



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**METODOLOGIA CINÉTICA EM FLUXO NÃO INTERROMPIDO  
– DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA EM FÁRMACOS**

*Luiz de Castro Rodrigues Junior*

**Recife – PE – Brasil**

**Fevereiro/2004**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**METODOLOGIA CINÉTICA EM FLUXO NÃO INTERROMPIDO  
– DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA EM FÁRMACOS**

*Dissertação apresentada por Luiz de Castro Rodrigues Junior à pós-graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.*

*Área de concentração: Química Analítica.*

**Orientação: Ricardo Saldanha Honorato**  
**Maria Fernanda Pimentel**

Dedico este trabalho a todos que me incentivaram durante  
toda a minha vida acadêmica contribuindo a minha  
formação profissional e a meus pais  
Luiz de Castro Rodrigues (*in memorian*) e  
Rosete de Moraes Rodrigues.

***Sem fé, sem ciência e sem consciência, a vida não passa de  
Insupórtável vazio.***  
(José Martins Catharino)

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovada:

---

*Prof. Ricardo Saldanha Honorato*  
(Orientador)  
Departamento de Química Fundamental - UFPE

---

*Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Junior*  
Departamento de Química Analítica - UNICAMP

---

*Prof. Dr. Severino Alves Junior*  
Departamento de Química Fundamental – UFPE

**"Metodologia Cinética em Fluxo Não-Interrompido –  
Determinação de Dopamina em Fármacos"**

*por*

**Luiz de Castro Rodrigues Junior**

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Exatas e da Natureza  
Departamento de Química Fundamental  
Recife - PE - Brasil  
19 de Fevereiro de 2004

## **AGRADECIMENTOS**

---

A Deus, que me ilumina e me conduz a realizações de todos os meus sonhos.

Ao professor Dr. Ricardo Saldanha Honorato, pela confiança, paciência, orientação e incentivo ao longo da realização deste trabalho.

A professora Dra. Maria Fernanda Pimentel pela ajuda e orientação neste trabalho e em outros realizados durante o curso.

A professora Valdinete Lins pelas amostras de dopamina fornecidas.

Ao secretário da pós-graduação em química, Maurílio, por toda ajuda e atenção que me foi dada.

Aos professores da pós-graduação em química da UFPE, com os quais eu tive a oportunidade de estudar e cujos ensinamentos contribuíram para minha formação geral.

Aos amigos João Carlos, Maria José (Mary), Ladjane Pereira, Andréa Monteiro, Fábio André, Silvania Oliveira, Micheline, Everaldo, Cláudia Mirian, Ricardo Oliveira, Givanildo, Alexandra, Fernanda Araújo, pela alegria, amizade, e todo apoio em todos esses anos.

As professoras Maria do Carmo Alves, Ana Maria e Kátia Aquino pela amizade gerada durante a graduação e que continuou durante todo esse tempo.

A professora e amiga Ângela Andrade pelos bons momentos de conselhos e diálogos.

Ao amigo Edmilson Silva pela força, amizade e atenção compartilhada durante esses anos.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A Marlene, Vera Lúcia, Verônica Batista, Ana e Jânio Nascimento que me acolheram durante os momentos que precisei.

Aos meus irmãos Rosangela, Rose Mary, Ricardo, Rinaldo, Rosete Filha e Rose Any de Moraes Rodrigues, pela convivência em família durante todos esses anos.

Aos meus pais, Rosete de Moraes Rodrigues e Luiz de Castro Rodrigues (*in memoriam*) pela atenção, carinhos, afeto recebidos daqueles que são a razão da minha existência.

# SUMÁRIO

---

<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i> .....	VIII
<i>ÍNDICE DE TABELAS</i> .....	IX
<i>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</i> .....	XI
<i>RESUMO</i> .....	XII
<i>ABSTRACT</i> .....	XIII
<i>1 – INTRODUÇÃO</i> .....	01
<i>2 – OBJETIVOS</i> .....	04
<i>3 – BASE TEÓRICA</i> .....	05
3.1 – Análise em Fluxo.....	05
3.1.2 – Análise por Injeção em Fluxo.....	08
3.1.2.1 – Calibração de Gradientes de concentração em FIA.....	10
3.1.2.2 – Métodos Cinéticos em FIA.....	13
3.2 – Dopamina.....	16
3.2.1 – Método Recomendado pela Farmacopéia Americana.....	17
3.2.2 – Métodos em Análise em Fluxo para a Determinação de Dopamina .....	18
3.2.2.1 – Determinação Espectrofotométrica baseada na reação com metaperiodato.....	20

3.3 – Planejamento Fatorial.....	22
3.4 – Função Desejabilidade.....	23
<b>4 – EXPERIMENTAL.....</b>	<b>25</b>
4.1 – Reagentes, Soluções padrão e Amostras.....	25
4.2 – Equipamentos.....	26
4.2.1 – Sistema de Análise em Fluxo.....	27
4.2.2 – Fotômetro.....	28
4.3 – Programa de Controle.....	30
4.3.1 – Aquisição de dados.....	32
4.3.2 – Tratamento de dados.....	33
4.4 Procedimento Analítico.....	34
4.4.1 – Otmização.....	34
4.4.2 – Determinação de dopamina em fármacos.....	35
4.5 – Planejamento Experimental.....	36
4.6 – Função Desejabilidade.....	37
<b>5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b></b>
5.1 – Planejamento Experimental.....	39
5.2 – Análise dos efeitos.....	43
5.2.1 – Sensibilidade.....	43
5.2.2 – Desvio padrão Relativo.....	47
5.2.3 – Tempo de análise.....	47
5.2 – Otmização do sistema.....	48

5.3 – Análise de dopamina em fármacos.....	50
<b>6 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>7 – PROPOSTAS FUTURAS.....</b>	<b>54</b>
<b>8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>
<b>9- APÊNDICE.....</b>	<b>63</b>

## ***LISTA DE FIGURAS***

---

<b>1</b>	Ilustração do processo de amostragem em Análise por Injeção em Fluxo.....	09
<b>2</b>	(a) Perfil apresentado momentos após a introdução da amostra. (b) Perfil da amostra, após o processo de dispersão e difusão.....	09
<b>3</b>	Sinal transiente gerado em Análise por Injeção em Fluxo.....	10
<b>4</b>	Ilustração do procedimento para a obtenção de uma curva analítica através da metodologia de Diluição por Gradiente.....	11
<b>5</b>	Estrutura da dopamina.....	16
<b>6</b>	Oxidação da dopamina.....	21
<b>7</b>	Produtos formados pela oxidação da dopamina.....	21
<b>8</b>	Diagrama de fluxos.....	27
<b>9</b>	Diagrama de fluxos para a análise de dopamina em fármacos.....	28
<b>10</b>	Esquema básico do fotômetro.....	29
<b>11</b>	Diagrama do circuito eletrônico desenvolvido para o fotômetro.....	30
<b>12</b>	Fluxograma do programa de aquisição e tratamento de dados.....	31
<b>13</b>	Curva absorbância versus tempo para ( <b>a</b> ) solução de calibração, $K_2Cr_2O_7$ $8,4 \times 10^{-2}$ g. L <sup>-1</sup> e ( <b>b</b> ) produto da reação entre dopamina e o reagente metaperiodato de sódio.....	35
<b>14</b>	Curva Analítica para soluções padrão preparadas em água e para amostras de diferentes fabricantes.....	50
<b>15</b>	Registro obtido para a solução de dicromato de potássio, introduzida em instantes diferentes, através dos loops para a amostra e solução padrão, através da do sistema FIA apresentado na Figura 8.	51

## **LISTA DE TABELAS**

---

<b>1</b> Variáveis do sistema (fatores) e seus níveis para a otimização da metodologia proposta, aplicando um planejamento fatorial $2^4$ .....	37
<b>2</b> Valores de $R_{ideal}$ , $R_{min}$ , $R_{max}$ e dos expoentes para as diferentes respostas, utilizadas na Função Desejabilidade.....	38
<b>3</b> Respostas para um planejamento fatorial completo $2^4$ com três repetições autênticas no ponto central.....	41
<b>4</b> Efeitos principais e de interação (segunda e terceira ordem) para o planejamento fatorial $2^4$ .....	42
<b>5</b> Avaliação do efeito da vazão (F) na sensibilidade.....	43
<b>6</b> Avaliação do efeito do loop ( $V_{am}$ ) na sensibilidade.....	44
<b>7</b> Avaliação do efeito da concentração (C) na sensibilidade.....	45
<b>8</b> Avaliação do efeito reator ( $R_e$ ) na sensibilidade.....	46
<b>9</b> Avaliação do efeito da concentração de metaperiodato (C) no tempo de análise.....	48
<b>10</b> Desejabilidades individuais encontradas para cada resposta no planejamento fatorial e seu respectivo valor para a função de desejabilidade.....	49
<b>11</b> Resultados, em $\text{g L}^{-1}$ comparativos da concentração de dopamina em soluções injetáveis para a metodologia proposta e para a recomendada pela farmacopéia dos Estados Unidos da América.....	52
<b>12</b> Avaliação do efeito da vazão no desvio padrão.....	63
<b>13</b> Avaliação do efeito do “Loop” no desvio padrão.....	63

<b>14 Avaliação do efeito da Concentração de metaperiodato de sódio no desvio padrão.....</b>	<b>64</b>
<b>15 Avaliação do efeito do Reator no desvio padrão.....</b>	<b>64</b>

## ***LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS***

---

<b>HPLC</b> .....	Cromatografia líquida de alta eficiência.
<b>FIA</b> .....	Análise por Injeção em Fluxo.
<b>SIA</b> .....	Análise por Injeção Sequencial.
<b>MSFA</b> .....	Análise em Fluxo Monossegmentado.
<b>EDTA</b> .....	Etilenodiaminotetracético .
<b>D</b> .....	Função deseabilidade.
<b>d</b> .....	Deseabilidade individual .
<b>LED</b> .....	Diodo emissor de luz.
<b>ΔA</b> .....	Variação de absorbância.
<b>t</b> .....	Tempo.
<b>A</b> .....	Absorbância
<b>LQ</b> .....	Limite de quantificação
<b>S</b> .....	Sensibilidade.
<b>F</b> .....	Vazão ( $\text{ml min}^{-1}$ )
<b>V<sub>am</sub></b> .....	Volume da amostra injetada ( $\mu\text{l}$ ).
<b>L<sub>R</sub></b> .....	Comprimento do reator (cm).
<b>R</b> .....	Coeficiente de regressão linear.
<b>DPR</b> .....	Desvio padrão relativo.
<b>TA</b> .....	Tempo de análise (s).
<b>FDC</b> .....	Faixa dinâmica de concentração linear.

## **RESUMO**

---

Um novo método cinético de análise por injeção em fluxo para a determinação de fármacos foi desenvolvido. Este método baseia-se na medida do sinal em posições equivalentes (em torno do máximo) do gradiente de concentração da amostra, sem a necessidade de interromper o fluxo transportador, requerendo um menor grau de automação. A estratégia de calibração do gradiente de concentração em Análise por Injeção em Fluxo foi utilizada.

Um planejamento factorial  $2^4$  foi realizado a fim de planejar as condições experimentais. Quatro variáveis do sistema (fatores) foram estudadas e os efeitos foram interpretados para seis respostas: sensibilidade, coeficiente de regressão linear, desvio padrão relativo dos resultados, magnitude da faixa dinâmica de concentração, limite de quantificação e tempo para medida. Para definir a melhor condição, as seis respostas foram consideradas, utilizando a função deseabilidade.

Ao analisar as amostras de dopamina injetável, observou-se que estas apresentaram efeito de matriz. Fez-se, então, necessária a utilização do método de adição do analito, que foi implementado utilizando a estratégia de zonas coalescentes (“*merging zones*”) com posterior amostragem da zona dispersa (“*zone sampling*”). A condição ideal, definida pela função deseabilidade, foi mantida. Foram analisadas amostras de três diferentes fabricantes, apresentando um erro relativo médio de 3,3%, com relação ao método recomendado pela farmacopéia Americana. A estimativa do desvio padrão encontrado para quinze repetições foi de  $0,0033 \text{ g L}^{-1}$ . Ainda, foi atingida uma freqüência analítica de 48 injeções por hora, bem maior que no método padrão (HPLC), em torno de 3 determinações por hora.

## **ABSTRACT**

---

A novel method to carry out kinetic analysis by Flow Injection, applied to dopamine determination in pharmaceuticals was developed. The method is based on measurements of the signal intensities at equivalent positions, around the peak, of the sample concentration gradient. The flow interruption was not necessary, requiring a low level of automation. The strategy of concentration gradient calibration was employed.

A  $2^4$ -factorial design was accomplished in order to plan the experimental condition of the flow methodology. Four system variables (factors) were studied and the effects were interpreted for six responses: sensitivity, linear regression coefficient, relative standard deviation of the results, magnitude of the concentration dynamic range, quantification limit and analysis time. In order to define the best condition, the six responses were considered, using the desirability function.

While analyzing the dopamine samples, the matrix effect was noted. Then, the Method of Analyte Addition was implemented by employing of merging zones, followed of zone sampling. The ideal condition, defined by the desirability function was maintained. Four samples from three different companies were analyzed and a mean relative error of 3,3% was obtained. An estimative of standard deviation achieved with fifteen replicates was 0,0033 g.L<sup>-1</sup>. Moreover, an analytical throughput equal to 48 injections per hour was attained, higher than the standard method (by HPLC), around 3 injections per hour.

## **1 - INTRODUÇÃO**

---

A dopamina (3,4-dihidroxifeniletilamina) é uma catecolamina (substâncias que apresentam os grupos catecol e amino) que possui a função de neurotransmissor, sendo a precursora natural de outras catecolaminas, como por exemplo a adrenalina e a noradrenalina. No caso da doença de Parkinson, por exemplo, cita-se a deficiência desta catecolamina em áreas cerebrais relacionadas com o movimento voluntário [1]. Apresenta, assim, grande importância para o organismo humano, uma vez que está relacionada com o sistema nervoso central.

Como medicamento é administrada pela via endovenosa, não podendo ser administrada oralmente devido a sua grande facilidade de sofrer oxidação e ser metabolizada pelo fígado ou rins, sendo, assim, nulo o seu efeito . Para soluções injetáveis de dopamina, a Farmacopéia do Estados Unidos recomenda a separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), seguida de detecção espectrofotométrica a 280 nm. Este procedimento requer uma coluna específica para a separação analítica, tornando o procedimento trabalhoso e demorado para a análise de rotina [2] Outros métodos para a determinação da dopamina em fármacos são encontrados na literatura, embora, em geral, apresentam inconvenientes, como exatidão pobre e pré-tratamento da amostra [3-4].

Desta forma, reveste-se de importância o desenvolvimento de metodologias para a determinação de dopamina mais simples e com uma alta frequência analítica. Neste sentido, a Análise em Fluxo [5] representa uma ferramenta poderosa na busca de procedimentos com alto desempenho analítico.

Dentre as diferentes modalidades de análise em fluxo, talvez a que mais tenha se destacado é a Análise por Injeção em Fluxo (FIA). Os sistemas FIA tiveram sua proposta e desenvolvimento inicial nos anos 70 e são até hoje reconhecidos como “excelentes gerenciadores de soluções” [6]. Procedimentos envolvendo sistemas FIA baseiam-se na injeção da amostra, dispersão da zona de amostra estabelecida e temporização, o que flexibiliza a execução de diversas etapas inerentes à determinação analítica específica, como, por exemplo, diluição, separação, pré-concentração, etc. Sua operação, potencialidades e limitações foram discutidas em monografias especializadas [7-9].

