adicionado	Encontrado	
A	1,00	1,03 ± 0,02	103,0
	5,00	5,02 ± 0,03	100,4
	8,00	8,08 ± 0,08	101,0
B	1,00	1,01 ± 0,02	101,0
	5,00	4,98 ± 0,03	99,6
	8,00	8,06 ± 0,04	100,8
C	1,00	1,03 ± 0,05	103,0
	5,00	4,45 ± 0,01	105,0
	8,00	8,10 ± 0,02	101,3
D	1,00	1,01 ± 0,05	101,0
	5,00	4,78 ± 0,03	95,6
	8,00	8,15 ± 0,02	101,9
E	1,00	1,05 ± 0,01	105,0
	5,00	4,85 ± 0,03	97,0
	8,00	7,92 ± 0,02	99,0

TABELA 5.5. Resultados do estudo de recuperação de CAP adicionada a cinco amostras comerciais ($n = 3$)

Amostras	CAP / 10^{-4} mol L $^{-1}$		Recuperado / %
	Adicionado	Encontrado	
A	1,00	0,93 ± 0,05	93,0
	5,00	5,01 ± 0,02	100,2
	8,00	8,06 ± 0,08	100,8
B	1,00	1,02 ± 0,02	102,0
	5,00	4,98 ± 0,03	99,6
	8,00	7,96 ± 0,04	99,5
C	1,00	1,03 ± 0,05	103,0
	5,00	4,65 ± 0,01	93,0
	8,00	8,05 ± 0,03	100,6
D	1,00	0,96 ± 0,05	96,0
	5,00	4,88 ± 0,03	97,6
	8,00	8,05 ± 0,05	100,6
E	1,00	1,03 ± 0,02	103,0
	5,00	4,95 ± 0,03	99,0
	8,00	7,96 ± 0,01	99,5

Os valores percentuais de recuperação variaram entre 95,6 e 105% para CAP e 93,0 e 103,0 % para NAC, sugerindo assim ausência de interferência da matriz no procedimento proposto.

5.2.5. Estudo da repetibilidade dos sinais analíticos e frequência de amostragem

Avaliou-se a repetibilidade dos sinais analíticos do procedimento em fluxo desenvolvido para concentrações de solução padrão de $5,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de NAC e CAP (FIGURAS 5.8 e 5.9).

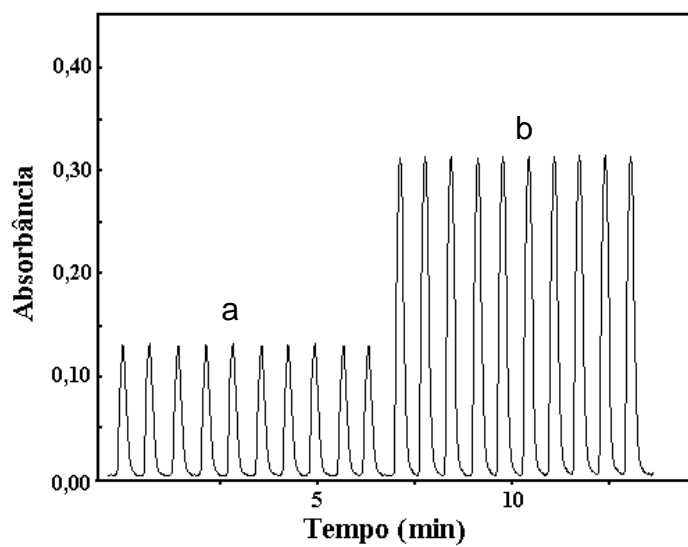


FIGURA 5.8. Estudo da repetibilidade para soluções de referência de NAC nas concentrações de (a) $5,0 \times 10^{-4}$ e (b) $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ ($n = 10$), $\lambda = 525$ nm.

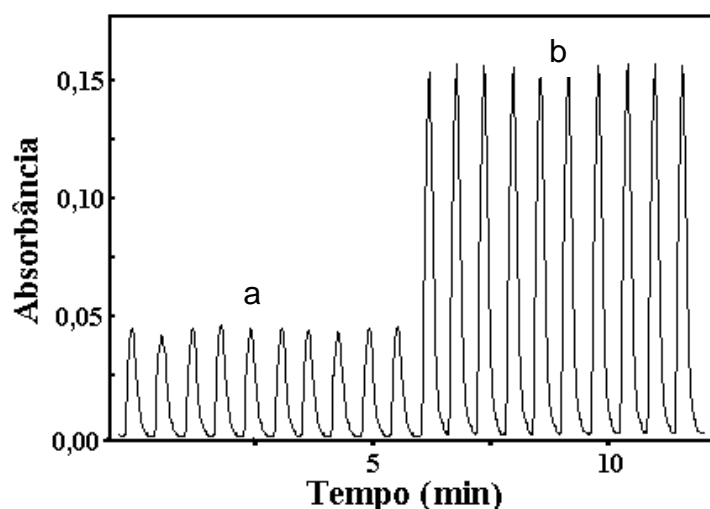


FIGURA 5.9. Estudo da repetibilidade para soluções de referência de CAP nas concentrações de (a) $5,0 \times 10^{-4}$ e (b) $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($n = 10$), $\lambda = 525$ nm.

Nos estudos de repetibilidade obteve-se desvios padrão relativos (RSD) de 0,5 e 0,9% para as concentrações a e b de CAP, e DPR de 0,3 e 1,3% para as respectivas concentrações de NAC. O procedimento proposto apresentou uma frequência de amostragem de 96 e 108 determinações por hora para NAC e CAP.

5.2.6. Curva Analítica

As curvas analíticas obtidas empregando o sistema FIA desenvolvido para a determinação de NAC e CAP podem ser visualizadas nas FIGURAS 5.10 e 5.11

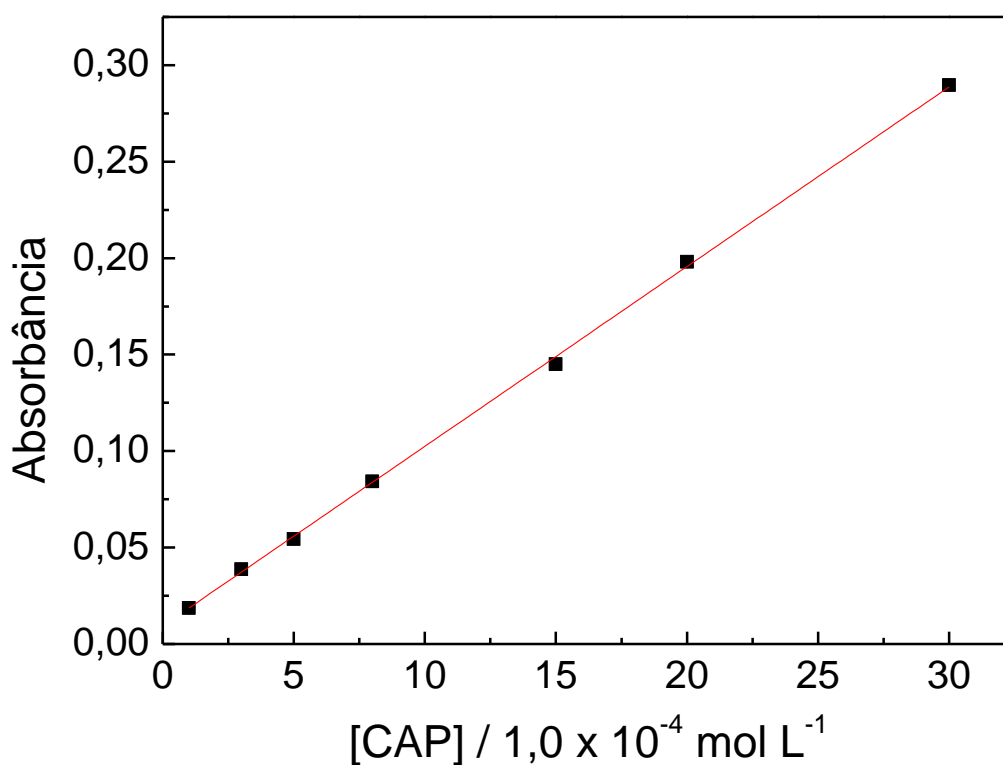


FIGURA 5.10. Curva analítica para a determinação de CAP.

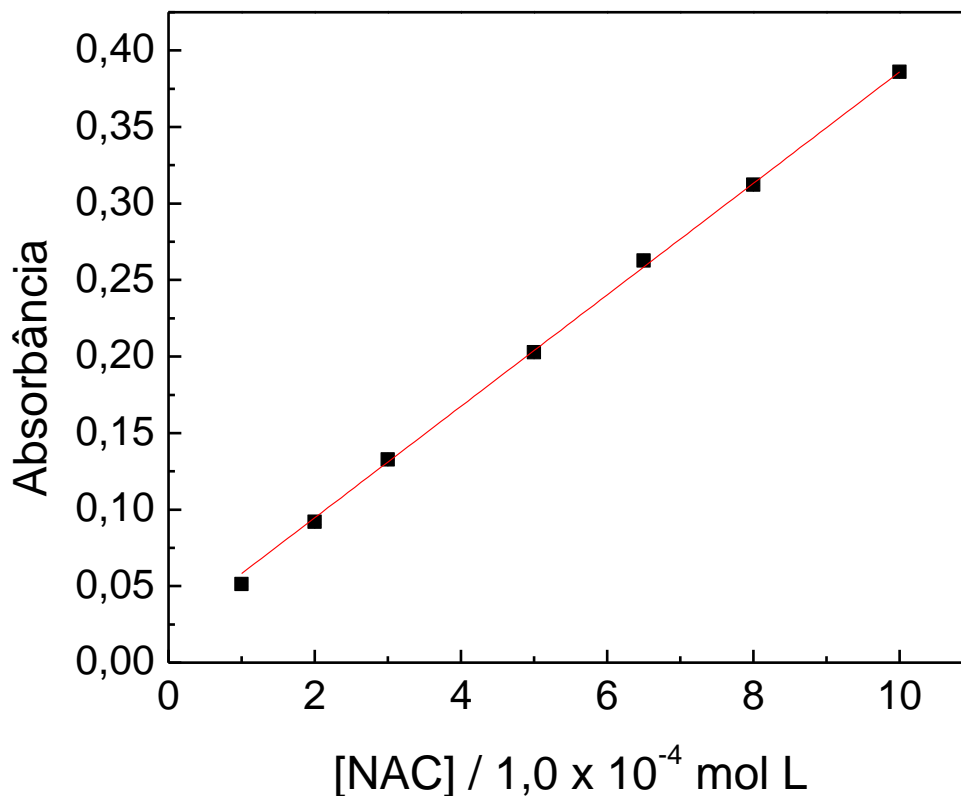


FIGURA 5.11. Curva analítica para a determinação de NAC.

A curva analítica para a determinação de CAP foi linear no intervalo de concentrações de $1,0 \times 10^{-4}$ e $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ ($A = - 0,00927 + 93,56 C$; $r = 0,999$ onde A é a absorbância e C a concentração de captopril em mol L⁻¹) e apresentou um limite de detecção de $2,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (três vezes o desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica). Já para a determinação de NAC obteve-se uma curva analítica linear para o intervalo de $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ ($A = - 0,0022 + 363,55 C$; $r = 0,999$ e apresentou um limite de detecção de $6,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹).

Os sinais transientes obtidos em triplicatas das soluções padrão e das amostras de NAC e CAP são apresentados nas Figuras 5.12 e 5.13.

