

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO PARA INCORPORAÇÃO DA ETAPA DE
OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS EM PROCEDIMENTOS
AUTOMATIZADOS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO SEQUENCIAL**

VITÓRIA REGINA BISPO SOARES

Salvador, BA

2009

VITÓRIA REGINA BISPO SOARES

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO PARA INCORPORAÇÃO DA ETAPA DE
OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS EM PROCEDIMENTOS
AUTOMATIZADOS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO SEQUENCIAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Federal da Bahia
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Naturais – Química.

ORIENTADOR: Prof. Dr. MAURO KORN

Salvador, BA

2009

“O Homem é do tamanho do seu sonho.”

Fernando Pessoa

*“O estudo, a busca da verdade e da beleza são
domínios em que nos é consentido sermos
crianças por toda a vida.”*

Albert Einstein

“O meu maior projeto é o próximo.”

Frank Lloyd Wright

AGRADECIMENTOS

Grande é minha lista de agradecimentos, o que me torna uma pessoa de sorte.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida e a possibilidade de poder desfrutar essa experiência.

À minha família (Inês, Messias, Ricardo, Rodrigo, Kaliane e Gui) pela base sólida que me deu força para encarar a vida de frente, por ter acreditado em mim, apoiado todas as minhas escolhas e ser responsável pela pessoa que sou. Principalmente, aos meus pais por todo empenho na minha formação. Mãe, Obrigada pelo incentivo incondicional, essa dissertação é em homenagem ao seu trabalho.

Contei com o estímulo, ajuda e carinho de todos os outros membros da minha família (vó, tios e primos), que permaneceram comigo mesmo com toda a ausência provocada por este curso. Agradeço pelo apoio e pela torcida. Obrigada por acreditarem em mim.

Gostaria de agradecer especialmente a Eduardo. Seu amor, carinho, companheirismo e compreensão certamente foram muito importantes para que eu seguisse em frente.

Ao meu orientador, professor Dr. Mauro Korn, pela orientação, confiança e incentivo. Acima de tudo, me ensinou a percorrer meu próprio caminho nessa trajetória. Suas contribuições e sua amizade foram fundamentais para minha formação científica.

Ao professor Dr. Sérgio Ferreira pela contribuição nas discussões e pelo empréstimo de material bibliográfico.

Aos alunos de iniciação científica Wdson e Jorginho pela colaboração direta nos métodos de referência. Com eles compartilho o mérito deste trabalho.

Aos amigos do laboratório SONOFIA pela amizade, momentos de alegria, animação, discussões e muito trabalho durante todos esses anos: Adriana, Rodolfo, Karlinha, Luciana, Jorginho, Wdson, Malta, Silvia e João. Um agradecimento especial aos grandes amigos Tiago e Josué pelo apoio e por tantas idéias compartilhadas. Aos que já fizeram parte do grupo: Daniela, Márcio, Sivan, Fábio, Daniel e Manoel. Aos amigos que sempre estiveram comigo e a todos os companheiros dos outros laboratórios do prédio de química da UNEB.

Agradeço a Cristovão e Paulo da PPG pela amizade e ajuda nestes anos de pós-graduação na UFBA. Aos professores da UNEB, da UFBA e aos funcionários pela ajuda continua nestes anos de convivência.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante a execução deste trabalho.

Agradecer não é uma tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço a todos que passaram pela minha vida e contribuíram de alguma forma para a construção de quem sou hoje e para realização desse trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

Para aumentar o nível de automatização no desenvolvimento de procedimentos analíticos em sistemas de análises por injeção sequencial foi proposta uma rotina em linguagem QuickBasic que permitia incorporar a etapa de otimização multivariada como uma das etapas do processo analítico, simplificando o gerenciamento do sistema. A rotina foi desenvolvida para sistemas de análises por injeção sequencial, uma vez que esta estratégia de análises em fluxo pode executar diferentes procedimentos sem reconfiguração do sistema. O processo automatizado de otimização, calibração e medida foi aplicado para as determinações espectrofotométricas de ferro total e de captopril em medicamentos, empregando os métodos da 1,10-o-fenantrolina e do acoplamento com o radical iminoquinona, respectivamente. Para rotina de otimização desenvolvida foi selecionado o sinal líquido como resposta e a intervenção do operador se restringiu a selecionar as variáveis do sistema sob otimização, definir os domínios experimentais de cada variável e escolher o desenho experimental a ser executado. Entretanto, caso as condições ótimas não fossem encontradas no domínio experimental selecionado a rotina foi programada de modo a sugerir ao operador os deslocamentos que deveriam ser feitos nos domínios experimentais. Os fatores investigados para a determinação de ferro total em amostras de fortificantes foram os volumes amostrados dos reagentes e a vazão da solução transportadora, enquanto que para o captopril foram investigados os volumes amostrados dos reagentes, a acidez da solução do oxidante e da solução da amina aromática, além da vazão da solução transportadora. Nas condições otimizadas os graus de sobreposição de zonas para ambos os procedimentos variaram entre 0,79 e 1, indicando a eficiente mistura das soluções das amostras e reagentes no percurso analítico. O procedimento SIA otimizado para a determinação do teor de ferro total em fortificantes apresentou baixa dispersão (<2%), limite de quantificação de $1,43 \text{ mg L}^{-1}$, com consumo de 0,7 mg de 1,10-o-fenantrolina e 6 mg de ácido ascórbico por determinação. A frequência analítica foi de 60 determinações h^{-1} e os resultados obtidos para diferentes amostras de fortificantes foram comparados com o mesmo método em batelada e não apresentaram diferenças significativas para 95% de confiabilidade. Trinta determinações de captopril em produtos farmacêuticos por hora de trabalho foram executadas pelo procedimento de análise por injeção seqüencial otimizado consumindo 0,15 mg de sulfato de N-N-dimetil-p-fenilodiamina (DMPD) e 4 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ por determinação. Faixa linear de trabalho entre 2,65 e 100 mg L^{-1} e boa precisão (ca. 1%) foram também obtidas. Os teores de captopril em amostras de produtos farmacêuticos foram determinados pelo procedimento proposto e os resultados, quando comparados com o método iodométrico de referência, não apresentaram diferenças significativa para 95% de confiança.

Palavras chaves: Otimização multivariada, Análise por Injeção Seqüencial, Automatização de procedimentos analíticos, Análise de fármacos, Determinação de ferro total, Determinação de captopril

ABSTRACT

A QuickBasic routine was proposed to increase the automatization in the development of analytical process for sequential injection analysis system in order to permit the inclusion of multivariate optimization as one of the steps of analytical process leading to simplify the system management. The routine was developed for sequential injection analysis once this flow analysis strategy can perform diverse analytical procedures in the same manifold. The automatized process for optimization, calibration and measurement was applied to determine the total iron concentration in pharmaceutical formulations by 1,10-o-phenantroline spectrophotometric method, as well as captopril in pharmaceutical formulations based on coupling reaction with iminoquinone radical. Sensitivity (net signal) was selected as dependent parameter for the optimization step and the analyst action was limited to select the parameters to be optimized and the experimental design to be used as well to define the experimental domains of all parameters. A decision of the analyst was also expected in the cases where the optimal conditions were not attained in the domains previously selected and, once new domains are suggested by the software, a new sequence of experiments will be carried out with human agreement. Aliquots volumes of reagents and carrier solution flow rate were the parameters evaluated for total iron determination in supplements, while the acidity and volumes of reagents solutions and the flow rate of carrier solution were optimized for captopril determination flow procedure. For both analytical procedures in the optimized conditions the index of zone overlapping was varied from 0.79 and 1, suggesting an efficient mixture of solutions in the analytical path. The optimized SIA procedure for total iron determination in supplement samples has low dispersion (<2%), limit of quantification of 1.43 mg L⁻¹, leading to consume 0.7 mg of 1,10-o-phenantroline and 6 mg of ascorbic acid per determination. An analytical throughput of 60 determinations h⁻¹ was estimated and no significant difference (95% confidence level) was observed by comparing the results obtained by the flow method in optimized conditions and those obtained by the spectrophotometric procedure in batch mode. Thirty captopril determinations in pharmaceutical formulations per hour were carried out by employing the optimized sequential injection analysis procedure, consuming 0.15 mg of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) and 4 mg of FeCl₃.6H₂O. Linear range from 2.65 to 100 mg L⁻¹ with high precision (ca. 1%) was also obtained and no significant differences (95% confidence level) were observed by comparing the optimized flow procedure with the iodometric reference method.

Key words: Multivariate optimization, Sequential Injection Analysis, Analytical procedures automatization, Pharmaceutical formulations analysis, Total iron determination, Captopril determination

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Introdução	1
1.1 - Automação de processos analíticos	1
1.2 - Sistemas de Análises por Injeção Seqüencial (SIA)	3
1.3 - Técnicas de planejamentos experimentais	15
CAPÍTULO 2: Experimental	22
2.1 - Reagentes, soluções e amostras	22
2.2 - Equipamentos	23
2.3 - Procedimentos	24
2.3.1 - Sistema de Análise por Injeção Seqüencial	24
2.3.2 - Estudos preliminares ao planejamento experimental	27
2.3.3 - Otimizações multivariadas empregando a metodologia de superfície de resposta	27
2.3.3.1 - Metodologia de superfície de resposta na determinação de ferro total	31
2.3.3.2 - Metodologia de superfície de resposta na determinação de captopril	31
2.3.4 - Comparação das figuras de mérito nas condições críticas e extremas do domínio experimental	33
2.3.5 - Métodos de referência	35
CAPÍTULO 3: Resultados e discussões	36
3.1 - Lógica da programação	37
3.2 - Otimizações preliminares ao planejamento experimental	44
3.3 - Otimizações multivariadas empregando a metodologia de superfície de resposta	49
3.3.1 - Metodologia de superfície de resposta na determinação de ferro total	49
3.3.2 - Metodologia de superfície de resposta na determinação de captopril	55
3.4 - Coeficiente de Dispersão (<i>D</i>) e grau de penetração (<i>P</i>)	62
3.5 - Comparação das figuras de mérito nas condições críticas e extremas do domínio experimental	65
3.5.1 - Curvas analíticas para determinação de ferro total	65

3.5.2 -	Curvas analíticas para determinação de captopril	67
3.6 -	Figuras de mérito na validação dos métodos otimizados	69
3.6.1 -	Determinação de ferro total em amostras de fortificantes	69
3.6.2 -	Determinação de captopril em amostras de medicamentos	71
3.7 -	Outras considerações	74
CAPÍTULO 4: Conclusões		76
CAPÍTULO 5: Referências Bibliográficas		78

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1:

- Figura 1.1.** Perfil de citações dos artigos de divulgação das estratégias de manipulação de soluções: (i) Análise em Fluxo Contínuo Segmentado (SCFA) e (ii) Análise por Injeção em Fluxo (FIA). 4
- Figura 1.2.** Diagrama de sistema de análise por injeção sequencial. 6
- Figura 1.3.** Perfil de publicações dos artigos explorando a Análise por Injeção Sequencial no período de 1998 a 2008. 8
- Figura 1.4.** Perfil de distribuição das publicações em Análise por Injeção em Fluxo no período de 1975 a 2008. 10
- Figura 1.5.** Perfil de distribuição das publicações em Análise por Injeção Seqüencial no período de 1990 a 2008. 11
- Figura 1.6.** Perfil de distribuição das publicações em Análise por Injeção em Fluxo no período de 2004 a 2008. 13
- Figura 1.7.** Perfil de distribuição das publicações em Análise por Injeção Sequencial no período de 2004 a 2008. 14
- Figura 1.8.** Representação gráfica do desenho Box-Behnker para três variáveis (i) um cubo constituído pelo ponto central e pelos pontos médios das arestas e (ii) representação como resultado da interlocução de desenhos fatoriais 2^2 . 19

CAPÍTULO 2:

- Figura 2.1.** Diagrama SIA para determinação de ferro total e captopril em amostras de medicamentos. 26
- Figura 2.2.** Lógica de programação do sistema automático desenvolvido para otimização multivariada em sistemas SIA. 30

CAPÍTULO 3:

- Figura 3.1.** Tela de entrada do domínio experimental. 38
- Figura 3.2.** Corte do programa contendo a lógica usada para a chamada de 39

sub-rotinas específicas referentes aos diferentes desenhos experimentais.

Figura 3.3.	Tela de apresentação das matrizes construídas baseadas no desenho experimental selecionado pelo operador.	39
Figura 3.4.	Efeito do comprimento da bobina reacional sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de ferro total em fortificantes.	47
Figura 3.5.	Efeito do comprimento da bobina reacional sobre o sinal analítico para o sistema de determinação captopril em medicamentos.	48
Figura 3.6.	Gráfico de pareto dos efeitos padronizados relativo ao planejamento fatorial 2^3 empregado na otimização multivariada das variáveis do sistema SIA para determinação de ferro total em fortificantes.	51
Figura 3.7.	Superfícies de resposta referente ao planejamento Box Behnker (i) volume de redutor x volume de 1-10-o-fenantrolina mantendo vazão do carregador constante no nível intermediário, (ii) vazão do carregador x volume do redutor mantendo volume da 1-10-o-fenantrolina constante no nível intermediário e (iii) vazão do carregador x volume da 1-10-o-fenantrolina mantendo volume do redutor constante no nível intermediário.	53
Figura 3.8.	Tela de saída gerada pelo programa contendo o relatório referente à etapa de otimização do procedimento para determinação de ferro total em fortificantes empregando o desenho experimental de Box-Behnker.	54
Figura 3.9.	Gráfico de pareto dos efeitos padronizados relativo ao planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} .	57
Figura 3.10.	Gráfico de pareto dos efeitos padronizados relativo ao planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .	59
Figura 3.11.	Superfície de resposta referente planejamento fatorial completo.	61
Figura 3.12.	Tela de saída gerada pelo programa contendo o relatório referente	62

à etapa de otimização do procedimento para determinação de captopril em medicamentos empregando o desenho experimental fatorial de três níveis.

- Figura 3.13.** Perfil de dispersão das zonas de reagentes e amostras nas condições otimizadas do sistema SIA. (a) estado estacionário (b) zona reacional total: fenantrolina+ferro+reductor (c) reductor (d) amostra (e) fenantrolina. 64
- Figura 3.14.** Perfil de dispersão das zonas de reagentes e amostras nas condições otimizadas do sistema SIA (a) estado estacionário (b) zona reacional total: captopril+DMPD+Fe(III) (c) Fe(III) (d) amostra (e) DMPD 64
- Figura 3.15.** i) Curva analítica para determinação espectrofotométrica de ferro total em fortificantes empregando o procedimento SIA proposto nas condições otimizadas e (ii) registro da curva analítica. 69
- Figura 3.16.** (i) Curva analítica para determinação espectrofotométrica de captopril empregando o sistema SIA proposto nas condições otimizadas e (ii) registro da curva analítica e sinais obtidos para algumas amostras. 72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1:

Tabela 1.1.	Comparação de valores de eficiência dos desenhos composto central (CCD), fatorial completo (FC), matriz Doehlert (DM) e Box-Behnker (BBD).	19
--------------------	--	----

CAPÍTULO 2:

Tabela 2.1.	Passos envolvidos no procedimento proposto para determinação de ferro total.	25
Tabela 2.2.	Passos envolvidos no procedimento proposto para determinação de captopril.	26
Tabela 2.3.	Níveis empregados na otimização das variáveis do sistema de fluxo para determinação de ferro.	31
Tabela 2.4.	Níveis empregados na otimização das variáveis do sistema de fluxo para determinação de captopril, planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} .	32
Tabela 2.5.	Níveis empregados na otimização das variáveis do sistema de fluxo para determinação de captopril, planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .	33
Tabela 2.6.	Níveis empregados na metodologia de superfície de resposta, desenho experimental fatorial completo 3^2 .	33
Tabela 2.7.	Condições experimentais de realização das curvas analíticas para determinação de ferro total.	34
Tabela 2.8.	Condições experimentais de realização das curvas analíticas para determinação de captopril.	34

CAPÍTULO 3:

Tabela 3.1.	Efeito da ordem de aspiração das soluções de reagentes e amostra sobre o sinal analítico para determinação de ferro total em fortificantes.	45
Tabela 3.2.	Efeito da ordem de aspiração das soluções de reagentes e amostra sobre o sinal analítico para determinação de captopril em medicamentos.	46
Tabela 3.3.	Planejamento fatorial 2^3 empregado na otimização multivariada das variáveis do procedimento SIA para determinação de ferro total em fortificantes, valores reais, suas coordenadas e as	50

respectivas respostas.

Tabela 3.4.	Planejamento Box-Behnker empregado na metodologia de superfície de resposta do procedimento SIA para determinação de ferro total em fortificantes, valores reais, suas coordenadas e as respectivas respostas.	52
Tabela 3.5.	Valores das variáveis otimizadas pelo sistema automatizado de otimização multivariada empregando o método da superfície de resposta para determinação de ferro total em fortificantes.	55
Tabela 3.6.	Planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} empregado na otimização multivariada das variáveis do procedimento SIA para determinação de captopril em medicamentos, valores reais, suas coordenadas e suas respectivas respostas.	56
Tabela 3.7.	Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} empregado na otimização multivariada das variáveis do procedimento SIA para determinação de captopril em medicamentos, valores reais, suas coordenadas e suas respectivas respostas.	58
Tabela 3.8.	Planejamento fatorial completo de três níveis empregado na metodologia de superfície de resposta do procedimento SIA para determinação de captopril em medicamentos, valores reais, suas coordenadas e suas respectivas respostas.	60
Tabela 3.9.	Valores das variáveis otimizadas pelo sistema automatizado de otimização multivariada empregando a metodologia de superfície de resposta para determinação de captopril em medicamentos.	62
Tabela 3.10.	Comparação de figuras de mérito das curvas analíticas para determinação de ferro total em fortificantes nas condições extremas, no ponto central e nas condições críticas observadas do domínio experimental investigado.	66
Tabela 3.11.	Comparação de figuras de mérito das curvas analíticas para determinação de captopril em amostras de medicamentos nas condições críticas e extremas do domínio experimental investigado.	68
Tabela 3.12.	Comparação dos resultados obtidos para a determinação de captopril em amostras de medicamentos utilizando o método	68

titrimétrico de referência e o procedimento proposto em sistema SIA utilizando as curvas analíticas nas condições extremas do domínio experimental e as condições críticas (N=3).

- | | | |
|---------------------|--|----|
| Tabela 3.13. | Comparação entre os resultados obtidos pelo procedimento SIA proposto para determinação de ferro total em fortificantes (expressos em mg L^{-1}) e o método de referência (N=3). | 70 |
| Tabela 3.14. | Características analíticas de métodos espectrofotométricos para determinação de ferro total empregando sistemas em fluxo. | 71 |
| Tabela 3.15. | Comparação entre os resultados obtidos pelo procedimento SIA proposto para determinação de captopril em medicamentos (expressos em mg) e o método titrimétrico de referência (N=3). | 72 |
| Tabela 3.16. | Características analíticas dos métodos espectrofotométricos para determinação de captopril empregando sistemas em fluxo. | 74 |

1- Introdução

1.1 – Automação de processos analíticos

A Química Analítica tem experimentado uma grande evolução e diversificação ao longo dos últimos anos e sua definição vem se tornando cada vez mais abrangente. No panorama atual, a Química Analítica é essencialmente uma ciência metrológica que desenvolve, aperfeiçoa e aplica ferramentas químicas (reagentes e reações), bioquímicas (enzimas imobilizadas e imunoenaios), físicas (fontes de laser e equipamentos diversos), matemáticas (tratamentos estatísticos), lógicas (software) e biológicas (biossensores) para produção de informações qualificadas, visando resolver problemas científicos, técnicos, econômicos e sociais (Valcárcel, 2000).

Nesse contexto, o químico analítico deve estar preparado para o progresso em outros campos científicos e deles extrair o que há de valioso para atingir os objetivos da Química Analítica (Gutz, 1985). Desde a década de 1980, os maiores impactos têm sido observados nos ramos da física e da ciência da computação, devido ao custo decrescente e a capacidade crescente dos microcomputadores.

A automatização, miniaturização e simplificação são três tendências da Química Analítica Moderna, todas coerentes com os avanços científicos e tecnológicos. Seus objetivos são a redução (i) da intervenção humana; (ii) do tamanho de instrumentos e dispositivos; e, (iii) do trabalho do processo (Valcárcel & Cárdenas, 2000).

A automatização implica em substituição parcial ou completa da participação humana em uma operação ou numa seqüência de operações (Valcárcel & Cárdenas, 2000). O objetivo da automatização na Química Analítica compreende à tomada de decisão baseada em informações consistentes e representativas, a melhoria da produtividade e a redução dos riscos para os operadores e o meio ambiente. A automatização deve ser explorada no sentido de permitir avanços na quantidade e qualidade dos resultados analíticos obtidos, o

que implica na melhoria das características analíticas (exatidão, precisão, reprodutividade, etc).

A automatização apresenta diversas vantagens como:

- Ampliação do campo de aplicação da Química Analítica: abordagem de novos problemas e processos analíticos que não poderiam ser empregados sem substituição humana;
- Minimização de erros aleatórios, devido à intervenção humana;
- Estímulo à qualificação profissional para a execução de trabalhos mais criativos, além de supervisão e controle;
- Possibilidade de redução de custos;
- Segurança do operador e do meio ambiente, uma vez que a automatização substitui a intervenção humana na realização de procedimentos de risco e, na maioria das vezes, reduz o consumo de reagentes e a produção de resíduos.

Porém, é necessário alertar para algumas desvantagens da automatização de procedimentos de análises químicas. Muitas vezes os equipamentos que substituem as atividades humanas são vendidos pelo fabricante como “caixas pretas” e o usuário desconhece ou não entende de forma plena o seu funcionamento, podendo utilizá-lo em condições inadequadas ou explorando o mínimo da capacidade destes dispositivos. Isso pode provocar um distanciamento entre o operador e o experimento. Esse distanciamento, aliado à facilidade de geração de resultados (informações) pelo sistema automatizado, pode acarretar na redução do senso crítico, visto que o analista pode confiar cega e totalmente no sistema e não interpretar adequadamente os dados gerados no processo. Vale ressaltar, que mesmo diante de um sistema automatizado ou até mesmo automático, a Química e a realidade no contexto do problema analítico nunca devem ser desconsiderados.

1.2 – Sistemas de Análises por Injeção Seqüencial (SIA)

Em diferentes áreas tem-se observado um aumento significativo na demanda por métodos analíticos que forneçam resultados rápidos e confiáveis, com um menor consumo de reagentes e amostras e menor geração de resíduos. A procura por procedimentos que eliminem ou reduzam significativamente a geração de resíduos, bem como a substituição de reagentes tóxicos ao ambiente por outros menos agressivos são os alicerces para inserção da Química Analítica nos princípios da Química Verde (Winterton, 2000).

Em 1957 foi proposta por Skeggs (1957) a Análise em Fluxo Contínuo Segmentado (SCFA), na qual uma zona composta por amostra e reagentes era inserida entre bolhas de ar, visando reduzir o consumo de amostras e reagentes, mas garantindo a plena a mistura das soluções no percurso analítico (Skeggs, 1957). Muitas aplicações do SCFA foram reportadas até duas décadas após a sua divulgação.

Desde o seu surgimento na década de 1970, as Análises por Injeção em Fluxo (FIA) têm se constituído em um grande avanço na procura por métodos mais limpos, ao contemplar em sua concepção muitos dos princípios da Química Verde. Os sistemas FIA destacam-se pela alta versatilidade, permitindo integrar as diferentes etapas envolvidas nos procedimentos analíticos. Nestes sistemas, uma alíquota de amostra (e eventualmente dos reagentes) é inserida no percurso analítico em um fluxo contínuo e não segmentado, sendo então, direcionada para o detector por um sistema de propulsão (e.g. bomba peristáltica ou de pistão ou ação da gravidade) a baixa pressão. De acordo com a concepção do sistema, durante o transporte, os componentes da amostra podem ser submetidos a diferentes processos, tais como derivatização, pré-concentração, separação de interferentes, difusão gasosa, entre outros (Yamane & Koshino, 1996).

Devido às vantagens apresentadas, as Análises por Injeção em Fluxo (FIA) tiveram rápida repercussão mundial e foram consideradas como a primeira geração entre as estratégias de análises em fluxo. A partir da publicação do primeiro trabalho dessa técnica de manipulação de soluções em 1975 (Ruzicka & Hansen, 1975), pôde-se observar uma redução do número de citações do trabalho de Skeggs que, em certo ponto de vista foi o

precursor das análises em fluxo (Figura 1.1(i)). Também pôde ser observado que desde sua publicação, o número de citações do primeiro artigo publicado sobre sistema FIA vem se mantendo elevado e estável ao longo das três últimas décadas (Figura 1.1(ii)).