Em geral, diferentes soluções padrão do analito são necessárias para a construção de uma curva analítica em metodologias FIA, todavia, a estratégia de Calibração de Gradientes de Concentração em FIA [10] possibilitou o emprego de apenas uma única solução padrão para este fim. Esta se baseia na determinação das concentrações relativas de secções transversais da zona da solução injetada, quando estas atingem o detector. Desta forma, permite-se a disponibilização de diferentes concentrações, através de uma única injeção (amostra, solução padrão ou reagente), em metodologia de análise por injeção fluxo.

Um progresso na Análise por Injeção em Fluxo também foi conseguido com o desenvolvimento da estratégia de parada do fluxo (do inglês “stopped flow”) [11]. Ao se interromper o fluxo, a dispersão da zona de amostra torna-se desprezível e se a mesma é parada na cela de fluxo, é possível registrar a variação da absorbância, causada pelo decorrer da reação entre o analito e o reagente presente no fluido transportador, podendo-se realizar determinações cinéticas. A diferença entre dois sinais medidos em tempos diferentes é usada para construir a curva analítica de calibração. Um certo grau de automação é, portanto, necessário para

controlar o fluxo da bomba e os tempos de medida. Também, a interrupção do fluxo resulta em um aumento no tempo de limpeza do sistema, diminuindo a velocidade analítica.

Desta forma pretende-se apresentar neste trabalho o método cinético desenvolvido, sem a necessidade da interrupção do fluxo, baseado na combinação de sistemas FIA juntamente com a exploração da estratégia de calibração de gradientes de concentração.

## **2 - OBJETIVOS**

---

### **OBJETIVO GERAL**

Propõe-se neste trabalho, o desenvolvimento de metodologia cinética de análise através da calibração de gradientes em FIA para a determinação de dopamina em fármacos. Esta metodologia, baseada na calibração de gradientes de concentração gerados em sistemas FIA, não requer a interrupção do fluxo e um menor grau de automação é necessário.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Propor metodologia por injeção em fluxo para a determinação de dopamina em fármacos, empregando a calibração de gradientes de concentração em FIA.
2. Realizar Planejamento Fatorial, estudando algumas variáveis experimentais, visando verificar qual delas influi no desempenho analítico, considerando: limite de detecção, faixa dinâmica, precisão, freqüência analítica, sensibilidade e coeficiente de correlação.
3. Através da função deseabilidade, selecionar entre as condições experimentais estudadas, qual oferece um melhor desempenho analítico.
4. Avaliar a eficiência da metodologia proposta, através da análise de amostras reais.
5. Validar a metodologia com o método padrão recomendado.

## **3 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

---

### **3.1 – ANÁLISE EM FLUXO**

O termo análise em fluxo é recomendado como o nome genérico para todos os métodos analíticos que são baseados na introdução e processamento de amostras em fluxos [12]. Separações e conversões químicas são geralmente conduzidas em fase líquida e a maioria destas análises envolve a interação da amostra com o fluido transportador ou com um reagente introduzido no fluxo, possibilitando a execução de processos analíticos em um fluxo que transporta a alíquota da amostra, do ponto de introdução até a unidade de detecção.

Pesquisas no campo de análises químicas em fluxo e sua aceitação têm experimentado um crescimento contínuo e exponencial, o que levou ao aparecimento de novos conceitos e inovações, tão bem como de avançados analisadores disponíveis comercialmente [13]. Neste contexto, sistemas de análises químicas por injeção em fluxo (FIA - do inglês *Flow Injection Analysis*) [14], por injeção seqüencial (SIA - do inglês *Sequential Injection Analysis*) [15] e em fluxo monosegmentado (MSFA, do inglês *Monosegmented Flow Analysis*) [16], assim como também modernos analisadores explorando várias válvulas independentemente acionadas (multicomutação) [17] e/ou câmaras de fluxo descontínuo, que caracterizam os sistemas fluxo-batelada [18], são atualmente reconhecidos como importantes ferramentas em resposta a sempre crescente demanda por análises químicas.

Sistemas SIA foram propostos por Ruzicka e Marshall em 1990 [15] e seus fundamentos teóricos, potencialidades e aplicações têm sido estudados por diversos grupos [19]. Em sistemas SIA, alíquotas da amostra e do(s) reagente(s) são sequencialmente aspiradas em direção a uma bobina de armazenamento, através de uma válvula de seleção . Após a rotação desta válvula e inversão do fluxo, a mistura amostra/reagente(s) é bombeada em direção ao detector. Relativamente às demais modalidades de análises em fluxo, SIA se caracteriza por sua flexibilidade na execução de procedimentos analíticos, pela simplicidade instrumental, pela facilidade de automação e pela economia de reagentes. O emprego dos sistemas SIA é bastante recomendado porque as variáveis hidrodinâmicas, tais como vazão, percurso analítico, volumes de amostra e de reagentes podem ser controladas por meios diretos. A razão volumétrica amostra/reagente pode ser otimizada para assegurar maior sensibilidade, os intervalos de tempo para desenvolvimento das reações são facilmente ajustados e, ainda, a modalidade de parada de fluxo (do inglês “*stopped flow*”) pode ser eficientemente implementada [20]. O módulo de análise, portanto, não precisa ser alterado para a execução de diferentes metodologias analíticas.

Na análise em fluxo monosegmentado, introduzida em 1985 [21], a amostra é injetada entre duas bolhas de ar, em um fluido transportador e, como consequência, a integridade da amostra é mantida e o tempo de lavagem reduzido. Várias amostras também podem ser adicionadas ao percurso analítico, já que a dispersão é pequena e a contaminação entre as amostras é minimizada devido às bolhas de ar. Desta forma, após a primeira amostra atingir o detector, o tempo para cada análise depende apenas do intervalo entre as injeções de amostra e metodologias analíticas que empregam reações de velocidades lentas podem então ser eficientemente realizadas. A baixa dispersão da amostra

permite ainda obter uma maior sensibilidade do que aquela obtida em sistemas SIA ou FIA.

Sistemas explorando a multicomutação são caracterizados pela alta versatilidade no desenvolvimento de analisadores dedicados (destinados a apenas um ou alguns métodos analíticos), em função da presença de diversas válvulas de três vias no percurso analítico, as quais podem ser acionadas individualmente. Os analisadores multicomutados foram recentemente revistos [22-23]. O emprego da multicomutação permite incluir abordagens típicas dos sistemas SIA e FIA tais como parada de fluxo[24], reamostragem de zonas dispersas [25], amostragem binária [26-27] etc.

Sistemas multicomutados após sua montagem, em geral, não apresentam flexibilidade, em função de normalmente serem destinados a apenas um ou alguns métodos analíticos. Por outro lado, os sistemas dedicados permitem alcançar as melhores características analíticas (sensibilidade, reproduzibilidade, velocidade analítica, etc.) para o método a que são destinados. [28].

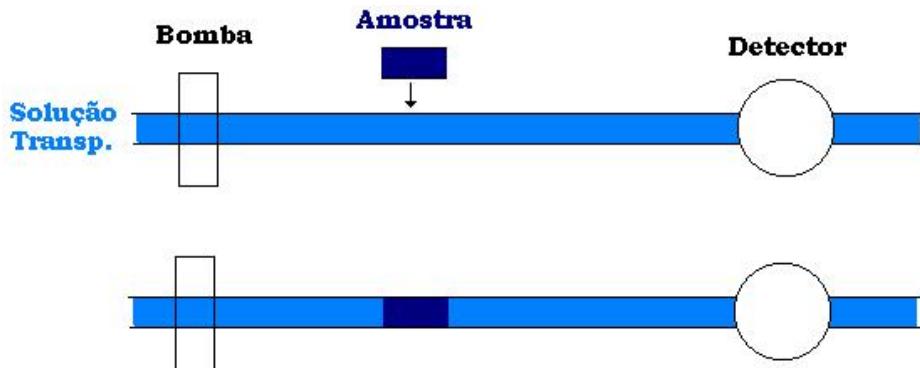
Sistemas híbridos fluxo-batelada se caracterizam por explorar estratégias inerentes a sistemas em fluxo e em batelada [29]. Assim como em sistemas em fluxo tradicionais, a amostragem e transporte dos reagentes e amostra, assim como o monitoramento do sinal ocorre em fluxo. Todavia, diferentemente dos sistemas em fluxo tradicionais, os reagentes são bombeados para uma câmara, onde se desenvolve a reação, sem que ocorra simultaneamente a drenagem destes em direção ao detector, ou descarte, quando a detecção é realizada na própria câmara [30]. Assim como acontece nos analisadores discretos, a integridade da amostra e do(s) reagente(s) é, então, mantida, o que potencializa bastante o universo de aplicações dos sistemas fluxo-batelada. As características

destes sistemas permitiram/facilitaram o desenvolvimento de procedimentos analíticos baseados no tratamento individualizado de amostras [30], em volumetria, explorando diferentes estratégias para minimização do número de adições do titulante [18, 31], que incluem o preparo de soluções padrão para análise multi-elementar simultânea [32] e para a realização do Método por Adição de Analito [33-34]. Baseados em suas propriedades de análise em fluxo, características próprias de analisadores FIA [32], SIA [30] e multicomutados [29, 31, 33-34] podem ser encontradas em sistemas fluxo-batelada.

### 3.1.2 – ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO

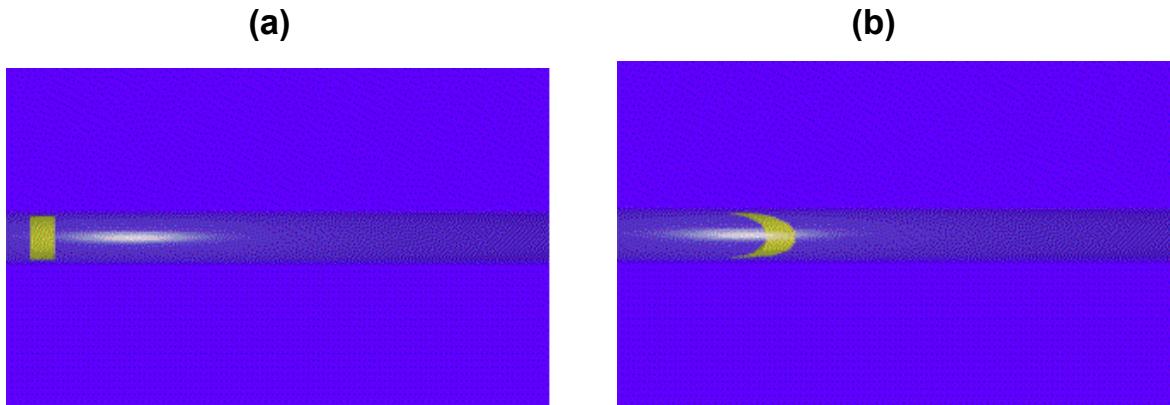
Os sistemas FIA tiveram sua proposta e desenvolvimento inicial, a partir de uma criativa combinação de características de métodos analíticos já existentes, bem como de um aperfeiçoamento do método de análise em fluxo segmentado. Em pouco tempo, mostrou-se uma ferramenta muito útil para determinações analíticas [35]. A Análise por Injeção em Fluxo, hoje, é considerada uma das principais “técnicas” analíticas; difundida em praticamente todo o mundo, até o final do século XX, cerca de 8.000 artigos abordando o tema foram produzidos [36].

As metodologias de análise por injeção em fluxo são caracterizadas pela introdução de um volume reproduzível da amostra (ou reagente) em um fluido transportador não segmentado, que se direciona ao detector, como ilustrado na **Figura 1**.



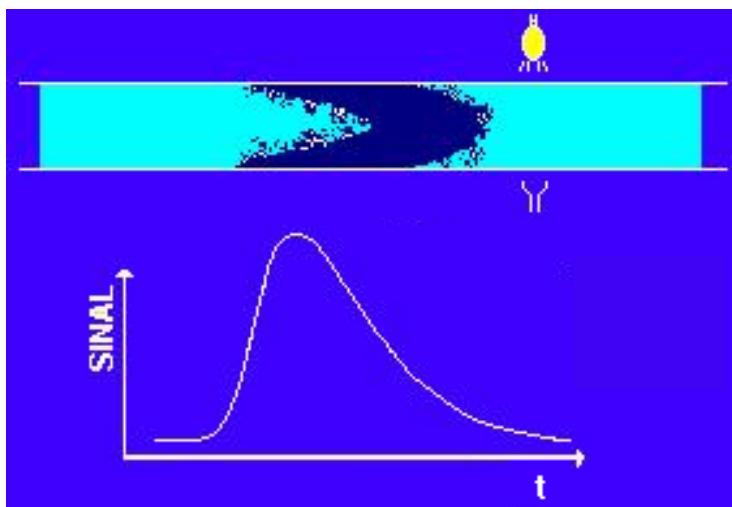
**Figura 1** – Ilustração do processo de amostragem em Análise por Injeção em Fluxo.

Logo após a introdução da amostra em um fluxo transportador, tem-se um perfil de concentração retangular (**Figura 2a**). Conforme a alíquota da amostra flui em direção ao detector, ela se dispersa através do fluido transportador (**Figura 2b**). O processo de dispersão ocorre como resultado do processo de convecção, ou seja, o fluxo laminar faz com que o centro do fluido se movimente mais rápido do que sua fração próxima às paredes dos tubos. A difusão, devido ao gradiente de concentração gerado pelo processo de convecção, também provoca alterações no perfil de concentração da alíquota injetada.



**Figura 2** – (a) Perfil apresentado momentos após a introdução da amostra.  
(b) Perfil da amostra, após o processo de dispersão.

O perfil de concentração gerado após a dispersão da amostra gera um sinal transitório com tempo, semelhante a uma gaussiana distorcida, quando a alíquota da amostra passa pelo detector (**Figura 3**).



**Figura 3** – Sinal transitório gerado em Análise por Injeção em Fluxo.

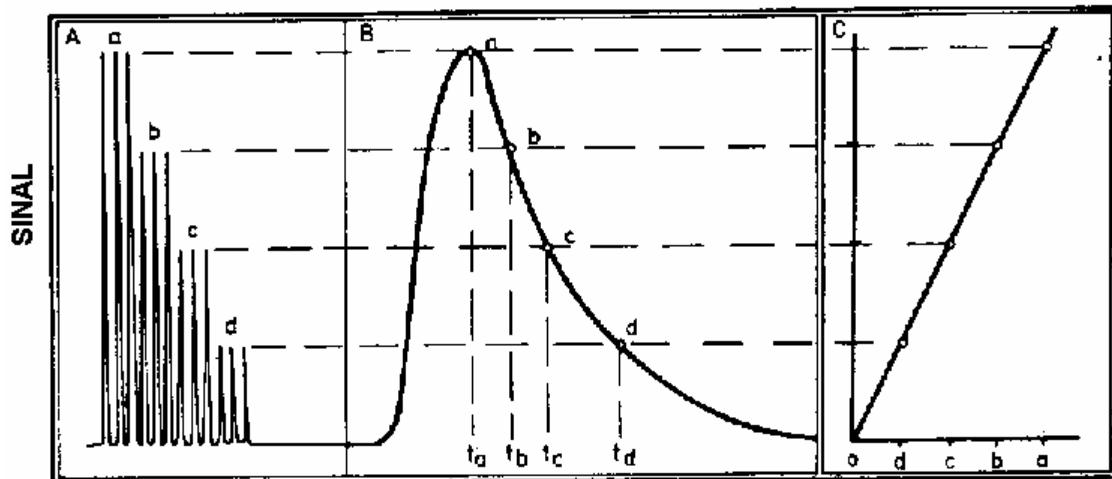
### 3.1.2.1 – CALIBRAÇÃO DE GRADIENTES DE CONCENTRAÇÃO EM FIA

Em geral, a concentração do analito, empregando um sistema FIA, é determinada através da construção de curvas analíticas, nas quais a altura, a largura ou a altura de pico é plotada contra a concentração de soluções padrão [37]. Dentre estas medidas, a mais utilizada é a altura do sinal obtido, basicamente porque este promove uma maior sensibilidade e é facilmente discernido.