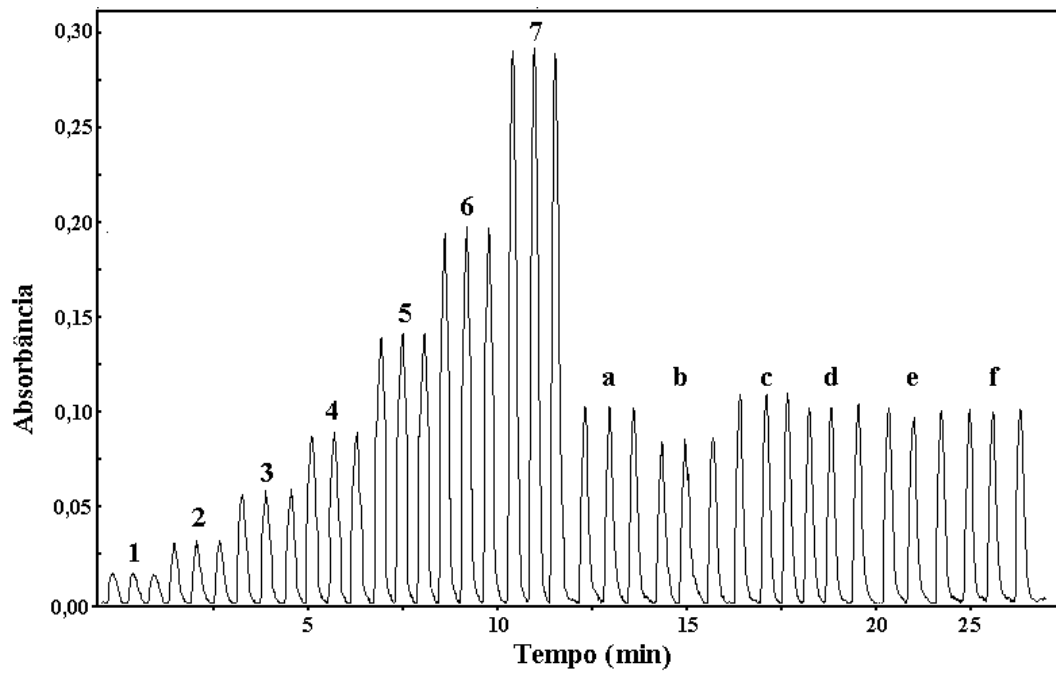


FIGURA 5.12. Sinais transientes obtidos na determinação das soluções padrão de 1 a 7 ($1,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) e amostras de CAP (a – f).

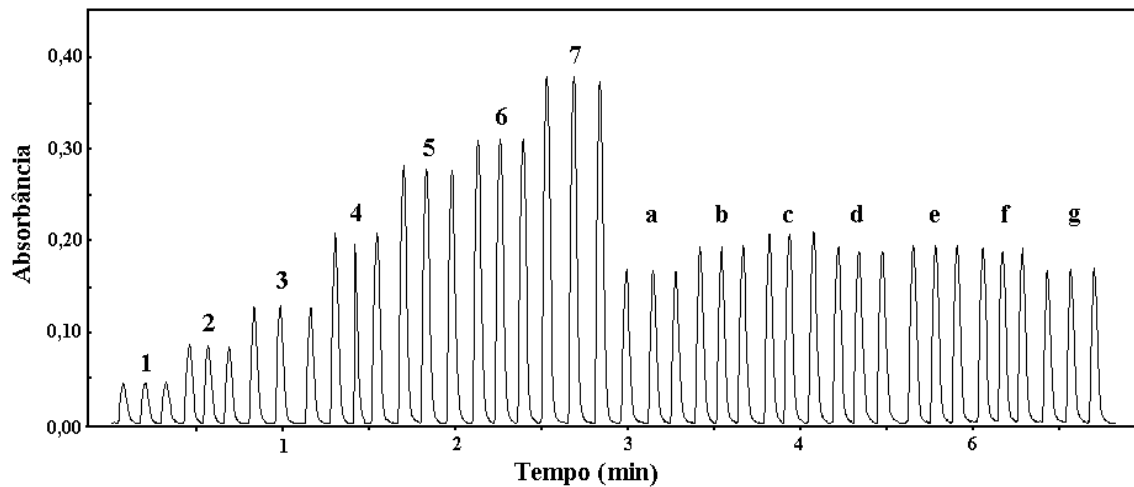


FIGURA 5.13. Sinais transientes obtidos na determinação das soluções padrão de 1 a 7 ($1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) e amostras de NAC (a – g).

5.2.7. Determinação da concentração dos analitos nas amostras

O método proposto foi aplicado nas determinações de NAC e CAP em formulações farmacêuticas e os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos empregando o método de referência baseado na titulação potenciométrica descrito na literatura. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 5.6 e 5.7.

TABELA 5.6. Determinação de CAP em formulações farmacêuticas empregando o sistema FIA proposto e o método referência⁹⁸ ($n = 3$)

Amostras	CAP / mg		Erro
	Referência	Proposto	Er / %
A	24,8 ± 0,7	25,5 ± 0,6	2,8
B	51,1 ± 0,5	49,4 ± 0,9	-3,3
C	26,2 ± 0,8	25,8 ± 0,5	-1,5
D	12,1 ± 0,1	12,1 ± 0,2	0,8
E	12,9 ± 0,3	12,2 ± 0,4	-5,4
F	25,6 ± 0,1	25,5 ± 0,2	-0,4

Er = erro relativo entre o procedimento proposto e o método de referência.

TABELA 5.7. Determinação de NAC em formulações farmacêuticas empregando o sistema FIA proposto e o método comparativo ($n = 3$)

Amostras	NAC / mg		Erro
	Referência	Proposto	Er / %
A	95,5 ± 0,7	94,6 ± 0,6	-1,1
B	105,4 ± 0,5	106,6 ± 0,9	1,1
C	669,1 ± 0,8	679,3 ± 0,9	1,5
D	199,4 ± 0,1	197,7 ± 0,2	-0,9
E	8,0 ± 0,3	8,1 ± 0,4	1,3
F	39,7 ± 0,1	38,8 ± 0,2	-2,3
G	9,9 ± 0,2	9,8 ± 0,2	-1,0

Er = erro relativo entre o procedimento proposto e o método de referência

O teste t -pareado foi aplicado aos resultados obtidos e valores de $t_{\text{calculado}}$ de 0,332 e 0,343 menores que o valor de t_{tabelado} (3,182) e (3,475) indicando que os valores entre os métodos não apresentaram diferenças significativas a um nível de confiança de 95%.

5.3. Determinação fotométrica de ácido *L*-ascórbico utilizando minifotômetro *lab-made* e LTCC em formulações farmacêuticas

5.3.1. Estudos preliminares: avaliação da degradação de AAc

O AAc é facilmente degradado pela ação do oxigênio dissolvido, como discutido por BULATOV *et al.*⁷⁹. Para evitar este efeito, todas as soluções foram desaeradas por meio do borbulhamento de nitrogênio por 20 minutos.

5.3.2. Estudo dos parâmetros do reator em fase sólida

O reator em fase sólida (RFS) utilizado neste trabalho foi confeccionado em tubos de PTFE com diâmetro interno de 1,8 mm para diminuir a pressão hidrodinâmica no sistema em fluxo.

Foram estudados alguns parâmetros, tais como: proporção entre $(\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2)$ e poliuretana; tamanho das partículas, comprimento do reator.

A proporção entre o sal $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ e a poliuretana foi avaliada nas seguintes proporções: 1:3; 1:5 e 1:7 m/m em tubos de PTFE (50 mm x 1,8 mm d.i.) para verificar o efeito deste parâmetro sobre o sinal analítico. Nestes estudos foram empregadas soluções padrão de AAc $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de batocuproína $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ as quais foram mantidas constantes. A FIGURA 5.3.2.1, mostra os resultados obtidos neste estudo.

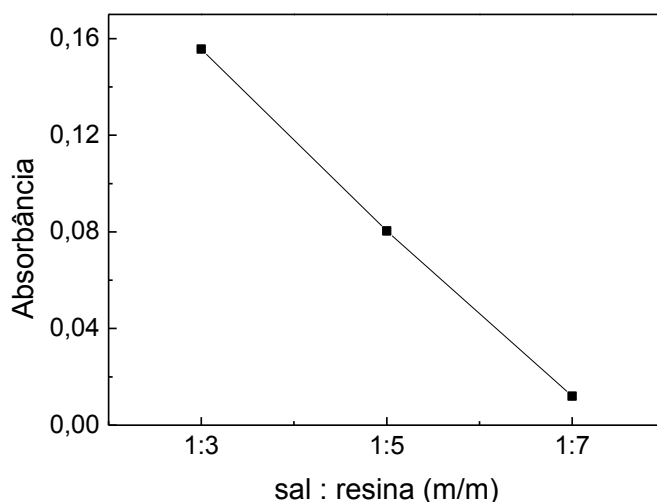


FIGURA 5.14. Estudo da proporção sal $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ /poliuretana para uma solução padrão de AAc $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e batocuproína $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Reator em fase sólida (RFS) com dimensões: 50 mm x 1,8 mm d.i.. Tamanho de partícula entre 250-350 μm .

Utilizando-se as soluções padrão de AAc e batocuproína citadas acima, observou-se um decréscimo do sinal analítico com o aumento da proporção da resina poliuretana. Proporções inferiores a 1:3 (sal:resina) não foram estudados, pois, não foi possível obter uma mistura efetiva entre o composto de cobre e a

resina. Assim a proporção selecionada foi de 1:3 (m/m) entre o composto de cobre e resina poliuretana.

Depois de selecionada a proporção sal:resina (m/m) foi estudada a granulometria das partículas em quatro faixas (<106; 106-250; 250-350 e 350-500 μm) utilizando peneiras granulométricas para a separação (FIGURA 5.15).

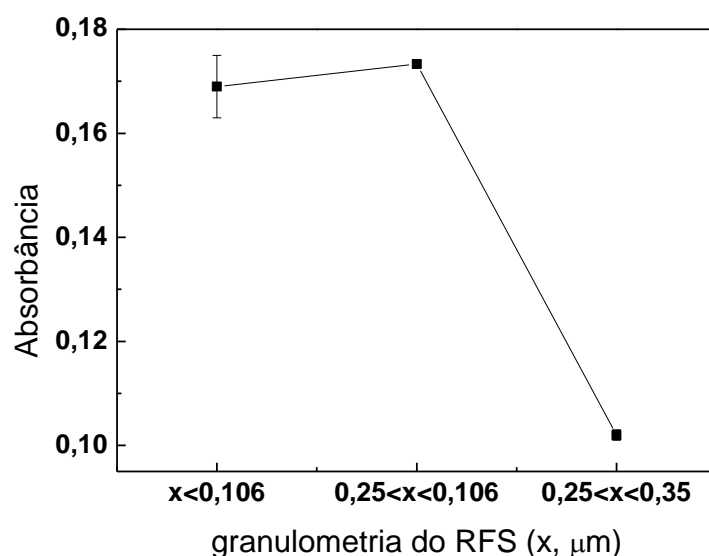


FIGURA 5.15. Estudo do tamanho das partículas do reator em fase sólida (RFS). Soluções padrões empregadas: AAc $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e batocuproína $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. RFS (1:3, sal/resina) e dimensões: 50 mm x 1,8 mm d.i..

Partículas de tamanho inferior a 106 μm não foram utilizadas por levarem a um aumento da pressão hidrodinâmica do sistema em fluxo. Outrora, partículas de diâmetros entre 350-500 μm apresentaram maiores desvios padrão nas medidas, possivelmente por favorecer a dispersão da amostra devido aos espaços vazios (lacunas) existentes quando se empregam estas partículas. Sendo assim, selecionou-se partículas com diâmetro de 106-250 μm por proporcionarem maior sinal analítico e menor desvio padrão entre as medidas, como visto na Figura 5.15.