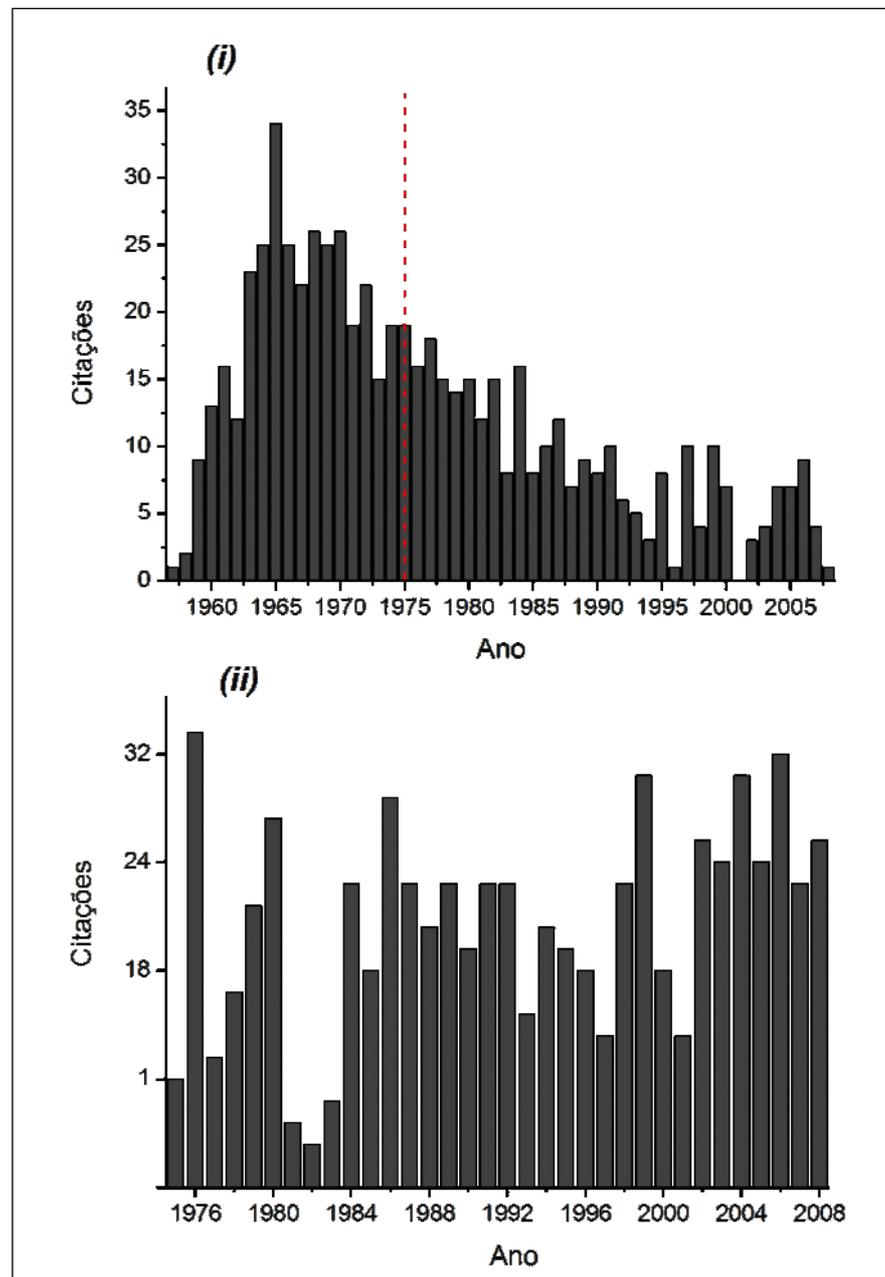


Figura 1.1. Perfil de citações dos artigos de divulgação das estratégias de manipulação de soluções: (i) Análise em Fluxo Contínuo Segmentado (SCFA) e (ii) Análise por Injeção em Fluxo (FIA). Fonte: www.isiknowledge.com, acesso em 24.12.08.

Desde então, diversas estratégias têm sido desenvolvidas visando aprimorar o desempenho de sistemas de análise em fluxo, como multicomutação (Reis et. al. 1994), flow-batch (Honorato *et al.*, 1999), análise por injeção seqüencial (SIA) (Ruzicka & Marshall, 1990), entre outras, associando novos dispositivos aos sistemas de análises em fluxo, como aqueles para a propulsão de soluções: multisseringas (Miro, 2002), minibombas (Santos et. al., 2007) e bombas piezelétricas (Ribeiro et. al. 2007).

A Análise por Injeção Seqüencial (SIA) surgiu como uma alternativa versátil e robusta para a automatização de procedimentos analíticos complexos e é designada como a segunda geração dos sistemas de análises em fluxo. Sua denominação foi devido à forma de inserção das soluções no percurso analítico, a qual é realizada de forma seqüencial. As Análises por Injecção Seqüencial são baseadas no conceito de fluxo descontínuo, bidirecional programado com controle computadorizado e necessita de uma válvula multiposição que permite modificações em diversas variáveis operacionais sem a necessidade de alterar a configuração do módulo de análise.

Pela seleção do canal da válvula multiposição é possível efetuar a inserção de alíquotas de amostras e reagentes em uma sequencia previamente estabelecida. O primeiro passo consiste na aspiração seqüencial de uma a uma das soluções (amostra e reagentes) posicionadas nos canais de acesso às portas da válvula multiposição, para uma bobina de armazenamento (B_a), conectada a porta central da válvula. Então, seleciona-se a porta onde está posicionado o detector e, com a inversão do sentido do fluxo, a zona composta (amostra + reagentes) é bombeada pelo canal correspondente para o detector e, finalmente, o produto formado é quantificado. As alíquotas das soluções (amostra e reagentes) apresentam uma única interface entre si, a partir da qual é formada a zona de mistura. A inversão do sentido de fluxo, contribui para melhorar a mistura da amostra com os reagentes, mas também leva ao aumento da dispersão (Ruzicka & Marshall, 1990). A Figura 1.2. apresenta um diagrama geral para sistemas SIA.

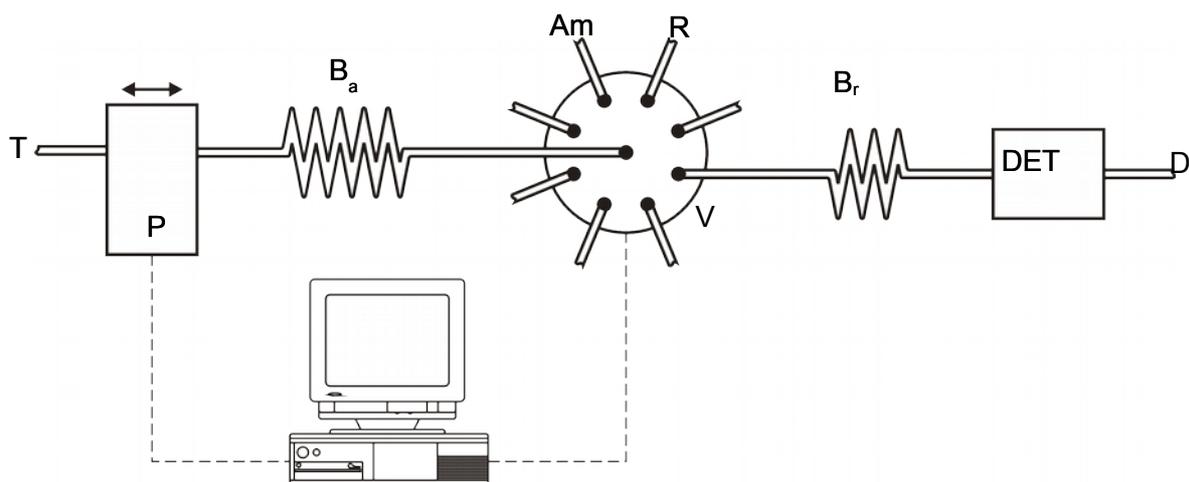


Figura 1.2. Diagrama de sistema de análise por injeção sequencial. *T* = solução transportadora, *Am* = amostra, *R* = reagente, *P* = sistema de propulsão bidirecional, *V* = válvula multiposição, *Br* = bobina de reação, *B_a* = bobina de armazenamento, *DET* = detector, *D* = descarte.

Com relação às características necessárias aos componentes do sistema SIA, a bobina de armazenamento (*B_a*) deve ser suficientemente longa para armazenar as alíquotas das soluções da amostra e reagentes sem que estas atinjam o dispositivo de propulsão de fluidos e contaminem a solução transportadora (Ruzicka & Gubeli, 1991). O dispositivo propulsor de fluidos deve ser bidirecional, ou seja, deve permitir aspirar e bombear os fluidos pelos canais, bem como deve apresentar alta precisão e baixa inércia (Lenehan *et al.*, 2002), para minimizar erros na tomada das alíquotas. Assim, bombas de pistão ou peristáltica são empregadas para propulsão de líquidos nos sistemas SIA.

O funcionamento de um sistema SIA associado à válvula seletora de fluidos (válvula multiposição), possibilita que, além do gerenciamento das soluções, seja possível realizar procedimentos de pré-tratamentos de amostras. O número de soluções e operações está limitado pelo número de posições da válvula. No entanto, há a possibilidade de incorporar outros dispositivos à válvula multiposição de seleção, incrementando a versatilidade do sistema.

Os princípios de dispersão controlada da zona de amostra, reprodutibilidade no tempo e natureza cinética dos processos químicos e físicos são similares aos princípios das Análises por Injeção em Fluxo (FIA).

A dispersão está relacionada com os processos de transporte por convecção (que ocorrem com o escoamento) e de difusão molecular (nas interfaces de contato do tubo). Ambos afetam a penetração mútua de duas zonas adjacentes. Um segmento inserido no sistema favorecerá a formação, em um primeiro momento, de gradientes de concentração responsáveis pela difusão radial e axial. A inversão do sentido do fluxo reduz a dispersão axial desse segmento, promovendo um perfil de dispersão quase que totalmente simétrico, gerando uma resposta analítica com formato tendendo ao gaussiano.

A dispersão (D) não é mais que o grau de diluição do segmento inserido no percurso analítico e é calculada pela razão entre os sinais analíticos antes (S^0) e depois do processo ter ocorrido (S^{max}) e pode ser descrita como $D = S^0/S^{max}$ (Ruzicka & Hansen, 1988).

Ao contrário dos sistemas FIA, nos sistemas SIA a mistura só é realizada através dos processos de dispersão e difusão. Com isso, a extensão com que a reação acontece depende do tempo de residência no sistema e do grau de sobreposição das zonas de reagentes e amostras. Alguns parâmetros clássicos como diâmetro, comprimento e geometria da bobina de reação também influenciam no grau de sobreposição de zonas.

O grau de sobreposição de zonas (P) é importante para estabelecer o intervalo de tempo em que é possível obter uma medida significativa baseada em altura ou área de pico e pode ser calculado pela equação: $P = 2L_s / (L_a + L_r)$, onde L_s corresponde à largura da base do pico da zona sobreposta; e, L_a e L_r correspondem às larguras dos picos das zonas de amostra e reagente, respectivamente (Gubeli *et al.*, 2001).

O valor de P varia entre zero e um. Há a sobreposição completa das zonas para $P = 1$. Porém, quando $P = 0$, não existe sobreposição. Na ausência de sobreposição completa, pode-se observar um ponto no qual os coeficientes de dispersão da amostra e reagente são idênticos (ponto de isodispersão). Nessa condição, a razão entre as concentrações é igual à das soluções puras antes de serem inseridas no percurso analítico (Masini, 2008). Esses

estudos foram efetuados levando em consideração os fenômenos físicos, não sendo exploradas reações químicas e a cinética envolvida. Para esses fatores, é necessário realizar a etapa de otimização no desenvolvimento de todos os procedimentos analíticos.

Assim, como na maioria das abordagens em fluxo, a Análise por injeção Seqüencial tem sido extensivamente explorada na última década. Fato esse que pode ser observado na Figura 1.3 pelo número de publicações que fazem uso dessa estratégia de análise química.

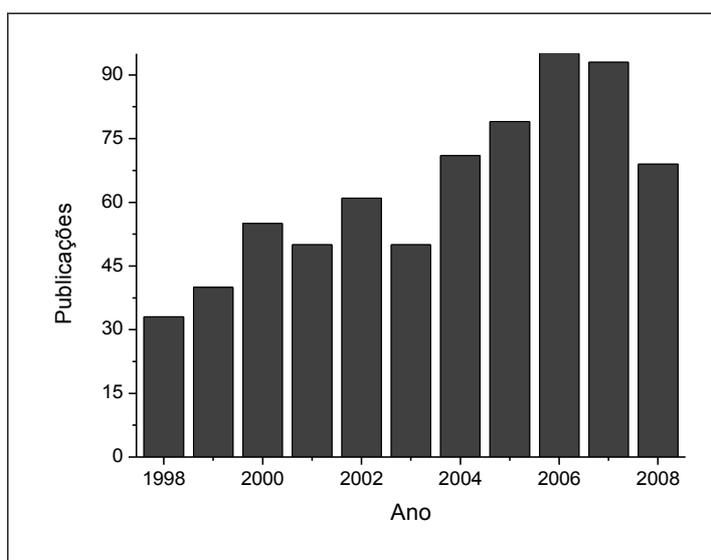


Figura 1.3. Perfil de publicações dos artigos explorando a Análise por Injeção Seqüencial no período de 1998 a 2008. Fonte: www.isiknowledge.com, acesso em 02.01.09, entrada: *sequential injection analysis*, sub áreas: *Química Analítica e Instrumentos e Instrumentação*.

Suas aplicações têm sido amplas na determinação de vários analitos por diferentes técnicas de análises químicas, como espectrofotometria (Oliveira & Korn, 2006), outras técnicas espectrométricas (Wang & Hansen, 2000; Araújo *et al.*, 1998), condutimetria (Silva *et al.*, 1999), quimioluminescência (Min *et al.*, 1996; Mervartova *et al.*, 2007), amperometria (Lapa *et al.*, 2003), potenciometria (Andrade-Eiroa *et al.*, 2002) e fluorimetria (Pinto *et al.*, 2006).

As principais vantagens do SIA com relação às outras estratégias de análises em fluxo são relacionadas à sua versatilidade. O canal único central da válvula multiposição disponível no operacional do SIA permite a implementação em uma ampla gama de ensaios

sem que o sistema precise ser reconfigurado (Economou, 2005). O consumo de reagentes também é drasticamente reduzido nos procedimentos que empregam sistemas SIA, visto que o excesso de reagente pode afetar a mistura e prejudicar as análises. (Cerdá *et al.*, 2001; Economou, 2005).

Entretanto, um sistema SIA requer o uso de uma válvula multiposição de atuação eletromecânica e controlável por computador, o que eleva consideravelmente o investimento para a construção do sistema. As posições da válvula poderiam ser alteradas manualmente, mas não haveria garantia de repetitividade e na tomada de alíquotas; portanto, é indispensável o controle rígido tanto da válvula (posição e tempo) quanto do sistema de propulsão (vazão e sentido de rotação). Usualmente, a frequência de amostragem nos sistemas SIA é menor que os análogos em sistemas FIA, pois todas as etapas de manipulação de soluções são inerentemente executadas de forma seqüencial.

Apesar da maioria dos grupos que desenvolvem pesquisas em análises em fluxo se concentrar na Europa, ambas as gerações da análise em fluxo já apresentam expressiva representatividade em todos os continentes. Nas Figuras 1.4 e 1.5 podem-se observar os dez países que apresentaram os maiores índices de produtividade nessas linhas de pesquisa desde o ano de suas respectivas divulgações. Vale ressaltar que o Brasil tem apresentado muitas contribuições nesse sentido, ocupando o quinto lugar em publicações em ambas as estratégias (FIA e SIA) em fevereiro de 2009. Condição superior à média de publicações científicas do Brasil em todas as áreas do conhecimento (15^a colocação) na classificação de produção por países, o que corresponde a aproximadamente 2% da produção científica mundial (SCImago Journal & Country Rank).

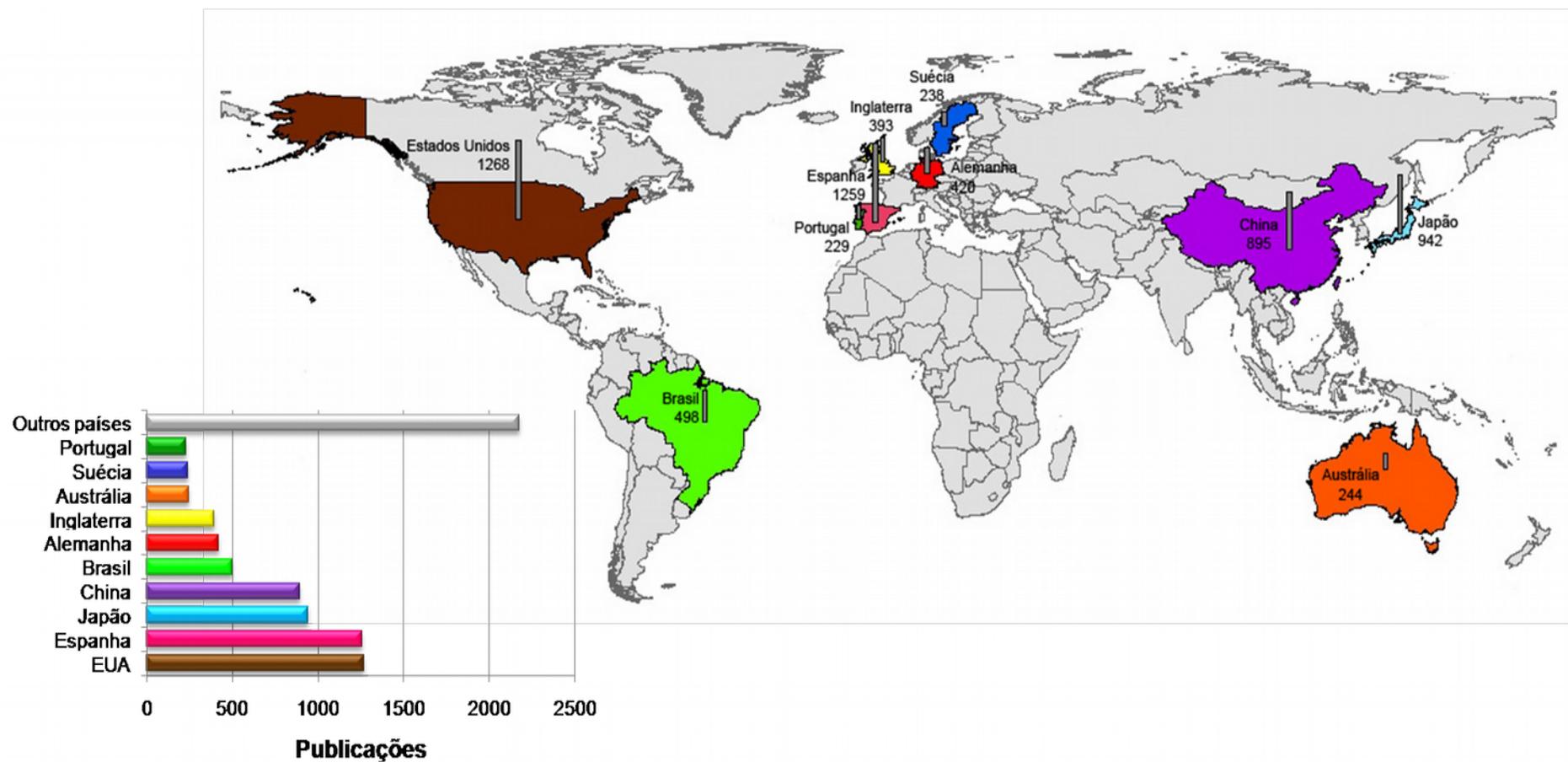


Figura 1.4. Perfil de distribuição das publicações em Análise por Injeção em Fluxo no período de 1975 a 2008. Fonte: www.isiknowledge.com, acesso em dezembro de 2008, entrada: flow injection analysis, sub áreas: Química Analítica e Instrumentos e Instrumentação.

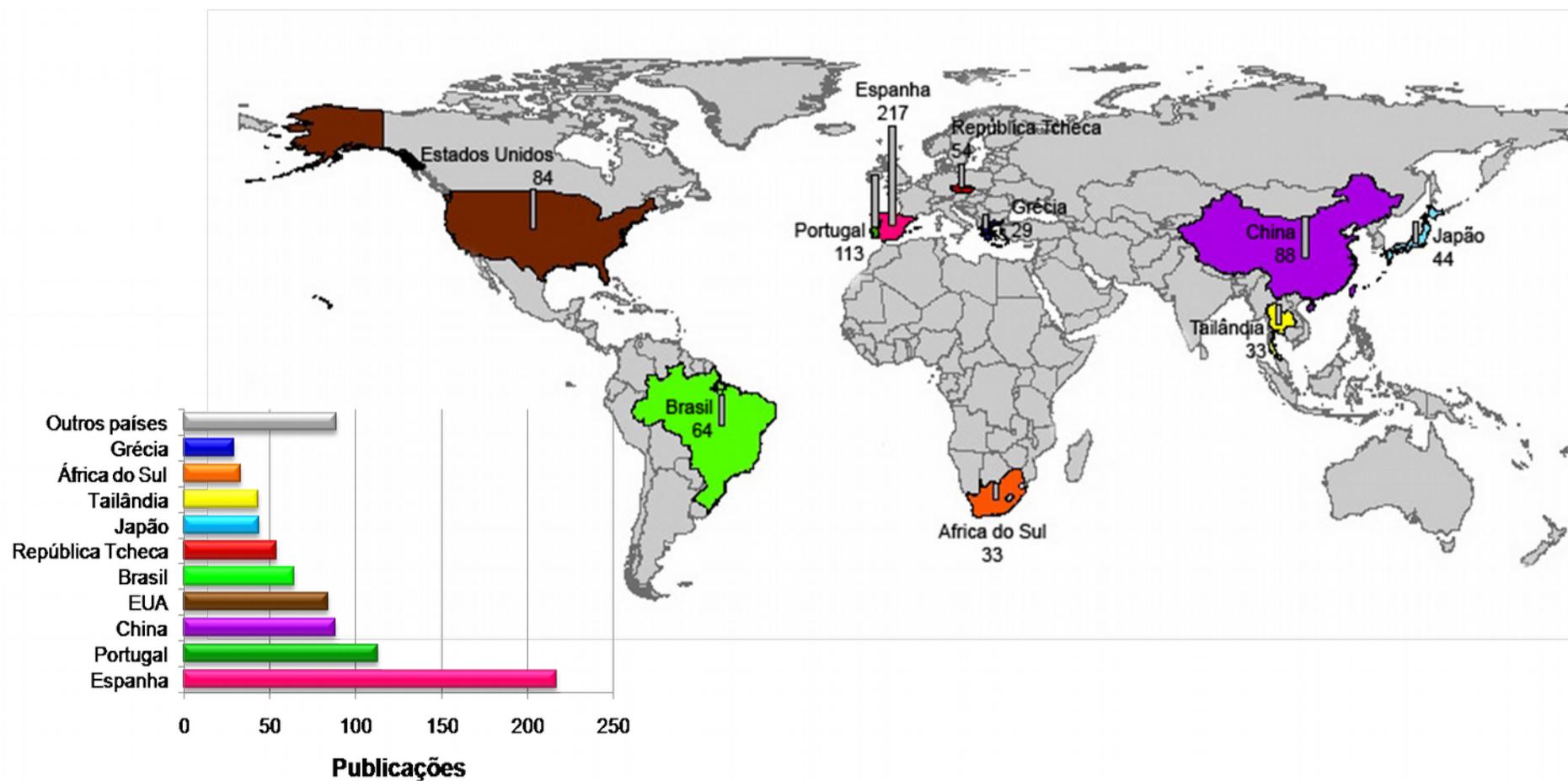


Figura 1.5. Perfil de distribuição das publicações em Análise por Injeção Seqüencial no período de 1990 a 2008. Fonte: www.isiknowledge.com, acesso em dezembro de 2008, entrada: sequential injection analysis, sub áreas: Química Analítica e Instrumentos e Instrumentação.

Desde 2004, a China vem impulsionando suas pesquisas em Análise por Injeção em Fluxo na mesma velocidade de crescimento do país, o que a tornou responsável por quase 20% das publicações, superando os antigos líderes (Estados Unidos e Espanha). Isso se deveu ao rápido aumento das ações em ciência e tecnologia na China. O Brasil manteve sua posição dentro dos dez países majoritários em produção nas estratégias de análises em fluxo.

Em 2008, os dez países majoritários respondiam por aproximadamente 75% das publicações que exploravam sistemas FIA, enquanto que o percentual referente aos sistemas SIA era de 95%. Esses dados permitem inferir que a época, os sistemas FIA estavam mundialmente mais difundidos do que os sistemas SIA.

Infelizmente, os percentuais correspondentes às contribuições dos outros países no período de 2004 a 2008 foram inferiores aos de tempos anteriores, o que permite concluir que, apesar da ascendência acadêmica, pesquisa envolvendo sistemas FIA (Figura 1.6) e SIA (Figura 1.7) vinham se restringindo a poucos grupos de pesquisa.