Metodologias que utilizam o gradiente em FIA exploram a informação vinda do registro completo do sinal (fiagrama).

Inicialmente, o gradiente FIA de concentração foi utilizado em uma metodologia denominada de Diluição por Gradiente ou Diluição

Eletrônica [38]. Ela emprega medidas obtidas em tempos superiores ao de residência, ou seja, na região descendente do sinal FIA obtido para uma solução padrão. Uma etapa prévia de calibração do gradiente de concentração é realizada, através da obtenção do máximo de sinal para soluções padrão de diferentes concentrações. Através destes máximos são encontrados tempos no fiagrama da solução padrão de máxima concentração. Para futuras calibrações, é necessário repetir apenas a introdução desta solução padrão de maior concentração (**Figura 4B**) e encontrar os sinais para os tempos determinados na primeira etapa (**Figura 4C**).



**Figura 4** – Ilustração do procedimento para a obtenção de uma curva analítica através da metodologia de Diluição por Gradiente. **(A)** Picos obtidos para soluções padrão de diferentes concentrações. **(B)** Fiagrama para solução padrão de maior concentração. **(C)** Curva analítica.

Com esta metodologia, consegue-se construir uma curva analítica em até 20s, com apenas uma única solução padrão. Todavia, é necessário realizar periodicamente uma nova calibração do gradiente de concentração através da introdução de soluções padrão de diferentes

concentrações, visando corrigir possíveis variações hidrodinâmicas do sistema, devido ao processo de desgaste dos tubos e da bomba.

Mais recentemente foi proposta uma metodologia de calibração do gradiente mais rápida e empregando apenas a introdução de uma única solução, além daquela da solução padrão [39]. Esta “solução de calibração” precisava apenas gerar uma resposta linear pelo detector empregado, podendo ser inclusive a própria solução padrão. Neste caso, determinavam-se apenas as concentrações relativas das frações da solução introduzida, que ocupavam a região de detecção. Em outras palavras, a proporção dos sinais em dois instantes diferentes correspondia à proporção da concentração das frações em monitoramento.

Método titulométrico, baseado na calibração prévia da variação temporal da concentração, gerada em uma câmara de mistura, quando a amostra era introduzida em um fluido transportador inerte, que confluía com o titulante, bombeado continuamente foi proposto [39]. Alternativamente, o titulante era introduzido e a amostra bombeada. A calibração era realizada a partir da injeção de uma solução absorvente, dentro de sua faixa linear de concentração. Através do processo de calibração, previamente descrito, determinava-se a razão entre as concentrações instantâneas do titulante e amostra no ponto estequiométrico. Esta razão e a concentração do titulante eram usadas para se encontrar a concentração da amostra. O sistema foi aplicado a análise de amostras de vinagre e de ligas metálicas. A mesma metodologia foi utilizada em seguida para a determinação de acidez total em vinhos [40]

A determinação de concentrações relativas foi também utilizada para a realização do Método por Adição do Analito [41]. O efeito de matriz na determinação de cobre em aguardentes de cana por espectrometria de absorção atômica era superado através de um sistema metodologia FIA

usando zonas coalescentes. Alíquotas iguais da amostra e solução padrão eram introduzidas por diferentes alças e encontravam-se por confluência. Para corrigir o efeito de matriz entre soluções padrão e da amostra, eles eram introduzidos previamente em separado e as concentrações relativas, através dos sinais analíticos, eram utilizadas para encontrar a concentração da amostra.

Metodologia empregando apenas uma única solução padrão para a obtenção de uma curva analítica não linear também tem sido proposta [42]. A ordem de reação diferente de zero causava uma resposta não-linear da absorbância monitorada e o teor de proteínas totais em amostras de soro sanguíneo. Uma injeção prévia de uma solução de permanganato de potássio ( $KMnO_4$ ) era utilizada para determinar a dispersão física do analito na solução padrão. Depois que a solução padrão e as amostras eram processadas, a concentração do analito nas amostras eram encontradas a partir de uma simples relação matemática, utilizando as absorbâncias das três soluções.

### **3.1.2.1 – MÉTODOS CINÉTICOS EM FIA**

A formação de um produto apresentando um estado intermediário pode também ser explorada para fins analíticos, em sistemas FIA. Problemas de seletividade podem, por exemplo, serem superados devido a diferenças das taxas de reação entre analitos distintos e o mesmo reagente. Entretanto, os parâmetros a serem medidos dependem criticamente do tempo e uma boa otimização das variáveis hidrodinâmicas torna-se necessária.

Com base nestes conceitos, métodos cinéticos em FIA puderam ser utilizados em determinações analíticas, como, por exemplo, na determinação fluorimétrica de prata, baseada na reação entre safranina e iodeto [43]. Como a prata apresenta um efeito catalítico reduzindo a quantidade de safranina que irá reagir com o iodeto, a presença de pequenas quantidades de prata faz com que a safranina seja reduzida, diminuindo assim a intensidade da fluorescência da safranina. Conhecendo-se o sinal analítico sem a presença de prata e o sinal analítico para as amostras com a prata, é possível determiná-la quantitativamente por esta diferença.

Já para a determinação de vanádio (V), outra metodologia cinética foi utilizada [44] Neste caso foi usada a estratégia de parada de fluxo, com determinação espectrofotométrica (544 nm). Para determinação foi utilizado, como reagente uma solução de 3,3-dimetilnaftidina (3,3,DMN). A amostra de vanádio foi introduzida em um fluxo, confluindo com o reagente que seguia para um banho de aquecimento, onde o fluxo era parado, durante 85 s. Após esse período, o fluxo era restabelecido em direção ao detector.

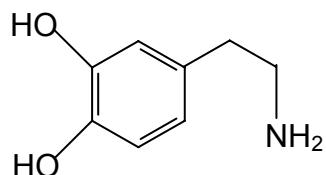
Catecolaminas (L-dopa, dopamina e epinefrina) foram também determinadas por métodos cinéticos [45] baseados na reação com o sistema “Rosa de Bengal” (RB), 3,4,5,6-tetracloro-2’,4’,5’7’-tetraiodofluorescina, e EDTA. Pela significativa redução da velocidade da reação quando estas catecolaminas estão presentes em pequenas quantidades pois apresentam um efeito inibidor sobre o estado excitado de RB. Em solução, o sistema RB com EDTA apresenta uma coloração rosa. Quando esta solução é fotoirradiada a um pH adequado (5,5) e na ausência de oxigênio, ocorre a fotorredução do composto formado e a coloração desaparece. Para se determinar a concentração das catecolaminas, mede-

se a absorbância da solução e o tempo necessário para que ela caia a 10% do valor inicial da absorbância. A concentração das catecolaminas é encontrada através de um gráfico da concentração da catecolamina versus  $t_x/t_0$ , onde  $t_x$  é o tempo necessário para o decaimento da absorbância da solução contendo dopamina e  $t_0$  é o tempo necessário para o decaimento da absorbância da solução livre de dopamina. Nesta metodologia, obteve-se uma faixa dinâmica para a dopamina de  $5.0 \times 10^{-6}$  a  $7.0 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>.

Paralelamente, metodologia baseada na cinética da reação para determinação fluorimétrica de amoxilina e ácido clavulânico em formulações farmacêuticas utilizando-se calibração multivariada (PLS) através da Análise por Injeção em Fluxo, foi proposta. Explora-se a estratégia de parada de fluxo [46]. O método baseia-se na reação destes compostos com cério (IV) em meio ácido, quando a mistura é levada ao aquecimento obtém-se um produto fluorescente. Soluções de amoxilina com ácido clavulânico e cério (IV) são introduzidas numa cela reator de fluxo parado, através de seringas, onde a mistura é aquecida até temperatura constante e efetuada a leitura do sinal analítico. Neste caso, a mistura era bombeada (empurrada) para a cela onde o fluxo era parado para a aquisição da curva cinética durante 60 s para cada amostra, pois a reação do ácido clavulânico é mais lenta do que para amoxilina. A curva analítica foi obtida plotando-se a intensidade do sinal obtido (fluorescência) pelo tempo.

### 3.2 – DOPAMINA

A Dopamina, **Figura 5**, é precursora imediata da noradrenalina na biossíntese das catecolaminas. Atua em receptores dopaminérgicos causando vasodilatação em nível renal, mesentérico e coronário. Este efeito ocorre principalmente em doses baixas e é decorrente do aumento do AMPc intracelular. Em doses mais altas atua no receptor  $\beta_1$  cardíaco, do que resulta sua ação inotrópica positiva. Além disto, ativa receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, levando à vasoconstrição.



**Figura 5** – Estrutura da dopamina.

Possui ação semelhante às demais catecolaminas (adrenalina e nor-adrenalina) apresentando um efeito menos potente. Em alguns órgãos apresenta ação diferente da adrenalina e noradrenalina e não é inibida pelos simpatolíticos que bloqueiam os receptores  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgicos. No metabolismo humano é obtida através da oxidação da *L-dopa* (precursora natural da dopamina) e é encontrada em maior quantidade no putamen, núcleo caudado e substância negra presentes no cérebro. A dopamina é útil no tratamento do choque cardiogênico, traumático ou hipovolêmico, onde o aumento da atividade simpática pode comprometer a função renal. [1]

### **3.2.1 - MÉTODO RECOMENDADO PELA FARMACOPÉIA AMERICANA**

A dopamina comercializada no Brasil, apresenta-se na forma injetável (cloridrato). O seu uso é restrito apenas a hospitais e apresenta-se, em geral, na forma de ampolas de 10 mL, contendo 5 mg mL<sup>-1</sup> do cloridrato de dopamina.

Na sua determinação quantitativa deve-se utilizar uma metodologia de alta precisão e exatidão. Para amostras de dopamina, a farmacopéia americana recomenda a detecção em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detector UV a 280 nm. No sistema cromatográfico recomenda-se a utilização de uma coluna de empacotamento C-18, com dimensões de 30 cm x 4 mm (diâmetro) em aço inoxidável, e vazão de 1,5 mL min<sup>-1</sup> [2].

A fase móvel é uma solução obtida a partir de 260 mL de acetonitrila e 1.760 mL de solução contendo 1:1000 (m/v) de 1-octanossulfonato de sódio em ácido acético 1% (v/v). Utiliza-se também uma solução de resolução contendo ácido benzóico 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, juntamente com o padrão de dopamina. A função desta solução é indicar se a análise está muito lenta, neste caso deve-se aumentar a vazão, ou muito rápida. O fator de resolução recomendado para a análise de dopamina não deve ser menor que 4.

A solução padrão é preparada conforme especificação, a fim de se obter uma concentração de 0,16 mg mL<sup>-1</sup>. As amostras são diluídas para atingirem um valor de concentração próximo.

Nesta metodologia não se fez necessário a construção de uma curva analítica a fim de se determinar quantitativamente a dopamina. Conforme recomendação, faz-se uso de equação matemática, apresentada a seguir:

$$C_{dopamina} = (100C_{padrão}/V)(r_u/r_s)$$

onde **C** é a concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ), **V** é o volume injetado ( $\text{mL}$ ), **r<sub>u</sub>** é a resposta (altura) obtida pelas amostras e **r<sub>s</sub>** é a resposta (altura) obtida pelo padrão de dopamina.

O valor 100 na equação é atribuído ao volume do balão volumétrico onde foi efetuada a diluição.

### 3.2.2 – MÉTODOS EM ANÁLISE EM FLUXO PARA A DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA

A determinação analítica de dopamina tem sido fonte de diversos estudos, tendo em vista a sua importância biológica e farmacêutica. Diversos artigos científicos relatam a sua determinação, sendo alguns desenvolvidos para sistemas FIA, onde se pode aumentar o número de amostras analisadas por hora, como também diminuir o volume dos reagentes utilizados. Algumas destas metodologias para determinação baseiam-se na capacidade que tem a dopamina em ser oxidada devido a existência do grupo catecol em sua estrutura.

Por oxidação enzimática a dopamina foi determinada tendo o extrato bruto do abacate como fonte de polifenol oxidase. A fonte enzimática foi obtida e determinada a sua atividade enzimática [47] O sistema de injeção em fluxo consistia na inserção de 375  $\mu\text{L}$  de dopamina e 400  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo a fonte enzimática, ambas confluindo em fluxo e seguindo para uma bobina de reação para posterior detecção a 466 nm. Como fluxo transportador foi utilizado uma solução tampão de fosfato

(pH=7) a uma vazão de  $2,2 \text{ mL min}^{-1}$ , tendo a curva analítica apresentado linearidade de  $5,3 \times 10^{-5}$  a  $5,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

Ainda em FIA, a dopamina foi determinada espectrofotometricamente, a 390 nm, utilizando-se hidróxido de sódio (NaOH) como reagente, fazendo-se necessário levar as amostras a um prévio aquecimento ( $65^{\circ}\text{C}$ ) [4]

Método em FIA, para a determinação da dopamina sem requerer pré-tratamento da amostra foi proposto [48]. Neste método foi utilizado um eletrodo seletivo de metaperiodato em um sistema simples, e de fácil operação que apresentou alta reproduzibilidade. O sistema consistia na inserção da dopamina em um fluxo transportador, que confluía posteriormente com uma solução de metaperiodato, seguindo para os eletrodos (íon seletivo e referência). Ambos eletrodos acoplados a um decimilivoltímetro e um registrador do sinal (microcomputador). A melhor condição para essa determinação após otimização das condições experimentais apresentou para a dopamina uma faixa linear entre  $8,0 \times 10^{-3}$  –  $2,7 \times 10^{-1} \text{ g.L}^{-1}$ , a uma vazão de  $7 \text{ ml min}^{-1}$ , injetando-se  $50 \mu\text{L}$  da solução.

Espectrofotometricamente , tendo-se o metaperiodato de sódio como agente oxidante, primeiramente foram determinadas adrenalina e isoprenalina (catecolaminas) [49], não sendo necessário levar as amostras a um pré-tratamento. O sistema desenvolvido era bastante simples, tendo, como fluido transportador, uma solução de metaperiodato ( $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ), onde  $200 \mu\text{L}$  de uma solução contendo a amostra era inserido, seguindo para um reator de 4,30 m, a uma vazão de  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ . O sistema desenvolvido apresentou boa reproduzibilidade para estas catecolaminas.

Posteriormente, o mesmo sistema foi utilizado para a determinação de dopamina e metildopa [50]. Neste caso, fez-se necessário levar o sistema ao aquecimento, devido a observações das condições

experimentais. Os melhores resultados foram obtidos à temperatura de 65°C para a dopamina, mantendo-se as mesmas condições anteriores (“loop”, vazão, reator e concentração do metaperiodato). A detecção foi realizada a 473 nm, obtendo uma faixa linear variando de  $2,0 \times 10^{-5}$  a  $2,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. O desvio padrão relativo para esta metodologia foi menor que 0,5 (n = 10).