Na Figura 5.16 são apresentados os resultados obtidos devido a influência do comprimento do reator em fase sólida (3, 5, 7 e 9 cm) no sinal analítico.

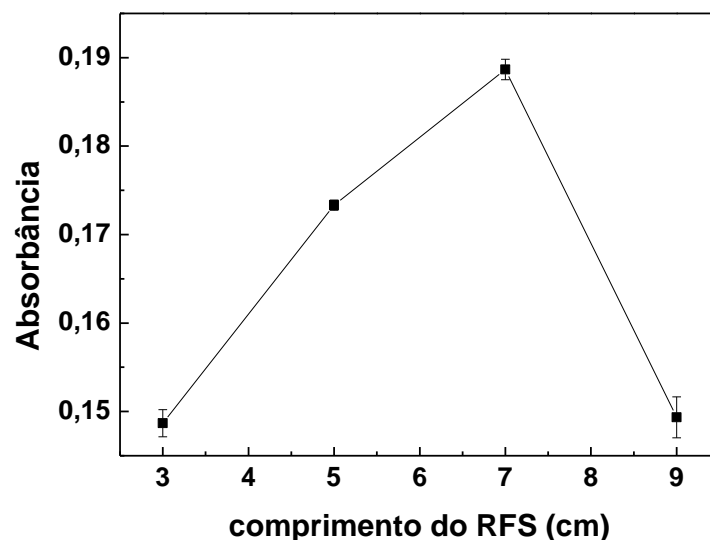


FIGURA 5.16. Estudo do comprimento do RFS. Soluções padrão empregadas: AAC $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e batocuproína $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. RFS (1:3, sal/resina). Tamanho de partícula entre 106-250 μm .

Como esperado, o reator com comprimento de 3 cm apresentou menor sinal analítico, provavelmente devido ao menor tempo de residência da amostra no mesmo, diminuindo assim o tempo de contato entre o analito e o reagente ($\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$) imobilizado na resina poliuretana, além de apresentarem um significativo desvio padrão nas medidas. Como pode ser observado, o reator que apresentou maior sinal analítico foi o de 7 cm, sendo este selecionado para os trabalhos posteriores. Reatores de comprimentos maiores que 9 cm não foram estudados por apresentarem maior dispersão da amostra, diminuindo-se assim os sinais analíticos o que poderia acarretar em uma menor sensibilidade do método.

5.3.3. Estudos dos parâmetros em fluxo

Os parâmetros do sistema em fluxo foram otimizados de forma univariada e os resultados foram avaliados em termos de sensibilidade e frequência analítica.

O volume da amostra ou do padrão foi determinado através do tempo de acionamento da válvula (V_1), Figura 5.3.3, visto que o volume é diretamente proporcional ao tempo de acionamento da válvula. Os tempos estudados neste

experimento foram de 5, 10, 15 e 20 s que correspondem a volumes de 21, 42, 62 e 83 μL de amostra ou padrão respectivamente.

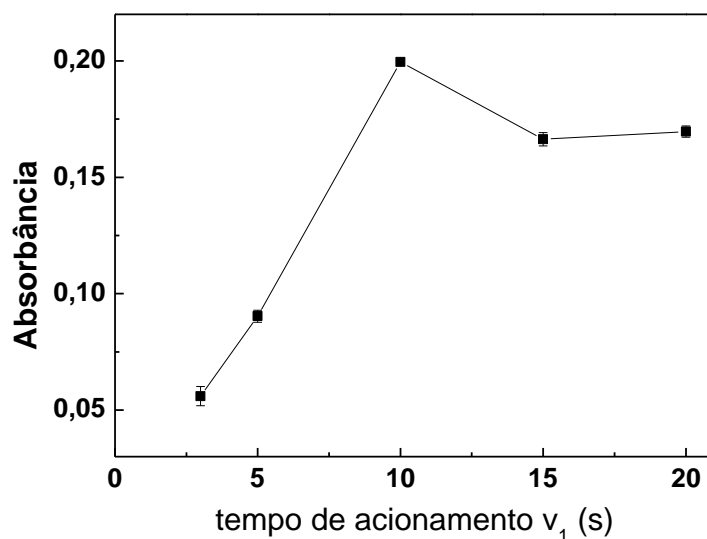


FIGURA 5.17. Estudo do tempo de acionamento da válvula v_1 (amostra ou padrão). Soluções padrões empregadas: AAc $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e batocuproína $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. RFS (1:3, sal:resina) e dimensões: 70 mm \times 1,8 mm d.i.. Tamanho de partícula entre 106-250 μm .

Como pode ser observado na Figura 5.17, o aumento no tempo de acionamento da válvula v_1 (válvula do AAc) aumenta o sinal analítico de forma significativa até 10 s (42 μL), como é esperado, pois uma maior quantidade do analito está sendo introduzida no reator. Porém, a partir de 10 s observa-se um decréscimo no sinal analítico. Desta maneira foi selecionado o tempo de 10 s, que é suficientemente curto, permitindo obter uma boa frequência analítica.

5.3.4. Efeito da concentração da batocuproína

O efeito da variação de concentração do reagente batocuproína (batocup), FIGURA 5.18 foi investigado na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para uma solução de AAc $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

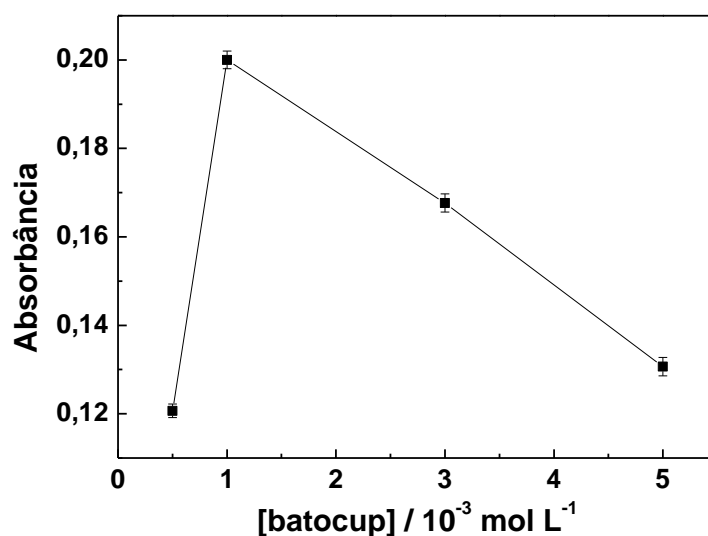


FIGURA 5.18. Efeito da variação da concentração da batocuproína: [AAc] = $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. RFS (1:3, sal/resina) e dimensões: 70 mm x 1,8 mm d.i.. Tamanho de partícula entre 106-250 µm.

Como pode ser observado na Figura 5.18 a concentração de batocuproína que apresentou maior absorbância foi $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, sendo este selecionado para experimentos posteriores.

5.3.5. Interferentes em potencial e teste de recuperação

O efeito de possíveis interferentes na determinação espectrofotométrica de AAc em formulações farmacêuticas foi avaliado considerando os principais excipientes (concomitantes) presentes nas formulações farmacêuticas, TABELA 5.8. Estes foram avaliados em proporções 10:1 (excipiente:AAc) em relação a uma solução padrão de $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AAc. Os excipientes que apresentaram

interferências maiores que 10% foram avaliados novamente, desta vez utilizado proporções menores de 1:1 e 1:10.

TABELA 5.8. Estudos dos possíveis interferentes na determinação fotométrica de AAc em formulações farmacêuticas

Excipiente	Razão / (excipiente:AAc)	Interferência (%)
ác. cítrico	10:1	4,21
aspartame	10:1	1,39
celulose cristalina	10:1	-4,80
glicose	10:1	3,58
polietileno glicol	10:1	-1,57
sacarina	10:1	10,37
	1:1	-1,90
sacarose	10:1	10,62
	1:1	-1,17
sorbitol	10:1	5,11
sulfato de zinco	10:1	29,51
	1:1	9,00
tartrazina	1:1	22,60
	1:10	-1,60

Como pode ser observado na TABELA 5.8, a adição de polietileno glicol, sorbitol, celulose cristalina, ácido cítrico, glicose, sacarose e aspartame em concentrações 10 vezes superior a concentração de AAc causou interferências inferiores a 6,0 % utilizando o procedimento desenvolvido. Sacarina e sulfato de zinco apresentaram interferências de -1,17% e 9,00% apenas quando a proporção foi de 1:1. A adição de sulfato de zinco (II) ocasionou uma interferência superior a 10,00 %, pois o mesmo apresenta propriedades redutoras e juntamente com o cobre (II) imobilizado no reator em fase sólida reduzindo este efeito gerando uma interferência positiva significativa para os níveis mostrados na Tabela 5.8.

Contudo a tartrazina (corante amarelo) apenas em concentração de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (10 vezes menor) possibilitou uma menor interferência espectral. Entretanto vale salientar que este corante, quando presentes nas amostras em

concentrações próximas ou abaixo de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ não ocasionou interferências significativas para a determinação de AAC como apresentados nos estudos subsequentes.

Foi realizado o teste de adição e recuperação para avaliar os efeitos da matriz sobre as amostras analisadas pelo método proposto. Para isto, três alíquotas de soluções padrão de AAC de concentrações diferentes foram adicionadas a três amostras de formulações farmacêuticas e os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 5.9.

TABELA 5.9. Teste de adição e recuperação de AAC nas amostras analisadas ($n = 3$)

Amostras	Ácido L-ascórbico (mg L^{-1})*		Recuperação (%)
	Adicionado	Recuperado	
A1	17,6	$17,0 \pm 0,0$	96,0
	35,2	$37,0 \pm 0,6$	105,0
	88,1	$88,4 \pm 0,9$	100,3
A2	17,6	$16,9 \pm 0,6$	95,7
	35,2	$33,0 \pm 0,5$	93,6
	88,1	$88,1 \pm 0,6$	100,0
A3	17,6	$18,5 \pm 0,6$	105,0
	35,2	$34,8 \pm 0,2$	98,9
	88,1	$88,2 \pm 0,7$	102,2

*As medidas foram realizadas em 472 nm.

Como pode ser visto na TABELA 5.9, as recuperações variaram 93,6 a 105,0%. Estes resultados sugerem ausência do efeito matriz na determinação de ácido ascórbico nas amostras analisadas, corroborando o que foi discutido anteriormente.

5.3.6. Curva analítica

Após as otimizações dos parâmetros físicos e químicos do sistema em fluxo proposto para a determinação de AAc em formulações farmacêuticas utilizando RFS, microsistema analítico LTCC e minifotômetro *lab-made* o sistema proposto foi aplicado em amostras farmacêuticas.