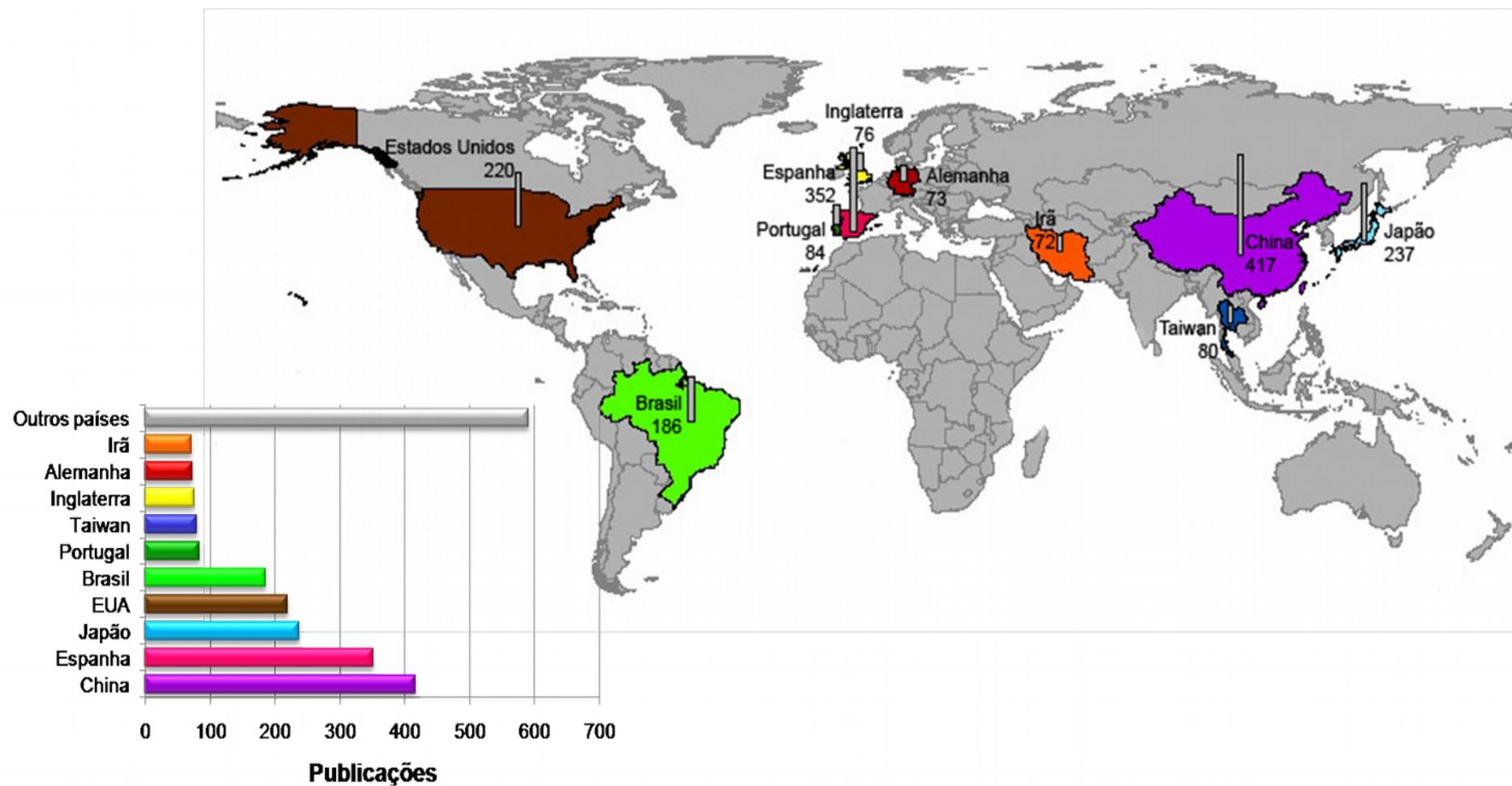


Figura 1.6. Perfil de distribuição das publicações em *Análise por Injeção em Fluxo* no período de 2004 a 2008. Fonte: www.isiknowledge.com, acesso em dezembro de 2008, entrada: *flow injection analysis*, sub áreas: *Química Analítica e Instrumentos e Instrumentação*.

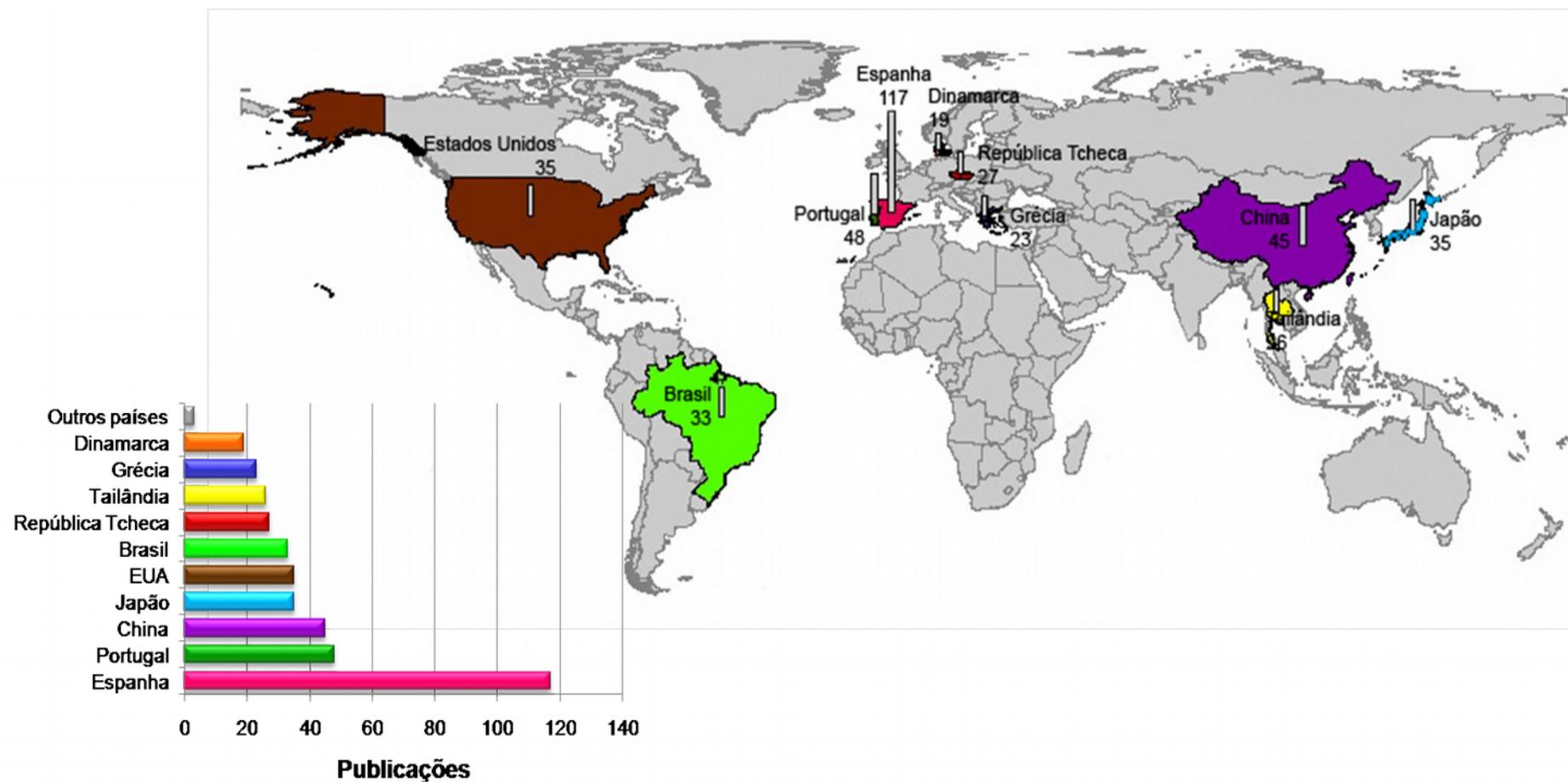


Figura 1.7. Perfil de distribuição das publicações em Análise por Injeção Sequencial no período de 2004 a 2008. Fonte: www.isiknowledge.com, acesso em dezembro de 2008, entrada: sequential injection analysis, sub áreas: Química Analítica e Instrumentos e Instrumentação.

1.3 - Técnicas de planejamentos experimentais

As diversas variáveis químicas e hidrodinâmicas relacionadas aos procedimentos em fluxo influenciam o desempenho analítico e a qualidade dos resultados obtidos. Desta forma, torna-se necessária uma avaliação adequada, visando à otimização dos parâmetros que influenciam nas figuras de mérito dos procedimentos analíticos, sendo esta, geralmente, a etapa que consome mais tempo no desenvolvimento de um procedimento.

O ideal prático da otimização deve atender aos seguintes objetivos:

- 1.0 Encontrar uma concepção física ou operacional que seja a mais adequada para resolver o problema em questão;
- 2.0 Definir os limites físicos para a formulação escolhida, representando fielmente a situação real;
- 3.0 Definir o modelo matemático adequado e otimizar.

Esse processo de otimização pode ser realizado de duas formas distintas: (i) empregando método univariado, onde o comportamento de cada variável é estudado individualmente e desconsiderando possíveis interações entre as mesmas; ou (ii) empregando planejamento multivariado, no qual as variáveis são otimizadas simultaneamente. Atualmente as técnicas de otimização multivariada vêm sendo preferencialmente aplicadas no desenvolvimento dos mais variados procedimentos analíticos, por permitir a otimização simultânea de todas as variáveis com menor número de experimentos. Isto, leva à menor geração de resíduos, menor consumo tempo e a uma maior eficiência de otimização.

Essas técnicas de otimização fazem parte de uma ciência recente – Quimiometria. A quimiometria começou formalmente na primeira metade da década de 70, mas só se firmou definitivamente quando os computadores tomaram espaço nos laboratórios químicos (Barros Neto *et al.*, 2006). Foi definida como a disciplina que utiliza a matemática, estatística e lógica formal para desenhar ou selecionar procedimentos experimentais ótimos e permitir

extrair o máximo de informações relevantes a partir da análise de dados químicos (Massart *et al.*, 1997).

Dentro dessa área, têm se destacado: a calibração multivariada, a classificação de espécies químicas e interpretação de dados multivariados por reconhecimentos de padrões e a otimização de experimentos. Esse último, nosso objeto de estudo.

O planejamento experimental é uma técnica multivariada de otimização que consiste em projetar um procedimento de forma a obter exatamente a informação que se procura sobre o sistema estudado. O planejamento fatorial (Bezerra *et al.*, 2008) composto central (Imandi *et al.*, 2008), matriz Doehlert (Ferreira *et al.*, 2004) e outros desenhos experimentais disponíveis podem ser utilizados quando se deseja avaliar, de maneira quantitativa, a influência das variáveis sobre o sistema, as interações entre essas variáveis, bem como as condições críticas para realização dos experimentos (Pasamontes *et al.*, 2006).

Esses planejamentos experimentais podem gerar equações de primeira ou segunda ordem. Os modelos lineares (de primeira ordem) são suficientes para identificar quais fatores apresentam influência sobre a resposta. Os modelos quadráticos (segunda ordem) permitem obter as condições ótimas.

Os fatores são as variáveis independentes que serão controladas no processo, podendo esses fatores ser quantitativos ou qualitativos. Enquanto que a resposta é a variável dependente. O domínio experimental investigado corresponde ao intervalo de valores de um fator entre os níveis inferior e superior, geralmente codificados como (-1) e (+1), respectivamente.

O planejamento fatorial de dois níveis é o planejamento mais simples. O número de experimentos (N) corresponde a 2^K ; onde K é o número de fatores. A partir desse tipo de planejamento só é possível gerar equações lineares do tipo $R(A,B) = b_0 + b_1A + b_2B + b_3AB + E$; onde, R é a resposta; b_0 é o termo independente que corresponde às informações que não estão intimamente ligada as variáveis investigadas; b_1 e b_2 são os coeficientes dos termos lineares; b_3 é o coeficiente do termo de interação; A e B são os fatores em processo

de otimização; e, E representa o erro experimental. Através dessa equação, é possível extrair informações sobre os fatores que mais afetam o sistema em estudo.

Os planejamentos experimentais multivariados que empregam mais de dois níveis exploram os desenhos experimentais que permitem gerar uma equação quadrática a partir da qual serão procuradas as condições críticas experimentais. A equação quadrática para dois fatores é do tipo: $R(A,B) = b_0 + b_1A + b_2B + b_3A^2 + b_4B^2 + b_5AB + E$; onde, R é a resposta; b_0 , o termo independente que corresponde às informações que não estão intimamente ligada as variáveis investigadas; b_1 e b_2 , os coeficientes dos termos lineares; b_3 e b_4 , os coeficientes dos termos quadráticos; b_5 , o coeficiente do termo de interação; A e B , os fatores em processo de otimização; e, E , o erro experimental. A partir da função quadrática gerada pelo planejamento experimental com mais de dois níveis, é possível encontrar duas distintas situações: (i) a função apresenta condição de máximo ou mínimo incluída no domínio investigado que representa a condição crítica experimental, concluindo a otimização; ou, (ii) a função não apresenta condição crítica e será calculada, através do vetor gradiente, uma região onde será feita a otimização.

As condições críticas para cada fator são calculadas de acordo com o critério de Lagrange que permite conclusões sobre o ponto crítico de uma equação de segunda ordem através do coeficiente de Hessian (H) de R : $H(A,B) = [\partial^2 R / \partial A^2(A,B) \quad \partial^2 R / \partial B^2(A,B) \quad \partial R / \partial A \partial B(A,B)]^2$ sob determinadas condições, o que corresponde a analisar pontos críticos dentro de um domínio restrito (Montgomery, 2005).

Quatro situações podem ser observadas a partir da equação quadrática. O ponto crítico é máximo se $H(A,B) > 0$ e $\partial^2 R / \partial A^2(A,B) < 0$ ou mínimo se $H(A,B) > 0$ e $\partial^2 R / \partial A^2(A,B) > 0$. O ponto crítico de máximo ou mínimo é calculado resolvendo o sistema de equações: $\partial R / \partial A(A,B) = 0$ e $\partial R / \partial B(A,B) = 0$.

Um ponto de sela pode ser observado se $H(A,B) < 0$ e não há informação sobre a condição crítica se $\partial^2 R / \partial A^2(A,B) < 0$. O ponto de sela é definido como um ponto crítico de uma superfície de resposta, o qual apresenta resposta máxima para níveis de algumas

variáveis e simultaneamente, apresenta resposta mínima para níveis de outras variáveis do sistema estudado (Santelli *et al.*, 2006).

Os sinais dos coeficientes quadráticos da equação do modelo permitem um indicativo preliminar de pontos críticos de máximo ou de mínimo. Se todos os coeficientes são positivos, a função pode apresentar uma condição de mínimo, enquanto que se todos os sinais são negativos, a função pode apresentar uma condição de máximo. Mas, ainda assim, será necessária a aplicação do critério de Lagrange.

Para o deslocamento dos domínios, aplicando o método do vetor gradiente, é necessário o cálculo do vetor que direciona o desenho a partir de dois ou mais pontos do desenho original, sendo este vetor dado por $\text{Grad } R(A,B) = \partial R/\partial A(A,B) + \partial R/\partial B(A,B)$. A interseção das linhas retas traçadas na direção do vetor gradiente indicará a zona onde é possível encontrar o máximo para a função resposta.

Em todos os desenhos experimentais é importante que os experimentos sejam realizados de forma aleatória para evitar que desvios sejam obrigatoriamente associados a prévias combinações de níveis. Nos casos em que eventuais variáveis são de difícil ajuste para realização dos experimentos em ordem aleatória, deve ser aplicado um tratamento matemático diferenciado (Barros Neto *et al.*, 2006). Também são necessárias réplicas de alguns experimentos. As réplicas permitem a obtenção de uma estimativa da variabilidade devido a erro experimental, ou erros aleatórios. Por meio da escolha adequada do número de réplicas é possível perceber, com a confiabilidade desejada, quaisquer efeitos produzidos pelas diferentes condições experimentais e que sejam considerados significantes do ponto de vista prático.

A eficiência de um planejamento corresponde à razão do número de coeficientes do modelo que será apresentado pelo número de experimentos necessários (Ferreira *et al.*, 2007). A Tabela 1.1 apresenta os valores de eficiência dos desenhos composto central, fatorial completo, matriz Doehlert e Box-Behnker.

Tabela 1.1. Comparação de valores de eficiência dos desenhos composto central (CCD), fatorial completo (FC), matriz Doehlert (DM) e Box-Behnker (BBD).

Fatores	Número de coeficientes	Eficiência			
		CCD	FC	DM	BBD
2	6	0,67	0,67	0,86	--
3	10	0,67	0,37	0,77	0,77
4	15	0,60	0,23	0,71	0,60
5	21	0,49	0,17	0,68	0,61
6	28	0,36	0,13	0,65	0,46
7	36	0,25	0,10	0,63	0,42
8	45	0,16	0,09	0,62	0,40

No Brasil, os planejamentos ou desenhos experimentais mais utilizados são os fatoriais completos ou fracionários e os planejamentos compostos centrais. Recentemente Ferreira e colaboradores (Ferreira *et al.*, 2004) vêm se dedicando à otimização de métodos analíticos usando planejamentos Doehlert. Esse desenho se difere dos demais devido aos diferentes números de níveis investigados para cada variável. A literatura ainda é muito restrita quanto ao uso do desenho Box-Behnker.

O desenho Box-Behnker (BBD) é uma classe de desenho de segunda ordem baseado em um fatorial incompleto de três níveis. O número de experimentos (N) corresponde a $N = 2k(k-1)$ (Ferreira *et al.*, 2007). As suas representações gráficas para três fatores podem ser observadas na Figura 1.8.

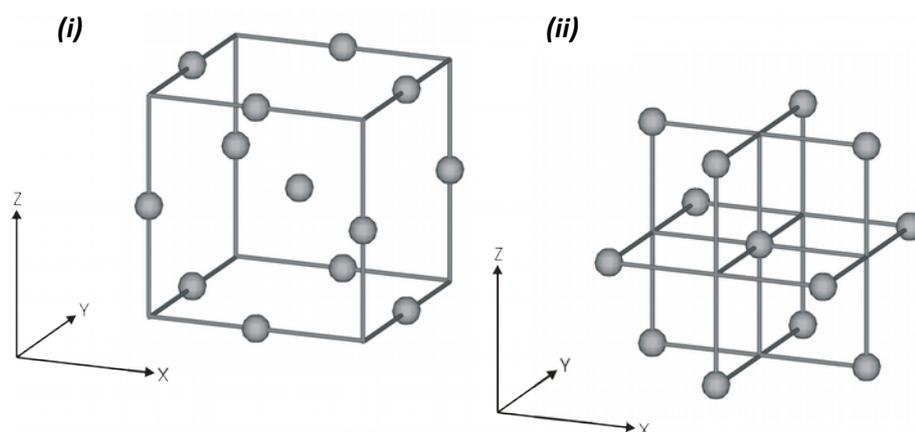


Figura 1.8. Representação gráfica do desenho Box-Behnker para três variáveis (i) um cubo constituído pelo ponto central e pelos pontos médios das arestas e (ii) representação como resultado da interlocação de desenhos fatoriais 2^2 .

Os pontos experimentais desse desenho situam-se sobre uma hiperesfera eqüidistante do ponto central. Pode-se observar (Figura 1.8(i)) que os pontos são derivados

de um cubo. Entretanto, ele é um desenho esférico, porque parte do domínio do cubo não é considerado para a construção do modelo.

A eficiência desse desenho é comparável com a eficiência da matriz Doehlert para três fatores e superior às eficiências do composto central e do planejamento fatorial completo. O modelo Box-Behnker não pode ser utilizado para metodologia de superfície de resposta de dois fatores.

O planejamento fatorial de três níveis (3^k), ao contrário dos planejamentos de dois níveis, permite uma relação quadrática entre a resposta e o desenho de fatores que deve ser modelado. O desenho 3^k é o menos eficiente quando comparado com outros desenhos experimentais (Tabela 1.1), mas pode ser muito útil para a otimização de dois fatores (Montgomery, 2005). O número de experimentos (N) pode ser calculado de acordo com a expressão $N = 3^k$, que nada mais é do que todas as combinações possíveis dos três níveis.

O aumento do número de fatores provoca também um aumento no número de ensaios que devem ser realizados e é preciso ter cuidado para estudar o maior número de variáveis possíveis para não excluir variáveis que possam influenciar significativamente na resposta. Quando é necessário avaliar a influência de muitos fatores, podemos utilizar nos estágios iniciais da experimentação, o planejamento fatorial fracionário que é constituído de uma fração do planejamento fatorial completo. No planejamento fracionário, o número de experimentos pode ser calculado por $N = 2^{k-1}$. Para a construção da matriz com as coordenadas dos experimentos, inicialmente é construído um planejamento 2^{k-1} completo para $K-1$ fatores e, para o fator K , é atribuído os sinais do produto das colunas anteriores.

Com o aumento do número de fatores há também aumento do número de interações de ordem alta que apresentam valores muito pequenos, praticamente desprezíveis. Se esses efeitos não são tão significativos, não é necessário que sejam determinados. Também, há maiores chances que esses efeitos não afetem significativamente a resposta, seja por meio de efeitos principais, seja por efeitos de interação (Barros Neto *et al.*, 2003).

Apesar das vantagens da otimização multivariada, somente nas últimas duas décadas houve sua efetiva difusão, devido à maior acessibilidade a microcomputadores e

pacotes estatísticos, os quais são necessários para a manipulação de dados e geração de informação. Porém, apesar desses subsídios (hardware e software), o processo de otimização ainda vem sendo realizado como uma etapa precedente e independente do desenvolvimento do procedimento analítico. Uma vez que essa etapa, geralmente é a que consome mais tempo no desenvolvimento de métodos e processos analíticos, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um sistema automatizado de otimização de parâmetros analíticos em procedimentos de Análises por Injeção Seqüencial empregando metodologias multivariadas. Assim, o desafio consistiu em criar uma rotina automatizada que incorporasse em um único módulo (microcomputador + sistemas de gerenciamento e propulsão de líquidos + detector) a otimização de parâmetros experimentais às etapas de construção de curvas analíticas e as determinações das concentrações do analito para simplificação e redução da interferência humana no desenvolvimento de procedimentos analíticos.

2- Experimental

2.1 - Reagentes, soluções e amostras

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico de pureza e as soluções foram sempre preparadas com água desionizada (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$).

Para determinação do teor de ferro total em amostras de fortificantes foi empregada solução carregadora de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ preparada a partir da diluição de 4,17 mL de ácido clorídrico P.A. (Merck) em 500 mL de água.

Solução de ácido ascórbico 2% (m/v) foi preparada a partir da dissolução de 1 g do reagente (Synth) em 50 mL de água. Solução de 1,10-*o*-fenantrolina 0,25% (m/v) foi preparada pela dissolução de 0,125 g do reagente (Riedel) em 50 mL de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A solução de Fe(III) 10 mg L^{-1} para utilização no processo de otimização foi previamente preparada pela dissolução de 0,0241 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck) em 50 mL de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para a construção da curva analítica e análise das amostras, soluções de referência de Fe(III) nas concentrações de 1 a 10 mg L^{-1} foram preparadas a partir de diluições adequadas da solução padrão 1000 mg L^{-1} (Tec-lab) em ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

As soluções das amostras de fortificantes foram preparadas a partir da diluição apropriada do medicamento em água. Os fortificantes utilizados foram Biotônico (DM Ind Farmacêutica), Maxtônico (Natulab), Tônico Vital (Globo) e Med Tônico (Medquímica).

Para os estudos envolvendo a determinação de captopril, solução 1,3% (m/v) em Fe(III) foi preparada dissolvendo-se 1,3 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck) em 100 mL de solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Solução de DMPD (sulfato de N-N-dimetil-p-fenilodiamina) $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 0,0586 g de DMPD ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{SO}_4$, Aldrich) em 50 mL de solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, sendo armazenada em frasco âmbar e em 4°C . Em todos os ensaios empregou-se água como transportador.

O fármaco utilizado para o preparo das soluções de referência apresentava grau de pureza mínima de 99,5%, conforme certificado de análise do fornecedor. O captopril (CPT) foi fornecido pela Galena Importação (Brasil).

Solução estoque de captopril foi preparada em água na concentração de 500 mg L⁻¹, partindo de 0,025 g do fármaco. Para evitar degradação do fármaco e de reagentes em geral, todas as soluções foram preparadas imediatamente antes dos experimentos. As soluções de referência no intervalo de concentração de 5 – 100 mg L⁻¹ do fármaco foram preparadas a partir de diluição apropriada da solução estoque.

Durante o processo de otimização do sistema de determinação de captopril foi utilizada amostra de medicamento contendo o fármaco, adquirida em farmácia de Salvador. As amostras analisadas após o processo de otimização foram também adquiridas em farmácias. As amostras foram preparadas pela dissolução de massa apropriada do comprimido em água, seguida por filtração. Os medicamentos utilizados foram Captopril (Sandoz), Captopril (Eurofarma), Captopril (Medley), Captopril (EMS) e Captopril (Biossintética).