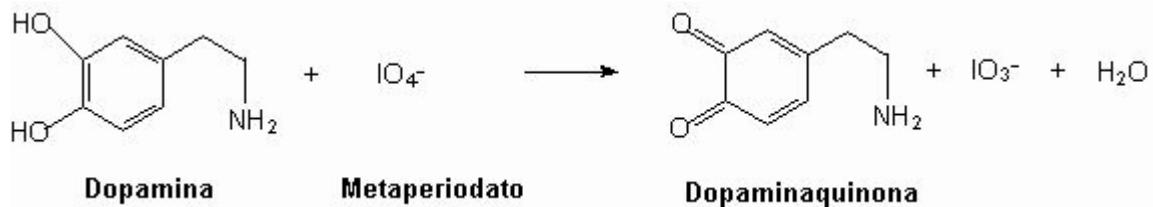
Outros métodos em análise em fluxo têm sido citados na literatura para a determinação de dopamina, dentre as quais, com detecção amperométrica [51], e por quimioluminescência [52-53]

### **3.2.2.1 – DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA BASEADA NA REAÇÃO COM METAPERIODATO**

Métodos analíticos são encontrados na literatura científica para a determinação desta catecolamina baseados na reação com metaperiodato de sódio, dentre os quais podemos citar primeiramente o trabalho desenvolvido por Sastry [3], através do qual, em 1982, foi estudado o tempo da estabilidade do composto colorido formado pela oxidação da mesma. Para a determinação de dopamina com periodato e aminofenol, o tempo máximo para o desenvolvimento da coloração obtido foi de 10 min e permaneceu estável por duas horas. O estudo foi realizado a partir de soluções preparadas de reagentes analíticos,, não sendo relatado observações em amostras farmacêuticas.

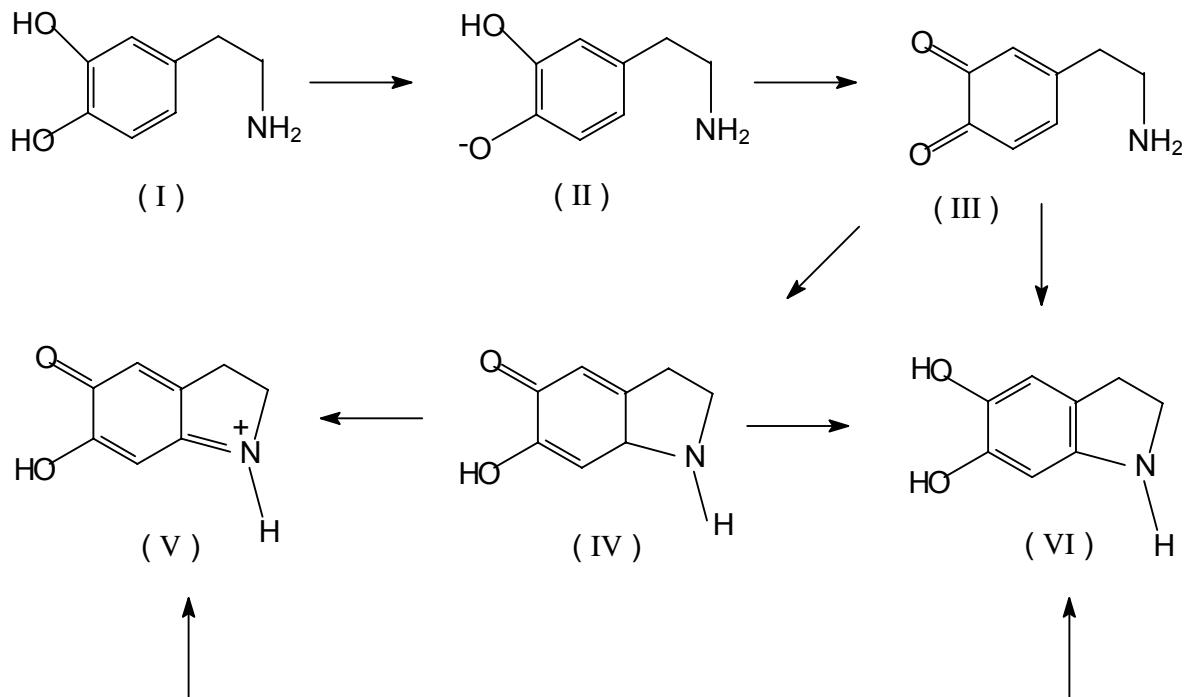
Já em drogas farmacêuticas, a dopamina foi determinada fazendo-se necessário um pré-tratamento das amostras, com um aquecimento em torno de 65°C, pelo tempo de 3 a 7 minutos, seguindo-se do resfriamento da amostra. Media-se, então, a absorbância a 465 nm. A

temperatura e o tempo de reação influenciam diretamente a taxa de ciclização oxidativa (produto final obtido na oxidação da dopamina). O mecanismo proposto para a oxidação da dopamina (**Figura 6**) foi investigado e proposto por vários pesquisadores [54-55], e é mostrado a seguir.



**Figura 6** – Oxidação da dopamina.

Após a oxidação da dopamina, o produto cromóforo pode originar outras espécies químicas [55].



**Figura 7** – Produtos formados pela oxidação da dopamina.

### 3.3 – PLANEJAMENTO FATORIAL

O planejamento fatorial permite determinar se as variáveis (ou fatores) escolhidas previamente têm ou não influência sobre as respostas do sistema, como também se existe alguma interação entre esses fatores e se estas interações são significativas ou não. Para se realizar um planejamento fatorial, definimos primeiramente os níveis que cada fator deve ser estudado (valores ou classes), isto é, os valores dos fatores que serão empregados no experimento. Quando o planejamento apresenta apenas dois níveis, são denominados de inferior e superior e representamos por ( - ) e ( + ), respectivamente. Atribuindo apenas dois níveis aos fatores, torna-se mais simples (e mais fácil) de se realizar um planejamento fatorial.

Como em um planejamento fatorial precisamos realizar todas as combinações possíveis dos níveis dos fatores. Se existir  $n_1$  níveis do fator 1,  $n_2$  do fator 2,...,  $n_k$  do fator  $k$  o planejamento será um fatorial de  $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$  ensaios diferentes. Costuma-se representar um planejamento de dois níveis e  $k$  variáveis por  $2^k$ .

Neste trabalho, selecionou-se como variáveis ou fatores para a determinação de dopamina pelo método cinético, a vazão, o volume introduzido (“loop”), a concentração do metaperiodato de sódio e o comprimento do reator. As respostas avaliadas foram a sensibilidade do método, o coeficiente de regressão linear, a faixa dinâmica de concentração linear, o desvio padrão relativo, o limite de quantificação e o tempo de análise.

### 3.4 – FUNÇÃO DESEJABILIDADE

Para definição dos níveis dos fatores que fornecem os resultados mais desejáveis, dentro das condições de análise, foi empregada uma metodologia de otimização simultânea baseada na definição da Função Desejabilidade [56], onde atribuímos para cada resposta, valores restritos ao intervalo (0,1). Para um valor indesejável é atribuído o valor zero e para o valor mais desejável é atribuído o valor um. Com esta função podemos eliminar algumas condições proposta no planejamento fatorial, que devido a ação de algum fator não apresentou um bom desempenho nos resultados. Todavia a forma da função desejabilidade global, D, depende de como ela está formulada para cada uma das respostas estudadas. A função desejabilidade, D, é definida por:

$$D = (d_1^a \times d_2^b \times d_3^c \times K d_n^x)^{\frac{1}{(a+b+c+\dots+x)}}, \quad (1)$$

onde:

$$d_n = \frac{R_n - R_{\min}}{R_{\text{ideal}} - R_{\min}}, \quad \text{para } R_{\min} \leq R_n \leq R_{\text{ideal}} \quad (2)$$

$$d_n = \frac{R_n - R_{\max}}{R_{\text{ideal}} - R_{\max}} \quad \text{para } R_{\text{ideal}} \leq R_n \leq R_{\max} \quad (3)$$

Aqui  $R_n$  são as diferentes respostas consideradas para a otimização. As Equações (2) ou (3) são utilizadas quando se deseja como uma resposta ideal,  $R_{\text{ideal}}$ , um valor alto (por exemplo, uma alta sensibilidade) ou baixo (um baixo desvio padrão), respectivamente.  $R_{\min}$  e

$R_{\max}$  são os valores mínimo e máximo aceitáveis. Empregando a Equação (2) deve ser atribuído o valor 1 para  $d_n$ , quando o valor de  $R_n$  for acima do  $R_{\text{ideal}}$  e o valor 0 para valores abaixo de  $R_{\min}$ . O oposto deve ser feito quando se utiliza a Equação (3). Desta forma, a desejabilidade, D, sempre ficará restringida a valores entre 0 e 1. Os expoentes a, b, c, ...n são definidos de acordo com a importância das diferentes respostas para o procedimento de análise.

## **4 - EXPERIMENTAL**

---

### **4.1 – REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS.**

#### **i) Planejamento e otimização do experimento.**

Para a realização do planejamento fatorial, as soluções de Cloridrato de dopamina ( $C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl$  MM 189,6 g/mol- Sigma.) foram obtidas pela diluição de uma solução estoque de  $1,90 \times 10^{-1}$  g.L $^{-1}$ , preparada a partir do reagente previamente pesado. Nas diluições, foi utilizada uma solução tampão com pH = 4,8 ( $CH_3COOH/CH_3COONa$  0,02 mol L $^{-1}$ ), sendo preparadas as seguintes soluções:  $9,48 \times 10^{-3}$ ,  $1,42 \times 10^{-2}$ ,  $1,90 \times 10^{-2}$ ,  $4,74 \times 10^{-2}$ ,  $9,48 \times 10^{-2}$  e  $1,90 \times 10^{-1}$  g L $^{-1}$ .

Para preparar a solução tampão, utilizou-se uma solução de hidróxido de sódio (NaOH - Sigma) 1,0 mol L $^{-1}$  e outra solução de ácido acético glacial ( $CH_3COOH$  - Merck) com concentração igual a 1,0 mol L $^{-1}$ .

Foram preparadas soluções de Metaperiodato de sódio ( $NaIO_4$  - Sigma) nas concentrações de 0,10; 0,55 e 1,00 g. L $^{-1}$

Foi preparada uma solução de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$  MM 293,8 g mol $^{-1}$  – Merck)  $2,174 \times 10^{-1}$  g L $^{-1}$ .

#### **ii) Análise das Amostras Reais.**

As soluções de Cloridrato de dopamina ( $C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl$ ) foram preparadas a partir de uma solução estoque de  $2,0 \times 10^{-2}$  g L $^{-1}$ , ficando as concentrações após diluição entre 1,0 e  $6,0 \times 10^{-2}$  g L $^{-1}$ , enquanto que as amostras reais foram preparadas a partir de amostras (ampolas injetáveis)

de concentração nominal igual a 5,0 g. L<sup>-1</sup>, tendo como concentração após a diluição 3,5 x 10<sup>-2</sup> g L<sup>-1</sup>.

A concentração de solução de dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) para a análise das amostras reais foi de 8,4 x 10<sup>-2</sup> g. L<sup>-1</sup>.

Na determinação por HPLC, foi utilizado como fase móvel, uma solução contendo 260 mL de Acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN - J. T. Baker) misturada com 1.760 mL de solução contendo 1:1000 de 1-octanosulfonato de sódio (C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>NaO<sub>3</sub>S.H<sub>2</sub>O MM. 234,29 - Vetec) diluído em uma solução 1:100 de ácido acético. Como solução de resolução foi utilizada uma solução de ácido benzóico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> MM 122,1 g mol<sup>-1</sup> - Merck) 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>.

#### **4.2 – EQUIPAMENTOS.**

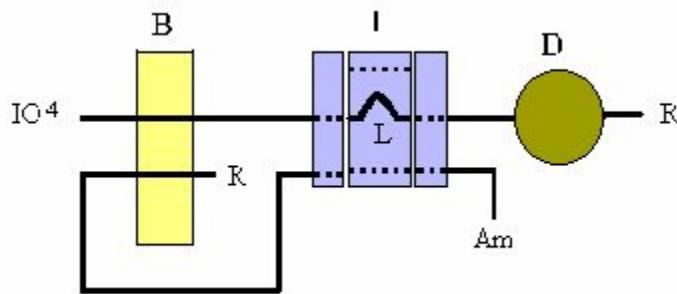
Para bombear as amostras originando o fluxo transportador foi utilizada uma bomba peristáltica Gilson modelo Minipuls 3 e um injetor comutador foi utilizado para a introdução das amostras em fluxo. Um colorímetro, construído no laboratório empregando um LED ( $\lambda_{\text{emissão}} = 464$  nm ) foi empregado na leitura do sinal analítico. A aquisição e visualização dos dados analíticos foi realizada por um microcomputador PC. Uma interface eletrônica, marca Advantech, modelo PCL-818L, foi conectada ao computador e ao colorímetro para a aquisição dos dados analíticos.

Para a validação do método analítico foi utilizado um equipamento HPLC Shimadzu CLASS-VP V.6,1.

Foram utilizados ainda no preparo das soluções uma balança analítica Bel Engineering e um PHmetro digital – Del Lab modelo DL-PHT.

#### 4.2.1 – SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO.

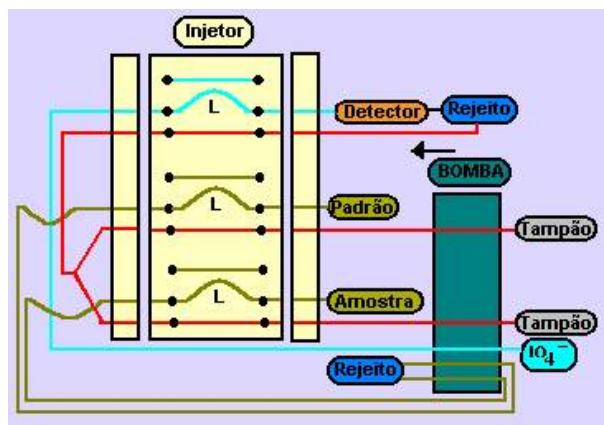
O sistema de análise em fluxo utilizado durante o planejamento factorial é mostrado na **Figura 8**. Os padrões de dopamina são introduzidos em um fluxo contínuo, tendo uma solução de metaperiodato de sódio como fluido transportador.



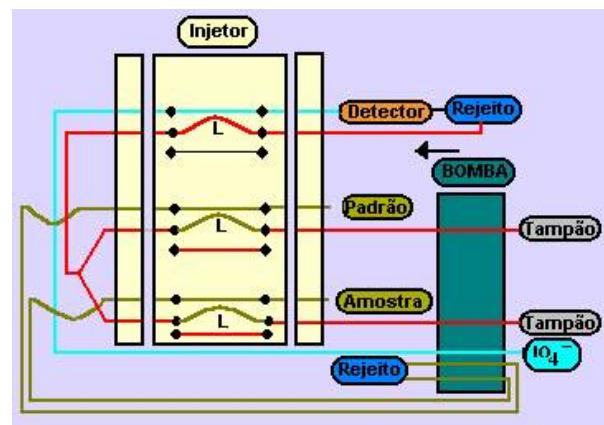
**Figura 8** – Diagrama de fluxos. **B**: bomba peristáltica, **I**: injetor (posição de injeção), **D**: detector (colorímetro a base de LED), **L**: alça de amostragem “loop”, **R**: rejeito, **Am**: solução amostra.

O sistema FIA foi alterado para a determinação da dopamina em fármacos, devido a existência de efeito de matriz. Foi então, proposto um novo sistema FIA que emprega as estratégias de zonas coalescentes (“merging zones”) e amostragem de zona dispersa (“zone sampling”), apresentado na **Figura 9**, para a realização do método por adições de analito. Volumes iguais a  $400 \mu\text{L}$  de solução padrão (reagente,  $1,0 - 6,0 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ ) e solução amostra (fármaco,  $3,5 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ ) são introduzidos através de “loops” diferentes. Após suas amostragens, o injetor-comutador tem sua posição alterada e estas soluções após se misturarem em uma confluência, preenchendo um terceiro “loop”  $400\mu\text{L}$ . Nesta etapa do processo de amostragem, como fluido transportador utiliza-se uma solução

tampão 4,8 ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  0,02 mol L<sup>-1</sup>). Após completar um tempo definido experimentalmente (22s), altera-se novamente a posição do injetor-comutador voltando-se para a posição inicial sendo a mistura de ambas as soluções (amostra + padrão) direcionada para o detector, tendo-se agora como fluido transportador uma solução de metaperiodato de sódio.