A curva analítica (FIGURA 5.19) do AAc foi obtida a partir de determinações repetidas ($n=5$) utilizando soluções padrões preparadas por diluições apropriada de uma solução estoque de AAc de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

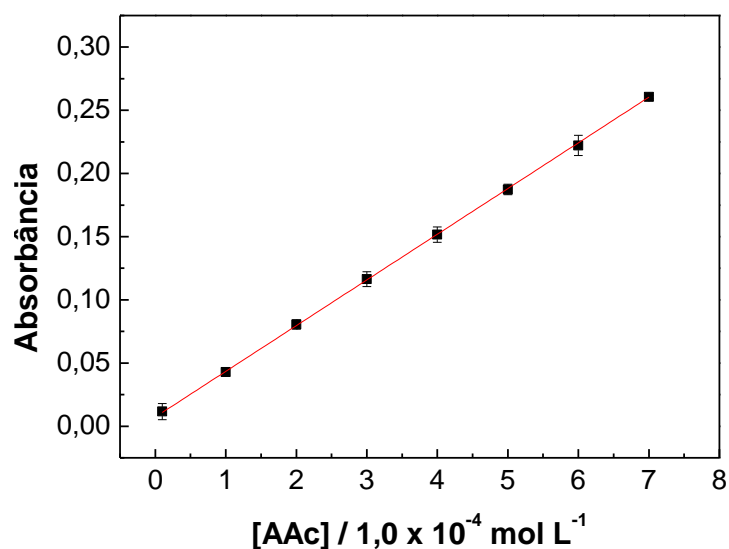


FIGURA 5.19. Curva analítica para a determinação de AAc. Medidas realizadas em 472 nm. Batocuproína = $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. RFS (1:3, sal/resina) e dimensões: 70 mm x 1,8 mm d.i.. Tamanho de partícula entre 106-250 μm .

O sistema proposto apresentou um faixa linear de trabalho de $8,5 \times 10^{-6}$ a $7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($A = 0,003 + 397,180 C$; $r = 0,9999$ onde A é a absorbância e C a concentração de AAc em mol L^{-1}).

Os valores de LOD e LOQ foram de $7,0 \times 10^{-7}$ e $2,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados foram bastante satisfatórios, principalmente devido à boa sensibilidade analítica para este procedimento.

5.3.7. Estudo da repetibilidade dos sinais analíticos e frequência de amostragem

O estudo de repetibilidade pode ser visto na Figura 5.3.7, e foi avaliado utilizando uma solução padrão de ácido L-ascórbico de concentração $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Foi obtido um desvio padrão relativo de 2,1% ($n=10$). A frequência de amostragem para o procedimento em fluxo desenvolvido foi de 120 determinações por hora.

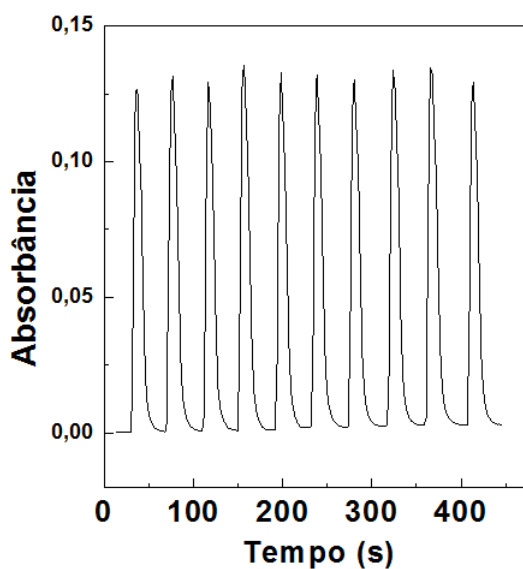


FIGURA 5.20. Estudo da repetibilidade da solução de AAc $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Medidas realizadas em 472 nm. Batocuproína = $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. RFS (1;3, sal/resina) e dimensões: 70 mm x 1,8 mm d.i.. Tamanho de partícula entre 106-250 μm ($n = 10$).

Um resumo dos parâmetros de desempenho é apresentado na TABELA 5.3.7.1.

TABELA 5.10. Resumos com os parâmetros de desempenho para a determinação de AAc

Parâmetros de desempenho	Resultados
equação da curva	$A = (0,003 \pm 0,001) + (397,2 \pm 0,001) \times [\text{AAc}]^*$
faixa linear	$8,5 \times 10^{-6} - 7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
limite de detecção (LD)	$7,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$
limite de quantificação (LQ)	$2,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
repetibilidade (RSD, $n=10$)	2,1 %

*[AAc] / mol L⁻¹

5.3.8. Aplicações

O procedimento proposto foi aplicado para a determinação de AAc em três amostras comerciais de ácido ascórbico adquiridas no comércio local. Os resultados obtidos foram comparados com o método recomendado pela Farmacopéia Brasileira e são mostrados na TABELA 11.

O teste-*t* pareado foi utilizado para avaliar o nível de similaridade entre as duas medidas a um nível de confiança de 95%.

TABELA 5.11. Determinação de ácido ascórbico em formulações farmacêuticas empregando-se o sistema FIA proposto e o método iodimétrico utilizado como referência⁸⁴

Amostras	Iodimétrico / (mg)	Proposto / (mg)	Er (%)	Test- t^a
A1	938 ± 7	921 ± 0	-1,8	1,6
A2	905 ± 8	905 ± 4	0,0	0,1
A3	466 ± 7	464 ± 7	-0,5	0,5

^a Teste- t pareado (2, 2, 95 %) = 4.3, com $n = 3$.

Er = erro relativo entre o procedimento proposto e o método de referência.

Os valores obtidos pela aplicação do teste t -pareado são menores que o valor crítico tabelado indicando que não há diferença significativa entre os resultados obtidos por ambas as técnicas a um nível de confiança de 95%.

5.4. Determinação fotométrica de adrenalina e dopamina utilizando minifotômetro *lab-made* e LTCC em formulações farmacêuticas

Os estudos realizados no desenvolvimento desse procedimento foram feitos de forma univariada, sempre buscando a melhor relação entre a magnitude dos sinais analíticos, precisão nas medidas, estabilidade da linha de base e frequência de amostragem. A temperatura foi controlada em 25°C durante toda a fase de otimização do sistema proposto.

Para os estudos envolvendo as determinações de adrenalina (ADN) e dopamina (DPN) alguns parâmetros como: tipo de tampão utilizado, faixa de pH, vazão da solução transportadora, tempo de acionamento da válvula da amostra e tamanho do reator foram avaliados.

Foram estudados 3 sistemas tamponantes distintos: tampão acetato na faixa de 4,1 a 5,8; fosfato de pH 6,0 e 8,0 e tris na faixa de pH entre 7,0 e 9,0. Entre os tipos de tampões e valores de pH avaliados, aquele que foi mais adequado para ADN e DPN foi tampão fosfato em pH 7,0.

Estudos referentes a vazão da solução transportadora (solução de tampão fosfato pH = 7,0) foram executados com a finalidade de obtenção de um maior sinal analítico para ambos os analitos estudados e três tempos distintos de acionamento das válvulas foram utilizados 10, 20 e 30 s. Os resultados para os ambos analitos variando os parâmetros de vazão são apresentados nas FIGURAS 5.21 e 5.22.

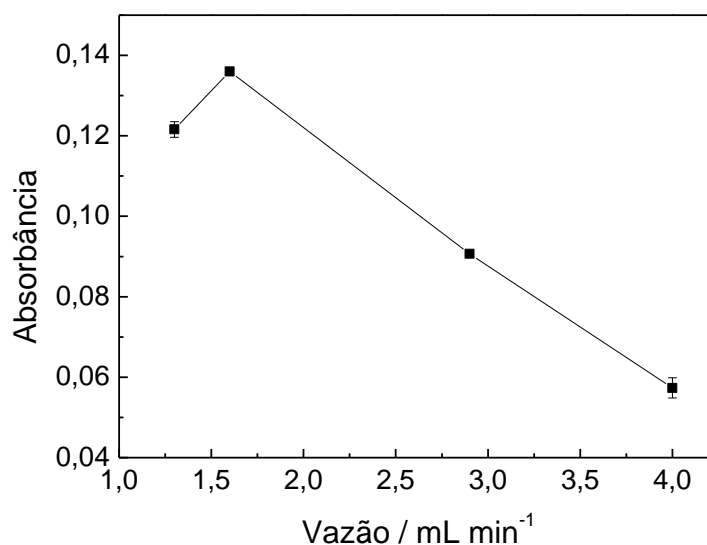


FIGURA 5.21. Estudo da vazão da solução transportadora (solução de tampão fosfato pH = 7,0). Concentração do padrão de ADN = $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Dimensões do reator em fase sólida (RFS): 50 mm x 1,5 mm d.i..

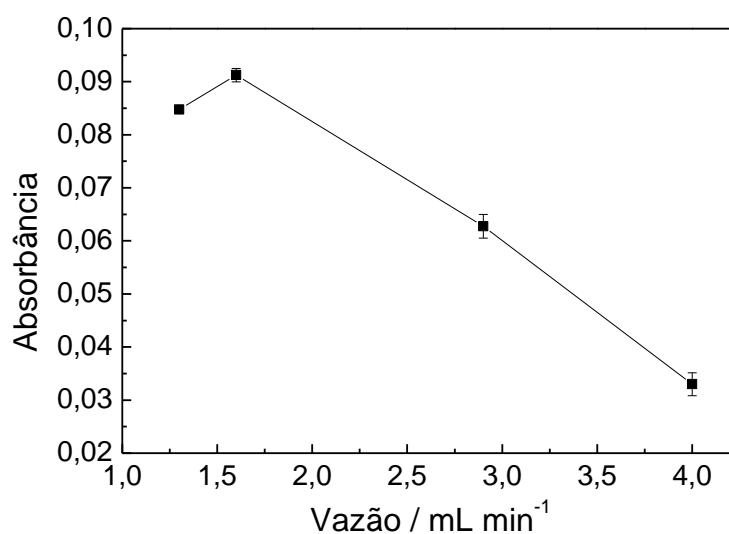


FIGURA 5.22. Estudo da vazão da solução transportadora (solução de tampão fosfato pH = 7,0). Concentração do padrão de DPN = $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Dimensões do reator em fase sólida (RFS): 50 mm x 1,5 mm d.i..

Como pode ser observado, a vazão de $1,6 \text{ mL min}^{-1}$ apresentou o maior sinal analítico, dessa forma foi vazão selecionada. O tempo de abertura das válvulas foi avaliado e os melhores resultados foram obtidos para tempos de abertura de 20 s.

Uma vez selecionada a vazão da solução transportadora e o tempo de acionamento da válvula, foi realizado o estudo do comprimento do reator em fase sólida para ambos os analitos, sendo os parâmetros apresentados nas FIGURAS 5.23. e 5.24.

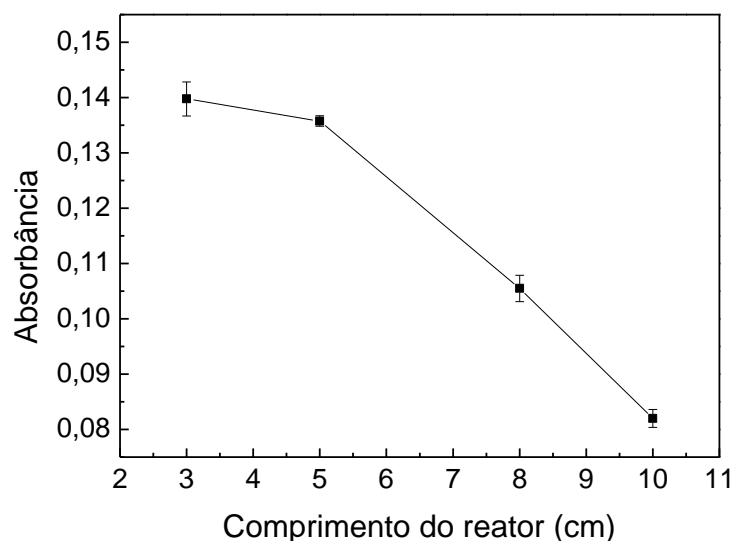


FIGURA 5.23. Avaliação do comprimento do reator em fase sólida. Solução transportadora (solução de tampão fosfato pH = 7,0). Concentração do padrão de ADN = $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Vazão da solução transportadora = $1,6 \text{ mL min}^{-1}$.