Uma massa dos comprimidos previamente pulverizados equivalente a 50 mg do fármaco foi dissolvida em água e submetida a irradiação em banho ultrassônico sob baixa potência por dois minutos sob temperatura ambiente. Essa solução foi submetida à filtração para eliminação dos excipientes insolúveis em água.

Em ambas as aplicações, os brancos analíticos foram preparados da mesma forma que as soluções de referência, porém, sem a presença dos analitos.

2.2 - Equipamentos

Para as medidas dos sinais analíticos foi empregado espectrofotômetro Femto 700 Plus (São Paulo, Brasil) equipado com cela de fluxo de quartzo (Hellma) com 10 mm de caminho ótico e 80 µL de volume.

Para manipulação das soluções no sistema de análise por injeção seqüencial foi empregada válvula multiposição de oito vias Cheminert™ 25C-3188EMH (Valco, EUA). Bomba peristáltica de quatro vias Gilson Minipuls 3 (Villiers-Le-Bell, França) equipada com

tubos de propulsão de Isoversinic® foi empregada para promover a propulsão dos fluidos. Tubos de PTFE (0,8 mm d.i) foram empregados nas linhas de transmissão.

Um microcomputador Pentium II equipado com duas saídas RS-232 (uma saída destinada ao espectrofotômetro e outra destinada à válvula SIA) e uma interface PCL711-B (Advantech, Taiwan) foi empregado para desenvolvimento e aplicação do software. Este promovia o controle da vazão e do sentido da propulsão dos fluidos, seleção de porta da válvula multipoisição, aquisição e tratamento de dados dos dados gerados pelo espectrofotômetro, bem como sugestão para tomadas de decisão.

O software para otimização de variáveis do sistema SIA e para realização de todos os experimentos foi desenvolvido em linguagem de programação QuickBasic 4.5 em ambiente MS-DOS, sem necessidade de utilização de Windows ou outro sistema operacional. Para a utilização do software Statistica utilizado para comparação de dados, foi utilizado um microcomputador Pentium IV em ambiente Windows XP. Todos esses equipamentos foram utilizados em ambos os procedimentos (determinação de ferro total e captopril em produtos farmacêuticos).

Para o preparo das amostras de medicamentos contendo captopril foi utilizado um banho de ultrassônico Aquasonic modelo 75 D (USA) com frequência de 40 kHz e potência máxima de 40 W.

2.3 - Procedimentos

2.3.1 - Sistema de Análise por Injeção Seqüencial

Uma vez otimizadas as condições experimentais, uma alíquota de 150 µL de amostra contendo ferro foi aspirada entre alíquotas de soluções dos reagentes 1,10-*o*-fenantrolina e ácido ascórbico. Os volumes aspirados dos reagentes foram 277,3 e 292,1 µL, respectivamente. Essa zona composta por reagentes e amostras foram armazenadas na bobina de amostragem (B_a) e, posteriormente direcionadas à bobina de reação (B_r) a vazão de 5,03 mL min⁻¹. Finalmente essa zona foi encaminhada para detecção espectrofométrica a

512 nm. Na Tabela 2.1 estão ilustrados os passos empregados na determinação de ferro total pelo procedimento proposto.

Para a determinação de captopril, alíquotas de 300 μL da amostra de medicamento, 129,65 μL da solução de DMPD e 332,82 μL da solução de Fe(III), nesta ordem, eram aspiradas para a bobina de armazenamento (B_a). Essa zona composta foi direcionada à bobina de reação (B_r), para mistura e, finalmente encaminhada para detecção espectrofométrica a 485 nm. Os passos empregados para essa determinação estão ilustrados na Tabela 2.2. O diagrama do sistema SIA para ambos os procedimentos está apresentado na Figura 2.1.

Tabela 2.1. Passos envolvidos no procedimento proposto para determinação de ferro total. R1 = solução de 1,10-o-fenantrolina 0,25% (m/v) em HCl 0,1 mol L⁻¹, R2 = solução de ácido ascórbico 2% e Amostra = fortificante. – = aspiração. + = bombeamento.

Passo	Canal da válvula	Tempo (s)	Vazão (mL min ⁻¹)	Direção
R1	7	6,97	2,42	-
Branco	2	3,75	2,42	-
R2	8	7,77	2,42	-
Direcionamento para o detector	1	40	4,78	+
R1	7	6,97	2,42	-
Amostra	6	3,75	2,42	-
R2	8	7,77	2,42	-
Direcionamento para o detector	1	40	4,78	+

Tabela 2.2. Passos envolvidos no procedimento proposto para determinação de captopril. R1 = sulfato de N-N-dimetil-p-fenilodiamina (DMPD), R2 = FeCl₃.6H₂O (Fe(III)) e Amostras = medicamentos contendo captopril. – = aspiração. + = bombeamento.

Passo	Canal da válvula	Tempo (s)	Vazão (mL min ⁻¹)	Direção
Branco	2	7,5	2,42	-
R1	7	3,24	2,42	-
R2	8	8,32	2,42	-
Direcionamento para o detector	1	100	1,98	+
Amostra	6	7,5	2,42	-
R1	7	3,24	2,42	-
R2	8	8,32	2,42	-
Direcionamento para o detector	1	100	1,98	+

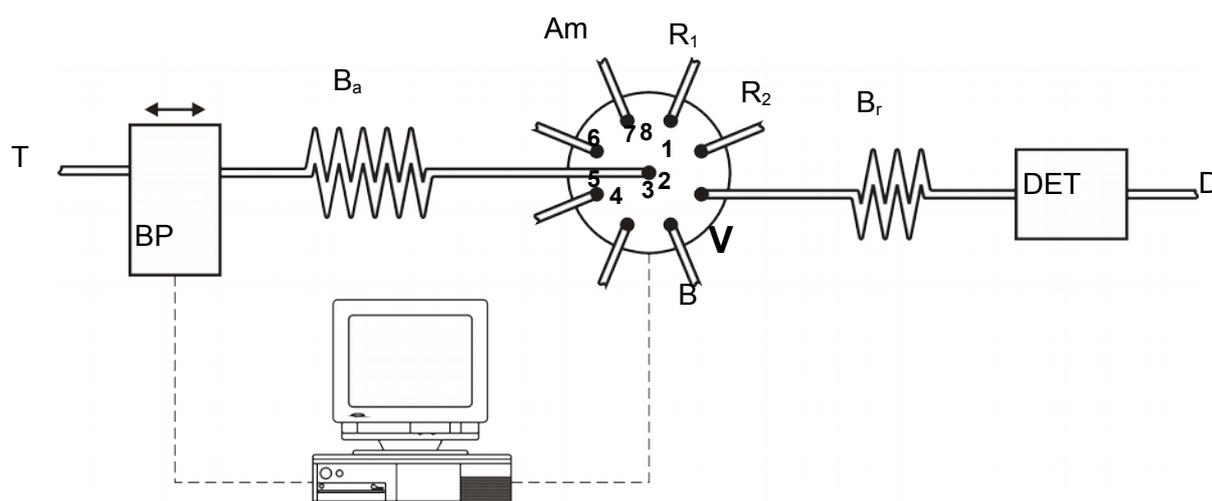


Figura 2.1. Diagrama SIA para determinação de ferro total e captopril em amostras de medicamentos. V = válvula multiposição, Am= amostra, B_a= Bobina de amostragem (3 m), B_r = Bobina de reação (150 cm), BP= bomba peristáltica, DET= espectrofotômetro e D= descarte. Para Fe total: R1 = solução de 1,10-o-fenantrolina, R2= solução de ácido ascórbico e T = solução de HCl. Para Captopril: R1 = solução de DMPD, R2= solução de Fe(III), B= branco analítico e T = água.

Os cálculos de *D* e *P* foram realizados pela injeção de solução de azul de bromotimol em NaOH 0,1 mol L⁻¹ (620 nm) nas condições otimizadas do sistema SIA proposto.

Os coeficientes de dispersão (*D*) foram calculados segundo a equação $D = S^0/S^{max}$, onde *S*⁰ corresponde ao sinal no estado estacionário e *S*^{max} ao sinal máximo nas condições

de análise (Ruzicka & Hasen, 1988). O grau de penetração entre zonas (P) foi calculado segundo a equação: $P = 2L_s/(L_a + L_r)$, onde L_s corresponde a largura na base do pico da zona sobreposta, L_a e L_r corresponde a largura na base do pico da zona da amostra e reagente, respectivamente (Gubeli *et al.*, 1991).

2.3.2 - Estudos preliminares ao planejamento experimental

Para cada um dos procedimentos propostos foi avaliada a influência da ordem de adição dos reagentes sobre a sensibilidade do método a partir da utilização de todas as combinações possíveis de ordem adição dos reagentes na bobina de amostragem. Nesses ensaios foram empregadas soluções de referência de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ em Fe(III) e amostras de captopril contendo *ca.* 50 mg L^{-1} .

A influência do comprimento de bobina de reação (B_r) sobre a sensibilidade do procedimento proposto foi avaliada entre 50 - 200 cm no procedimento para determinação de ferro total e no intervalo de 25 - 200 cm no procedimento para determinação de captopril.

2.3.3 - Otimizações multivariadas empregando a metodologia de superfície de resposta

Na otimização dos procedimentos utilizando metodologias multivariadas foi desenvolvido um sistema automático de otimização baseado em programa escrito em linguagem QuickBasic 4.5 que permitia a entrada de dados fornecida pelo usuário, a atuação sobre os dispositivos (seleção do canal da válvula multiposição e direção e velocidade de rotação dos roletes da bomba peristáltica), a aquisição dos sinais analíticos e o tratamento de dados. A lógica de programação envolvida é apresentada em fluxograma (Figura 2.2).

O primeiro passo do sistema consistia no fornecimento de dados por parte do usuário ao sistema operacional. Os dados necessários para os passos posteriores consistiam em: número de variáveis, domínio experimental (limites superior e inferior) de cada variável,

número de réplicas e número de experimentos no ponto central. Outra informação que o usuário devia fornecer era o desenho experimental desejado para a realização da otimização. Foram desenvolvidas sub-rotinas para os planejamentos fatoriais completo de dois e três níveis, o planejamento fatorial fracionário, o desenho composto central e o planejamento Box-Behnker. Os níveis intermediários eram calculados de acordo com o desenho selecionado e a matriz correspondente ao desenho experimental \mathbf{X} era então projetada, levando em consideração o número de réplicas e o número de experimentos no ponto central.

Uma vez construída a matriz relacionada ao desenho experimental, essa matriz passava por alguns processamentos matemáticos (cálculo da pseudomatriz) para facilitar o tratamento de dados após realização dos experimentos. Os experimentos eram sorteados para que fossem executados em ordem aleatória.

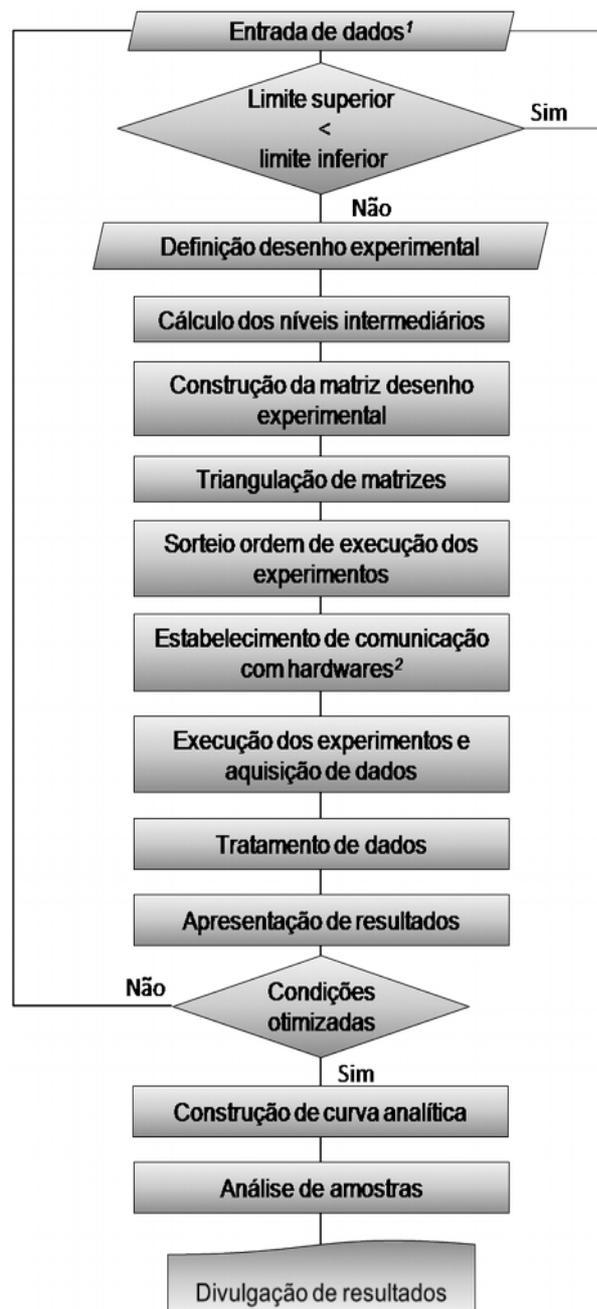
A comunicação com os hardwares eram estabelecidas através de portas seriais e também utilizando uma interface digital-analógica. Através dessa comunicação foi possível controlar a válvula multiposição, a bomba peristáltica e adquirir os dados gerados pelo espectrofotômetro.

Os coeficientes referentes à equação do modelo foram calculados de acordo com a expressão $\mathbf{b} = (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^t \cdot \mathbf{y}$ (Barros Neto, et. al. 2003), onde \mathbf{b} corresponde ao vetor dos coeficientes do modelo e \mathbf{X}^t a transposta da matriz desenho experimental, enquanto \mathbf{y} corresponde ao vetor resposta. Os efeitos correspondem ao dobro dos valores dos coeficientes. Foram considerados como efeitos significativos, se os valores fossem superiores aos desvios padrão dos experimentos realizados em réplicas multiplicados pelo valor de t correspondente ao número de grau de liberdade em estudo para probabilidade (p) de 0,05. Os resíduos foram calculados utilizando o método dos mínimos quadrados lineares. A avaliação da curvatura em torno do ponto central foi feita pelo cálculo de z, que pôde ser obtido pela equação $z = m_{\text{respostas}} - m_{\text{PC}}$, onde $m_{\text{respostas}}$ = média das respostas referente ao planejamento fatorial, m_{PC} = média das respostas dos experimentos no ponto central. Para

essa avaliação, o número de experimentos no ponto central foi pelo menos 20% superior ao número de experimentos do restante do planejamento (Massart et. al, 1997).

Para os experimentos realizados em três níveis, as condições críticas experimentais foram calculadas empregando o critério de Lagrange (Montgomery, 2005). Caso fossem obtidas condições críticas dentro do domínio investigado, o próximo passo passava a ser a construção da curva analítica para a determinação da concentração do analito nas amostras. Caso contrário, o programa desenvolvido permitia o cálculo do vetor gradiente e o deslocamento dos domínios onde um novo planejamento poderia ser construído.

Para confrontar os dados gerados pelo software desenvolvido e para apresentação das superfícies de respostas e gráficos de pareto foi utilizado o pacote Statistica 6.0.



¹Número de variáveis, domínio experimental: limites superior e inferior, número de réplicas e número de experimentos no ponto central.

²Válvula multiposição, bomba peristáltica com interface digital-analógica e espectrofotômetro.

Figura 2.2. Lógica de programação do sistema automático desenvolvido para otimização multivariada em sistemas SIA.

2.3.3.1 - Metodologia de superfície de resposta na determinação de ferro total

Foi avaliada a influência no sinal líquido do método das seguintes variáveis do sistema em fluxo: volumes dos reagentes e vazão de solução carregadora. A resposta selecionada para a otimização foi a diferença entre os sinais obtidos para o branco e para solução 10 mg L⁻¹ em ferro.

O método de otimização multivariada foi aplicado, empregando inicialmente o planejamento fatorial completo (Brereton, 2003). Os níveis das variáveis de fluxo avaliadas estão apresentados na Tabela 2.3. Foram efetuadas medidas em duplicata de todos os experimentos e medidas em sextuplicata no ponto central.

Tabela 2.3. Níveis empregados na otimização das variáveis do sistema de fluxo para determinação de ferro.

Variável	Valores codificados		
	-1	0	+1
Volume injetado de 1,10- <i>o</i> -fenantrolina / μ L	40	180	320
Volume injetado de ácido ascórbico / μ L	40	180	320
Vazão da solução transportadora / (mL min ⁻¹)	1,18	3,17	5,15

A partir dos resultados obtidos pelo planejamento fatorial, foi construído um novo planejamento experimental do tipo Box-Behnker (Massart *et. al*, 1997; Esbensen, 2002), onde se buscou as condições críticas dos três fatores investigados no planejamento anterior: volume do reagente cromogênico, volume do redutor e vazão da solução transportadora. Foram efetuadas medidas em triplicata no ponto central. Vale salientar que o programa permitia a utilização de outros desenhos experimentais que não foram explorados durante os experimentos.

2.3.3.2 - Metodologia de superfície de resposta na determinação de captopril

Nesse sistema, foi avaliada a influência das seguintes variáveis do sistema em fluxo no sinal líquido do método: volumes dos reagentes e vazão de solução carregadora, assim como das variáveis químicas: acidez dos reagentes DMPD e Fe(III). A resposta selecionada

para a otimização foi a diferença entre os sinais líquidos obtidos para o branco e para amostra de captopril rotulada como 50 mg L⁻¹.

O desenho experimental inicialmente aplicado foi o planejamento fatorial fracionário de dois níveis 2⁵⁻¹ para 5 fatores (Brereton, 2003). Os níveis das variáveis avaliadas estão apresentados na Tabela 2.4. As medidas no ponto central foram realizadas oito vezes. Nesse nível foi necessário multicomutar as soluções dos reagentes de maior e menor acidez para obter o reagente de acidez no nível intermediário que corresponde ao ponto central do domínio experimental. Uma zona composta por segmentos alternados entre soluções de acidez extremas promoveu uma mistura resultante onde a solução apresentava acidez intermediária.

Tabela 2.4. Níveis empregados na otimização das variáveis do sistema de fluxo para determinação de captopril, planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻¹.

Variável	Valores codificados		
	-1	0	+1
Acidez do reagente Fe(III) / (mol L ⁻¹)	0,1	0,3	0,5
Volume injetado Fe / µL	30	90	150
Acidez do reagente DMPD / (mol L ⁻¹)	0,1	0,3	0,5
Volume injetado DMPD / µL	15	45	75
Vazão da solução carregadora / (mL min ⁻¹)	1,18	3,17	5,15

Um segundo desenho experimental foi empregado, que consistia em um planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹ para quatro fatores. Duas variáveis do planejamento fatorial 2⁵⁻¹ (acidez do DMPD e acidez do Fe(III)) foram incorporadas em uma única variável: acidez dos reagentes. Os níveis das variáveis avaliadas estão apresentados na Tabela 2.5. As medidas no ponto central foram realizadas em sextuplicata. Também foi necessário multicomutar as soluções com acidez extremas (alternando entre injeções de solução de maior acidez e solução de menor acidez) para obter a acidez na condição intermediária.

Tabela 2.5. Níveis empregados na otimização das variáveis do sistema de fluxo para determinação de captopril, planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹.

Variável	Valores codificados		
	-1	0	+1
Acidez dos reagentes / (mol L ⁻¹)	0,1	0,3	0,5
Volume injetado Fe / µL	30	90	150
Volume injetado DMPD / µL	15	45	75
Vazão da solução carregadora / (mL min ⁻¹)	1,18	3,17	5,15

A partir dos resultados obtidos pelos planejamentos fatoriais fracionários, foi construído um novo planejamento experimental empregando a metodologia de superfície de resposta onde os novos níveis estão apresentados na Tabela 2.6. O desenho experimental empregado foi o fatorial completo para três níveis (Brereton, 2003) onde se buscou as condições críticas de dois fatores investigados no planejamento anterior: volume de solução de Fe(III) e volume de DMPD. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e o ponto central foi realizado em quintuplicata. O programa para automatização desenvolvido realizava os experimentos de forma aleatória.

Tabela 2.6. Níveis empregados na metodologia de superfície de resposta, desenho experimental fatorial completo 3².

Variável	Valores codificados		
	-1	0	+1
Volume injetado Fe / µL	60	230	400
Volume injetado DMPD / µL	60	130	200

2.3.4 - Comparação das figuras de mérito nas condições críticas e extremas do domínio experimental

Uma vez otimizadas as condições experimentais, foram construídas curvas analíticas nas condições limites do domínio experimental e nas condições críticas experimentais que

estão apresentadas nas Tabela 2.7 e 2.8, visando estabelecer uma comparação entre as figuras de mérito dessas curvas.

Tabela 2.7. Condições experimentais de realização das curvas analíticas para determinação de ferro total.

Curvas	Fatores		
	Volume injetado 1,10-o-fenantrolina	Volume injetado ácido ascórbico	Vazão da solução carregadora
	/ μL	/ μL	/ (mL min^{-1})
Curva 1	1	1	1
Curva 2	1	1	-1
Curva 3	1	-1	1
Curva 4	1	-1	-1
Curva 5	-1	1	1
Curva 6	-1	1	-1
Curva 7	-1	-1	1
Curva 8	-1	-1	-1
Curva 9	0	0	0
Curva 10	crítico	crítico	crítico

Tabela 2.8. Condições experimentais de realização das curvas analíticas para determinação de captopril.

Curvas	Fatores	
	Volume injetado	Volume injetado
	DMPD / μL	Fe(III) / μL
Curva 1	1	1
Curva 2	1	-1
Curva 3	-1	1
Curva 4	-1	-1
Curva 5	crítico	crítico

2.3.5 - Métodos de referência

Para validação do procedimento proposto quanto à exatidão foi utilizado o método de referência para determinação de ferro total em amostras de fortificantes baseado na mesma reação empregada (Fe(II) com 1,10-o-fenantrolina), mas em batelada.

A validação do procedimento proposto para determinação de captopril, quanto à exatidão, foi realizada empregando o método de referência preconizado pela Farmacopéia Americana (United States Pharmacopeial Convention, 2002). O método é baseado em uma titulação iodimétrica em meio ácido, onde o titulante KIO_3 e a amostra devem estar na presença de iodeto e amido para identificação do ponto final.

Os cálculos relativos às figuras de mérito: limites de detecção e de quantificação foram realizados de acordo com as seguintes expressões, $\text{LOD} = c_b + 3s_b/a_c$ e $\text{LOQ} = c_b + 10s_b/a_c$; onde c_b corresponde a concentração calculada referente ao sinal do branco analítico e s_b o desvio padrão ($N = 10$), enquanto a_c corresponde ao coeficiente angular da curva analítica correspondente (Miller & Miller, 2002). O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado de acordo com a expressão: $\text{RSD} = (s_p/x_p) \times 100$; onde s_p equivale ao desvio padrão relativo a um determinado padrão analítico e x_p corresponde ao valor médio encontrado para este padrão ($N = 10$) (Miller & Miller, 2002).

3- Resultados e discussões

Os sistemas automatizados até então desenvolvidos em instrumentação analítica, geralmente empregam a automatização a partir da etapa de construção da curva analítica. Neste sistema, a automatização do planejamento experimental seguiu como diferencial para o aumento do desempenho de procedimentos analíticos. Para exemplificação de sua atuação, o sistema foi aplicado em uma reação clássica para determinação de ferro total em amostras de fortificantes, onde o Fe(III) primeiramente foi reduzido para Fe(II) que reagia com o 1,10-*o*-fenantrolina. Em um segundo momento, a aplicação do sistema foi exemplificada em uma reação de formação de um produto instável para determinação de captopril pela reação com uma amina aromática *p*-substituída (DMPD) na presença de agente oxidante (solução de Fe(III)) em amostras de medicamentos. Como o objetivo consistia em avaliar o desempenho do sistema automatizado, essas reações foram empregadas em amostras de medicamentos, que são amostras com um baixo grau de complexidade.

Do ponto de vista instrumental, para a utilização do sistema automatizado, é necessário dispor de um microcomputador inferior a Pentium II com conector de interfaces tipo ISA para adaptação da interface de conversão digital/analógica (D/A), a qual foi responsável pelo controle da vazão das soluções nos sistemas SIA. Esse controle poderia ser feito sem essa interface, caso fosse construído um circuito eletrônico para o controle da diferença de potencial produzida pela porta paralela. Se não fosse utilizada a interface de conversão de sinal digital em analógico ou qualquer outra interface de conversão, não seria possível realizar a otimização da vazão.

O microcomputador deve possuir duas portas seriais, uma destinada ao controle da válvula multiposição e outra para a aquisição de dados do espectrofotômetro. Na ausência de uma das portas, a aquisição de dados poderia ser realizada por interface que permita conversão analógica/digital (A/D). A interface PCL 711B empregada para a conversão D/A

apresenta também um conversor A/D que poderia ser empregado para a aquisição de dados.