**Figura 9A.**

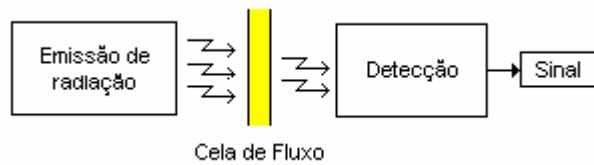


**Figura 9B.**

**Figura 9** – Diagrama de fluxos para a análise de dopamina em fármacos. **9A:** Injetor na posição de enchimento dos “loops” e análise. **9B:** Injetor na posição de amostragem de zonas dispersa.

#### 4.2.2 – FOTÔMETRO

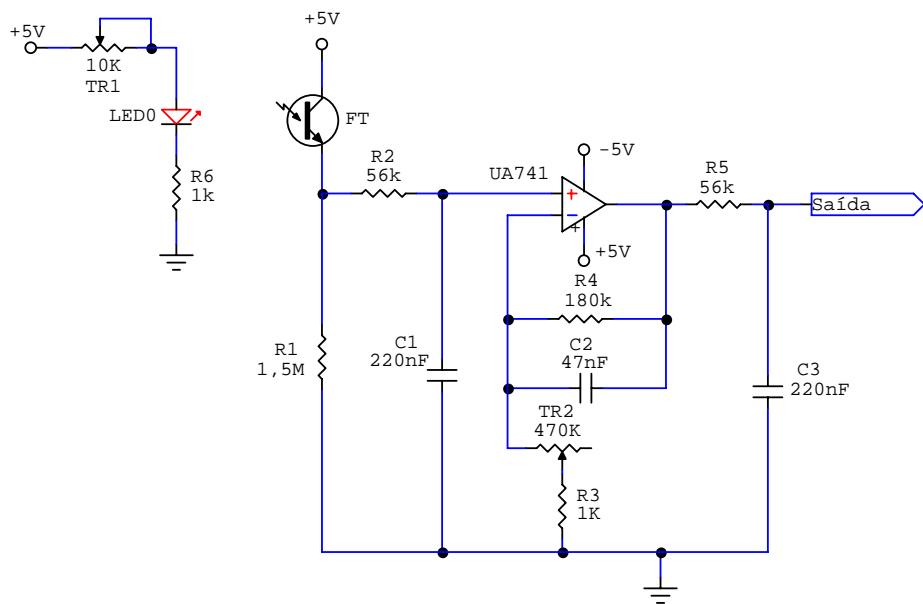
O fotômetro construído pode ser separado em dois blocos básicos, como ilustrado na **Figura 9**. O primeiro desses blocos é responsável pela emissão de radiação e o segundo trata da detecção da radiação que não foi absorvida pela solução. Ao fotômetro foi acoplada uma cela de fluxo em acrílico construída no laboratório.



**Figura 10 – Esquema básico do fotômetro.**

O diagrama do circuito eletrônico do fotômetro é apresentado na **Figura 10**. A parte do circuito responsável pela emissão de luz é formada por um LED (“*Light Emitting Diode*” ou Diodo Emissor de Luz), que emite radiação numa faixa de comprimento, com emissão máxima em no comprimento de onda de 466 nm, e um resistor variável TR1 que regula a intensidade de radiação emitida, de modo que o fototransistor no circuito de detecção não fique saturado.

O circuito detector tem, como principal componente, o fototransistor FT que capta a radiação emitida pelo LED. O fototransistor tem um encapsulamento transparente que permite a radiação externa atingir uma pastilha semicondutora interna. A corrente que circula nos terminais do fototransistor é então gerada através de efeito fotoelétrico, o que faz com que ela seja proporcional à intensidade de luz incidente. As variações de corrente nos terminais do fototransistor são levadas para a entrada não inversora do amplificador operacional via resistor R2 de 56KΩ, onde será amplificado. O ganho do amplificador é determinado pelo resistor variável TR2 de 470KΩ.

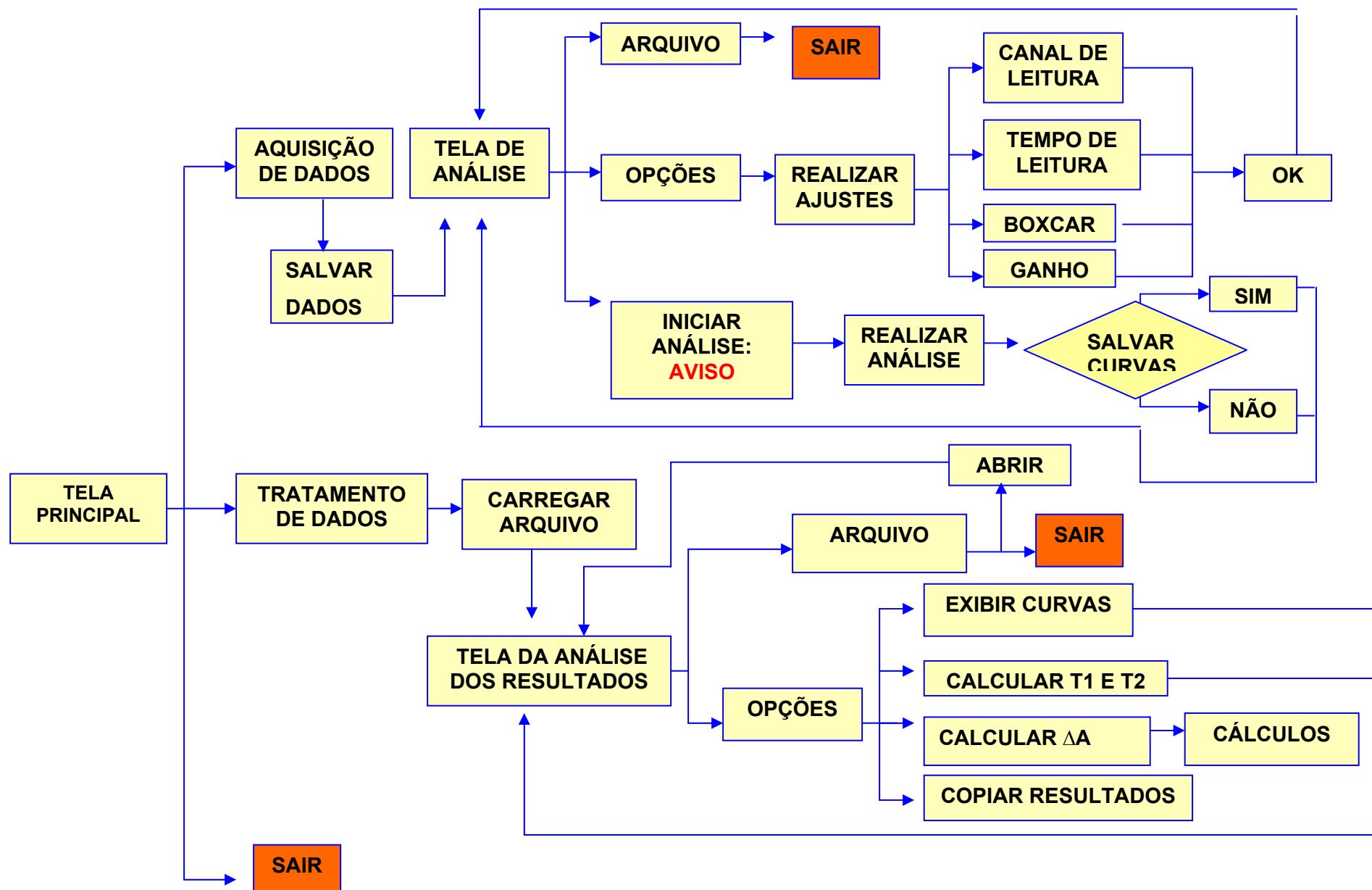


**Figura 11 – Diagrama do circuito eletrônico desenvolvido para o fotômetro.**

O sinal final amplificado é proporcional à intensidade de luz incidente no fototransistor, sendo enviado, através do resistor R5, a um sistema de aquisição de dados via computador.

#### 4.3 – PROGRAMA DE CONTROLE

Para realizar a aquisição, tratamento e apresentação dos dados obtidos com o sistema proposto foi desenvolvido um programa apresentando uma interface amigável com o analista. Quando se inicia o programa, a tela principal é acionada. Nela pode-se direcionar qual atividade será realizada, sejam procedimentos de análise, tratamentos de dados, ou sair do programa. Na **Figura 12**, apresenta-se o fluxograma para o programa desenvolvido.



**FIGURA 12 – Fluxograma do programa de aquisição e tratamento de dados.**

#### **4.3.1 AQUISIÇÃO DE DADOS.**

Utiliza-se este diretório quando se pretende realizar uma análise. Logo após ser acionado, é aberta uma tela de arquivamento dos dados. Nesta janela devemos indicar em qual endereço do computador as informações obtidas na análise serão arquivadas em formato de texto (.txt). Esta opção de arquivamento é executada antes de serem iniciadas as análises, para se evitar a perda das informações por motivos, tais como queda de energia ou falha no sistema . Após esta operação é aberta a tela de análise.

Nesta tela, estão os comandos relacionados à aquisição dos dados analíticos, (canal de leitura, tempo de leitura, boxcar e ganho), presentes no comando ajustes. O canal de leitura está relacionado com o canal da interface, no qual está conectado o fotômetro para a realização da leitura e conversão do sinal de analógico para digital, cujo valor é enviado ao computador onde é arquivado. O tempo de leitura é o tempo de duração da aquisição dos dados, desde a leitura do branco, logo quando a amostra é injetada, até o término da análise. Para as análises de dopamina foi selecionado um tempo de 75 s. O boxcar está relacionado com a quantidade de pontos em um determinado período que o programa irá calcular a média, visando aumentar a precisão das medidas. O ganho está relacionado com a faixa de tensão, na qual o sinal eletrônico analógico do fotômetro é capaz de ser convertido em um sinal digital pela interface. O ganho 3 (-0,625 a +0,625 Volts) foi utilizado neste trabalho. Confirmadas as condições de aquisição dos dados retorna-se para a tela principal e inicia-se as análises.

Para se iniciar a determinação , o injetor deve estar na posição de amostragem . Após preencher-se o “loop” com a amostra, altera-se o injetor para a posição de análise, onde um sinal elétrico é enviado para a placa indicando a inserção da amostra e consequentemente o início das medidas.

No término de cada medida, abre-se uma tela onde se deve escolher entre salvar a curva obtida ou não. Em ambos os casos, afirmativo ou negativo, retorna-se a tela principal para efetuar-se uma nova medida. Este

procedimento repete-se até que sejam analisadas todas as amostras necessárias para a construção da curva analítica.

#### **4.3.2 - TRATAMENTO DOS DADOS**

Para o tratamento dos dados é necessário abrir o arquivo da análise realizada... Em seguida inicia-se uma tela com opções para o tratamento analítico das informações obtidas nas análises (exibir curvas, copiar resultados, calcular  $t_1$ ,  $t_2$  e calcular a variação de absorbância –  $\Delta A$ ). Os procedimentos para o tratamento de dados são os seguintes:

A opção “exibir curvas” mostra todas as curvas obtidas na análise.

As variáveis  $t_1$  e  $t_2$  representam os tempos onde as medidas de absorbância são realizadas para análise e seus valores são escolhidos para que uma variação máxima de absorbância seja obtida. A escolha destes tempos deve ser feita a cada modificação do sistema de análise; uma vez definidas as condições experimentais, este procedimento não precisa mais ser realizado.

Uma vez definidos  $t_1$  e  $t_2$ , calcula-se o valor da variação de absorbância,  $\Delta A$ .

Com os valores de  $\Delta A$ , calcula-se a média para cada concentração das soluções injetadas e o desvio padrão, ambas através da opção “copiar resultados”, onde os resultados obtidos são transferidos para o programa Excel. A “opção” cálculos é responsável pela realização dos cálculos necessários para a determinação da concentração da amostra pelo Método de Adição do Analito. O gráfico variação de absorbância ( $\Delta A$ ) versus concentração de dopamina também é apresentado.

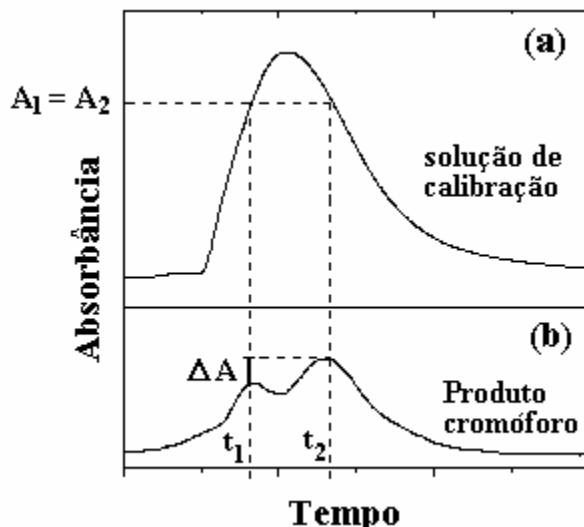
## 4.4 – PROCEDIMENTO ANALÍTICO

De fato dois procedimentos analíticos foram empregados neste trabalho, um durante a etapa de otimização do sistema e um segundo, com pequenas modificações, foi adaptado para a realização do Método de Adição do Analito na determinação de dopamina.

### 4.4.1 – OTIMIZAÇÃO

Duas etapas são necessárias ao procedimento de análise, calibração e a análise propriamente dita. Na etapa de calibração, uma solução cromófora com capacidade absorver radiação no mesmo comprimento de onda do analito é utilizada para determinar as concentrações relativas do analito, dopamina, na etapa de análise. Como solução de calibração, foi utilizada uma solução de dicromato de potássio  $2,174 \times 10^{-1}$  g L<sup>-1</sup>. Uma vez que ambas soluções são aquosas e diluídas, considera-se que estas sofrem dispersões iguais. Em seqüência, inicia-se a etapa de análise, onde a amostra é inserida no fluido transportador reacional, solução de metaperiodato, sendo que a leitura do branco é realizada imediatamente após a injeção de cada amostra. As curvas, sinal versus tempo, encontradas para as etapas de calibração e análise são apresentadas na **Figura 13**.

Na etapa de calibração, são encontrados dois pontos (tempos), em torno do máximo de concentração, com mesma absorbância,  $A_1 = A_2$ , que significa mesma concentração para a solução de calibração e, consequentemente, para o analito. Após a calibração da dispersão, são medidas as absorbâncias do produto reacional para os dois tempos,  $t_1$  e  $t_2$ , na etapa de análise. Apesar da mesma concentração inicial do analito, deve haver uma mudança na absorbância referente aos diferentes graus da reação química. A variação de absorbância,  $\Delta A$ , é então utilizada como sinal analítico.



**Figura 13 –** Curva absorbância versus tempo para **(a)** solução de calibração,  $K_2Cr_2O_7 8,4 \times 10^{-2} g L^{-1}$  e **(b)** produto da reação entre dopamina e o reagente metaperiodato de sódio.