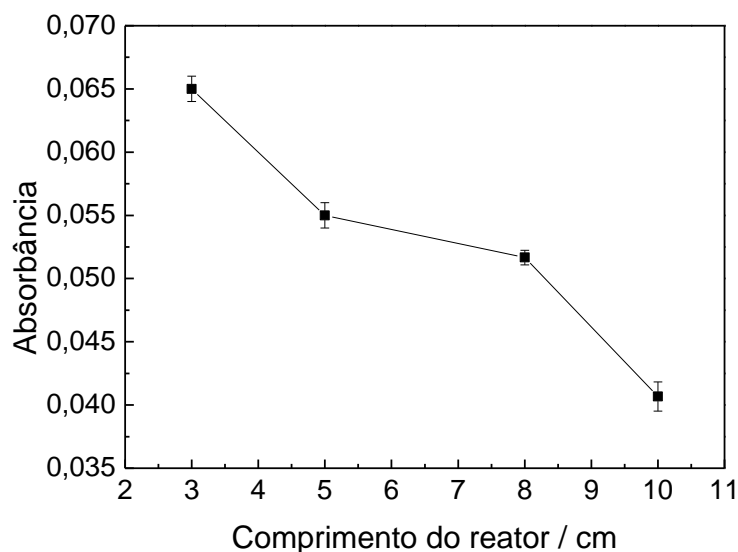


FIGURA 5.24. Avaliação do comprimento do reator. Solução transportadora (solução de tampão fosfato pH = 7,0). Concentração do padrão de DPN = $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Dimensões do RFS.

Como pode ser visto nas FIGURAS 5.23 e 5.24, o tamanho do reator que possibilitou a aquisição de um maior sinal analítico foi o de 3 cm para ambos os casos. Comprimentos de reatores maiores apresentaram um decréscimo gradativo do sinal analítico, provavelmente devido a efeitos de dispersão.

Os parâmetros estudados e otimizados foram utilizados para a construção das curvas analíticas. Abaixo nas FIGURAS 5.25 e 5.26 são apresentadas as curvas analíticas obtidas para a determinação das catecolaminas estudadas neste trabalho.

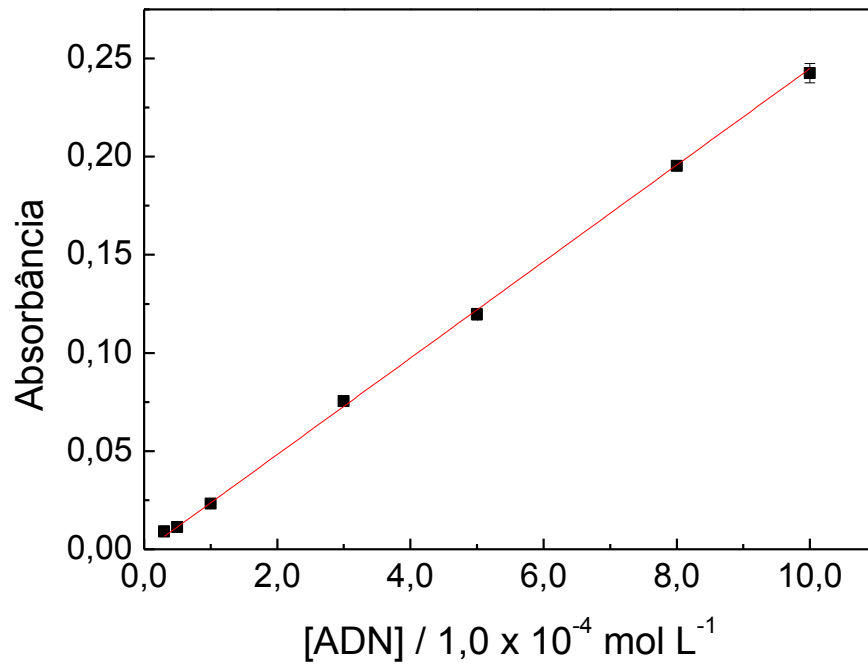


FIGURA 5.25. Curva analítica obtida para a determinação de ADN. Condições utilizadas: Solução transportadora (tampão fosfato pH = 7,0). Dimensões do RFS: 30 mm x 1,5 mm d.i..

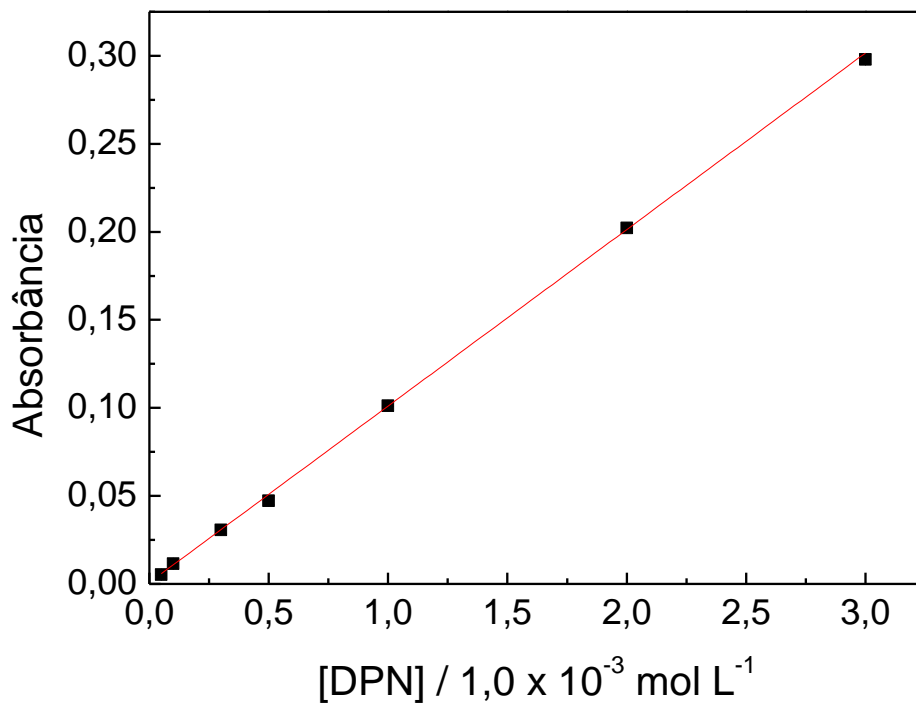


FIGURA 5.26. Curva analítica obtida para a determinação de DPN. Condições utilizadas: Solução transportadora (tampão fosfato pH = 7,0). Dimensões do RFS: 30 mm x 1,5 mm d.i..

Uma faixa linear de trabalho de $3,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ ($A = 3,92 \times 10^{-4} + 245,8 C$; $r = 0,9997$ onde A é a absorbância e C a concentração de ADN em mol L⁻¹), limite de detecção e quantificação de $6,2 \times 10^{-6}$ e $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ foram obtidos para a determinação de ADN.

No procedimento proposto para a determinação de DPN foram obtidos os seguintes parâmetros: curva analítica de $5,0 \times 10^{-5}$ – $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ ($A = 7,67 \times 10^{-4} + 100,3 C$; $r = 0,999$ onde A é a absorbância e C a concentração de DPN em mol L⁻¹); limite de detecção e de quantificação $1,5 \times 10^{-5}$ e $4,9 \times 10^{-5}$, respectivamente.

A TABELA 5.12 apresenta os parâmetros avaliados e os selecionados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de adrenalina (ADN) e dopamina (DPN) em formulações farmacêuticas.

TABELA 5.12. Parâmetros avaliados na otimização do sistema em fluxo para a determinação de adrenalina e dopamina empregando o sistema FIA proposto

Parâmetros	Faixa estudada	Selecionado
pH (tampão fosfato)	5 a 9	7
vazão da solução transportadora / mL min ⁻¹	1,3 a 4,0	1,6
tempo de acionamento da válvula V ₁ / s	10 a 30	20
tamanho do reator / cm	3 a 10	3

5.4.1. Estudos de interferentes em potencial e testes de recuperação empregando o microssistema analítico

O efeito de interferentes em potencial na determinação de adrenalina e dopamina em formulações farmacêuticas foram avaliados para excipientes normalmente presentes em amostras comerciais. Nestes experimentos, foram utilizadas soluções de referência das catecolaminas $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com cada um dos possíveis interferentes (EDTA, cloreto de sódio, lactose, sacarose, citrato) em concentrações de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Nenhuma

das substâncias investigadas causou interferências maiores que 5,0 % na determinação das catecolaminas.

Nos testes de adição e recuperação dos analitos, duas concentrações diferentes de catecolamina foram adicionadas a três amostras de formulações farmacêuticas e os resultados comparados com aqueles obtidos apenas com a solução padrão, nas TABELAS 5.13 e 5.14. As medidas foram realizadas em 472 nm com $n = 3$.

TABELA 5.13. Teste de adição e recuperação de Adrenalina nas amostras analisadas ($n = 3$)

Amostras	Adrenalina / 10^{-4} mol L $^{-1}$		Recuperação (%)
	Adicionado	Recuperado	
A1	1,0	1,0 ± 0,2	100,0
	2,5	2,4 ± 0,3	95,8
A2	1,0	1,1 ± 0,2	110,0
	2,5	2,6 ± 0,2	103,8
A3	1,0	0,9 ± 0,1	90,0
	2,5	2,5 ± 0,2	100,0

TABELA 5.14. Teste de adição e recuperação de Dopamina nas amostras analisadas ($n = 3$)

Amostras	Dopamina / 10^{-4} mol L $^{-1}$		Recuperação (%)
	Adicionado	Recuperado	
A1	1,0	1,1 ± 0,4	110,0
	2,5	2,4 ± 0,6	95,8
A2	1,0	0,9 ± 0,3	90,0
	2,5	2,4 ± 0,2	95,8
A3	1,0	1,0 ± 0,1	100,0
	2,5	2,6 ± 0,2	103,8

Os valores percentuais de recuperação variaram entre 90,0 e 110 % para ambos os analitos, valores estes dentro do recomendado pelas normas estabelecidas pela Farmacopéia Brasileira, sugerindo ausência de interferência em potencial na determinação das catecolaminas nessas amostras, empregando o procedimento proposto.

5.4.2. Estudo da repetibilidade dos sinais analíticos e frequência de amostragem

Estudou-se a repetibilidade do procedimento desenvolvido empregando o microsistema desenvolvido nas concentrações de $5,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para ambos analitos, adrenalina e dopamina, obtendo-se desvios padrão relativos menores que 1,8% e frequência de 80 determinações por hora.

5.4.3. Parâmetros de desempenho

A TABELA 5.15 apresenta alguns parâmetros de desempenho do analisador proposto para a determinação das catecolaminas (ADN e DPN) utilizando o microsistema analítico, reator em fase sólida e o minifotômetro.

TABELA 5.15. Parâmetros de desempenho para a determinação das catecolaminas (ADN e DPN) utilizando o sistema proposto

Analitos	Faixa dinâmica (mol L ⁻¹)	Eq. da curva analítica	LOD* (mol L ⁻¹)	LOQ** (mol L ⁻¹)
ADN	$3,0 \times 10^{-5}$ - $1,0 \times 10^{-3}$	$A=245,8xC+3,9 \times 10^{-5}$	$6,2 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-5}$
DPN	$5,0 \times 10^{-5}$ - $3,0 \times 10^{-3}$	$A=100,7xC+7,7 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-5}$	$4,9 \times 10^{-5}$

*LOD = limite de detecção

**LOQ = limite de quantificação

5.4.4. Aplicações

O método proposto foi aplicado na determinação de adrenalina e dopamina em formulações farmacêuticas e os resultados obtidos foram comparados com ao método de referência, espectrofotométrico recomendado pelas farmacopéias brasileira e americana para ADN e DPN respectivamente. As TABELAS 5.16 e 5.17 mostram os valores rotulados nos fármacos, referência e pelo procedimento proposto.