3.1 - Lógica da programação

Para aumentar o desempenho de procedimentos analítico, foi desenvolvido um sistema automatizado que incorporou a etapa de otimização multivariada de parâmetros aos procedimentos de Análises por Injeção Seqüencial. O programa foi elaborado de forma a acoplar etapas que eram então realizadas pelo operador de forma independente: a otimização de variáveis (planejamento experimental + execução + aquisição de dados + tratamento dos dados), construção de curva analítica nas condições otimizadas e determinação da concentração do analito nas amostras. Neste contexto, as intervenções por parte do operador foram minimizadas e não foi necessário modificações nas configurações físicas do sistema SIA.

O sistema automatizado possuiu grau de complexidade médio, onde as tarefas foram pré-definidas e o papel da automatização foi parcial onde havia a participação humana, mesmo que limitada. Uma vez desenvolvido o programa, a participação do operador foi restrita ao preparo das soluções (amostra, reagentes, soluções de referência), troca das soluções no canal de amostra (A_m), entrada de dados (quantidade e tipo de variáveis, domínios experimentais, tipo de desenho experimental, número de réplicas e número de experimentos no ponto central) e a tomada de decisão de sugestões emitidas pelo programa.

Assim, inicialmente era definido pelo operador o número de variáveis ($n.var$) e o tipo correspondente a cada uma das variáveis (vazão, volume e acidez). Uma vez definida a variável $n.var$, a etapa seguinte consistia na entrada de dados referente ao domínio experimental de cada variável, formando uma matriz $dom.var(n.var, 3)$. As três colunas dessa matriz correspondiam ao número de níveis investigados. Um exemplo da tela referente à entrada de dados para três fatores pode ser observado na Figura 3.1. Uma vez definido o domínio experimental, o operador devia selecionar o desenho experimental e

estabelecer o número de réplicas (*n.rep*) e o número de experimentos no ponto central (*n.pontocentral*), para que o programa efetuasse as etapas seguintes como o cálculo do número de experimentos (*n.exp*) e, posteriormente, construir a matriz referente ao planejamento experimental correspondente ao desenho escolhido e era apresentada ao operador sob duas formas distintas: codificada (*matriz*) e com os valores reais (*matriz.real*). Corte do programa contendo a lógica para a definição dessas matrizes está apresentado na Figura 3.2. O operador selecionava o número para variável *resp.design* que assumia valores de 1 a 4 e, dessa forma as matrizes referentes ao desenho selecionado era construída na sub-rotina correspondente. Neste trabalho foram disponibilizados para a seleção do operador os seguintes planejamentos: fatorial completo de dois e três níveis, fatorial fracionário, desenho composto central e Box-Behnker. Para a utilização desses desenhos, foi necessário que o operador apresentasse conhecimento prévio sobre as condições e informações que poderia adquirir com o planejamento experimental selecionado.

```
----- ENTRADA DE DADOS -----  
  
Numero de variáveis: 3  
  
Limite inferior do fator 1: __           Limite superior do fator 1: __  
Limite inferior do fator 2: __           Limite superior do fator 2: __  
Limite inferior do fator 3: __           Limite superior do fator 3: __
```

Figura 3.1. Tela de entrada do domínio experimental.

```

'----- CONSTRUCAO DA MATRIZ DESIGN -----
IF resp.design = 1 THEN
  CALL CompostoCentral(n.rep%, n.pontocentral%, n.exp%, matriz!(), matriz.real!())
ELSE
  IF resp.design = 2 THEN
    CALL Fatorial3Niveis(n.rep%, n.pontocentral%, n.exp%, matriz!(), matriz.real!())
  ELSE
    IF resp.design = 3 THEN
      CALL BoxBehnKer(n.rep%, n.pontocentral%, n.exp%, matriz!(), matriz.real!())
    ELSE
      IF resp.design = 4 THEN
        CALL FatorialFrac(n.rep%, n.pontocentral%, n.exp%, matriz!(), matriz.real!())
      END IF
    END IF
  END IF
END IF
END IF

```

Figura 3.2. Corte do programa contendo a lógica usada para a chamada de sub-rotinas específicas referentes aos diferentes desenhos experimentais.

Para todas as fases do tratamento de dados foi utilizada a matriz contendo os valores codificados $matriz(n.exp, n.var+1)$. Uma nova coluna foi adicionada ao número de variáveis para numeração aleatória dos experimentos. Ambas as matrizes eram apresentadas ao operador antes da realização dos experimentos, como na Figura 3.3.

APRESENTAÇÃO DAS MATRIZES							
Matriz codificada				Matriz com valores reais			
Ordem dos experimentos	Tempo reagente1	Tempo reagente2	Vazão	Ordem dos experimentos	Tempo reagente1	Tempo reagente2	Vazão
13	-1	-1	0	13	1	1	3
2	1	-1	0	2	8	1	3
4	-1	1	0	4	1	8	3
5	1	1	0	5	8	8	3
7	-1	0	-1	7	1	4.5	1
9	1	0	-1	9	8	4.5	1
3	-1	0	1	3	1	4.5	5
6	1	0	1	6	8	4.5	5
11	0	-1	-1	11	4.5	1	1
12	0	1	-1	12	4.5	1	1
1	0	-1	1	1	4.5	1	5
15	0	1	1	15	4.5	8	5
8	0	0	0	8	4.5	4.5	3
14	0	0	0	14	4.5	4.5	3
10	0	0	0	10	4.5	4.5	3

Figura 3.3. Tela de apresentação das matrizes construídas baseadas no desenho experimental selecionado pelo operador.

A matriz contendo valores reais passava por processamentos matemáticos para o cálculo de sua pseudomatriz para facilitar o tratamento de dados após realização dos experimentos. Nesta etapa, a primeira coluna da matriz, a qual correspondia às informações sobre a ordem de execução dos experimentos era desprezada. Para esse processamento, a matriz $matriz.real(n.exp, n.var)$ era então modificada de acordo com o número de coeficientes ($n.c$) que seriam gerados no modelo, ao assumir as dimensões ($n.exp, n.c$). Por exemplo, em um modelo quadrático para duas variáveis, seriam gerados seis coeficientes. Portanto, as duas primeiras colunas passariam a apresentar os termos quadráticos; as duas subseqüentes, os termos lineares; e, as duas últimas colunas assumiriam o termo de interação e o termo independente (1). Assim como descrito no exemplo a seguir:

$$Matriz\ dos\ fatores: \begin{pmatrix} A_{1,1} & B_{1,2} \\ \vdots & \vdots \\ A_{n.exp,1} & B_{n.exp,2} \end{pmatrix}$$

$$Matriz\ modificada: \mathbf{X} = \begin{pmatrix} A_{1,1}^2 & B_{1,2}^2 & A_{1,3} & B_{1,4} & AB_{1,5} & 1_{1,6} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ A_{n.exp,1}^2 & B_{n.exp,2}^2 & A_{n.exp,3} & B_{n.exp,4} & AB_{n.exp,5} & 1_{n.exp,6} \end{pmatrix}$$

Para realização dessa etapa, a matriz transposta (\mathbf{X}^t) era então calculada pela transposição da matriz (\mathbf{X}), para, então, ser calculada a matriz inversa deste produto $(\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1}$. Para a aplicação desta sub-rotina, só era necessário, os números de linhas e colunas da matriz, os quais já haviam sido definidos por $n.exp$ e $n.c$, respectivamente. É importante ressaltar que não havia a possibilidade de inexistência de matriz inversa, visto que elas são baseadas em desenhos experimentais previamente estabelecidos em que a matriz quadrática dos parâmetros não apresenta determinante nulo.

Devido ao laborioso processo de criação de sub-rotinas para esse processamento matemático em linguagem QuickBasic 4.5, em um segundo momento, as pseudomatrizes $(X^t X)^{-1} X^t$ foram fixadas no programa em um banco de dados. Isto foi feito, devido ao fato dessas matrizes dependerem somente do desenho experimental selecionado, do número de réplicas e do número de experimentos no ponto central, uma vez que as variáveis já estavam codificadas e os domínios das variáveis codificadas estão sempre entre -1 e +1, exceção feita ao domínio referente ao planejamento composto central. Assim, todas as vezes que essas variáveis (número de variáveis, desenho experimental selecionado, número de réplicas e número de experimentos no ponto central) se repetissem, a matriz planejamento será a mesma e, conseqüentemente, a sua pseudomatriz também será. Desta forma, foi evitada a etapa de cálculo da pseudomatriz substituindo pela busca em um banco de dados.

A execução dos experimentos foi realizada de acordo com a ordem sorteada e, para cada experimento era realizada a leitura do branco e da amostra (real ou sintética). Idealmente o processo de otimização deve ser realizado com amostra, uma vez que a matriz da solução de referência geralmente não apresenta semelhança com a composição da amostra. Para a realização desse processo é necessário ter um conhecimento aproximado da concentração do analito na amostra, caso não seja possível, pode ser realizada uma adição de padrão à amostra de concentração desconhecida.

Todos os registros eram gravados em arquivos no diretório escolhido pelo usuário e os sinais correspondentes aos máximos valores líquidos de absorvância eram armazenados no vetor resposta $resp(n.exp)$. A multiplicação da pseudomatriz $matriz.real(n.exp, n.c)$ pelo vetor resposta $resp(n.exp)$ permitiu a geração do vetor dos coeficientes do modelo $coeficientes(n.c)$. Toda essa triangulação inicial pode ser resumida pela equação abaixo

$$b_{(n.c)} = (X_{(n.c,n.exp)}^t \cdot X_{(n.exp,n.c)})^{-1} X_{(n.c,n.exp)}^t \cdot Y_{n.exp}$$

Exemplo genérico de cálculo do vetor contendo os coeficientes para um modelo quadrático de dois fatores é apresentado na equação abaixo:

$$\begin{pmatrix} b_1 \\ \vdots \\ b_{n.c} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_{1,1}^2 & \dots & A_{n.exp,1}^2 \\ B_{1,2}^2 & \vdots & B_{n.exp,2}^2 \\ A_{1,3} & \vdots & A_{n.exp,3} \\ B_{1,4} & \vdots & B_{n.exp,4} \\ AB_{1,5} & \vdots & AB_{n.exp,5} \\ 1_{1,6} & \dots & 1_{n.exp,6} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} A_{1,1}^2 & B_{1,2}^2 & A_{1,3} & B_{1,4} & AB_{1,5} & 1_{1,6} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ A_{n.exp,1}^2 & B_{n.exp,2}^2 & A_{n.exp,3} & B_{n.exp,4} & AB_{n.exp,5} & 1_{n.exp,6} \end{pmatrix}^{-1} \cdot \begin{pmatrix} y_1 \\ \vdots \\ y_{n.exp} \end{pmatrix}$$

A equação do modelo podia então ser apresentada através dos coeficientes encontrados e os pontos críticos calculados de acordo com o critério de Lagrange. O vetor dos efeitos *efeito(n.c)* foi obtido pela multiplicação dos valores referentes ao vetor dos coeficientes *coeficientes(n.c)* pelo escalar dois, exceção feita ao termo independente, uma vez que só foram avaliados efeitos de planejamentos fatoriais e fatoriais fracionários.

$$\begin{pmatrix} e_1 \\ \vdots \\ e_{n.c} - 1 \end{pmatrix} = 2 \cdot \begin{pmatrix} b_1 \\ \vdots \\ b_{n.c} - 1 \end{pmatrix}$$

Caso fossem obtidas condições críticas dentro do domínio investigado, o próximo passo passava a ser a construção da curva analítica para a análise das amostras. Para dar continuidade aos experimentos, era necessário o aval (tomada de decisão) do operador, bem como a disponibilidade de soluções de referências com diferentes concentrações do

analito. Optou-se por não empregar o processo de diluição *in-line* (ECONOMOU, 2005), pois seria necessária uma etapa precedente de construção de uma curva analítica em batelada para cálculo do fator de diluição, o que possivelmente, exigiria maior qualificação do operador.

Caso a função resposta não apresentasse um máximo, era necessário prosseguir com o processo de otimização das variáveis, estimando uma nova zona de região ótima. Para isto é necessário o cálculo do vetor gradiente que direciona para um novo domínio experimental onde outro planejamento experimental pode ser realizado, desde que a sugestão emitida pelo programa tenha sido acatada pelo operador. Na entrada de dados, era necessário que ele apresentasse algum conhecimento prévio sobre o sistema químico para informar as variáveis de interesse e o domínio experimental. O desconhecimento da química envolvida e limitações instrumentais podem inviabilizar o deslocamento dos domínios experimentais para um ou mais fatores, mas essa decisão cabe ao operador.

Os resíduos referentes ao modelo gerado foram calculados utilizando o método de regressão dos mínimos quadrados lineares, que consiste na busca dos coeficientes que minimizem a soma dos quadrados dos resíduos. O ajuste mais simples é uma reta. O mesmo método foi utilizado para o tratamento dos dados para geração da equação da reta referente à curva analítica.

O primeiro relatório gerado continha as informações referentes ao processo de otimização como a equação do modelo, as condições críticas calculadas, os efeitos e as informações sobre os resíduos do modelo. Se fossem realizadas as análises, no relatório seguinte, estavam presentes informações sobre a curva analítica e as concentrações do analito nas amostras. Este último relatório continha também outras informações como os coeficientes angular, linear e de correlação da curva analítica e as concentrações das amostras analisadas com seus respectivos desvios padrão.

No desenvolvimento do programa foram avaliadas possíveis funções respostas a partir dos dados gerados pelo detector. A primeira opção analisada foi a sensibilidade, pois a mesma atua sobre outras características analíticas como limites de detecção e

quantificação. Uma segunda opção foi normalizar a resposta (absorbância) em função dos volumes de reagentes injetados para o procedimento do captopril, visando promover melhor resposta com menor consumo de reagentes, em especial de DMPD. Dessa forma, estariam sendo consideradas tanto as figuras de mérito (sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação), como fatores de ordem econômica e ambiental. Contudo, não foi observada diferença significativa utilizando esta resposta para o procedimento proposto para o captopril. É importante a obtenção de grau de sobreposição de zonas (P) próxima a unidade, mas não foi possível a utilização desse parâmetro como fator resposta porque menores volumes de amostras e reagentes provocariam maior dispersão da zona composta (amostra + reagentes) no percurso analítico e, conseqüentemente, o sinal líquido seria reduzido. Portanto, o fator resposta selecionado foi o sinal líquido, o qual corresponde à diferença entre os sinais da amostra e do branco analítico.

3.2 - Otimizações preliminares ao planejamento experimental

Dois parâmetros que devem ser considerados em sistemas de Análise por Injeção Seqüencial foram otimizados sem utilização do programa para automatização desenvolvido. Esses parâmetros foram: (i) ordem de aspiração dos reagentes e amostra para a bobina de amostragem (B_a); e (ii) o comprimento da bobina de reação (B_r).

A ordem de aspiração dos reagentes e amostra influencia sensivelmente no sinal analítico gerado e todas as combinações possíveis devem ser antecipadamente avaliadas. Fato esse que corroborou para que esse parâmetro não fosse explorado no planejamento experimental. Portanto para essa etapa foi dispensado o uso do programa desenvolvido. Os sinais obtidos para as mesmas soluções de amostra e reagentes para as diferentes ordens de aspiração avaliadas no procedimento de determinação de ferro total em fortificantes estão apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Efeito da ordem de aspiração das soluções de reagentes e amostra sobre o sinal analítico para determinação de ferro total em fortificantes. Condição: 120 μL de solução de Fe(III) 2,5 mg L^{-1} , 120 μL de agente redutor: ácido ascórbico e reagente cromogênico: 1,10-*o*-fenantrolina, $B_r = 50 \text{ cm}$ e $\Phi_{\text{transportador}} = 2,42 \text{ mL min}^{-1}$ ($N = 3$).

Entrada	Ordem de Aspiração	Sinal líquido
1	Fe – Redutor – Fenantrolina	0,049 \pm 0,001
2	Fe – Fenantrolina – Redutor	0,072 \pm 0,001
3	Redutor – Fenantrolina – Fe	0,054 \pm 0,001
4	Fenantrolina – Redutor – Fe	0,054 \pm 0,001
5	Fenantrolina – Fe – Redutor	0,081 \pm 0,001
6	Redutor – Fe – Fenantrolina	0,081 \pm 0,001

De acordo com os aspectos envolvidos na reação em estudo onde o produto medido é o complexo formado entre o ferro no estado de oxidação 2+ e a 1,10-*o*-fenantrolina, a amostra contendo íons Fe(III) e Fe(II) deve entrar em contato primeiro com o redutor para posterior reação com o reagente cromogênico. Era de se esperar que as ordens de aspiração referente às entradas 1 e 4 (Tabela 3.1) apresentassem melhores níveis de sensibilidade. Contudo, os baixos valores de resposta obtidos para as entradas 1 e 4 (Tabela 3.1) foram relacionados a uma mistura pouco efetiva da 1,10-*o*-fenantrolina com a zona da amostra, já que as mesmas não apresentavam interface.

As misturas que apresentaram maiores sensibilidades correspondiam às zonas onde as soluções de complexante e redutor encontravam-se nos extremos (entradas 5 e 6), formando um sanduíche com a zona de amostra. Portanto, a ordem de aspiração selecionada para os experimentos posteriores foi Fenantrolina – Fe – Redutor.

A etapa principal da reação em estudo para determinação de captopril consistia na formação de um radical iminoquinona para posterior reação com o analito (Chagas, 2007). As alíquotas dos reagentes DMPD e Fe(III) deveriam ser aspiradas em seqüência para formar uma interface de reação. Desta forma, ocorreria primeiramente a produção do radical

iminoquinona e, em seqüência, a reação desta espécie com o captopril. Mais uma vez, todas as ordens de adição possíveis foram avaliadas e estão apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Efeito da ordem de aspiração das soluções de reagentes e amostra sobre o sinal analítico para determinação de captopril em medicamentos. Condição: 120 μL de CPT (50 mg L^{-1}), 120 μL de solução de Fe(III) e 60 μL de solução de DMPD, $B_r = 100 \text{ cm}$ e $\Phi_{\text{transportador}} = 4,01 \text{ mL min}^{-1}$ ($N = 3$).

Entrada	Ordem de Aspiração	Sinal líquido
1	CPT – Fe(III) – DMPD	-0,049 \pm 0,036
2	CPT – DMPD – Fe(III)	0,262 \pm 0,001
3	DMPD – Fe(III) – CPT	0,043 \pm 0,002
4	Fe(III) – DMPD – CPT	0,241 \pm 0,003
5	Fe(III) – CPT – DMPD	0,067 \pm 0,008
6	DMPD – CPT – Fe(III)	0,144 \pm 0,016

As entradas 2 e 4 da Tabela 3.2 correspondem às misturas que apresentaram os maiores sinais líquidos. Nessas misturas, as amostras não entraram em contato diretamente com a solução de Fe(III), evitando uma possível reação oxidação do captopril pelo Fe(III) ou complexação do Fe(III) com o captopril. A oxidação do captopril pelo Fe(III) foi a explicação para o sinal líquido negativo (entrada 1, Tabela 3.2), pois o radical iminoquinona formado também absorve no comprimento de onda de 485 nm. Nesta condição menos radical iminoquinona foi produzido pois parte dos íons Fe(III) foram consumidos para a oxidação do analito.

Os menores sinais obtidos para as condições onde a amostra permanece no centro da zona (entradas 5 e 6, Tabela 3.2) foram relacionados com a mistura pouco efetiva entre as soluções de DMPD e Fe(III), assim como por uma oxidação parcial do captopril pelo Fe(III).

A ordem de aspiração CPT–DMPD–Fe(III) foi selecionada para os experimentos posteriores, pela virtude de apresentar sensibilidade ligeiramente mais elevada que a obtida com a ordem de aspiração Fe(III) – DMPD – CPT.

A influência do comprimento de bobina sobre nos procedimentos propostos foi avaliada de forma univariada, variando o comprimento de B_r no intervalo de 50 - 200 cm

para determinação do teor de ferro total (Figura 3.4) e entre 25 e 200 cm para a determinação de captopril (Figura 3.5). Todos esses comprimentos de bobina não poderiam ser avaliados sem manipulação do usuário, já que o número de posições da válvula multiposição disponível era limitado a oito. Portanto, a otimização do comprimento de Br também foi realizada de forma independente do processo automatizado de análise. Idealmente, a otimização do comprimento da bobina de reação deveria ser incorporada ao planejamento experimental. Porém, essa possibilidade foi descartada para evitar reconfiguração do sistema SIA. Uma alternativa para promover essa avaliação seria a substituição do fator comprimento de bobina pelo fator número de reversões do sentido do fluxo, visto que a reversão do sentido do fluxo também proporciona a mistura e a dispersão das soluções inseridas no percurso analítico. Outras configurações do módulo de análise poderiam ser utilizadas para o mesmo propósito. Contudo, poderia ser descartada a avaliação do efeito desse fator, já que a mistura e dispersão das soluções também são avaliadas pelos fatores relacionados com os volumes aspirados das soluções e vazão da solução carregadora.

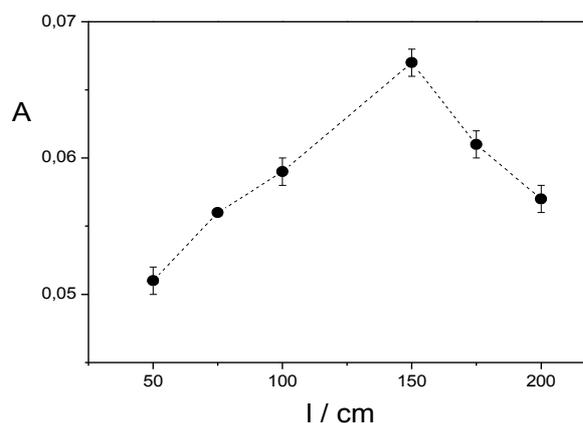


Figura 3.4. Efeito do comprimento da bobina reacional sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de ferro total em fortificantes. Condição: 120 μL de solução de Fe(III) 2,5 mg L^{-1} , 120 μL de ácido ascórbico e de 1,10-o-fenantrolina, $\Phi_{\text{transportador}} = 2,42 \text{ mL min}^{-1}$ e ordem de aspiração: Fenantrolina-Fe-Redutor ($N= 3$).

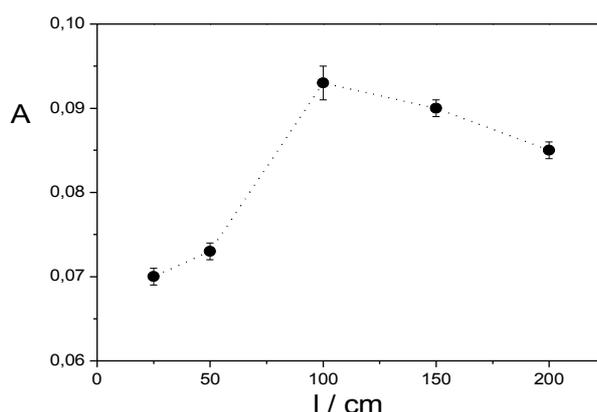


Figura 3.5. Efeito do comprimento da bobina reacional sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de captopril em medicamentos. Condição: 120 μL de CPT (50 mg L^{-1}), 120 μL de solução de Fe(III) e 60 μL de solução de DMPD, $\Phi_{\text{transportador}} = 4,01 \text{ mL min}^{-1}$ e ordem de aspiração: CPT-DMPD-Fe(III) ($N = 3$).

Para a aplicação visando à determinação de ferro total em fortificantes, foi observado um aumento pronunciado do sinal analítico no intervalo de comprimento de bobina entre 50 e 150 cm (Figura 3.4). Uma vez que a cinética envolvida na reação entre Fe(II) e 1,10-o-fenantrolina é rápida, os fenômenos que predominam são físicos (penetração entre zonas e dispersão). No comprimento de bobina de reação de 150 cm foi observado o sinal analítico máximo. O decaimento do sinal analítico para comprimentos de Br maiores que 150 cm foi associado ao aumento da dispersão do complexo (Fe(II) - 1,10-o-fenantrolina) na solução transportadora. Assim foi selecionada bobina de reação de 150 cm para determinação de ferro total em amostras de fortificantes.

Na aplicação relativa à determinação de captopril, foi observado um aumento pronunciado no sinal analítico no intervalo de comprimento de bobina de 25 a 100 cm (Figura 3.5). O decaimento do sinal analítico a partir do comprimento de bobina de 100 cm foi relacionado com a dispersão da mistura na solução transportadora. Comprimentos de bobina inferiores a 100 cm produziram sinais analíticos que também poderiam estar associados ao intermediário de reação (radical iminoquinona), o qual apresenta menor absorvibilidade molar no mesmo comprimento de onda do produto formado (485 nm). A

partir dos resultados obtidos foi selecionada bobina de reação de 100 cm para a realização das determinações de captopril em produtos farmacêuticos.