Os tempos  $t_1$  e  $t_2$  devem gerar um máximo de variação de absorbância na etapa de análise e são definidos previamente. Na prática, apenas um deles,  $t_1$ , é pré-definido e o segundo é encontrado pelo programa em cada medida realizada. Com isto evita-se erros devido a alterações na dispersão das soluções, devido a desgastes dos tubos ou da bomba.

#### 4.4.2 – DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA EM FÁRMACOS.

Neste caso, o procedimento analítico permanece sendo realizado em duas etapas: a calibração e a análise propriamente dita, porém, a inserção das soluções é levemente modificada. Na etapa de calibração a solução cromófora,  $K_2Cr_2O_7 2,174 \times 10^{-1} g L^{-1}$ , é inserida a partir dos dois “loops”, relativos à amostra e à solução padrão (**Figura 9**), em direção ao terceiro e após 22 segundos, o injetor comutador tem sua posição alterada e a solução de dicromato migra em direção ao detector. Na etapa de análise, a amostra e a solução padrão são inseridas cada uma em seu “loop”, repetido os passos

da etapa de calibração. O valor de  $\Delta A$  também é encontrado da mesma forma.

#### 4.5 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A metodologia proposta foi otimizada através da realização de um planejamento fatorial  $2^4$  [56], acrescido de um ponto central em triplicata. As variáveis estudadas foram volume de amostra inserido, concentração do reagente metaperiodato, comprimento do reator e vazão do fluido transportador (metaperiodato). As respostas (parâmetros analíticos) avaliadas foram: sensibilidade, coeficiente de regressão linear, desvio padrão relativo, ordens de grandeza da faixa dinâmica de concentração, limite de quantificação e tempo de análise. A sensibilidade (definida pela inclinação da curva de calibração) e o coeficiente de regressão linear foram obtidos dentro da faixa dinâmica de concentração de cada condição experimental utilizando amostras testes de dopamina com concentrações  $9,48 \times 10^{-3}$ ;  $1,42 \times 10^{-2}$ ;  $1,90 \times 10^{-2}$ ;  $4,74 \times 10^{-2}$ ;  $9,48 \times 10^{-2}$  e  $1,90 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$ . O limite de quantificação [57] foi calculado de acordo com a equação:

$$LQ = \frac{10 \times s_{br}}{S},$$

Onde  $s_{br}$  é o desvio padrão para o branco e  $S$  a inclinação da curva de calibração.

Na **Tabela 1**, estão apresentadas as variáveis e seus níveis selecionados para o processo de otimização. Esses níveis foram escolhidos baseados em experimentos preliminares univariados conforme a convenção estabelecida usualmente, os dois valores extremos dos níveis são identificados como -1 (nível inferior) e +1 (nível superior). Os dezenove ensaios (dezesseis para o planejamento  $2^4$  e três no ponto central) foram realizados aleatoriamente.

**Tabela 1** – Variáveis do sistema (fatores) e seus níveis para a otimização da metodologia proposta, aplicando um planejamento fatorial 2<sup>4</sup>.

Fatores	Níveis		
	-	Central	+
Vazão (ml.min <sup>-1</sup> ), <b>F</b>	0,70	0,85	1,00
Volume de amostra (μl), <b>V<sub>am</sub></b>	200	300	400
Concentração do metaperiodato (g l <sup>-1</sup> ), <b>C</b>	0,1	0,55	1
Comprimento do reator (cm), <b>L<sub>R</sub></b>	20	60	100

#### 4.6 – FUNÇÃO DESEJABILIDADE

Os valores admitidos referente à equação da deseabilidade ( $d_n$ ) bem como os valores dos expoentes adotados para as diferentes respostas são apresentados na **Tabela 2**. O expoente 1 foi selecionado para a resposta limite de quantificação, uma vez que a concentração de dopamina nas amostras reais é elevada e com pouca variação, necessitando de diluição para a sua determinação pela metodologia proposta. Para as outras respostas o expoente dois foi adotado. A *Faixa Dinâmica de Concentração* não foi incluída no cálculo da deseabilidade, pois as variáveis estudadas não apresentaram efeitos estatisticamente significativos para esta resposta, como será demonstrado mais adiante. Os valores escolhidos de  $R_{ideal}$ ,  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  e dos expoentes foram selecionados arbitrariamente como sendo os que apresentam a melhor condição para a função deseabilidade.

**Tabela 2** – Valores de  $R_{ideal}$ ,  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  e dos expoentes para as diferentes respostas, utilizadas na Função Desejabilidade.

<b>Respostas</b>	<b><math>R_{ideal}</math></b>	<b><math>R_{min}</math></b>	<b><math>R_{max}</math></b>	<b>Expoente</b>
Sensibilidade, <b>S</b>	100	40	—	2
Coeficiente de regressão linear, <b>R</b>	1,0	0,990	—	2
Desvio padrão relativo; DPR	2,0	—	5,0	2
Limite de quantificação; LQ ( $\mu.l^{-1}$ )	7,6	—	13,3	1
Tempo de análise; TA (s)	5	—	55	2

## **5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES**

---

### **5.1 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL**

Os valores para as diferentes respostas estudadas (sensibilidade, S; coeficiente de regressão linear, R; desvio padrão relativo, DPR; ordens de grandeza da faixa dinâmica de concentração, FDC; limite de quantificação, LQ; e tempo de análise, TA, obtidos nos dezenove ensaios referentes ao planejamento fatorial  $2^4$ , com três repetições autênticas no ponto central estão apresentados na **Tabela 3**).

Os efeitos principais e de interação até terceira ordem, bem como seus erros padrão são apresentados na **Tabela 4**. Os efeitos considerados significativos ao nível de 95% de confiança estão destacados em negrito. No caso da resposta *faixa dinâmica linear de concentração*, observou-se que as variáveis estudadas não mostraram efeitos estatisticamente significativos. Assim, esta resposta, como já comentado, não foi considerada na otimização do sistema utilizando a função deseabilidade. Para todas as outras respostas são significativos vários efeitos de interação de segunda e terceira ordem, evidenciando que a otimização do sistema não poderia ser realizada de forma univariada.

As interpretações dos efeitos para as respostas *Sensibilidade*, *Desvio Padrão Relativo* e *Tempo de Análise* são apresentadas separadamente nas seções que seguem.

Os efeitos mostraram-se significativos para o coeficiente de correlação devido a pouca variabilidade das respostas no ponto central e suas interpretações não são necessárias para a compreensão do sistema desenvolvido. Além do mais, observa-se que, exceto pela condição experimental 8 (tabela 3), os valores de **R** são superiores a 0,99. O limite de quantificação, por sua vez, também não é uma resposta que mereça

interpretações mais detalhadas, pois, como já citado, os teores de Dopamina nas amostras reais são elevados.

**Tabela 3** – Respostas para um planejamento fatorial completo  $2^4$  com três repetições autênticas no ponto central. **S**: sensibilidade, **R**: coeficiente de correlação, **DPR**: desvio padrão relativo, **FDC**: ordens de grandeza da faixa dinâmica de concentração, **LQ**: limite de quantificação, **TA**: tempo de análise.

Condição	Fatores / Níveis					Respostas				
	F (ml min <sup>-1</sup> )	V <sub>am</sub> (μl)	C <sup>-</sup> (g l <sup>-1</sup> )	R <sub>e</sub> (cm)	S	R	DPR (%)	FDC	LQ (g l <sup>-1</sup> )	TA (s)
1	-	-	-	-	57,9	1,000	3,01	3,33	1,26 x-10 <sup>-2</sup>	29,3
2	+	-	-	-	46,0	0,999	4,59	3,33	1,12 x-10 <sup>-2</sup>	16,1
3	-	+	-	-	62,8	1,000	4,50	3,33	1,39 x-10 <sup>-2</sup>	41,9
4	+	+	-	-	60,2	0,999	3,18	5,00	8,98 x-10 <sup>-2</sup>	31,3
5	-	-	+	-	50,4	0,999	5,88	5,00	2,25 x-10 <sup>-2</sup>	22,6
6	+	-	+	-	40,7	1,000	7,32	4,00	2,28 x-10 <sup>-2</sup>	14,5
7	-	+	+	-	89,7	1,000	0,85	3,33	1,03 x-10 <sup>-2</sup>	34,4
8	+	+	+	-	87,4	1,000	1,73	3,33	1,32 x-10 <sup>-2</sup>	23,4
9	-	-	-	+	31,2	0,979	2,45	5,00	1,25 x-10 <sup>-2</sup>	40,6
10	+	-	-	+	31,2	0,995	8,00	5,00	8,75 x-10 <sup>-2</sup>	30,1
11	-	+	-	+	62,5	0,999	4,43	5,00	7,73 x-10 <sup>-2</sup>	73,8
12	+	+	-	+	60,6	1,000	1,75	3,33	9,97 x-10 <sup>-2</sup>	36,1
13	-	-	+	+	57,7	1,000	4,13	20,00	7,34 x-10 <sup>-2</sup>	53,4
14	+	-	+	+	9,3	1,000	35,31	4,00	3,23 x-10 <sup>-2</sup>	38,9
15	-	+	+	+	40,8	0,991	1,63	10,00	1,37 x-10 <sup>-2</sup>	100,0
16	+	+	+	+	90,5	0,998	3,40	5,00	8,11 x-10 <sup>-2</sup>	32,3
17	0	0	0	0	64,8	1,000	1,50	3,33	1,02 x-10 <sup>-2</sup>	25,2
18	0	0	0	0	58,1	0,999	3,84	6,67	1,35 x-10 <sup>-2</sup>	29,3
19	0	0	0	0	57,6	1,000	4,10	5,00	1,40 x-10 <sup>-2</sup>	29,9

**Tabela 4** – Efeitos principais e de interação (segunda e terceira ordem) para o planejamento fatorial  $2^4$ . Vazão do fluido transportador (**F**), volume injetado da amostra (**V<sub>am</sub>**), concentração da solução de metaperiodato (**C**), comprimento do reator (**L<sub>R</sub>**). Os efeitos estatisticamente significativos no nível de 95% de confiança estão em negrito.

Efeitos	Estimativas ± erro padrão					
	S	R	DPR (%)	FDC(ordens)	LQ (g l <sup>-1</sup> )	TA (s)
'	54,8 ± 1,0	0,9978 ± 0,0001	5,3 ± 0,3	<b>5,4 ± 0,4</b>	<b>0,013 ± 0,0005</b>	37,0 ± 0,6
<b>F</b>	-3,4 ± 2,0	<b>0,0029 ± 0,0003</b>	<b>4,8 ± 0,7</b>	-2,6 ± 0,8	0,003 ± 0,0010	<b>-21,7 ± 1,3</b>
<b>V<sub>am</sub></b>	<b>28,8 ± 2,0</b>	<b>0,0019 ± 0,0003</b>	<b>-6,1 ± 0,7</b>	-1,4 ± 0,8	<b>-0,007 ± 0,0010</b>	<b>16,0 ± 1,3</b>
<b>C</b>	6,6 ± 2,0	<b>0,0021 ± 0,0003</b>	<b>3,5 ± 0,7</b>	2,7 ± 0,8	<b>0,007 ± 0,0010</b>	2,6 ± 1,3
<b>L<sub>R</sub></b>	<b>-13,9 ± 2,0</b>	<b>-0,0044 ± 0,0003</b>	<b>3,7 ± 0,7</b>	3,3 ± 0,8	-0,000 ± 0,0010	<b>24,0 ± 1,3</b>
<b>F*V<sub>am</sub></b>	<b>14,1 ± 2,0</b>	-0,0011 ± 0,0003	<b>-5,1 ± 0,7</b>	1,5 ± 0,8	-0,002 ± 0,0010	<b>-10,1 ± 1,3</b>
<b>F*C</b>	0,7 ± 2,0	-0,0009 ± 0,0003	<b>4,0 ± 0,7</b>	-2,6 ± 0,8	0,002 ± 0,0010	-3,7 ± 1,3
<b>F* L<sub>R</sub></b>	3,2 ± 2,0	<b>0,0031 ± 0,0003</b>	<b>4,2 ± 0,7</b>	-2,9 ± 0,8	0,001 ± 0,0010	<b>-10,9 ± 1,3</b>
<b>V<sub>am</sub>*C</b>	<b>8,8 ± 2,0</b>	<b>-0,0044 ± 0,0003</b>	<b>-5,1 ± 0,7</b>	-1,4 ± 0,8	-0,003 ± 0,0010	-0,8 ± 1,3
<b>V<sub>am</sub>* L<sub>R</sub></b>	2,5 ± 2,0	<b>0,0016 ± 0,0003</b>	<b>-3,5 ± 0,7</b>	-1,3 ± 0,8	0,002 ± 0,0010	3,8 ± 1,3
<b>C* L<sub>R</sub></b>	-3,6 ± 2,0	<b>0,0019 ± 0,0003</b>	<b>3,4 ± 0,7</b>	2,5 ± 0,8	-0,002 ± 0,0010	<b>8,5 ± 1,3</b>
<b>F*V<sub>am</sub>*C</b>	<b>12,3 ± 2,0</b>	<b>0,0026 ± 0,0003</b>	-2,4 ± 0,7	1,5 ± 0,8	<b>-0,005 ± 0,0010</b>	-4,0 ± 1,3
<b>F*V<sub>am</sub>* L<sub>R</sub></b>	<b>9,9 ± 2,0</b>	-0,0009 ± 0,0003	<b>-4,3 ± 0,7</b>	0,8 ± 0,8	<b>-0,005 ± 0,0010</b>	<b>-10,0 ± 1,3</b>
<b>F*C* L<sub>R</sub></b>	0,1 ± 2,0	<b>-0,0016 ± 0,0003</b>	<b>3,5 ± 0,7</b>	-2,1 ± 0,8	0,003 ± 0,0010	-4,8 ± 1,3
<b>V<sub>am</sub>*C* L<sub>R</sub></b>	-7,9 ± 2,0	<b>-0,0046 ± 0,0003</b>	-2,4 ± 0,7	-0,4 ± 0,8	-0,001 ± 0,0010	1,0 ± 1,3
t <sub>(2,95%)</sub> x s	<b>8,6</b>	<b>0,0013</b>	<b>3,0</b>	<b>3,4</b>	<b>0,004</b>	<b>5,6</b>

## 5.2 – ANÁLISE DOS EFEITOS

Para a análise dos efeitos foi utilizado o programa “Statistica” versão 5.1, calculando as interações de até três fatores.

### 5.2.1 – SENSIBILIDADE

Para facilitar a interpretação dos efeitos, devido a presença de interações, foram construídas as tabelas 5 a 8.

**Tabela 5** – Avaliação do efeito da vazão (F) na sensibilidade.

Condições	V <sub>am</sub> (μL)	C(g L <sup>-1</sup> )	L <sub>R</sub> (cm)	Efeitos
1	200	0,1	20	-11,9
2	400	0,1	20	-2,6
3	200	1,0	20	-9,8
4	400	1,0	20	-2,3
5	200	0,1	100	-0,04
6	400	0,1	100	-1,9
7	200	1,0	100	-48,4
8	400	1,0	100	49,7

Os efeitos mais significativos foram observados quando a concentração e o reator encontram-se simultaneamente em seus níveis superiores (1,0 g/L e 100 cm), entretanto com comportamento oposto dependendo do loop. Quando se altera a vazão do nível (-) para o nível (+), com o “loop” de (200 μL) mantendo a concentração de metaperiodato de sódio de 1,0 g L<sup>-1</sup> e com um reator de 100 cm, tem-se uma diminuição de 48,4% na sensibilidade, enquanto que, com o loop de 400 μL, temos um aumento de 49,7% na sensibilidade. Isto fica mais fácil de compreender uma vez que as variáveis que influenciam neste caso são a dispersão e a taxa de reação química (cinética da reação). Com o “loop” de 400 μL

(situação 8), o tempo de reação tanto em 0,70 quanto em 1,0  $\text{ml min}^{-1}$  foi suficientemente longo para que a diferença de sinal devido à taxa de reação química tenha sido insignificante. Neste caso, a variável que mais influenciou foi a dispersão. A resposta obtida a 1,0  $\text{ml min}^{-1}$  foi maior, uma vez que a dispersão é menor, a 0,70  $\text{ml min}^{-1}$ , promovendo um aumento na sensibilidade. Entretanto, com o “loop” de 200  $\mu\text{L}$  (situação 7), na vazão de 0,70  $\text{ml min}^{-1}$ , tem-se um tempo maior para a reação química que na vazão de 1,0  $\text{ml min}^{-1}$ , contribuindo para o aumento da sensibilidade. A dispersão ocorrida nesta situação não contribuiu significativamente, como na situação 8. Nas situações de dois a seis, a vazão apresentou efeitos pouco significativos.