TABELA 5.16. Determinação de tartarato de adrenalina em formulações farmacêuticas comerciais pelo método proposto e pelo método da farmacopéia brasileira⁸⁴, nível de confiança de 95%, ($n = 3$)

Amostras	Adrenalina		Erro relativo/%
	Método Oficial	Procedimento Proposto	Er ₁
A	1,80 ± 0,06	1,83 ± 0,04	1,7
B	1,82 ± 0,03	1,84 ± 0,03	2,2
C	1,81 ± 0,01	1,77 ± 0,04	-2,2

Er₁ = erro relativo entre o procedimento proposto e o método oficial
* mg mL⁻¹.

TABELA 5.17. Determinação de cloridrato de dopamina em formulações farmacêuticas comerciais pelo método proposto e pelo método da farmacopéia americana⁹⁸, nível de confiança de 95%, ($n = 3$)

Amostras	Dopamina		Erro relativo/%
	Método Oficial	Procedimento Proposto	Er ₁
A	4,8 ± 0,9	5,1 ± 0,6	6,3
B	5,1 ± 0,4	4,9 ± 0,5	2,0
C	5,0 ± 0,3	5,0 ± 0,8	0,0

Er₁ = erro relativo entre o procedimento proposto e o método oficial
* mg mL⁻¹

O teste-*t* pareado foi aplicado para comparar o método proposto com os de referência e não foram observadas diferenças significativas entre os resultados a um nível de confiança de 95%.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

6. Considerações Finais

Neste trabalho foi desenvolvido um minifotômetro a base de LED-RGB e fotodiodo acoplado a um microssistema de análises utilizando cerâmicas verdes (LTCC) e utilizando procedimentos analíticos envolvendo reator em fase sólida aplicados a determinação de analitos de interesse farmacêutico.

A utilização de LED-RGB e fotodiodo substituiu satisfatoriamente o uso de espectrofotômetros comerciais, diminuindo os custos e tornando assim possível a implementação em laboratórios comerciais para análises de rotina, além da possibilidade de miniaturização para desenvolvimento de instrumentação portátil.

A utilização do minifotômetro proposto acoplado ao microssistema analítico LTCC mostrou-se uma alternativa viável na miniaturização de sistemas analíticos.

O uso de reator em fase sólida acoplados aos métodos automatizados e o microssistema analítico LTCC aqui apresentados mostraram-se capazes de minimizar o consumo de reagentes, gerando assim menor quantidade de resíduos/efluentes e favorecendo assim a química verde.

Os procedimentos desenvolvidos neste trabalho apresentaram boa frequência de amostragem e a possibilidade de portabilidade. Para isto, basta substituir a bomba peristáltica e o microcomputador por microbombas e microcontroladores, respectivamente. Todos os procedimentos aqui descritos apresentaram resultados concordantes e satisfatórios quando comparados com os métodos de referência descritos na literatura.

Pelo exposto nesse trabalho, pode-se concluir que os sistemas analíticos junto com o minifotômetro, reator em fase sólida e microssistema analítico (LTCC) apresentaram uma elevada versatilidade e robustez, podendo ser aplicado a outras determinações sem grandes mudanças em sua configuração física, além da possibilidade de aplicação utilizando outras técnicas de detecção. Assim, a

metodologia e os sistemas desenvolvidos são alternativas viáveis e econômicas para a determinação de analitos de interesse farmacêutico, com a possibilidade de ser aplicado a outros tipos de amostras.

CAPÍTULO VII

ATIVIDADES FUTURAS

7. Atividades Futuras

Algumas idéias foram surgindo durante a execução desse trabalho de doutorado.

No início das atividades ainda não tínhamos a experiência em trabalhar com microssistemas de analíticos (LTCC). Por isso, optamos iniciar utilizando uma configuração simples de analisador por injeção em fluxo (FIA) com injetor comutador. Terminado esse experimento resolvemos substituir o injetor comutador por válvulas solenóides de três vias tornando-o assim o analisador mais automático. Por isso, como proposta futura pretende-se substituir as válvulas solenóides por microbombas e o computador por microcontroladores PIC tornando-os mais robusto e versátil podendo assim fazer análises *in-locu* e *in situ*.

Pretende-se também implementar pastas resistoras ao LTCC que permitirá trabalhar com reações que necessitem ser catalisadas por aquecimento. Outra possibilidade é de acoplar ao LTCC eletrodos para que se possa realizar medidas eletroquímicas.

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO VIII

8. Referências bibliográficas

1. *Portal da Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. 2010: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/posuso/fiscalizacao>.
2. RUZICKA, J. & HANSEN, E.H., *Flow injection analysis*. 2 ed. 1988, New York.
3. VANDERLINDEN, W.E., "Classification and Definition of Analytical Methods Based on Flowing Media - (Iupac Recommendations 1994)". *Pure Appl Chem*. **66**(12): 2493, 1994.
4. SKEGGS, L.T., "An Automatic Method for Colorimetric Analysis". *Am J Clin Pathol*. **28**(3): 311, 1957.
5. ZAGATTO, E.A.G.; VAN STADEN, J.F.; MANIASSO, N.; STEFAN, R.I. & MARSHALL, G.D., "Information essential for characterizing a flow-based analytical system - (IUPAC technical report)". *Pure Appl Chem*. **74**(4): 585, 2002.
6. PASQUINI, C. & DEOLIVEIRA, W.A., "Monosegmented System for Continuous-Flow Analysis - Spectrophotometric Determination of Chromium(VI), Ammonia, and Phosphorus". *Anal Chem*. **57**(13): 2575, 1985.
7. DE AQUINO, E.V.; ROHWEDDER, J.J.R.; FACCHIN, I. & PASQUINI, C., "Effect of ethanol in the organic phase on liquid-liquid extraction in monosegmented flow analysis. Determination of zinc in drugs". *Talanta*. **56**(4): 643, 2002.
8. DASILVA, M.D.H. & PASQUINI, C., "Determination of gaseous species by monosegmented flow systems. Volumetric determination of oxygen and carbon dioxide". *Anal Chim Acta*. **349**(1-3): 377, 1997.
9. DA SILVA, M.D.H.; ROHWEDDER, J.J.R. & PASQUINI, C., "Determination of CO₂ in gaseous samples using a monosegmented flow system and conductimetric detection". *Anal Chim Acta*. **366**(1-3): 223, 1998.
10. ARAUJO, A.N.; CATITA, J.A.M.; LIMA, J.L.F.C. & ZAGATTO, E.A.G., "Monosegmented flow analysis of slow enzymatic reactions: Determination of triglycerides in serum". *Fresen J Anal Chem*. **360**(1): 100, 1998.

11. RAIMUNDO, I.M. & PASQUINI, C., "Automated monosegmented flow analyser. Determination of glucose, creatinine and urea". *Analyst*. **122**(10): 1039, 1997.
12. SILVA, M.S.P.; GALHARDO, C.X. & MASINI, J.C., "Application of sequential injection-mono segmented flow analysis (SI-MSFA) to spectrophotometric determination of sulfide in simulated waters-samples". *Talanta*. **60**(1): 45, 2003.
13. AQUINO, E.V.D.; ROHWEDDER, J.J.R. & PASQUINI, C., "Monosegmented flow titrator". *Anal Chim Acta*. **438**: 67, 2001.
14. VIEIRA, J.A.; RAIMUNDO, I.M.; REIS, B.F.; MONTENEGRO, M.C.B.S.M. & ARAUJO, N.N., "Monosegmented flow potentiometric titration for the determination of chloride in milk and wine". *J Brazil Chem Soc*. **14**(2): 259, 2003.
15. MARTELLI, P.B.; REIS, B.F.; KORN, M. & LIMA, J.L.F.C., "Automatic potentiometric titration in monosegmented flow system exploiting binary search". *Anal Chim Acta*. **387**(2): 165, 1999.
16. VALCARCEL, M. & CASTRO, M.D.L., *Flow-injection Analysis - Principles and Applications*, Chichester. 1987.
17. ZAGATTO, E.A.G.; JACINTHO, A.O.; KRUG, F.J.; REIS, B.F.; BRUNS, R.E. & ARAUJO, M.C.U., "Flow-Injection Systems with Inductively-Coupled Argon Plasma Atomic Emission-Spectrometry .2. The Generalized Standard Addition Method". *Anal Chim Acta*. **145**(Jan): 169, 1983.
18. ARAUJO, M.C.U.; PASQUINI, C.; BRUNS, R.E. & ZAGATTO, E.A.G., "A Fast Procedure for Standard Additions in Flow-Injection Analysis". *Anal Chim Acta*. **171**(May): 337, 1985.
19. SILVA, E.C.; MARTINS, V.L.; ARAUJO, A.F. & ARAUJO, M.C.U., "Implementation of a generalized standard addition method in a flow injection system using merging-zones and gradient exploitation". *Anal Sci*. **15**(12): 1235, 1999.
20. SILVA, E.C.; ARAUJO, M.C.U.; HONORATO, R.S.; LIMA, J.L.F.C.; ZAGATTO, E.A.G. & BRIENZA, S.M.B., "Standard additions in flow injection analysis based on merging zones and gradient exploitation: Application to copper determination in spirits". *Anal Chim Acta*. **319**(1-2): 153, 1996.
21. ARAUJO, M.C.U.; SANTOS, A.V. & HONORATO, R.S., "Single standard calibration and data processing in flow injection titration based on concentration gradients". *J Autom Chem*. **19**(5): 157, 1997.
22. GAIAO, E.N.; HONORATO, R.S.; SANTOS, S.R.B. & ARAUJO, M.C.U., "An automated flow-injection titrator for spectrophotometric determinations of total acidity

in wines, using a single standard solution and gradient calibration". *Analyst*. **124**(11): 1727, 1999.

23. BERGAMIN, H.; MEDEIROS, J.X.; REIS, B.F. & ZAGATTO, E.A.G., "Solvent-Extraction in Continuous-Flow Injection Analysis - Determination of Molybdenum in Plant Material". *Anal Chim Acta*. **101**(1): 9, 1978.

24. ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F.; MARTINELLI, M.; KRUG, F.J.; BERGAMIN, H. & GINE, M.F., "Confluent Streams in Flow-Injection Analysis". *Anal Chim Acta*. **198**: 153, 1987.

25. BERGAMIN, H.; ZAGATTO, E.A.G.; KRUG, F.J. & REIS, B.F., "Merging Zones in Flow Injection Analysis .1. Double Proportional Injector and Reagent Consumption". *Anal Chim Acta*. **101**(1): 17, 1978.

26. BERGAMIN, H.; REIS, B.F. & ZAGATTO, E.A.G., "New Device for Improving Sensitivity and Stabilization in Flow-Injection Analysis". *Anal Chim Acta*. **97**(2): 427, 1978.

27. ZAGATTO, E.A.G.; JACINTHO, A.O.; MORTATTI, J. & BERGAMIN, H., "An Improved Flow-Injection Determination of Nitrite in Waters by Using Intermittent Flows". *Anal Chim Acta*. **120**(Nov): 399, 1980.

28. REIS, B.F.; JACINTHO, A.O.; MORTATTI, J.; KRUG, F.J.; ZAGATTO, E.A.G.; BERGAMIN, H. & PESSEDA, L.C.R., "Zone-Sampling Processes in Flow-Injection Analysis". *Anal Chim Acta*. **123**(Jan): 221, 1981.