3.3 - Otimizações multivariadas empregando a metodologia de superfície de resposta

A etapa de planejamento experimental foi realizada utilizando o sistema automático de otimização de parâmetros desenvolvido e todos os resultados foram calculados com o programa desenvolvido (item 3.1). Os gráficos de pareto e de superfície de resposta que serão apresentados foram construídos com o auxílio do pacote Statistica, apenas para facilitar visualização e interpretação dos leitores. Vale salientar que todo o processo de otimização poderia ser finalizado sem visualização do gráfico de pareto ou superfície de resposta.

3.3.1 - Metodologia de superfície de resposta na determinação de ferro total

O sistema automatizado desenvolvido foi testado inicialmente com uma reação clássica amplamente difundida para determinação espectrofotométrica de Fe(II) com o reagente cromogênico 1,10-o-fenantrolina. Nesse primeiro sistema testado, optou-se por otimizar utilizando o planejamento experimental somente as variáveis hidrodinâmicas relacionadas com o sistema SIA. Inicialmente foi realizada a sondagem sobre o efeito dos fatores em estudo: volume de cada um dos reagentes envolvidos e vazão da solução carregadora. A matriz referente aos experimentos está apresentada na Tabela 3.3.

Esse processo de otimização foi realizado com soluções de referência em íons Fe(III) 10 mg L⁻¹. Essa concentração corresponde à máxima concentração de interesse da curva de trabalho. Assim, otimizadas as condições para a máxima concentração de Fe(III), haverá reagente suficiente para a determinação da concentração do analito nas amostras e em todas as outras soluções da curva analítica.

Tabela 3.3. Planejamento fatorial 2^3 empregado na otimização multivariada das variáveis do procedimento SIA para determinação de ferro total em fortificantes, valores reais, suas coordenadas e as respectivas respostas.

Volume injetado RC (μL)	Volume injetado AR (μL)	Vazão da solução carregadora (mL min^{-1})	Resposta ΔA
320 (+)	320 (+)	5,15 (+)	0,168
320 (+)	320 (+)	1,18 (-)	0,175
320 (+)	40 (-)	5,15 (+)	0,104
320 (+)	40 (-)	1,18 (-)	0,163
40 (-)	320 (+)	5,15 (+)	0,000
40 (-)	320 (+)	1,18 (-)	0,005
40 (-)	40 (-)	5,15 (+)	0,000
40 (-)	40 (-)	1,18 (-)	0,006
180 (0)	180 (0)	3,17 (0)	0,135
180 (0)	180 (0)	3,17 (0)	0,134
180 (0)	180 (0)	3,17 (0)	0,133
320 (+)	320 (+)	5,15 (+)	0,165
320 (+)	320 (+)	1,18 (-)	0,170
320 (+)	40 (-)	5,15 (+)	0,103
320 (+)	40 (-)	1,18 (-)	0,164
40 (-)	320 (+)	5,15 (+)	0,002
40 (-)	320 (+)	1,18 (-)	0,015
40 (-)	40 (-)	5,15 (+)	0,001
40 (-)	40 (-)	1,18 (-)	0,003
180 (0)	180 (0)	3,17 (0)	0,132
180 (0)	180 (0)	3,17 (0)	0,138
180 (0)	180 (0)	3,17 (0)	0,137

RC = 1,10-o-fenantrolina. AR = ácido ascórbico

O resultado da análise de variância, admitindo $p = 0,05$ e considerando como resposta a diferença de sinal entre os sinais analíticos da amostra e do branco, está apresentado no gráfico de pareto (Figura 3.6). Os comprimentos das barras são proporcionais aos valores absolutos dos efeitos.

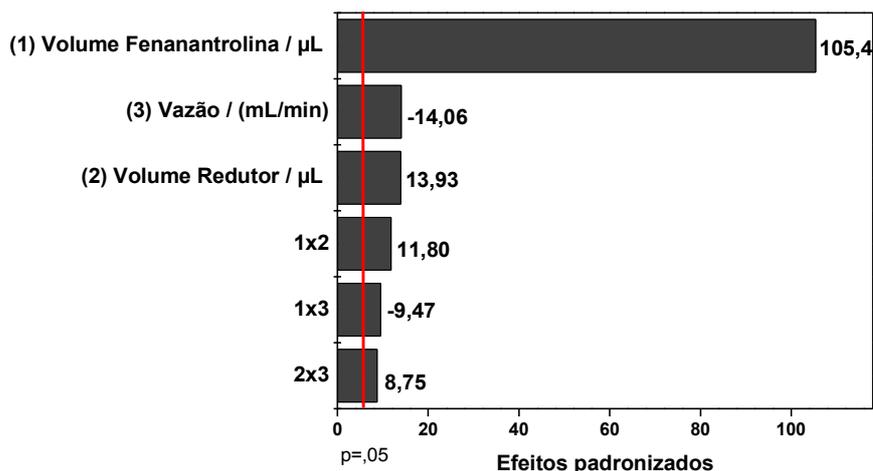


Figura 3.6. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados relativo ao planejamento fatorial 2^3 empregado na otimização multivariada das variáveis do sistema SIA para determinação de ferro total em fortificantes.

Foi observado que o volume do reagente 1,10-o-fenantrolina é um fator cujo efeito é altamente significativo, o que pode ser confirmado com os resultados individuais apresentados na Tabela 3.3 quando os experimentos foram realizados no nível máximo para esse fator. Os efeitos do volume do reagente redutor e da vazão também se mostraram significativos. Sendo assim, todos os fatores investigados foram novamente considerados no planejamento posterior utilizando a metodologia de superfície de resposta.

Foi realizado o teste de curvatura para avaliar o comportamento em torno do ponto central e foi observado valor negativo para z , permitindo a inferência de uma região de trabalho próxima às condições críticas de máximo (Massart *et al.*, 1997). Dessa forma, o domínio investigado também foi mantido para os experimentos seguintes. O desenho experimental selecionado para a metodologia de superfície de resposta foi o Box-Behnker. Como o domínio experimental não sofreu alterações, através do procedimento usual em que os experimentos são realizados pelo operador, seria provável a adição de seis pontos em estrela para formar um desenho composto central e evitar a realização de um novo planejamento. Contudo, o programa desenvolvido não possibilitava identificar os pontos ausentes no desenho experimental já executado e que permitiriam a complementação de experimentos para obter um novo desenho. O desenho Box-Behnker também foi

selecionado para explorar mais matrizes disponíveis no programa. A matriz referente aos experimentos está apresentada na 3.4.

Tabela 3.4. Planejamento Box-Behnker empregado na metodologia de superfície de resposta do procedimento SIA para determinação de ferro total em fortificantes, valores reais, suas coordenadas e as respectivas respostas.

VOLUME INJETADO RC (µL)	VOLUME INJETADO AR (µL)	VAZÃO DA SOLUÇÃO CARREGADORA (mL min ⁻¹)	RESPOSTA ΔA
40 (-)	40 (-)	3,17 (0)	0,006
320 (+)	40 (-)	3,17 (0)	0,163
40 (-)	320 (+)	3,17 (0)	0,015
320 (+)	320 (+)	3,17 (0)	0,192
40 (-)	180 (0)	1,18 (-)	0,045
320 (+)	180 (0)	1,18 (-)	0,152
40 (-)	180 (0)	5,15 (+)	0,002
320 (+)	180 (0)	5,15 (+)	0,190
180 (0)	40 (-)	1,18 (-)	0,154
180 (0)	320 (+)	1,18 (-)	0,148
180 (0)	40 (-)	5,15 (+)	0,130
180 (0)	320 (+)	5,15 (+)	0,180
180 (0)	180 (0)	3,17 (0)	0,183
180 (0)	180 (0)	3,17 (0)	0,184
180 (0)	180 (0)	3,17 (0)	0,183

RC = 1,10-o-fenantrolina. AR = ácido ascórbico

O planejamento Box-Behnker consiste em um desenho fatorial incompleto de três níveis. O planejamento utilizado e a matriz Doehlert apresentam eficiência superior a obtida com a aplicação dos desenhos composto central e o fatorial completo, já que o número de experimentos necessários para geração de um mesmo número de parâmetros é menor para o número de fatores investigados (Ferreira *et al.*, 2007). As superfícies de resposta pelo planejamento Box-Behnker (Figura 3.7) foram descritas pela equação do modelo apresentada na tela de saída (Figura 3.8) que contém o relatório referente a essa etapa de otimização. Os termos x e y correspondem aos volumes das soluções de 1,10-o-fenantrolina e do agente redutor, respectivamente; e z, à vazão da solução carregadora.

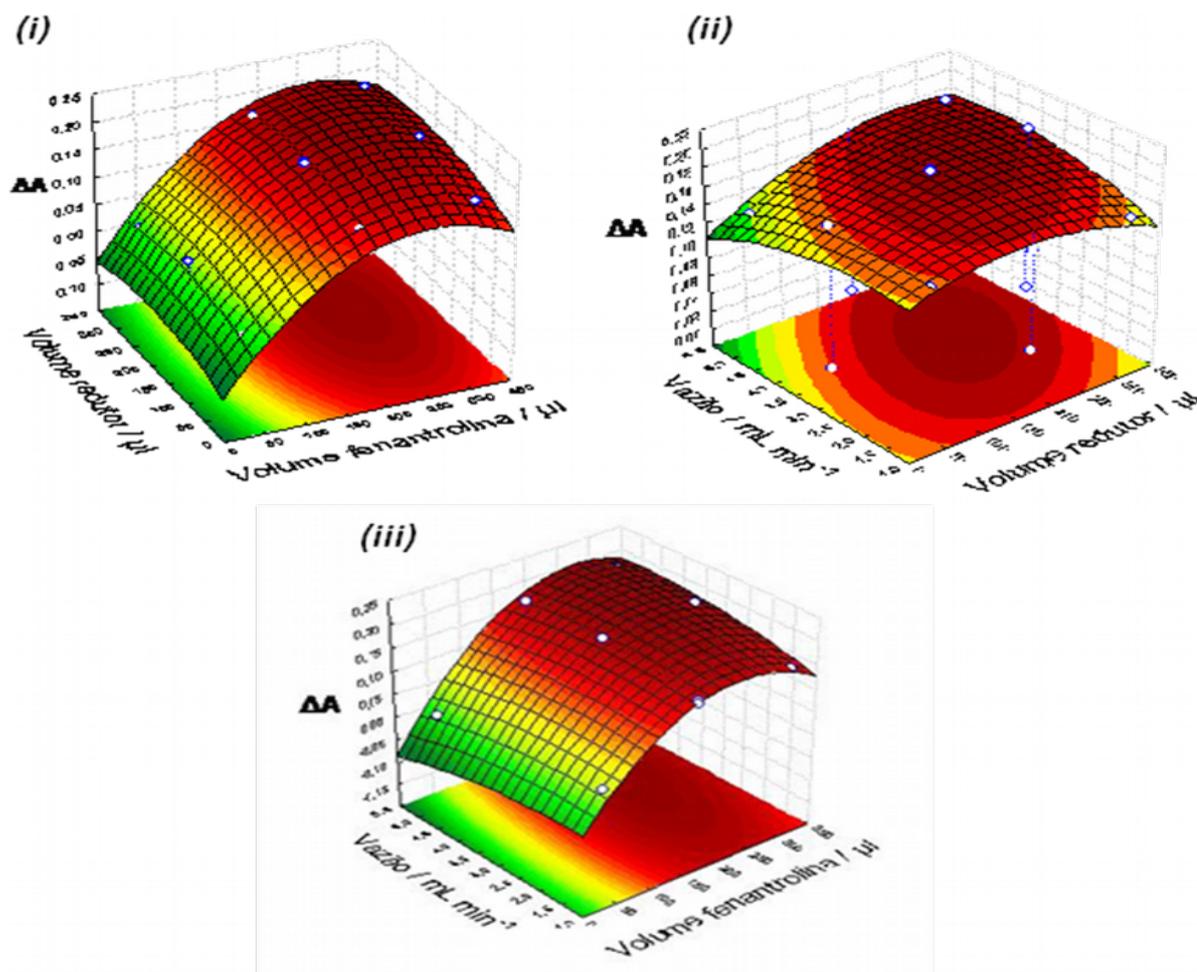


Figura 3.7. Superfícies de resposta referente ao planejamento Box-Behnker (i) volume de reductor x volume de 1,10-o-fenantrolina mantendo vazão do carregador constante no nível intermediário, (ii) vazão do carregador x volume do reductor mantendo volume da 1,10-o-fenantrolina constante no nível intermediário e (iii) vazão do carregador x volume da 1,10-o-fenantrolina mantendo volume do reductor constante no nível intermediário.

RELATÓRIO DO PLANEJAMENTO REALIZADO

Equação do modelo:

$$R = \text{co.1 } x^2 + \text{co.2 } y^2 + \text{co.3 } z^2 + \text{co.4 } x + \text{co.5 } y + \text{co.6 } z + \text{co.7 } xy + \text{co.8 } xz + \text{co.9 } yz + \text{co.10}$$

$$R = -0.072 x^2 - 0.017 y^2 - 0.014 z^2 + 0.079 x + 0.010 y + 0.000 z + 0.005 xy + 0.020 xz + 0.014 yz + 0.183$$

criticox.cod=0.704

criticox.real=297.3

criticoy.cod=0.809

criticoy.real=292.1

criticoz.cod=0.958

criticoz.real=5.0

Valores dos efeitos:

efeito(co.1)= -0.072

efeito(co.2)= -0.017

efeito(co.3)= -0.014

efeito(co.4)= 0.157

efeito(co.5)= 0.020

efeito(co.6)= 0.000

efeito(co.7)= 0.010

efeito(co.8)= 0.040

efeito(co.9)= 0.028

efeito(co.10)= 0.115

Efeitos significativos:

efeito(co.1)= -0.072

efeito(co.2)= -0.017

efeito(co.3)= -0.014

efeito(co.4)= 0.157

efeito(co.5)= 0.020

efeito(co.7)= 0.010

efeito(co.8)= 0.040

efeito(co.9)= 0.028

efeito(co.10)= 0.115

Equação de ajuste do modelo:

$$y = (3.80202 \times 10^{-4} \pm 0.0022) + (0.99704 \pm 0.01507).x$$

$$R = 0.99852 \text{ (n=15)}$$

Figura 3.8. Tela de saída gerada pelo programa contendo o relatório referente à etapa de otimização do procedimento para determinação de ferro total em fortificantes empregando o desenho experimental Box-Behnker.

No estágio atual do programa, todos os coeficientes do modelo (significativos ou não) foram utilizados para a realização dos cálculos dos valores preditos e condições críticas. Muitas vezes não é observada discrepância entre os valores preditos calculados pela equação completa e pela equação onde só são incorporados os coeficientes significativos, já que a contribuição dos efeitos não significativos é mínima, entretanto é possível a geração de ruído. Para o desenvolvimento da superfície de resposta foram considerados os valores reais das variáveis. Os valores preditos pela equação do modelo apresentaram boa concordância com os valores experimentais encontrados, apresentando coeficiente de correlação igual a 0,9985, coeficiente angular 0,997 e coeficiente linear $3,80 \times 10^{-4}$. Não foi observada falta de ajuste no modelo gerado.

Foram observados perfis diferentes nas superfícies de respostas (Figura 3.7). Pôde-se observar que a variação do sinal com o volume do reagente 1,10-*o*-fenantrolina foi

bastante pronunciada quando comparada com a variação do sinal provocada pelos dois outros fatores, confirmando as informações obtidas pela análise do gráfico de pareto (Figura 3.6).

Pelos resultados obtidos com o planejamento Box-Behnker, foi possível determinar o ponto de ótimo dentro do domínio experimental investigado utilizando o critério de Lagrange, como anteriormente descrito. As condições críticas encontradas estão apresentadas na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Valores das variáveis otimizadas pelo sistema automatizado de otimização multivariada empregando o método da superfície de resposta para determinação de ferro total em fertilizantes.

Variáveis otimizadas	
Volume injetado de 1,10-o-fenantrolina	277,3 µL
Volume injetado de ácido ascórbico	292,1 µL
Vazão da solução transportadora	5,0 mL min ⁻¹

3.3.2 - Metodologia de superfície de resposta na determinação de captopril

O mesmo sistema automatizado foi empregado para melhorar o desempenho do procedimento para determinação de captopril baseado na reação de formação de um produto instável. Em trabalhos anteriores do Grupo (Chagas, 2007) tinha sido desenvolvido um sistema FIA para a determinação de captopril, no qual as concentrações dos reagentes Fe(III) e DMPD foram otimizadas de forma univariada. Portanto, nessa segunda aplicação, optou-se por otimizar pelo planejamento experimental as mesmas variáveis relacionadas com o sistema SIA anterior (Determinação de ferro total em fertilizantes): volumes dos reagentes e vazão do carregador, além da acidez das soluções dos reagentes.

Foi realizada a sondagem sobre os efeitos dos fatores em estudo: volume de cada um dos reagentes, vazão da solução carregadora, acidez de cada um dos reagentes empregando o planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻¹ (Barros Neto *et al.*, 2003). A matriz referente aos experimentos está apresentada na Tabela 3.6. Devido ao número de

experimentos realizados no ponto central do domínio investigado (8), seriam necessários somente mais oito experimentos para completar a matriz contendo o planejamento fatorial completo e, desta forma, eliminar vieses e perda na interpretação dos efeitos. Contudo, o objetivo neste trabalho foi explorar e avaliar ao máximo o programa desenvolvido.

Tabela 3.6. Planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} empregado na otimização multivariada das variáveis do procedimento SIA para determinação de captopril em medicamentos, valores reais, suas coordenadas e suas respectivas respostas.

Acidez do reagente Fe(III) (mol L ⁻¹)	Volume injetado Fe(III) (µL)	Acidez do reagente DMPD (mol L ⁻¹)	Volume injetado DMPD (µL)	Vazão da solução carregadora (mL min ⁻¹)	Resposta ΔA
0,1(-)	30 (-)	0,1(-)	15 (-)	5,15 (+)	0,058
0,5 (+)	150 (-)	0,1(-)	15 (-)	1,18 (-)	0,043
0,1(-)	30 (+)	0,1(-)	15 (-)	1,18 (-)	0,059
0,5 (+)	150 (+)	0,1(-)	15 (-)	5,15 (+)	0,015
0,1(-)	30 (-)	0,5 (+)	15 (-)	1,18 (-)	0,029
0,5 (+)	150 (-)	0,5 (+)	15 (-)	5,15 (+)	0,018
0,1(-)	30 (+)	0,5 (+)	15 (-)	5,15 (+)	0,022
0,5 (+)	150 (+)	0,5 (+)	15 (-)	1,18 (-)	0,030
0,1(-)	30 (-)	0,1(-)	75 (+)	1,18 (-)	0,089
0,5 (+)	150 (-)	0,1(-)	75 (+)	5,15 (+)	0,069
0,1(-)	30 (+)	0,1(-)	75 (+)	5,15 (+)	0,109
0,5 (+)	150 (+)	0,1(-)	75 (+)	1,18 (-)	0,128
0,1(-)	30 (-)	0,5 (+)	75 (+)	5,15 (+)	0,029
0,1(-)	150 (-)	0,5 (+)	75 (+)	1,18 (-)	0,032
0,1(-)	30 (+)	0,5 (+)	75 (+)	1,18 (-)	0,107
0,1(-)	150 (+)	0,5 (+)	75 (+)	1,18 (-)	0,107
0,3 (0)	90 (0)	0,3 (0)	45 (0)	3,17 (0)	0,059
0,3 (0)	90 (0)	0,3 (0)	45 (0)	3,17 (0)	0,062
0,3 (0)	90 (0)	0,3 (0)	45 (0)	3,17 (0)	0,066
0,3 (0)	90 (0)	0,3 (0)	45 (0)	3,17 (0)	0,061
0,3 (0)	90 (0)	0,3 (0)	45 (0)	3,17 (0)	0,057
0,3 (0)	90 (0)	0,3 (0)	45 (0)	3,17 (0)	0,058
0,3 (0)	90 (0)	0,3 (0)	45 (0)	3,17 (0)	0,060
0,3 (0)	90 (0)	0,3 (0)	45 (0)	3,17 (0)	0,057

O processo de otimização foi realizado com amostras de captopril preparadas em concentração ca. 50 mg L⁻¹.

Assim, como no sistema anterior, o resultado da análise de variância, admitindo p = 0,05 e considerando como resposta a diferença entre os sinais da amostra e do branco, está

apresentado no gráfico de pareto (Figura 3.9). Os comprimentos das barras são proporcionais aos valores absolutos dos efeitos.

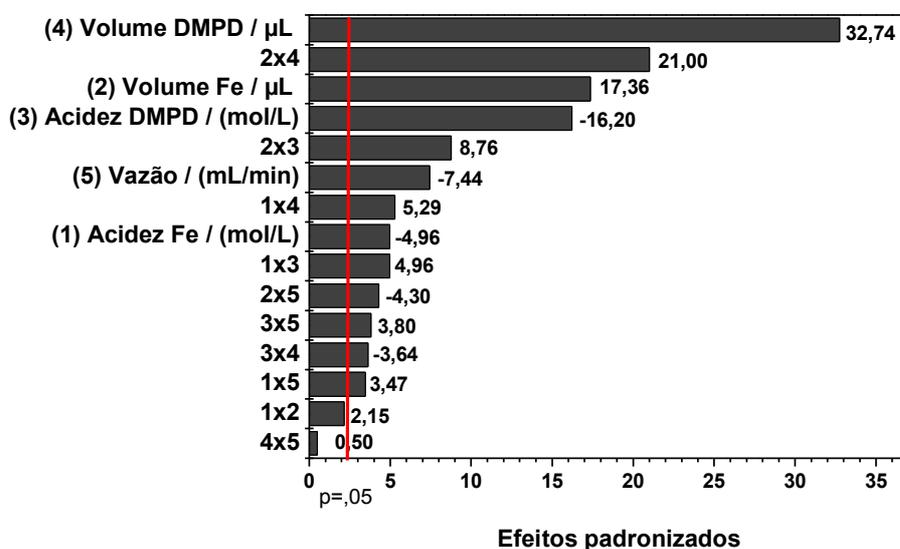


Figura 3.9. Gráfico de pareto dos efeitos padronizados relativo ao planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} .

Foi observado que os volumes dos reagentes DMPD e Fe(III), assim como a interação entre eles foram fatores cujos efeitos foram os mais significativos. Isso porque na interface entre esses dois reagentes há a formação do radical iminoquinona que absorve no mesmo comprimento de onda do produto da reação de interesse. Dessa forma, o radical produzido contribui no sinal do branco e, conseqüentemente, na resposta líquida. Portanto, pequenas variações na quantidade de um desses reagentes provocam diferenças significativas na resposta.

Os outros fatores investigados: vazão do carregador, acidez da solução de Fe(III) e acidez da solução de DMPD também apresentaram efeitos significativos sobre o sinal analítico. Os efeitos correspondentes à acidez nas soluções dos dois reagentes apresentaram sinal negativo (mesmo comportamento), indicando que a redução da acidez do meio, provocaria aumento no sinal líquido. Assim, para reduzir possíveis efeitos Schlieren (Rocha & Nóbrega, 1996) e evitar o preparo de soluções de cada um dos reagentes com diferentes níveis acidez, foi realizado um novo planejamento onde as variáveis acidez da

solução de Fe(III) e acidez da solução de DMPD foi incorporada em uma única variável denominada acidez dos reagentes.

Sendo assim, todos os fatores investigados foram considerados no desenho posterior também utilizando o planejamento fatorial fracionário, nesse momento para quatro fatores. A matriz referente aos experimentos está apresentada na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} empregado na otimização multivariada das variáveis do procedimento SIA para determinação de captopril em medicamentos, valores reais, suas coordenadas e suas respectivas respostas.

Acidez dos reagentes (mol L ⁻¹)	Volume injetado Fe(III) (µL)	Volume injetado DMPD (µL)	Vazão da solução carregadora (mL min ⁻¹)	Resposta ΔA
0,1 (-)	30 (-)	15 (-)	1,18 (-)	0,070
0,5 (+)	30 (-)	15 (-)	5,15 (+)	0,023
0,1 (-)	150 (+)	15 (-)	5,15 (+)	0,037
0,5 (+)	150 (+)	15 (-)	1,18 (-)	0,045
0,1 (-)	30 (-)	75 (+)	5,15 (+)	0,175
0,5 (+)	30 (-)	75 (+)	1,18 (-)	0,045
0,1 (-)	150 (+)	75 (+)	1,18 (-)	0,168
0,5 (+)	150 (+)	75 (+)	5,15 (+)	0,055
0,3 (0)	90 (0)	45 (0)	3,17 (0)	0,073
0,3 (0)	90 (0)	45 (0)	3,17 (0)	0,078
0,3 (0)	90 (0)	45 (0)	3,17 (0)	0,076
0,3 (0)	90 (0)	45 (0)	3,17 (0)	0,069
0,3 (0)	90 (0)	45 (0)	3,17 (0)	0,073
0,3 (0)	90 (0)	45 (0)	3,17 (0)	0,070

O gráfico de pareto com o resultado da análise de variância, admitindo nível de significância de 5% e considerando como resposta o sinal líquido está apresentado na Figura 3.10. Os mesmos comportamentos foram observados para os fatores investigados no planejamento anterior, com exceção do efeito do volume da solução de Fe(III) que deixou de apresentar significância para o nível de confiança de 95%.