**Tabela 6 – Avaliação do efeito do loop ( $V_{\text{am}}$ ) na sensibilidade.**

Condição	F ( $\text{mL min}^{-1}$ )	C ( $\text{g L}^{-1}$ )	L <sub>R</sub> (cm)	Efeitos
1	0,70	0,1	20	4,9
2	1,0	0,1	20	14,3
3	0,70	1,0	20	39,3
4	1,0	1,0	20	46,7
5	0,70	0,1	100	-30,2
6	1,0	0,1	100	29,4
7	0,70	1,0	100	-16,9
8	1,0	1,0	100	81,2

O aumento do “loop”, em geral, apresenta efeito no sentido de aumentar a sensibilidade. Apenas nas condições 5 e 7 (vazão igual a 0,70  $\text{mL min}^{-1}$  e reator igual 100 cm), observa-se uma diminuição na sensibilidade.

Para melhor compreender esta questão, é necessário conhecer como a amostra é processada no sistema. Quando a alíquota da amostra é inserida em fluido transportador com o reagente metaperiodato. Independente do loop empregado, a fração anterior da alíquota da amostra inicia o contato e,

portanto, a reação, a uma mesma distância (distância entre o injetor e o detector) com relação ao detector. Porém, com “loops” de diferentes tamanhos, suas frações posteriores estarão a uma distância maior do detector, permitindo um maior tempo de reação. Como consequência, o aumento do loop produz, no geral, um aumento na sensibilidade. Por outro lado, a maior distância das frações posteriores da alíquota da amostra no “loop” de 400  $\mu\text{L}$  também provoca uma maior dispersão da amostra, o que contribui na diminuição do sinal, e consequentemente, na sensibilidade. Este seria o fator predominante, nas condições 5 e 7 (vazão de  $0,70 \text{ mL min}^{-1}$  e o reator de 100 cm), uma vez que, com o loop de 200  $\mu\text{L}$ , o tempo de reação é suficiente para que a reação ocorra quase completamente. O efeito mais significativo foi observado na condição oito, quando todos os fatores estão no nível superior, com um aumento de 81,2% na sensibilidade. Neste caso, os níveis dos fatores, com exceção da vazão, permitem um aumento no tempo de reação, o que deve ter sido o fator preponderante para a alta sensibilidade.

**Tabela 7 – Avaliação do efeito da concentração (C) na sensibilidade.**

Condição	F( $\text{mL min}^{-1}$ )	V <sub>am</sub> ( $\mu\text{L}$ )	R <sub>e</sub> (cm)	Efeitos
1	0,70	200	20	-7,4
2	1,0	200	20	-5,3
3	0,70	400	20	26,9
4	1,0	400	20	27,1
5	0,70	200	100	26,5
6	1,0	200	100	-21,9
7	0,70	400	100	-21,7
8	1,0	400	100	29,8

O efeito do aumento da concentração de metaperiodato leva a um aumento médio de 27,6 na sensibilidade nas condições experimentais 3,

4, 5 e 8. Já nas condições 6 e 7 ocorre o oposto. Há uma diminuição na sensibilidade de 21,8, em média. Quando o  $V_{am}$  e  $R_e$  estão ambos no nível (-), condições 1 e 2, a elevação de  $C$  não altera significativamente o valor da sensibilidade. As variações, não foram suficientemente sistemáticas e não permitiram chegar a alguma inferência.

**Tabela 8 – Avaliação do efeito reator ( $R_e$ ) na sensibilidade.**

Condição	F (mL min <sup>-1</sup> )	V <sub>am</sub> (μL)	C (g L <sup>-1</sup> )	Efeitos
1	0,70	200	0,1	-26,6
2	1,0	200	0,1	-14,8
3	0,70	400	0,1	-0,3
4	1,0	400	0,1	0,4
5	0,70	200	1,0	7,3
6	1,0	200	1,0	-31,4
7	0,70	400	1,0	- 48,9
8	1,0	400	1,0	3,1

O efeito apresentado pelo aumento do reator, em geral, é no sentido de diminuir sensibilidade e isto é mais bem observado na situação sete onde  $V_{am}$  e  $C$  estão nos níveis (+) e F no nível (-). Com o reator de 100 cm, foi observado que uma mudança nas outras condições não provocava alteração significativa na taxa de reação química. Desta forma, concluiu-se que o aumento da dispersão quando o reator sofre um aumento de 20 para 100 cm, foi o responsável pela maior parte dos efeitos negativos.

### 5.2.2 – DESVIO PADRÃO RELATIVO

Na tabela 3, observa-se um valor muito elevado para o desvio padrão relativo (35,3%) no experimento 14, que se torna altamente influente no cálculo dos efeitos, como pode ser observado nas **Tabelas 12 a 15** do

Apêndice. Além do experimento 14, os experimentos 2, 6 e 10, também tiveram altos valores para o desvio padrão relativo. Uma menor alíquota da amostra ( $200 \mu\text{L}$ ) e uma mais alta vazão ( $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) resultaram em um tempo de reação pequeno, e, consequentemente em baixos valores de  $\Delta A$ . Estes baixos valores foram então responsáveis pelo considerável desvio padrão relativo.

### 5.2.3 – TEMPO DE ANÁLISE

O efeito principal da elevação da vazão é no sentido de diminuir, em média, o tempo de análise em 21,7 s. Alterar o volume da amostra, de 200 para 400  $\mu\text{l}$  provoca, em média, uma elevação no tempo de análise de 16,0 s. O aumento do tamanho do reator também eleva o tempo de análise em 24,0 s, em média. Todos estes efeitos são esperados e não merecem interpretações detalhadas, embora sejam evidenciadas pelas interações significativas entre estas variáveis.

A concentração de metaperiodato, embora não apresente efeito principal significativo, interage com as outras variáveis. A **Tabela 9** apresenta os efeitos calculados para esta variável em cada condição experimental. Observa-se que, para o reator de 20 cm, o efeito de **C** é sempre no sentido de diminuir o tempo de análise (condições de 1 a 4). Quando se emprega o reator de 100 cm, a elevação de **C** contribui para um aumento no tempo de análise nas condições 5 a 7, e não causa efeito significativo na condição 8. Nenhuma explicação foi encontrada para estas observações.

**Tabela 9** – Avaliação do efeito da concentração de metaperiodato (C) no tempo de análise.

Condição	F (mL.min <sup>-1</sup> )	V <sub>am</sub> ( $\mu$ L)	L <sub>R</sub> (cm)	Efeitos
1	0,70	200	20	-7,0
2	1,0	400	20	-2,0
3	0,7	200	20	-7,5
4	1,0	400	20	-7,9
5	0,7	200	100	12,8
6	1,0	400	100	8,8
7	0,7	200	100	<b>26,2</b>
8	1,0	400	100	-3,8

### 5.3 – OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA

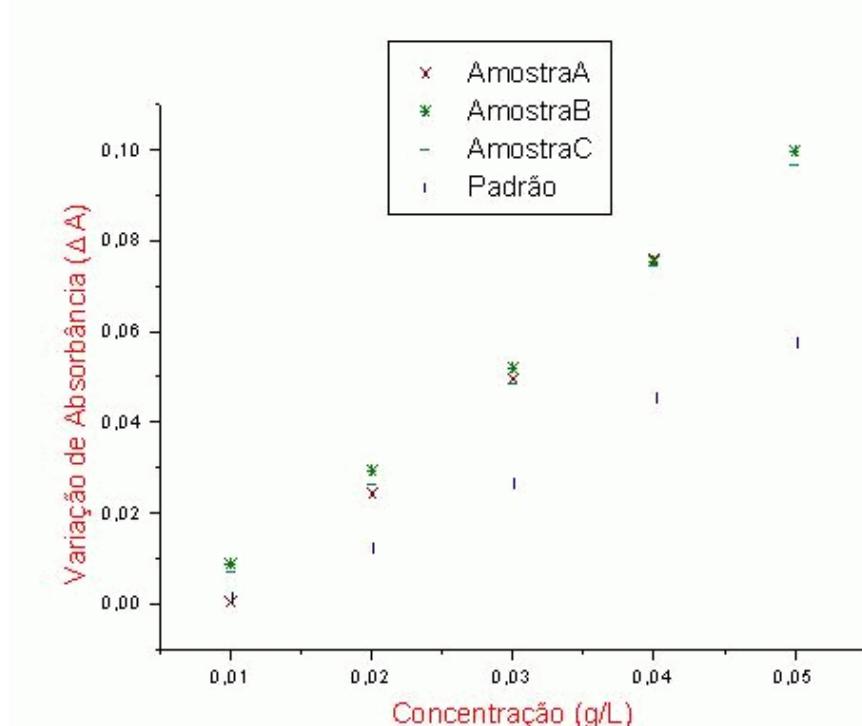
A **Tabela 10** apresenta os valores para as desejabilidades individuais obtidas para os experimentos realizados, considerando as condições impostas na **Tabela 2**. As situações 7 e 16 apresentaram valores para a função desejabilidade iguais. Entretanto, foi escolhida a condição 16 por apresentar um menor desvio padrão relativo e tempo de análise semelhante à condição 7, promovendo uma melhor precisão nos resultados sem haver perda significativa na freqüência analítica.

**Tabela 10 – Desejabilidades individuais encontradas para cada resposta no planejamento fatorial e seu respectivo valor para a função de desejabilidade.**

Situação	Fatores / Níveis					DESEJABILIDADES INDIVIDUAIS				FUNÇÃO DESEJABILIDADE
	F (ml min <sup>-1</sup> )	V <sub>am</sub> (μl)	C (g l <sup>-1</sup> )	R <sub>e</sub> (cm)	S	R	DPR (%)	LQ (g l <sup>-1</sup> )	TA (s)	
1	-	-	-	-	0,30	1,00	0,66	0,12	0,51	0,5
2	+	-	-	-	0,10	0,90	0,14	0,37	0,78	0,3
3	-	+	-	-	0,38	1,00	0,17	1,00	0,26	0,4
4	+	+	-	-	0,34	1,00	0,61	0,75	0,47	0,6
5	-	-	+	-	0,17	0,90	0,00	0,00	0,65	0
6	+	-	+	-	0,01	1,00	0,00	0,00	0,81	0
7	-	+	+	-	0,83	1,00	1,00	0,52	0,41	<u>0,7</u>
8	+	+	+	-	0,79	1,00	1,00	0,01	0,63	0,5
9	-	-	-	+	0,00	0,00	0,85	0,14	0,29	0
10	+	-	-	+	0,00	0,95	0,00	0,79	0,50	0
11	-	+	-	+	0,38	0,99	0,19	0,97	0,00	0
12	+	+	-	+	0,34	1,00	1,00	0,58	0,38	0,6
13	-	-	+	+	0,30	1,00	0,29	1,04	0,03	0,3
14	+	-	+	+	0,00	1,00	0,00	0,00	0,32	0
15	-	+	+	+	0,01	0,10	1,00	0,00	0,00	0
16	+	+	+	+	0,84	0,80	0,53	0,91	0,45	<u>0,7</u>
18	0	0	0	0	0,34	0,97	0,37	0,12	0,54	0,5

### 5.3 – ANÁLISE DE DOPAMINA EM FÁRMACOS

Com base na função desejabilidade, a condição escolhida para serem analisadas as amostras de medicamentos foi:  $F = 1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $V_{\text{am}} = 400 \mu\text{l}$ ,  $C = 1.0 \text{ g L}^{-1}$ ,  $R_e = 100 \text{ cm}$ . Foram analisadas quatro diferentes amostras de três fabricantes, obtidas no comércio especializado. Foi observado, entretanto, que as amostras apresentavam efeito de matriz, como demonstrado na **Figura 14**.

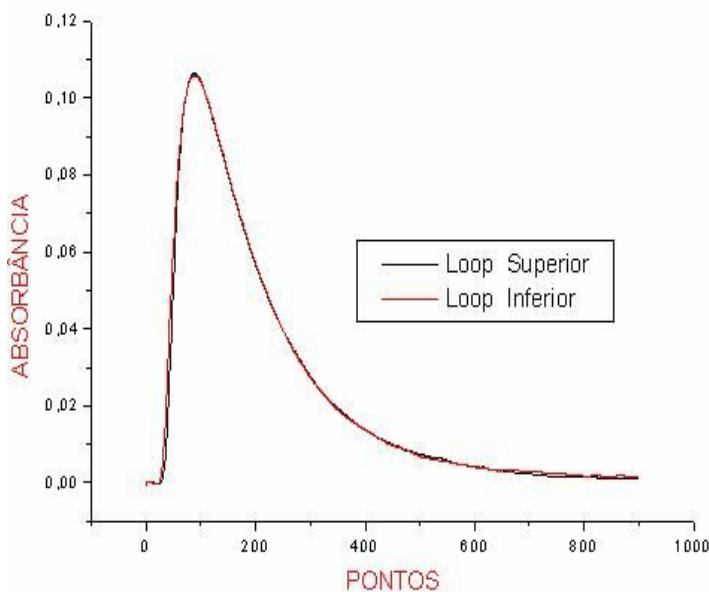


**Figura 14** – Curva Analítica para soluções padrão preparadas em água e para amostras de diferentes fabricantes.

Desta forma, resolveu-se, realizar o Método de Adição de Analito, e o sistema de análise foi alterado para o apresentado na **Figura 8**.

Uma necessidade para a realização do Método por Adição do Analito era que a concentração de dopamina, não apenas na alíquota da

amostra, mas também da solução padrão fosse a mesma nos tempos  $t_1$  e  $t_2$  (**Figura 15**), já que, durante todas as medidas realizadas, uma determinação cinética exige uma mesma concentração inicial do analito na amostra e o Método por Adição do Analito, no padrão adicionado. Neste sentido, o sistema foi construído com loops idênticos para a amostra e solução padrão, o que pode ser evidenciado pelo registro obtido para a solução de dicromato de potássio, introduzida através dos loops para a amostra e solução padrão em instantes diferentes.



**Figura 15** – Registro obtido para a solução de dicromato de potássio, introduzida em instantes diferentes, através dos loops para a amostra e solução padrão, através do sistema FIA apresentado na Figura 8.

Os resultados (**Tabela 11**) para as amostras de fármacos apresentaram uma boa concordância com aqueles obtidos pelo método padrão, recomendado pela Farmacopéia do Estados Unidos. Erros relativos menores que 3,3 % e um desvio padrão para 15 repetições em uma das amostras de 0,0033 g/L foram obtidos.

Foi possível com o sistema proposto realizar uma determinação a cada 75 segundos.

**Tabela 11** – Resultados, em g L<sup>-1</sup>, comparativos da concentração de dopamina em soluções injetáveis para a metodologia proposta e para a recomendada pela farmacopéia dos Estados Unidos da América.