29. KRUG, F.J.; REIS, B.F.; GINE, M.F.; ZAGATTO, E.A.G.; FERREIRA, J.R. & JACINTHO, A.O., "Zone Trapping in Flow-Injection Analysis - Spectrophotometric Determination of Low-Levels of Ammonium Ion in Natural-Waters". *Anal Chim Acta*. **151**(1): 39, 1983.

30. ZAGATTO, E.A.G.; BERGAMIN, H.; BRIENZA, S.M.B.; ARRUDA, M.A.Z.; NOGUEIRA, A.R.A. & LIMA, J.L.F.C., "Multisite Detection in Flow-Analysis .1. Relocation of Spectrophotometric Detector". *Anal Chim Acta*. **261**(1-2): 59, 1992.

31. SANTOS, S.R.B.; ARAUJO, M.C.U.; HONORATO, R.S.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.F.C. & LAPA, R.A.S., "An improved leaping detector for flow analysis applied to iron speciation in drugs". *J Autom Method Manag*. **22**(3): 83, 2000.

32. RUZICKA, J. & MARSHALL, G.D., "Sequential Injection - a New Concept for Chemical Sensors, Process Analysis and Laboratory Assays". *Anal Chim Acta*. **237**(2): 329, 1990.

33. LENEHAN, C.E.; BARNETT, N.W. & LEWIS, S.W., "Sequential injection analysis". *Analyst*. **127**(8): 997, 2002.

34. REIS, B.F.; GINE, M.F.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C. & LAPA, R.A., "Multicommutation in Flow-Analysis .1. Binary Sampling - Concepts, Instrumentation and Spectrophotometric Determination of Iron in Plant Digests". *Anal Chim Acta*. **293**(1-2): 129, 1994.
35. ROCHA, F.R.P.; REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C.; LAPA, R.A.S. & SANTOS, J.L.M., "Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends". *Anal Chim Acta*. **468**(1): 119, 2002.
36. ICARDO, M.C.; MATEO, J.V.G. & CALATAYUD, J.M., "Multicommutation as a powerful new analytical tool". *Trac-Trend Anal Chem*. **21**(5): 366, 2002.
37. HONORATO, R.S.; ARAUJO, M.C.U.; LIMA, R.A.C.; ZAGATTO, E.A.G.; LAPA, R.A.S. & LIMA, J.L.F.C., "A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search". *Anal Chim Acta*. **396**(1): 91, 1999.
38. BONIFACIO, V.G.; SALAMI, F.H.; MARCOLINO, L.H. & FATIBELLO, O., "Use of Barium Chloranilate Solid-Phase Reactor for the Determination of Sulfate in Natural Water Samples Exploiting Long Pathlength Spectrophotometry and Multicommutation". *Anal Lett*. **44**(1-3): 298, 2011.
39. CALATAYUD, J.M. & GARCIA, J.V., "Online Solid-Phase Reactors for Unsegmented Continuous-Flow Drug Analysis". *Trac-Trend Anal Chem*. **12**(10): 428, 1993.
40. DECASTRO, M.D.L., "Solid-Phase Reactors in Flow-Injection Analysis". *Trac-Trend Anal Chem*. **11**(4): 149, 1992.
41. VIEIRA, H.J., Determinação de catecolaminas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com reator em fase sólida acoplado. São Carlos, 2002. Dissertação de mestrado, 114 p.
42. ZAMORA, L.L.; MATEO, J.V.G. & CALATAYUD, J.M., "Entrapment of Reagents in Polymeric Materials - Indirect Atomic-Absorption Spectrometric Determination of Isoniazid by Oxidation with Manganese-Dioxide Incorporated in Polyester Resin Beads in a Flow-Injection System". *Anal Chim Acta*. **265**(1): 81, 1992.
43. RIVAS, G.A. & CALATAYUD, J.M., "Fia-Aas Determination of Salicylic-Acid by a Solid-Phase Reactor of Copper Carbonate Incorporated in Polyester Resin Beads". *Talanta*. **42**(9): 1285, 1995.
44. PEREIRA, A.V. & FATIBELLO-FILHO, O., "Flow injection spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in pharmaceutical formulations with on-line solid-phase reactor containing copper (II) phosphate". *Anal Chim Acta*. **366**(1-3): 55, 1998.

45. IBANEZ-GARCIA, N.; BAEZA, M.; PUYOL, M.; GOMEZ, R.; BATLLE, M. & ALONSO-CHAMARRO, J., "Biparametric Potentiometric Analytical Microsystem Based on the Green Tape Technology". *Electroanal.* **22**(20): 2376, 2010.
46. IBANEZ-GARCIA, N.; MERCADER, M.B.; DA ROCHA, Z.M.; SEABRA, C.A.; GONGORA-RUBIO, M.R. & CHAMARRO, J.A., "Continuous flow analytical microsystems based on low-temperature co-fired ceramic technology. Integrated potentiometric detection based on solvent polymeric ion-selective electrodes". *Anal Chem.* **78**(9): 2985, 2006.
47. BAEZA, M.; LOPEZ, C.; ALONSO, J.; LOPEZ-SANTIN, J. & ALVARO, G., "Ceramic Microsystem Incorporating a Microreactor with Immobilized Biocatalyst for Enzymatic Spectrophotometric Assays". *Anal Chem.* **82**(3): 1006, 2010.
48. SUAREZ, W.T.; PESSOA-NETO, O.D.; DOS SANTOS, V.B.; NOGUEIRA, A.R.D.; FARIA, R.C.; FATIBELLO, O.; PUYOL, M. & ALONSO, J., "A compact miniaturized continuous flow system for the determination of urea content in milk". *Anal Bioanal Chem.* **398**(3): 1525, 2010.
49. GONGORA-RUBIO, M.R.; FONTES, M.B.A.; DA ROCHA, Z.M.; RICHTER, E.M. & ANGNES, L., "LTCC manifold for heavy metal detection system in biomedical and environmental fluids". *Sensor Actuat B-Chem.* **103**(1-2): 468, 2004.
50. SHAFIQUE, M.F.; SAEED, K.; STEENSON, D.P. & ROBERTSON, I.D., "Laser Prototyping of Microwave Circuits in LTCC Technology". *Ieee T Microw Theory.* **57**(12): 3254, 2009.
51. TERRY, S.C.; JERMAN, J.H. & ANGELL, J.B., "Gas-Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon-Wafer". *Ieee T Electron Dev.* **26**(12): 1880, 1979.
52. COLTRO, W.K.T.; PICCIN, E.; CARRILHO, E.; DE JESUS, D.P.; FRACASSI DA SILVA, J.A.; TORRES DA SILVA, H.D. & DO LAGO, C.L., "Micro chemical analysis systems. Introduction, fabrication technologies, instrumentation and applications". *Quim Nova.* **30**(8): 1986, 2007.
53. MANZ, A.; GRABER, N. & WIDMER, H.M., "Miniaturized Total Chemical-Analysis Systems - a Novel Concept for Chemical Sensing". *Sensor Actuat B-Chem.* **1**(1-6): 244, 1990.
54. MANZ, A.; MIYAHARA, Y.; MIURA, J.; WATANABE, Y.; MIYAGI, H. & SATO, K., "Design of an Open-Tubular Column Liquid Chromatograph Using Silicon Chip Technology". *Sensor Actuat B-Chem.* **1**(1-6): 249, 1990.
55. WOOLLEY, A.T.; LAO, K.Q.; GLAZER, A.N. & MATHIES, R.A., "Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection". *Anal Chem.* **70**(4): 684, 1998.

56. *Lab-on-a-chip: The Revolution in portable instrumentation*. 1999, Frost & Sullivan: New York.
57. CHEN, Y. & PEPIN, A., "Nanofabrication: Conventional and nonconventional methods". *Electrophoresis*. **22**(2): 187, 2001.
58. REYES, D.R.; IOSSIFIDIS, D.; AUROUX, P.A. & MANZ, A., "Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology". *Anal Chem*. **74**(12): 2623, 2002.
59. *Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS*. 2008.
60. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J. & NIEMAN, T.A., *Princípios de análises instrumental*. 2006, São Paulo.
61. MANDEL, L. & WOLF, E., *Optical coherence and quantum optics*. 1995, New York: Cambridge University Press.
62. DA SILVA, J.A.F.; DEBLIRE, A.; DE JESUS, D.P. & COLTRO, W.K.T., "Visible LED-Based Instrumentation for Photometric Determination of Electroosmotic Flow in Microchannels". *J Brazil Chem Soc*. **22**(4): 736, 2011.
63. SOUZA, M.C.; MARTINS, V.L.; ALMEIDA, L.F.; NETO, O.D.P.; GAIAO, E.N. & ARAUJO, M.C.U., "Kinetics independent spectrometric analysis using non-linear calibration modelling and exploitation of concentration gradients generated by a flow-batch system for albumin and total protein determination in blood serum". *Talanta*. **82**(3): 1027, 2010.
64. FERNANDES, R.N.; REIS, B.F.; MORALES-RUBIO, A. & DE LA GUARDIA, M., "Multi-Pumping Mechanised Determination of Selenium in Natural Waters by Light Emitting Diode (LED) Spectrometry". *J Brazil Chem Soc*. **20**(7): 1242, 2009.
65. GAIAO, E.D.; DOS SANTOS, S.R.B.; DOS SANTOS, V.B.; DO NASCIMENTO, E.C.L.; LIMA, R.S. & DE ARAUJO, M.C.U., "An inexpensive, portable and microcontrolled near infrared LED-photometer for screening analysis of gasoline". *Talanta*. **75**(3): 792, 2008.
66. O'TOOLE, M.; LAU, K.T.; SHEPHERD, R.; SLATER, C. & DIAMOND, D., "Determination of phosphate using a highly sensitive paired emitter-detector diode photometric flow detector". *Anal Chim Acta*. **597**(2): 290, 2007.
67. GARCIA, A.J.C. & REIS, B.F., "Instrumentation and automated photometric titration procedure for total acidity determination in red wine employing a multicommutated flow system". *J Autom Method Manag*, 2006.

68. GAIAO, E.D.; DE MEDEIROS, E.P.; LYRA, W.D.; MOREIRA, P.N.T.; DE VASCONCELOS, P.C.; DA SILVA, E.C. & DE ARAUJO, M.C.U., "A multi-led, microcontrolled, portable and inexpensive photometer". *Quim Nova*. **28**(6): 1102, 2005.
69. RAOOF, J.B.; OJANI, R.; AMIRI-AREF, M. & CHEKIN, F., "Catechol as an electrochemical indicator for voltammetric determination of N-acetyl-L-cysteine in aqueous media at the surface of carbon paste electrode". *J Appl Electrochem*. **40**(7): 1357, 2010.
70. VIEIRA, H.J. & FATIBELLO-FILHO, O., "Indirect flow injection determination of N-acetyl-L-cysteine using cerium(IV) and ferroin.". *Quim Nova*. **28**(5): 797, 2005.
71. KOLAR, M. & DOBCNIK, D., "Chemically prepared silver electrode for determination of N-acetyl-L-cysteine by flow-injection potentiometry". *Pharmazie*. **58**(1): 25, 2003.
72. GUZELOGLU, S.; YALCIN, G. & PEKIN, M., "The determination of stability constants of N-acetyl-L-cysteine chrome, nickel, cobalt and iron complexes by potentiometric method". *J Organomet Chem*. **568**(1-2): 143, 1998.
73. MARTINOVIC, A.; KUKOC-MODUN, L. & RADIC, N., "Kinetic spectrophotometric determination of thiols and ascorbic acid". *Anal Lett*. **40**(4): 805, 2007.
74. JANEGITZ, B.C.; SUAREZ, W.T.; FATIBELLO-FILHO, O. & MARCOLINO-JUNIOR, L.H., "Conductometric Determination of N-acetylcysteine in Pharmaceutical Formulations Using Copper(II) Sulphate as Titrant". *Anal Lett*. **41**(18): 3264, 2008.
75. RAOOF, J.B.; OJANI, R.; CHEKIN, F.; JAHANSHAHI, M. & RASHID-NADIMI, S., "Fabrication of Nanocomposite Containing Naphthoquinone and Nanogold Supported on Poly(2,6-pyridinedicarboxylic acid) Film for Voltammetric Determination of N-Acetyl-L-Cysteine". *Electroanal*. **21**(24): 2674, 2009.
76. SHAHROKHIAN, S.; KAMALZADEH, Z.; BEZZAATPOUR, A. & BOGHAEI, D.M., "Differential pulse voltammetric determination of N-acetylcysteine by the electrocatalytic oxidation at the surface of carbon nanotube-paste electrode modified with cobalt salophen complexes". *Sensor Actuat B-Chem*. **133**(2): 599, 2008.
77. SUAREZ, W.T.; VIEIRA, H.J. & FATIBELLO-FILHO, O., "Flow injection turbidimetric determination of acetylcysteine in pharmaceutical formulations using silver nitrate as precipitant reagent". *J Brazil Chem Soc*. **18**(5): 1028, 2007.
78. FREITAS, S.K.B.; DA SILVA, V.L.; ARAUJO, A.N.; MONTENEGRO, M.C.B.S.M.; REIS, B.F. & PAIM, A.P.S., "A Multicommutated Flow Analysis Method for the Photometric Determination of Amoxicillin in Pharmaceutical Formulations using a Diazo Coupling Reaction". *J Brazil Chem Soc*. **22**(2): 279, 2011.