O efeito da acidez dos reagentes foi altamente significativo e negativo. Entretanto, não era possível reduzir o valor dessa variável para valores inferiores ao limite mínimo do domínio experimental investigado. A redução da acidez do meio provocaria a precipitação de íons Fe(III) na forma de Fe(OH)₃, o que possivelmente causaria entupimentos e

danificaria a válvula multiposição. Neste momento o usuário interferiu no processo de otimização e fixou a variável (acidez dos reagentes) no limite inferior do domínio investigado para a realização dos experimentos seguintes. Vale ressaltar que as informações inferidas através desse gráfico de pareto foram baseadas apenas nos efeitos principais, uma vez que em planejamentos fatoriais 2^{4-1} , os padrões de confundimento ocorrem desde os efeitos de interação de segunda ordem.

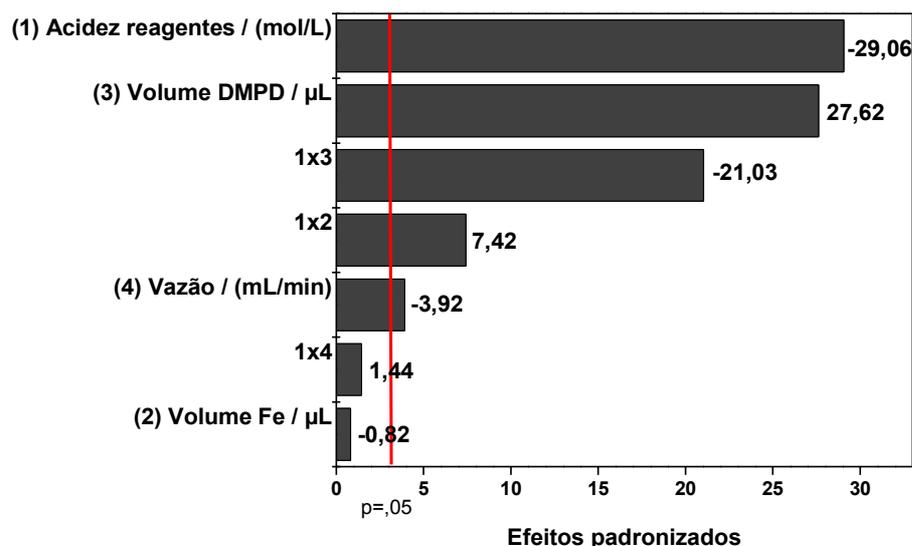


Figura 3.10. Gráfico de pareto dos efeitos padronizados relativo ao planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

Também foi realizado o teste de curvatura para avaliar o comportamento em torno do ponto central e foi observado valor de z de 0,004 (próximo de zero), o que permitiu inferir que a região investigada não apresentava curvatura. Portanto, foi necessário o deslocamento do domínio experimental para aplicação da metodologia de superfície de resposta.

Na busca pelas condições críticas, alguns planejamentos foram realizados utilizando os três fatores: volumes das soluções de Fe(III) e DMPD e vazão do carregador, o sistema desenvolvido indicava contínuo deslocamento do domínio experimental para completa otimização. A curvatura apresentada pela variável vazão nas superfícies de respostas obtidas era sempre contrária às curvaturas geradas pelas outras variáveis investigadas.

Mais uma vez, o usuário precisou intervir no processo e fixar a variável vazão do carregador próxima ao limite mínimo do domínio experimental.

Dessa forma, os fatores otimizados pela metodologia de superfície de resposta foram os volumes das soluções de Fe(III) e DMPD. O desenho experimental selecionado para a metodologia de superfície de resposta foi o fatorial completo de três níveis, pois esse desenho experimental só apresenta baixa eficiência para número de fatores superior a dois. A matriz referente aos experimentos está apresentada na Tabela 3.8.

Tabela 3.8. Planejamento fatorial completo de três níveis empregado na metodologia de superfície de resposta do procedimento SIA para determinação de captopril em medicamentos, valores reais, suas coordenadas e suas respectivas respostas.

Volume injetado Fe(III) (μL)	Volume injetado DMPD (μL)	Resposta ΔA
400 (+)	200 (+)	0,175
400 (+)	200 (+)	0,180
400 (+)	200 (+)	0,197
400 (+)	60 (-)	0,204
400 (+)	60 (-)	0,178
400 (+)	60 (-)	0,166
400 (+)	130 (0)	0,232
400 (+)	130 (0)	0,211
400 (+)	130 (0)	0,221
60 (-)	200 (+)	0,094
60 (-)	200 (+)	0,090
60 (-)	200 (+)	0,076
60 (-)	60 (-)	0,151
60 (-)	60 (-)	0,143
60 (-)	60 (-)	0,145
60 (-)	130 (0)	0,139
60 (-)	130 (0)	0,128
60 (-)	130 (0)	0,137
230 (0)	200 (+)	0,180
230 (0)	200 (+)	0,183
230 (0)	200 (+)	0,156
230 (0)	60 (-)	0,170
230 (0)	60 (-)	0,184
230 (0)	60 (-)	0,158
230 (0)	130 (0)	0,228
230 (0)	130 (0)	0,231
230 (0)	130 (0)	0,230
230 (0)	130 (0)	0,232
230 (0)	130 (0)	0,230

A superfície de resposta obtida empregando o planejamento fatorial completo (Figura 3.11) pôde ser descrita pela equação do modelo apresentada na tela de saída do programa (Figura 3.12) que contém o relatório referente a essa etapa de otimização. Os termos x e y correspondem aos volumes das soluções Fe(III) e DMPD, respectivamente.

Para o desenvolvimento da superfície de resposta foram considerados os valores reais das variáveis. O modelo apresentou pequena falta de ajuste devido ao baixo desvio padrão das réplicas. Entretanto, essa falta de ajuste não impossibilitou a aplicação do modelo.

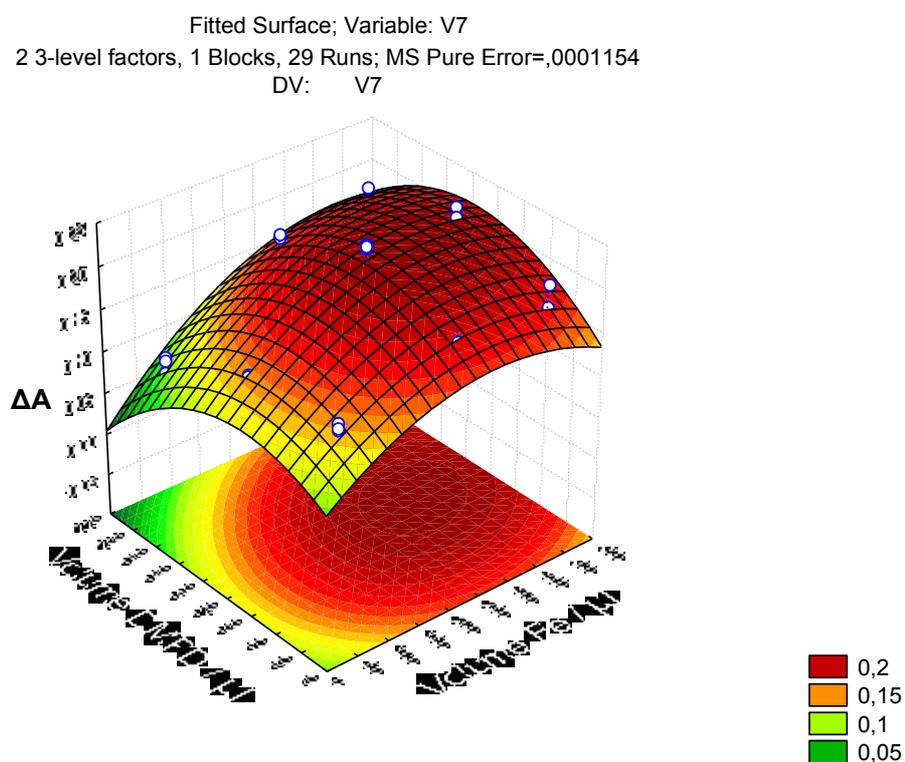


Figura 3.11. Superfície de resposta referente planejamento fatorial completo

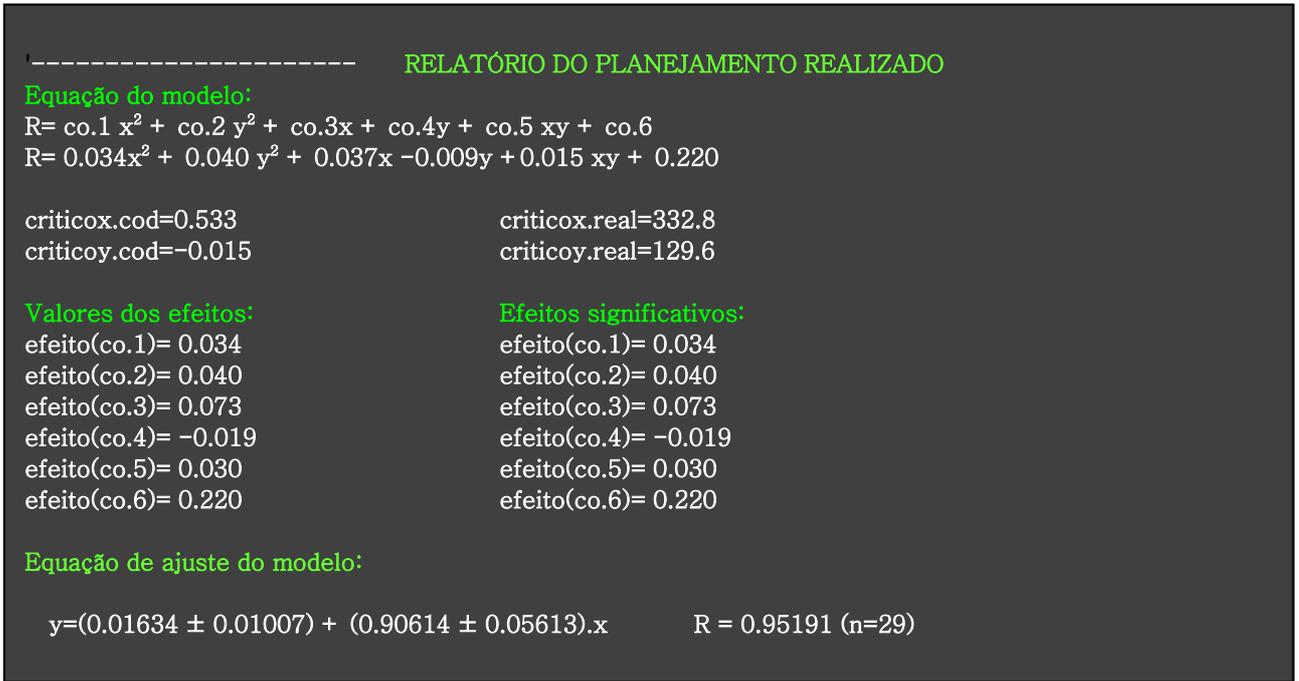


Figura 3.12. Tela de saída gerada pelo programa contendo o relatório referente à etapa de otimização do procedimento para determinação de captopril em medicamentos empregando o desenho experimental fatorial de três níveis.

Pelos resultados obtidos com o planejamento fatorial completo foi possível determinar o ponto de ótimo dentro do domínio experimental investigado utilizando o critério de Lagrange. As condições críticas encontradas estão apresentadas na Tabela 3.9.

Tabela 3.9. Valores das variáveis otimizadas pelo sistema automatizado de otimização multivariada empregando a metodologia de superfície de resposta para determinação de captopril em medicamentos.

Variáveis otimizadas	
Volume injetado Fe(III)	332,8 µL
Volume injetado DMPD	129,6 µL

3.4 - Coeficiente de Dispersão (D) e grau de penetração (P)

A extensão com que uma reação se procede em um sistema SIA depende, além do tempo de residência da zona composta no percurso analítico, do grau de sobreposição das zonas de reagentes e amostras (Masini, 2008), o que justificou um criterioso estudo sobre

os volumes empregados. Os coeficientes de dispersão das zonas de reagentes e amostras foram calculados nas condições otimizadas. As Figuras 3.13 e 3.14 ilustram o perfil de dispersão de cada reagente e amostra, bem como a mistura entre eles no procedimento proposto para determinação de ferro total e de captopril em produtos farmacêuticos, respectivamente.

Os coeficientes de dispersão calculados foram $D_{Fenantrolina} = 2,69$; $D_{Fe} = 4,09$; $D_{reductor} = 1,85$ e $D_{Total:Fenantrolina:Fe:Redutor} = 1,19$. A zona de solução relativa a 1,10-*o*-fenantrolina e a zona de amostra contendo ferro sofreu uma dispersão média ($D = 2-10$), enquanto a zona do redutor sofreu uma dispersão limitada ($D = 1-2$) (Ruzicka & Hansen, 1988). Vale ressaltar que dispersões médias são ideais para medidas colorimétricas (Gubeli *et al.*, 1991).

A primeira etapa dessa reação para determinação de ferro total consiste na redução do Fe(III) e o grau de penetração calculado entre as zonas da amostra e do redutor ($P_{Am1-Redutor}$) foi de 0,79. Lembrando que valores próximos a unidade indicam sobreposição completa entre as zonas em contato. Grau de penetração igual a 0,84 foi calculado entre as zonas de amostra e 1,10-*o*-fenantrolina ($P_{Am1-Fenantrolina}$), indicando quase 85% de interpenetração entre as zonas, o que garantiu uma boa mistura.

No segundo sistema estudado, apresentaram dispersão média, as zonas relativas às soluções de DMPD e captopril, onde $D_{DMPD} = 4,37$ e $D_{CPT} = 2,45$, e dispersão limitadas as zonas relativas à solução de Fe(III) e a zona composta total, $D_{Fe(III)} = 1,89$ e $D_{total:CPT:DMPD:Fe} = 1,25$.

A primeira etapa da reação consiste na oxidação do DMPD pela solução de Fe(III). O valor do grau de penetração entre essas zonas foi $P_{Fe(III)-DMPD} = 0,98$, indicando uma excelente mistura, tornando disponível mais radical $DMPD^{*+}$ para posterior reação com o captopril.

O valor do grau de penetração calculado entre as zonas de amostra e a amina aromática DMPD foi $P_{Am2-DMPD} = 1$, indicando completa sobreposição entre essas zonas, concluindo, dessa forma que nas condições otimizadas, houve quase que completa

sobreposição entre as zonas de amostras e reagentes, fenômeno esse que pode ser observado pelas curvas de **c** a **e** da Figura 3.14.

Os volumes otimizados, juntamente com a configuração do sistema SIA em ambas aplicações utilizando o sistema automatizado baseado em metodologias de superfícies de respostas promoveram misturas eficientes entre as zonas de amostras e reagentes.

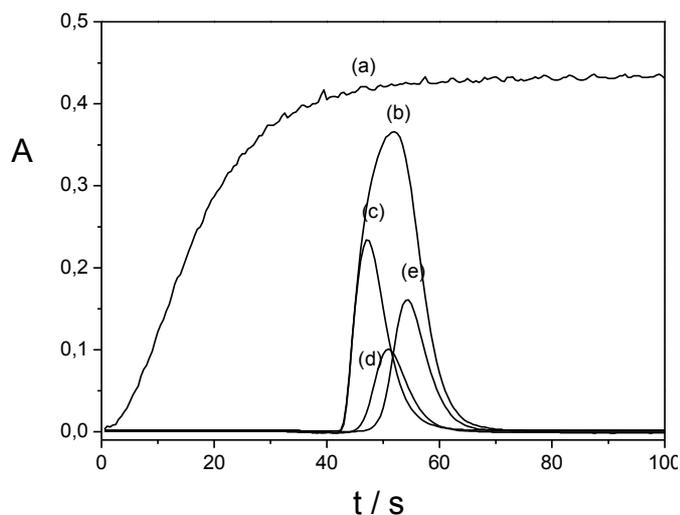


Figura 3.13. Perfil de dispersão das zonas de reagentes e amostras nas condições otimizadas do sistema SIA. (a) estado estacionário (b) zona reacional total: fenantrolina+ferro+redutor (c) redutor (d) amostra (e) fenantrolina.

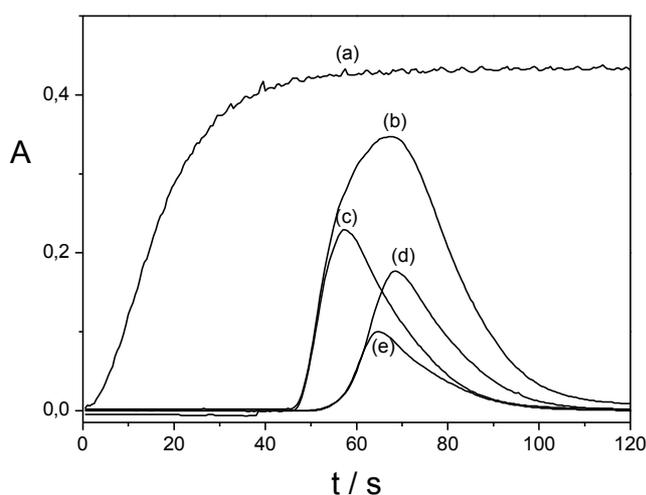


Figura 3.14. Perfil de dispersão das zonas de reagentes e amostras nas condições otimizadas do sistema SIA (a) estado estacionário (b) zona reacional total: captopril+DMPD+Fe(III) (c) Fe(III) (d) amostra (e) DMPD.

3.5 - Comparação das figuras de mérito nas condições críticas e extremas do domínio experimental

3.5.1 - Curvas analíticas para determinação de ferro total

Algumas das figuras de mérito do procedimento analítico foram investigadas para avaliar o desempenho na condição otimizada. Para tal fim, foram construídas curvas analíticas nas condições limites, condições críticas e no ponto central do domínio experimental do processo de otimização realizado. As figuras de mérito referentes a essas curvas para determinação de ferro total em amostras de fortificantes estão apresentadas na Tabela 3.10.

Foi possível observar que os limites de detecção e quantificação apresentaram os menores valores para a curva construída nas condições críticas (Curva 10) obtidas pela metodologia de superfície de resposta (Tabela 3.10). Também foi possível observar maior sensibilidade analítica nessa condição. A curva 3 apresentou características semelhantes à curva analítica construída na condição crítica, exceção feita à sensibilidade, a qual era significativamente menor. As curvas analíticas construídas nos extremos superiores e no ponto central do domínio experimental (Curvas 1 e 9) apresentaram figuras de mérito próximas às encontradas pela Curva 10. Entretanto, ainda é vantajoso, aumentar a sensibilidade analítica, reduzindo consumo de reagentes, mesmo que essa redução seja pequena. Em algumas condições não foram encontradas condições de linearidade (Curvas 5, 6 e 8), devido às pequenas quantidades de reagentes disponíveis. As faixas lineares não foram semelhantes para todas as condições avaliadas.

Tabela 3.10. Comparação de figuras de mérito das curvas analíticas para determinação de ferro total em fortificantes nas condições extremas, no ponto central e nas condições críticas observadas do domínio experimental investigado.

Curvas	Fatores			Figuras de mérito			
	Volume injetado (μL)		Vazão do carregador	LOD	LOQ	Sensibilidade	Faixa linear
	RC	AR	mL min^{-1}	$\mu\text{g L}^{-1}$	$\mu\text{g L}^{-1}$	uA L mg^{-1}	mg L^{-1}
1	+1	+1	+1	1,09	1,48	$2,12 \times 10^{-2}$	1,48 - 10
2	+1	+1	-1	2,01	2,69	$1,70 \times 10^{-2}$	2,69 - 10
3	+1	-1	+1	1,06	1,33	$1,74 \times 10^{-2}$	1,33 - 10
4	+1	-1	-1	1,12	1,59	$1,92 \times 10^{-2}$	1,59 - 8
5	-1	+1	+1	----	----	----	----
6	-1	+1	-1	----	----	----	----
7	-1	-1	+1	1,54	5,07	$1,28 \times 10^{-3}$	5,07 - 10
8	-1	-1	-1	----	----	----	----
9	0	0	0	1,58	2,50	$2,02 \times 10^{-2}$	2,50 - 10
10	crítico	crítico	crítico	1,08	1,30	$2,32 \times 10^{-1}$	1,30 - 10

RC = 1,10-o-fenantrolina. AR = ácido ascórbico

3.5.2 - Curvas analíticas para determinação de captopril

Também foram construídas curvas analíticas nas condições limites e nas condições críticas do domínio experimental para otimização do procedimento proposto para determinação de captopril (Tabela 3.11). Foi possível observar que a curva analítica na condição crítica (Curva 5) apresentou melhores características como menores limites de detecção e quantificação, maior sensibilidade e maior faixa linear. Essas características não eram as mais relevantes quando o objetivo era a determinação de captopril em amostras de medicamentos que possuíam concentração relativamente elevadas, *ca.* de 50 mg por comprimido. Portanto, amostras aleatórias foram analisadas utilizando as curvas anteriormente construídas. Os resultados encontrados foram comparados com os resultados obtidos pelo método de referência (United States Pharmacopeial Convention, 2002) preconizado pela Farmacopéia americana e foram observados melhores valores de exatidão e precisão utilizando a curva analítica construída nas condições críticas obtidas experimentalmente (Tabela 3.12). Neste caso, a sensibilidade, além de atuar nos limites de detecção e quantificação, também atuou nas características primárias do procedimento analítico: exatidão e precisão.

Tabela 3.11. Comparação de figuras de mérito das curvas analíticas para determinação de captopril em amostras de medicamentos nas condições críticas e extremas do domínio experimental investigado.

Curvas	Fatores		Figuras de mérito			
	Volume injetado (μL)		LOD	LOQ	Sensibilidade	Faixa linear
	DMPD	Fe(III)	$\mu\text{g L}^{-1}$	$\mu\text{g L}^{-1}$	$\mu\text{A L mg}^{-1}$	mg L^{-1}
1	+1	+1	5,63	16,06	$2,05 \times 10^{-3}$	16,06 - 100
2	+1	-1	6,68	22,27	$1,13 \times 10^{-3}$	23,27 - 60
3	-1	+1	1,41	4,70	$2,50 \times 10^{-3}$	4,70 - 100
4	-1	-1	13,54	15,33	$1,95 \times 10^{-3}$	15,33 - 100
5	crítico	crítico	0,80	2,65	$2,64 \times 10^{-3}$	2,65 - 100

Tabela 3.12. Comparação dos resultados obtidos para a determinação de captopril em amostras de medicamentos utilizando o método titrimétrico de referência e o procedimento proposto em sistema SIA utilizando as curvas analíticas nas condições extremas do domínio experimental e as condições críticas ($N=3$).

Amostras	Declarado	Método de referência	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5		
			Condições experimentais						críticas
			+	+	+	-	-	-	
	mg/comprimido	Mg/comprimido	mg/comprimido	mg/comprimido	mg/comprimido	mg/comprimido	mg/comprimido		
1	50	$49,18 \pm 0,08$	$45,5 \pm 0,6$	$39,8 \pm 0,1$	$47,8 \pm 0,6$	$46,2 \pm 0,6$	$49,3 \pm 0,4$		
2	50	$49,43 \pm 0,07$	$46,8 \pm 0,6$	38 ± 1	$47,7 \pm 0,1$	$46,6 \pm 0,6$	$49,2 \pm 0,3$		
3	50	$49,3 \pm 0,3$	$48,6 \pm 0,8$	42 ± 5	$50,6 \pm 0,7$	$48,3 \pm 0,6$	$49,2 \pm 0,3$		

3.6 - Figuras de mérito na validação dos métodos otimizados

3.6.1 - Determinação de ferro total em amostras de fortificantes

Nas condições otimizadas, o procedimento SIA proposto para determinação de ferro total possibilitou uma frequência analítica de 60 determinações por hora. A faixa linear de trabalho se estendeu para concentrações de Fe(II) até 10,0 mg L⁻¹, respondendo à equação $A = 0,0232xC \text{ (mg L}^{-1}\text{)} - 3,39 \times 10^{-3}$, $R = 0,9999$ (Figura 3.13(i)).

O procedimento em fluxo proposto apresentou boa precisão, desvios padrão relativos inferiores a 2% (Figura 3.13(ii)) e limite de quantificação para Fe(II) foi estimado em 1,30 mg L⁻¹. Nesse estágio do programa, foram armazenados em diretório apenas os dados correspondentes aos sinais líquidos obtidos. Dessa forma, não foram registrados os sinais transientes (Figura 3.13(ii)). O armazenamento de dados foi expandido para permitir o registro dos sinais transientes numa segunda aplicação.