Amostra*	FIA-cinético**	Farmacopéia	Erro
		americana	Relativo
A	5,13	5,01	2,39
A	4,93	5,12	-3,71
B	5,20	5,05	2,97
C	5,09	4,89	4,09

\*As amostras apresentavam uma concentração nominal de 5mg ml<sup>-1</sup>.

## **6 – CONCLUSÕES**

---

Neste trabalho foi possível de desenvolver um método cinético em sistema FIA para determinação de dopamina em fármacos sem a interrupção do fluxo, através da calibração do gradiente de concentração. Variáveis relacionadas com o método (volume de amostra inserido, concentração do reagente metaperiodato, comprimento do reator e vazão do fluido transportador, metaperiodato) foram, ainda estudadas, visando obter uma condição adequada, considerando os seguintes parâmetros analíticos: sensibilidade, coeficiente de regressão, desvio padrão relativo, ordens de grandeza da faixa dinâmica de concentração, limite de quantificação e tempo de análise.

Todavia devido às amostras de fármacos terem apresentado efeito de matriz, fez-se necessário o desenvolvimento de um sistema de análise em fluxo, baseado nas estratégias de zonas coalescentes e amostragem de zona, para a realização do Método por Adição de Analito.

Devido à existência do efeito de matriz, com a utilização do método por adição de padrão, diminuindo a freqüência de amostragem e construindo para cada amostra uma curva analítica.

Por outro lado, a possibilidade de implementação do Método por Adição do Analito, através da metodologia de determinação cinética proposta, demonstra sua robustez. Todavia, caso esta metodologia seja aplicada a análises de amostras que não apresentem efeito de matriz, a análise direta das amostras através de curva analítica, pode ser realizada, como descrito na etapa do planejamento fatorial.

## **7 – PROPOSTAS FUTURAS**

---

Estudar o sistema proposto com um intervalo maior nos níveis inferior e superior em um planejamento fatorial para as variáveis vazão, comprimento do reator e “loop”, visando possíveis resultados que venham a explicar as variações nas respostas de interesse estudadas.

Estudar como o efeito da variação de temperatura possa influenciar nas respostas de interesse no método proposto.

Desenvolver um sistema automático para a injeção da amostra em sistema FIA que utiliza amostragem de zonas.

Investigar possíveis aplicações da metodologia proposta para outros tipos de compostos, explorando-se a calibração de gradiente em FIA, bem como para outras catecolaminas.

## **8 – BIBLIOGRAFIA**

---

1. GOLDMAN, A. G.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1983.
2. USP 23. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, **The national formulary**, p. 549-550. Rockville, MD 1995.
3. SASTRY, C.S.P. Spectrometric determinations of some phenols with sodium metaperiodate and aminophenols. **Talanta** v. 29, p. 917-920, 1982.
4. NEVADO, J. J. B.; GALLEGOS, J. M. L.; LAGUNA, P. B. Flow-injection Spectrophotometric determination of adrenaline and dopamine with sodium hydroxide. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 571-577, 1996.
5. TROJANOWICZ, M. **Flow injection analysis: instrumentation and applications**,: World Scientific, 2000.
6. KRUG, F. J.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E. A. G. Commutation in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 179, p. 103-118, 1986.
7. RUZICKA, J. **Flow Injection Analysis**, New York: John Wiley & Sons, 1988.
8. VALCARCEL, M.; CASTRO, M. D. L. **Flow-injection Analysis - Principles and Applications**, Chichester: Ellis Horwood Limited, 1987.
9. TROJANOWICZ, M. **Flow injection analysis: instrumentation and applications**,: World Scientific, 2000.

10. RUZICKA, J.; HANSEN, E. H.; MOSBAEK, H. Flow injection analysis: Part IX. A New Approach to Continuous Flow Titrations. **Analytica Chimica Acta**, v. 92, p. 235-249, 1977.
11. RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analysis. principles, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 114 p. 19-44, 1980.
12. ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C. Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (Recomendações – IUPAC 1994). **Química Nova**, v.22(1) p.143-146, 1999.
13. ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F.; OLIVEIRA, C. C.; SARTINI, R. P.; ARRUDA, M. A. Z. Evolution of the commutation concept associated with the development of flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 400, p. 249-256, 1999.
14. RUZICKA, J.; Hansen, E. H. Flow injection Analyses: Part I A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta** , v. 78, p. 145-157, 1975.
15. RUZICKA, J.; MARSHALL, G. D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 237, p. 329-343, 1990.
16. PASQUINI, C. Why it is called monosegmented flow analysis. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 10, p. 527-529, 1999.
17. REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S. Multicommunication in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 293, p. 129-138, 1994.
18. HONORATO, R. S.; ARAÚJO, 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 an one-dimensional optimisation algorithm for end point search. *Analytica Chimica Acta*, v. 396, p. 91-97, 1999.
19. GÓMEZ, E.; TOMÁS, C.; CLADERA, A.; ESTELA, J. M.; CERDÀ, V. Multicomponent techniques in sequential injection analysis. *The Analyst*, v. 120, p. 1181-1184, 1995. – Lenehan, C. E.; Barnett, N. W.; Lewis, W. S. Sequential injection Analysis. *The Analyst*, v. 127, p. 997-1020, 2002.
20. SILVAIEH H., SCHMID M. G.; HOFSTETTER O.; SCHURIG, V.; GUBITZ, G. Development of enantio selective chemiluminescence flow- and sequential-injection immunoassays for alpha-amino acids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 53, p. 1-14, 2002.
21. PASQUINI, C.; OLIVEIRA, W. A. Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium (VI), ammonia, and phosphorous. *Analytical Chemistry*, v. 57, p. 2575-2579, 1985.
22. ICARDO M. C.; MATEO, J. V. G.; CALATAYUD, J. M. Multicommunication as a powerful new analytical tool. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 21, p. 366-378, 2002.
23. ROCHA, F. R. P.; R. B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S.; SANTOS, J. L. M. Multicommunication in flow analysis: concepts, applications and trends. *Analytica Chimica Acta*, v. 468, p. 119–131, 2002.
24. LAPA, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C.; SANTOS, J. L. M. Dual-stopped-flow spectrophotometric determination of amiloride hydrochloride in a multicommuted flow system. *Analytica Chimica Acta*, v. 407, p. 225-231, 2000.

25. ARAUJO, A. N.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G. Multicommunication in flow-analysis. Part 3. Spectrophotometric kinetic determination of creatinine in urine exploiting a novel zone sampling approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 310, p. 447-452, 1995.
26. REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S. Multicommunication in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 293, p. 129-138, 1994.
27. KORN, M.; GOUVEIA, L. F.; OLIVEIRA, E.; REIS, B. F. Binary search in flow titration employing photometric end-point detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 313, p.177-184, 1995.
28. REIS, B. F.; RUBIO,A. M.; GUARDIA, M. Environmentally friendly analytical chemistry through automation: comparative study of strategies for carbaryl determination with p-aminophenol. **Analytica Chimica Acta**, v. 392, p. 265 – 272, 1999.
29. HONORATO, R. S.; ARAÚJO, 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 an one-dimensional optimisation algorithm for end point search. **Analytica Chimica Acta**, v. 396, p. 91-97, 1999.
30. CARNEIRO, J. M. T.; HONORATO, R. S.; ZAGATTO, E. A. G. Individual sample conditioning in flow analysis: Determination of N-total in plant materials. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 416, p. 496-500, 2000.
31. - HONORATO, R. S.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, R. A. C.; ARAÚJO, M. C. U. Prior assay as an approach to flow titrations.

Spectrophotometric determination of iron in alloys and iron ores,  
**Analytica Chimica Acta**, v. 416, p. 231-237, 2000.

32. SANTANA, R. S.; GAIÃO, E.; PIMENTEL, M. F.; NASCIMENTO, G.; HONORATO, R. S.; ARAÚJO, M. C. U. Um sistema automático de preparação de misturas de calibração multielementar para análise por ICP-AES, **23<sup>a</sup> Reunião Anual - Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas - MG, 23 - 26 de maio de 2000.
33. ALMEIDA, L. F.; MARTINS, V. L.; SILVA, E. C.; MOREIRA, P. N. T.; ARAUJO, M. C. U. An Automatic Flow-Batch Standard-Addition Method for Sodium Determination in Alcohol Fuel by Flame Photometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 249-253, 2003.
34. ALMEIDA, L. F.; MARTINS, V. L.; SILVA, E. C.; MOREIRA, P. N. T.; ARAUJO, M. C. U. Implementation of an automatic standard addition method in a flow-batch system: application to copper determination in an alcoholic beverage by atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 486 p. 143–148, 2003.
35. STEWART, K. K.; Flow-Injection Analysis: A review of its early history. **Talanta**, v. 28, p.789-797, 1981.
36. RUZICKA, J.; HANSEN, E. H.; Flow injection analysis - Where are we heading? **Trends in analytical chemistry**, v. 17, n. 2, 1998.
37. VALCAREZ, M., CASTRO, L. D. Flow-injectiion analysis Principles and applications. **Ellis horwood limited** - New York, 1987. p. 236-240.
38. OLSEN, S.; RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Gradient techniques in flow injection analysis : Stopped-flow measurement of the activity of

- lactate dehydrogenase with electronic dilution. **Analytica Chimica Acta**, v. 136, p. 101-112, 1982.
39. ARAÚJO, M. C. U.; SANTOS, A. V.; HONORATO, R. S.; PASQUINI, C. Single standard calibration and data processing in flow injection titration based on concentration gradients. **Journal of Automatic Chemistry**, v.19, p.157-164, 1997.
40. GAIÃO, E.N.; HORATO, R.S.; SANTOS, S.R.B.; ARAÚJO, M.C.U. An automated flo-injection titrator for spectrophotometric determinations of total acidity in wines, using na single standard solution and gradient calibration. **The Analyst**, v. 124, p. 1727-1730, 1999.
41. SILVA, E. C.; ARAÚJO, 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. **Analytica Chimica Acta**, v. 319, p. 153-158, 1996
42. VERAS, G.; HONORATO, R. S.; SARINHO, V. T.; ARAÚJO, M. C. U. A single solution for non-linear calibration in flow injection spectrophotometry: Kinetic determination of total protein in blood serum. **Analytica Chimica Acta**, v. 401, p. 215-221, 1999.
43. SAFAVI, A., BAEZZART, M. R. Fluorimetric kinectic-FIA determination of Ag (I) based on it's catalytic effect on the reduction reaction on safranine with iodide. **Microchemical Journal**, v. 58, p. 138-143, 1997.
44. PALOMEQUE, M. E.; LISTA, A. G.; FERNÁNDEZ BAND.; B. S. Determination of V(V) by a kinetic stopped-fow FIA method with

- spectrophotometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, p. 287-293, 1998.
45. LOZANO, C. M.; RUIZ, T. P.; TOMÁS, V.; VAL, O. Determination of epinephrine, norepinephrine and l-dopa in pharmaceuticals by a photokinetic method. **Analyst**, v.116, p. 857-859, 1991.
46. Pena, A. M.; Valenzuela, M. I. A.; Mansilla, A. E.; Maqueda, R. S. Stopped-flow fluorimetric determination of amoxycillin and clavulanic acid by partial least-squares multivariate calibration, **Talanta**, v. 56, p. 635, a. 2002.
47. LUPETTI, K. O.; RAMOS, L. A.; FATIBELLO-FILHO. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea Americana*). **Química Nova**, v. 26(2) p. 197-201, 2003.
48. CONCEIÇÃO, M.; MONTENEGRO, B. S. M.; SALES, M. G. F. Flow-injection analysis of dopamine in injections with a periodate-selective electrode. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 89, v.7, p.876-884, 2000.
49. NEVADO, J. J. B.; GALLEGOS, J. M. L.; LAGUNA, P. B.; Spectrophotometric determination of catecolamines with metaperiodate by flow-injections analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 300, p. 293-297, 1994.
50. NEVADO, J. J. B.; GALLEGOS, J. M. L.; LAGUNA, P. B. Spectrophotometric determination of Dopamine and methildopa with metaperiodate by flow-injections analysis. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 353, p. 221-223, 1995.

51. GARRIDO, E. M.; LIMA, J. L. F. C.; MATOS, C. D. Flow injection amperometric determination of L-dopa, epinephrine or dopamine in pharmaceutical preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.15, p. 845-849, 1997.
52. TESHIMA, L. Z. N.; HASEBE, T.; KURIHARA, M.; KAWASHIMA, T. Flow-injection determination of trace amounts of dopamine by chemiluminescence detection. **Talanta**, v. 50, p. 677-683, 1999.
53. ZHANG, C.; HUAND, J.; ZHANG, Z.; AIZAWA, M. Flow-injection chemiluminescence determination of catecholamines with eletrogenerated hipochorite. **Analytica Chimica Acta**, v.374 p.105-110, 1998.
54. SENO, S.; CREVELING, C.R.; UNDENFRIEND, S.; WITROP, B. Chemical, enzymatic and metabolic studies on the mechanism of oxidation of dopamine. **Journal of the American Chemical Society**, n. 81 n. 23, p. 6236-6240, 1959.
55. EL-KOMMOS, M. E.; MOHAMED, F. A.; KHEDR, A. Spectrophotometric determination of some catecholamine Drugs Using Metaperiodate. **J. ASSOC. OFF ANAL. CHEM**, v. 73, p. 520, 1990.
56. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. UNICAMP, São Paulo, 2001.
57. SKOOG, D., A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Bookman, São Paulo, 2002.

## **– APÊNDICE**

**Tabela 12 – Avaliação do efeito da vazão no desvio padrão.**

Condição	V <sub>am</sub> ( $\mu\text{L}$ )	C ( $\text{g L}^{-1}$ )	L <sub>R</sub> (cm)	Efeitos
1	200	0,1	20	1,6
2	400	0,1	20	-1,3
3	200	1,0	20	1,4
4	400	1,0	20	0,9
5	200	0,1	100	5,5
6	400	0,1	100	-2,7
7	200	1,0	100	<b>31,2</b>
8	400	1,0	100	1,8

**Tabela 13 – Avaliação do efeito do “Loop” no desvio padrão.**

Condição	F ( $\text{mL min}^{-1}$ )	C ( $\text{g L}^{-1}$ )	L <sub>R</sub> (cm)	Efeitos
1	0,70	0,1	20	1,5
2	1,0	0,1	20	-1,4
3	0,70	1,0	20	-5,0
4	1,0	1,0	20	-5,6
5	0,70	0,1	100	2,0
6	1,0	0,1	100	-6,2
7	0,70	1,0	100	-2,5
8	1,0	1,0	100	-31,9

**Tabela 14** – Avaliação do efeito da Concentração de metaperiodato de sódio no desvio padrão.

Condição	F (mL min <sup>-1</sup> )	V <sub>am</sub> (μL)	L <sub>R</sub> (cm)	Efeitos
1	0,70	200	20	2,9
2	1,0	200	20	2,7
3	0,70	400	20	-3,7
4	1,0	400	20	-1,4
5	0,70	200	100	1,7
6	1,0	200	100	27,3
7	0,70	400	100	-2,8
8	1,0	400	100	1,6

**Tabela 15** – Avaliação do efeito do Reator no desvio padrão.

Condição	F (mL min <sup>-1</sup> )	V <sub>am</sub> (μL)	C (g L <sup>-1</sup> )	Efeitos
1	0,70	200	0,1	-0,6
2	1,0	200	0,1	3,4
3	0,70	400	0,1	-0,1
4	1,0	400	0,1	-1,4
5	0,70	200	1,0	-1,7
6	1,0	200	1,0	28,0
7	0,70	400	1,0	0,8
8	1,0	400	1,0	1,7