79. BULATOV, A.V.; STRASHNOVA, U.M.; VISHNIKIN, A.B.; ALEKSEEVA, G.M.; SINEVA, T.D.; MOSKVIN, A.L. & MOSKVIN, L.N., "Stepwise injection photometric determination of ascorbic acid in drugs". *J Anal Chem+*. **66**(3): 275, 2011.
80. FORNAZARI, A.L.D.T.; SUAREZ, W.T.; VIEIRA, H.J. & FATIBELLO, O., "Flow injection spectrophotometric system for N-acetyl-L-cysteine determination in pharmaceuticals". *Acta Chim Slov.* **52**(2): 164, 2005.
81. NAKAMURA, H. & TAMURA, Z., "Fluorometric-Determination of Thiols by Liquid-Chromatography with Postcolumn Derivatization". *Anal Chem.* **53**(14): 2190, 1981.
82. CHAGAS, M.P.; SANTOS, J.C.C.; SANTOS, E.B.G.N.; OLIVEIRA, T.D. & KORN, M., "Exploiting Iminoquinone Free Radical Production for Thiol Based Drugs Determination in Pharmaceutical Formulations". *J Brazil Chem Soc.* **20**(9): 1646, 2009.
83. *United States Pharmacopeia National Formulary XXI, United Pharmacopeial Convention.* 1985: Rockville, MD.
84. *Farmacopéia Brasileira.* 1997, São Paulo: Organizações Andrei S. A. 71.
85. TZANAVARAS, P.D.; TSIOMLEKTSIS, A. & ZACHARIS, C.K., "Derivatization of thiols under flow conditions using two commercially available propiolate esters". *J Pharmaceut Biomed.* **53**(3): 790, 2010.
86. TZANAVARAS, P.D.; THEMELIS, D.G.; ECONOMOU, A. & THEODORIDIS, G., "Reversed flow-injection manifold for the spectrophotometric determination of captopril based on its inhibitory effect on the Co(II)-2,2'-dipyridyl-2-pyridylhydrazone complex formation". *Talanta.* **57**(3): 575, 2002.
87. SUAREZ, W.T.; BONIFACIO, V.G.; MADI, A.A. & FATIBELLO, O., "Flow-Injection Spectrophotometric Determination of Captopril Exploiting Silver Chloranilate Solid-Phase Reactor". *Anal Lett.* **42**(7): 973, 2009.
88. KARLICEK, R. & SOLICH, P., "Flow-injection spectrophotometric determination of captopril using on-line solid phase extraction". *Pharmazie.* **53**(8): 549, 1998.
89. JOVANOVIĆ, T.; STANOVIĆ, B. & KORICANAC, Z., "Spectrophotometric Investigation on Complex-Formation of Captopril with Palladium(II) and Its Analytical Application". *J Pharmaceut Biomed.* **13**(3): 213, 1995.
90. ECONOMOU, A.; THEMELIS, D.G.; THEODORIDIS, G. & TZANAVARAS, P.D., "Sensitive determination of captopril by flow injection analysis with chemiluminescence detection based on the enhancement of the luminol reaction". *Anal Chim Acta.* **463**(2): 249, 2002.

91. XINRONG, Z.; BAEYENS, W.R.G.; VANDERWEKEN, G.; CALOKERINOS, A.C. & NAKASHIMA, K., "Chemiluminescence Analysis of Captopril - Comparison between Luminol and Rhodamine B-Sensitized Cerium(IV) Methods". *J Pharmaceut Biomed.* **13**(4-5): 425, 1995.
92. MARCOLINO-JUNIOR, L.H.; BONIFÁCIO, V.G.; VICENTINI, F.C.; JANEGITZ, B.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Amperometric determination of captopril using a carbon paste electrode in flow analysis". *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy.* **54**(1): 45, 2009.
93. MIRZA, T. & TAN, H.S.I., "Determination of captopril in pharmaceutical tablets by anion-exchange HPLC using indirect photometric detection; a study in systematic method development". *J Pharmaceut Biomed.* **25**(1): 39, 2001.
94. RIZK, M.; BELAL, F. & EID, M., "Conductometric determination of some pharmaceutically important thiol compounds in dosage forms". *Acta Pharm Hung.* **63**(6): 313, 1993.
95. SANCHEZ, M.A.; ROCHA, D.L.; MELCHERT, W.R. & ROCHA, F.R.P., "A Multicommutated Flow System for Dissolution Studies of Captopril in Pharmaceutical Preparations". *J Brazil Chem Soc.* **22**(5): 813, 2011.
96. SCHMIDT, E.; MELCHERT, W.R. & ROCHA, F.R.P., "Flow-Injection Iodimetric Determination of Captopril in Pharmaceutical Preparations". *J Brazil Chem Soc.* **20**(2): 236, 2009.
97. TZANAVARAS, P.D.; THEMELIS, D.G.; ECONOMOU, A. & THEODORIDIS, G., "Flow and sequential injection manifolds for the spectrophotometric determination of captopril based on its oxidation by Fe(III)". *Microchim Acta.* **142**(1-2): 55, 2003.
98. *USP, The United States pharmacopeia.* 24 ed. 2000: Rockville.
99. PAIM, A.P.S.; KRONKA, E.A.M.; REIS, B.F. & KORN, M., "Spectrophotometric determination of ascorbic acid in drugs employing binary sampling in flow system.". *Quim Nova.* **21**(1): 47, 1998.
100. PEREIRA, A.V. & FATIBELLO, O., "Flow injection spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in pharmaceutical formulations with on-line solid-phase reactor containing copper (II) phosphate". *Anal Chim Acta.* **366**(1-3): 55, 1998.
101. MONAKHOVA, Y.B.; MUSHTAKOVA, S.P. & KOLESNIKOVA, S.S., "Determination of vitamins in mixtures of various composition by spectrophotometry with self-modeling curve resolution". *J Anal Chem+.* **65**(6): 588, 2010.
102. CHEN, H.I.; LI, R.B.; LIN, L.; GUO, G.S. & LIN, J.M., "Determination of L-ascorbic acid in human serum by chemiluminescence based on hydrogen peroxide-

sodium hydrogen carbonate-CdSe/CdS quantum dots system". *Talanta*. **81**(4-5): 1688, 2010.

103. CORONA-AVENDANO, S.; ALARCON-ANGELES, G.; ROJAS-HERNANDEZ, A.; ROMERO-ROMO, M.A. & RAMIREZ-SILVA, M.T., "Study on the stability of adrenaline and on the determination of its acidity constants". *Spectrochim Acta A*. **61**(1-2): 305, 2005.

104. NEVADO, J.J.B.; GALLEGO, J.M.L. & LAGUNA, P.B., "Flow-injection spectrophotometric determination of adrenaline and dopamine with sodium hydroxide". *J Pharmaceut Biomed*. **14**(5): 571, 1996.

105. TEIXEIRA, M.F.S.; MARCOLINO-JUNIOR, L.H. & FATIBELLO, O., "Flow injection spectrophotometric determination of adrenaline in pharmaceutical formulations using a solid-phase reactor containing lead(IV) dioxide immobilized in a polyester resin". *Farmaco*. **57**(3): 215, 2002.

106. PALOP, S.G.; ROMERO, A.M. & CALATAYUD, J.M., "Oxidation of adrenaline and noradrenaline by solvated molecular oxygen in a FIA assembly". *J Pharmaceut Biomed*. **27**(6): 1017, 2002.

107. ABDULRAHMAN, L.K.; AL-ABACHI, A.M. & AL-QAISSY, M.H., "Flow injection-spectrophotometric determination of some catecholamine drugs in pharmaceutical preparations via oxidative coupling reaction with p-toluidine and sodium periodate". *Anal Chim Acta*. **538**(1-2): 331, 2005.

108. CHITRAVATHI, S.; SWAMY, B.E.K.; MAMATHA, G.P. & SHERIGARA, B.S., "Simultaneous electrochemical determination of dopamine and ascorbic acid using poly (L-serine) modified carbon paste electrode". *J Mol Liq*. **160**(3): 193, 2011.

109. XU, X.D.; SHI, H.M.; MA, L.; KANG, W. & LI, S., "Determination of trace amounts of dopamine by flow-injection analysis coupled with luminol-Ag(III) complex chemiluminescence detection". *Luminescence*. **26**(2): 93, 2011.

110. LUPETTI, K.O.; RAMOS, L.A. & FATIBELLO, O., "Enzymatic determination of dopamine in pharmaceutical formulations using a flow injection analysis system with avocado (*Persea americana*) crude extract". *Quim Nova*. **26**(2): 197, 2003.

111. NALEWAJKO, E.; RAMIREZ, R.B. & KOJLO, A., "Determination of dopamine by flow-injection analysis coupled with luminol-hexacyanoferrate(III) chemiluminescence detection". *J Pharmaceut Biomed*. **36**(1): 219, 2004.

112. MOGHADAM, M.R.; DADFARNIA, S.; SHABANI, A.M.H. & SHAHBAZIKHAH, P., "Chemometric-assisted kinetic-spectrophotometric method for simultaneous determination of ascorbic acid, uric acid, and dopamine". *Anal Biochem*. **410**(2): 289, 2011.

113. 115. *Datasheet sensor TSLB257, Texas Advanced Optoelectronic SolutionsTM, TAOS. 2007.*

114. WENG, C.C.; CHANG, C.F. & CHUNG, S.J., "Development of a Compact Low-Temperature Co-Fired Ceramic Antenna Front-End Module". *Ieee T Microw Theory*. **56**(11): 2483, 2008.

115. SUAREZ, W.T., Desenvolvimento de procedimentos em fluxo envolvendo reatores em fase sólida e microssistema analítico construído com LTCC (Low Temperature Co-fired Ceramics) para a determinação de analitos de interesse farmacêutico. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, 2009. Tese de doutorado, 140 p.

116. RIBEIRO, P.R.D.; SANTINI, A.O.; PEZZA, H.R. & PEZZA, L., "Potentiometric determination of captopril in pharmaceutical formulations". *Eclét Quim*. **28**(1): 39, 2003.