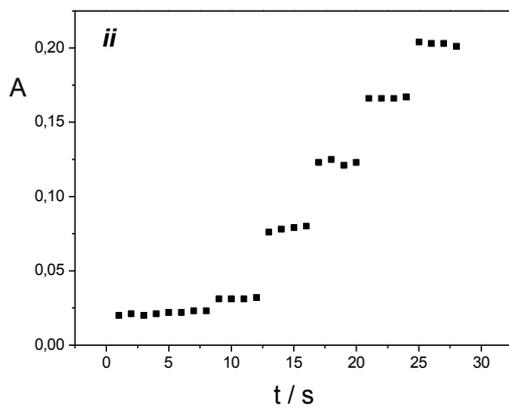
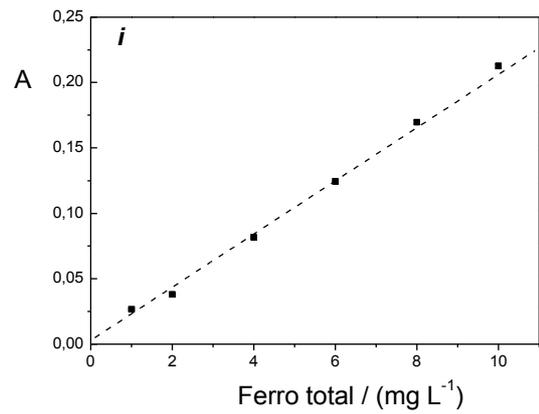


Figura 3.15. (i) Curva analítica para determinação espectrofotométrica de ferro total em fortificantes empregando o procedimento SIA proposto nas condições otimizadas e (ii) registro da curva analítica (a) branco; (b) 1,0; (c) 2,0; (d) 4,0; (e) 6,0; (f) 8,0; (g) 10,0 mg L⁻¹ (N = 3).

O procedimento proposto levou ao consumo de apenas 0,7 mg de reagente cromogênico, 6 mg de ácido ascórbico e a geração de ca. 5 mL de resíduo por determinação (incluindo a solução transportadora).

Os resultados obtidos com o procedimento analítico proposto foram comparados com o método de referência e estão apresentados na Tabela 3.13 e foram estatisticamente concordantes para 95% de confiabilidade, a partir da aplicação do teste *t* pareado. Os desvios padrão procedentes do procedimento proposto foram inferiores aos desvios encontrados utilizando o método de referência.

Tabela 3.13. Comparação entre os resultados obtidos pelo procedimento SIA proposto para determinação de ferro total em fortificantes (expressos em mg L⁻¹) e o método de referência (N=3).

Amostras	Declarado mg L ⁻¹	SIA proposto mg L ⁻¹	Método de referência mg L ⁻¹	Erro %
1	168	185 ± 2	190,0 ± 0,1	-2,6
2	5036	4533,3 ± 0,1	4898 ± 52	-7,4
3	5036	5033 ± 20	5136 ± 200	-2,0
4	450	56,1 ± 0,1	61,1 ± 0,1	-8,2
5	182,5	351 ± 2	355 ± 8	-1,1
6	30,4	99,5 ± 0,8	103 ± 2	-3,4
7	168	195 ± 2	193 ± 2	1,0
8	168	193,8 ± 0,8	190 ± 4	2,0
9	168	187,7 ± 0,1	181 ± 2	3,7
10	168	206,5 ± 0,8	209 ± 6	-1,2

A Tabela 3.14 apresenta uma compilação de métodos espectrofotométricos que não exploram etapa de pré-concentração e empregam estratégias em fluxo para a determinação de ferro total em amostras diversas. Todos os procedimentos foram baseados na redução dos possíveis Fe(III) presentes na amostra e determinação do complexo com Fe(II) formado. Em alguns procedimentos (Yamane & Yamada, 1995; Tesfaldet *et al.*, 2004), o redutor era adicionado em excesso às soluções de amostras ou do próprio reagente cromogênico, acarretando em maior consumo desse reagente.

Tabela 3.14. Características analíticas de métodos espectrofotométricos para determinação de ferro total empregando sistemas em fluxo.

Comentários	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	RSD (%)	Frequência analítica (h ⁻¹)	Referências
(FIA) Reação com NITRO-PAPS* + ácido ascórbico	0 - 100	1,0	< 1,3	15	Yamane & Yamada, 1995
(SIA) Redução para Fe(II) com ácido ascórbico e reação com 1,10-o-fen	0,25 - 5,0	0,018	< 1,6	40	Tesfaldet <i>et al.</i> , 2004
(FIA) Redução para Fe(II) com ácido ascórbico e reação com ferrozina	0,5 - 6,0	0,012	< 0,30	ni	Pascual-Reguera <i>et al.</i> , 1997
(FIA) Redução para Fe(II) com ácido ascórbico e reação com 1,10-o-fen	0,1 - 5,0	0,010	< 0,28	ni	Pascual-Reguera <i>et al.</i> , 1997
(FIA-multipumping) Reação entre Fe(III) e SCN ⁻	ni	0,002	< 2,3	100	Ródenas-Torralba <i>et al.</i> , 2006
(SIA) Coluna redutora de Jones e reação com 1,10-o-fen	0,05 - 6,0	0,03	< 0,70	20	Galhardo & Masini, 2001
(SIA) Redução para Fe(II) com ácido ascórbico e reação com 1,10-o-fen	1,30 - 10	1,08	< 1,7	60	Proposto

ni = não informado

NITRO-PAPS= 2-(5-nitro-2-piridilazo)-5-(N-propil-N-sulfopropilamino)fenol

3.6.2 - Determinação de captopril em amostras de medicamentos

O procedimento proposto empregando sistema de Análise por Injeção Sequencial e explorando uma reação espectrofotométrica com formação de um produto instável foi aplicado para determinação de captopril em amostras de medicamentos adquiridas em farmácias de Salvador.

Esse procedimento possibilitou a realização de 30 determinações por hora. A faixa linear de trabalho foi compreendida entre 2,65 – 100 mg L⁻¹, respondendo à equação $A = 2,64 \times 10^{-3} C \text{ (mg L}^{-1}\text{)} + 0,0612$, $R = 0,9992$. A curva analítica pode ser observada na Figura 3.14 (i). O procedimento proposto apresentou desvios padrão relativos inferiores a 1% em todas as medidas (Figura 3.14 (ii)).

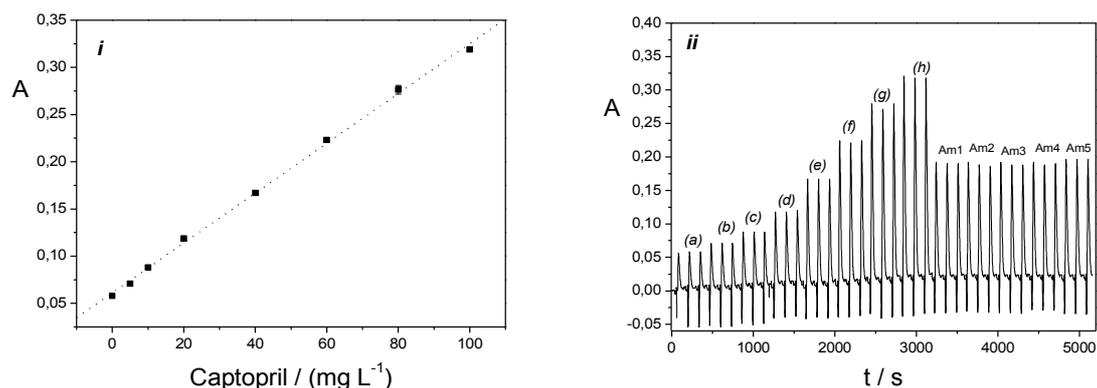


Figura 3.16. (i) Curva analítica para determinação espectrofotométrica de captopril empregando o sistema SIA proposto nas condições otimizadas e (ii) registro da curva analítica e sinais obtidos para algumas amostras de (Am): (a) branco; (b) 5,0; (c) 10,0; (d) 20,0; (e) 40,0; (f) 60,0; (g) 80,0; (h) 100 mg L⁻¹ (N = 3).

Os resultados obtidos com o procedimento proposto foram comparados com os resultados oriundos do método de referência (Farmacopéia Americana) e estão apresentados na Tabela 3.15. Os resultados obtidos pelo procedimento analítico proposto foram estatisticamente concordantes para 95% de confiabilidade aos resultados derivados do método de referência, a partir da aplicação do teste *t*. Deve-se ressaltar que não há referência a métodos analíticos para determinação de captopril na última edição da Farmacopéia brasileira (Farmacopéia Brasileira).

Tabela 3.15. Comparação entre os resultados obtidos pelo procedimento SIA proposto para determinação de captopril em medicamentos (expressos em mg) e o método titrimétrico de referência (N=3).

Amostras	Declarado mg/comprimido	SIA proposto mg/comprimido	Método de referência mg/comprimido	Erro %
1	50	49,3 ± 0,4	49,18 ± 0,08	0,2
2	50	49,2 ± 0,3	49,43 ± 0,07	-0,5
3	50	49,2 ± 0,3	49,3 ± 0,3	-0,2
4	50	48,8 ± 0,8	50,50 ± 0,06	-3,4
5	50	51,8 ± 0,7	49,2 ± 0,6	5,3

O procedimento proposto levou ao consumo de apenas 0,15 mg de DMPD, 4 mg de FeCl₃.6H₂O e a geração de ca. 3 mL de resíduo por determinação.

A Tabela 3.16 apresenta uma compilação de métodos espectrofotométricos que empregam estratégias em fluxo para determinação de captopril, onde é possível observar a variedade de métodos disponíveis. Os métodos com detecção espectrofotométrica são, em geral, baseados em reações indiretas ou de complexação com íons metálicos. A maioria deles explora a característica redutora do captopril. Um método cinético foi desenvolvido baseado na reação entre captopril e iodato na presença de iodeto ($\lambda = 350 \text{ nm}$) empregando minibombas para propulsão das soluções (Prior *et al.*, 2007). A redução de Fe(III) a Fe(II) mediada pela molécula do tiol também foi explorada para determinação de captopril com posterior reação dos íons Fe(II) com 1,10-o-fenantrolina ou DPPH (2,2 o-piridil-2-piridilidrazona) (Suarez *et al.*, 2007, Tzanavaras *et al.*, 2003).

A característica complexante foi investigada por Pimenta e colaboradores, uma vez que o captopril forma um complexo de coloração amarela com íons Pd^{2+} em meio ácido, o qual pode ser determinado a 400 nm (Pimenta *et al.*, 2001)

Tabela 3.16. Características analíticas dos métodos espectrofotométricos para determinação de captopril empregando sistemas em fluxo.

Comentários	Faixa Linear (mg L^{-1})	LOD (mg L^{-1})	RSD (%)	Frequência	
				analítica (h^{-1})	Referências
(FIA) Método cinético. Reação com IO_3^-	10 - 60	ni	< 4,5	100	Prior <i>et al.</i> , 2007
(FIA) Redução do Fe^{3+} pelo CPT e posterior reação com 1,10- o-fen	2,2 - 170	1,1	< 0,2	60	Suarez <i>et al.</i> , 2007
(SIA) Formação de complexo com Pd^{2+} .	43 - 304	ni	< 1,3	5	Pimenta <i>et al.</i> , 2001
(FIA) Redução do Fe^{3+} pelo CPT e posterior reação com DPPH	7 - 1000	4,0	< 0,8	120	Tzanavaras <i>et al.</i> , 2003
(SIA) Redução do Fe^{3+} pelo CPT e posterior reação com DPPH	12 - 1000	7,0	< 1,2	60	Tzanavaras <i>et al.</i> , 2003
(FIA) Reação com DMPD	2,5 - 90	0,22	< 1,0	120	Chagas, 2007
(SIA) Reação com DMPD	2,65 - 100	0,80	< 0,7	30	Proposto

ni = não informado

Apenas três dos métodos citados apresentaram semelhança de figuras de mérito em relação ao procedimento proposto, o primeiro havia sido proposto por Tzanavaras e colaboradores (Tzanavaras *et al.*, 2003), o segundo pelo Grupo em 2007 (Chagas, 2007), e o terceiro por Suarez e colaboradores, também em 2007 (Suarez *et al.*, 2007). Todos eles exploraram sistemas FIA onde o consumo de reagentes era bastante elevado devido à ausência de interrupção de fluxo entre as determinações.

3.7 – Outras considerações

Os pacotes estatísticos disponíveis no mercado para a etapa de otimização apenas contemplam o preenchimento do domínio experimental, a geração de matrizes (planejamento experimental), e, após o preenchimento das respostas, a análise dos dados. Para a realização dos experimentos, ainda, é necessária a transferência para outro programa e muitas vezes, até para outro equipamento (microcomputador).

Esse trabalho permitiu a simplificação no desenvolvimento de procedimentos analíticos pela incorporação da etapa de otimização às etapas de construção das curvas analíticas e determinações, evitando as transferências e manipulações pelo operador. Definidas as condições críticas, os valores correspondentes poderiam ser armazenados para que em um segundo momento que aquele procedimento fosse requerido, não sendo necessária a repetição da etapa de otimização. Essa simplificação promove economias relevantes quanto ao tempo e ao custo demandados para o desenvolvimento do procedimento analítico.

A fim de aprimorar e ampliar as aplicações do sistema proposto, algumas etapas que até então não foram exploradas podem ser incorporadas ao programa, como a identificação de alguns detectores previamente estabelecidos, ampliação do tipo de fatores que podem sofrer otimização, abordagem diferenciada das respostas, ampliação do número de portas da válvula multiposição e acoplamento com outras estratégias de manipulação de soluções. Ainda existe a possibilidade de miniaturização desse sistema, o que facilitaria o processo de otimização, calibração e análises rápidas.

4– Conclusões

Um sistema automatizado para Análises por Injeção Sequencial que garantia a possibilidade da aplicação da otimização de parâmetros, bem como as etapas convencionais envolvidas na medida do sinal analítico foi desenvolvido. A otimização de parâmetros foi explorada por planejamento experimental e aplicada com sucesso a dois diferentes métodos espectrofotométricos, permitindo a execução das análises em condições apropriadas, de forma rápida e eficiente. A incorporação da etapa de otimização à rotina analítica levou, como esperado, a melhorias em diversas figuras de mérito dos métodos devido ao aumento da sensibilidade analítica. O tempo necessário para o desenvolvimento do procedimento analítico e os erros inerentes às manipulações por parte do operador foram significativamente reduzidos utilizando a estratégia de otimização automatizada incorporada às etapas de construção de curvas analíticas e medidas em uma única rotina. Essas características foram alcançadas devido à (i) redução do número de experimentos, propriedade intrínseca do planejamento experimental; (ii) simplificação da seqüencialidade de etapas, pela construção de uma rotina única; e, (iii) pela redução da intervenção do operador.

Adicionalmente, foram constatados, para as análises realizadas envolvendo a determinação de ferro total e captopril, que os erros obtidos foram comparáveis com os anteriormente reportados na literatura. Contudo, os volumes de reagentes requeridos para análises (definidos pela otimização) foram inferiores a maioria dos trabalhos encontrados com o mesmo propósito, levando à diminuição da produção de resíduos.

Esse sistema automatizado foi facilmente aplicado a diferentes métodos (reações) utilizando detecção espectrofotométrica e, pequenas alterações na aquisição/conversão de sinais podem vir a ser necessárias para permitir a utilização da rotina com outros tipos de detectores.

Apesar de eficiente, o programa para gerenciamento do sistema SIA desenvolvido não pôde ser considerado autônomo e tomadas de decisões por parte do operador podem ser indispensáveis, como observado na etapa de otimização do procedimento para determinação de captopril em produtos farmacêuticos. Essa intervenção não foi necessária durante a otimização do procedimento para determinação de ferro total em amostras de fortificantes. No caso da determinação de captopril, pôde ser constatado que apesar dos modelos matemáticos contribuírem para a análise dos dados, nenhum sistema químico deve ser unicamente dependente das informações geradas pelos modelos. Assim, a intervenção humana, a qual poderia ocorrer no nível operacional (manipulação) e/ou crítico (tomada de decisão), foi e pode vir a ser imprescindível.

5- Referências Bibliográficas

- ANDRADE-EIROA, A., ERUSTES, J.A., FORTEZA, R., CERDÁ, V., LIMA, J.L.F.C. Determination of chloride by multisyringe flow injection analysis and sequential injection analysis with potentiometric detection. *Anal. Chim. Acta*, 467, 25-33, 2002.
- ARAÚJO, A.N., COSTA, R.C.C., LIMA, J.L.F.C., REIS, B.F. Sequential injection system in flame atomic absorption spectrometry for the determination of calcium and magnesium in mineral waters. *Anal. Chim. Acta*, 358, 111-119, 1998.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, 2ª ed. Editora da Unicamp, Campinas, 2003.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. 25 anos de quimiometria no Brasil. *Quim. Nova*, 29, 6, 401-406, 2006.
- BEZERRA, M.A., SANTELLI, R.E., OLIVEIRA, E.P., VILLAR, L.S., ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965-977, 2008.
- BRERETON, R.G. *Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. John Wiley & Sons, England, 2003.
- CERDA, V., CERDA, A., CLADERA, A., OMS, M.T., MAS, F., GÓMEZ, E., BAUZÁ, F., MIRÓ, M., FORTEZA, R., ESTELA, J.M., Monitoring of environmental parameters by sequential injection analysis. *Trends Anal. Chem.*, 20, 407-418, 2001.
- CHAGAS, M.P. Determinação Espectrofotométrica de fármacos em sistema de análise por injeção em fluxo pela reação de acoplamento oxidativo para o grupo tiol, Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Bahia, 2007.
- ECONOMOU, A. Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample handling and pre-treatment. *Trends Anal. Chem.*, 24, 416-425, 2005.
- ESBENSEN, K.H., *Multivariate Data Analysis in Practice: An Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design*. CAMO, 5ª ed., New Jersey, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia>, acesso em 05/11/2008

FERREIRA, S.L.C., DOS SANTOS, W.N.L., QUINTELLA, C.M., NETO, B.B., BOSQUESENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. *Talanta*, 63, 1061-1067, 2004.

FERREIRA, S.L.C., BRUNS, R.E., FERREIRA, H.S., MATOS, G.D., DAVID, J.D., BRANDÃO, G.C., DA SILVA, E.G.P., PORTUGAL, L.A., Dos REIS, P.S., SOUZA, A.S., DOS SANTOS, W.N.L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal. Chim. Acta*, 597, 179-186. 2007.

GALHARDO, C.X., MASINI, J.C. Sequential injection analysis as a tool for in situ monitoring of Fe(II), Fe(III), NO_3^- and NO_2^- in natural waste waters. *Anal. Chim. Acta*, 438, 39-48, 2001.

GUBELI, T.; CHRISTIAN, G.D., RUZICKA, J. Fundamentals of sinusoidal flow sequential injection spectrophotometry. *Anal. Chem.*, 63, 2407-2413. 1991.

GUTZ, I. G. R. Quimiometria e automação em química analítica: algumas contribuições. Tese de livre docência. 1985.

HONORATO, R.S., ARAUJO, M.C.U., LIMA, R.A.C., ZAGATTO, E.A.G., LAPA, R.A.S., LIMA, J.L.F.C. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. *Anal. Chim. Acta*, 396, 91-97, 1999.

IMANDI, S.B., BANDARU, V.V.R., SOMALANKA, S.R., BANDARU, S.R., GARAPATI, H.R. Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste. *Bioresour. Technol.*, 99, 4445-4450, 2008.

LAPA, R.A.S., LIMA, J.L.F.C., PINTO, I.V.O.S. Development of a sequential injection analysis system for the simultaneous biosensing of glucose and ethanol in bioreactor fermentation. [Food Chem.](#), 81, 141-146, 2003.

LENEHAN, C.E., BARNETT, N.W., LEWIS, S.W., Sequential Injection Analysis. *Analyst*, 127, 997, 2002.

- MASSART, D.L., VANDEGINSTE, B.G.M., BUYDENS, L.M.C., DE JONG, S., LEWI, P.J., SMEYER-VERBEKE, J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- MASSINI, J. Demonstrando os fundamentos, potencialidades e limitações da análise por injeção seqüencial. Quím. Nova, 31, 704-708, 2008.
- MERVARTOVA, K., POLÁSEK, M., CALATAYUD, J.M. Sequential injection analysis (SIA)-chemiluminescence determination of indomethacin using tris[(2,2_-bipyridyl)]ruthenium(III) as reagent and its application to semisolid pharmaceutical dosage forms. Anal. Chim. Acta, 600, 114-121, 2007.
- MILLER, J.N., MILLER, J.C. Estadística y quimiometria para química analítica, 4ª edición, Prentice Hall, Madrid, 2002.
- MIN, R.W., NIELSEN, J., VILLADSEN, J. On-line monitoring of glucose and penicillin by sequential injection analysis. Anal. Chim. Acta, 320, 199-205, 1996.
- MIRO, M., CERDA, V., ESTELA, J.M. Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications. Trends Anal. Chem., 21, 199-210, 2002.
- MONTGOMERY, D. C. Designs and Analysis of Experiments, 6ª ed. John Wiley & Sons, Danvers, 2005.
- OLIVEIRA, F.S., KORN, M. Spectrophotometric determination of sulphate in automotive fuel ethanol by sequential injection analysis using dimethylsulphonazo(III) reaction. Talanta, 68, 992-999, 2006.
- PASAMONTES, A.E., CALLAO, M.P. Optimization by means of responses surface of an analytical sequence using a sequential injection system. Talanta, 68 (5), 1617-1622, 2006.
- PASCUAL-REGUERA, M.I., ORTEGA-CARMONA, I., MOLINA-DÍAZ, A. Spectrophotometric determination of iron with ferrozine by flow-injection analysis. Talanta 44, 1793-1801, 1997.
- PIMENTA, A.M., ARAÚJO, A.N., MONTENEGRO, M.C.B.S.M. Sequential injection analysis of captopril based on colorimetric and potentiometric detection. Anal. Chim. Acta, 438, 31-38, 2001.

- PINTO, P.C.A.G., SARAIVA, M.L.M.F.S., SANTOS, J.L.M., LIMA, J.L.F.C. Fluorimetric determination of aminocaproic acid in pharmaceutical formulations using a sequential injection analysis system. *Talanta*, 68, 857-862, 2006.
- PRIOR, J.A.V., Santos, J.L.M., LIMA, J.L.F.C. Exploiting kinetic spectrophotometric determination of captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, in a multi-pumping flow system. *Anal. Chim. Acta*, 600, 183-187, 2007.
- REIS, B.F., GINE, M.F., ZAGATTO, E.A.G., LIMA, J.L.F.C., LAPA, R.A. Multicommutation in Flow-Analysis 1. Binary Sampling - Concepts, Instrumentation and Spectrophotometric Determination of Iron in Plant Digests. *Anal. Chim. Acta*, 293, 129-138, 1994.
- RIBEIRO, M.F.T., SANTOS, J.L.M., LIMA, J.L.F.C. Piezoelectric pumping in flow analysis: Application to the spectrophotometric determination of gabapentin. *Anal. Chim. Acta*, 600, 14-20, 2007.
- ROCHA, F.R.P., NÓBREGA, J.A. Efeito Schlieren em Sistemas de Análise por Injeção em Fluxo, *Quím. Nova*, 19 (6), 636-640, 1996.
- RÓDENAS-TORRALBA, E., ROCHA, F.R.P., REIS, B.F., MORALES-RUBIO, A., DE LA GUARDIA, M. Evaluation of a Multicommutated Flow System for Photometric Environmental Measurements. *J. Autom. Methods Manage. Chem.*, 2006, 1-9, 2006.
- RUZICKA, J., HANSEN, E.H. A new concept of fast flow analysis. *Anal. Chim. Acta*, 78, 145-157, 1975.
- RUZICKA, J., HANSEN, E.H. *Flow Injection Analysis*, 2^a edition, John Wiley & Sons, New York, 1988.
- RUZICKA, J., MARSHALL, G.D. *Sequential Injection - a New Concept for Chemical Sensors, Process Analysis and Laboratory Assays*. *Anal. Chim. Acta*, 237, 329-343, 1990.
- RUZICKA, J., GUBELI, T. Principles of stopped-flow sequential injection analysis and its application to the kinetic determination of traces of a proteolytic enzyme. *Anal. Chem.*, 63, 1680-1685, 1991.
- SANTELLI, R.E., BEZERRA, M.A., SANTANA, O.D., CASSELA, R.J., FERREIRA, S.L.C. Multivariate technique for optimization of digestion procedure by focussed microwave system for determination of Mn, Zn and Fe in food samples using FAAS. *Talanta*, 68, 1083-1088, 2006

- SANTOS, J.L.M., RIBEIRO, M.F.T., DIAS, A.C.B., LIMA, J.L.F.C. ZAGATTO, E.A.G. Multi-pumping flow systems: The potential of simplicity. *Anal. Chim. Acta*, 600, 21-28, 2007.
- SCIMAGO JOURNAL & COUNTRY RANK. <http://www.scimagojr.com>, acesso em 31/01/2009
- SKEGGS, L.T. An automatic method for colorimetric analysis. *American Journal Of Clinical Pathology*. 28, 311-322, 1957.
- SILVA, F.V., SOUZA, G.B., FERRAZ, L.F.N., NOGUEIRA, A.R.A. Determination of chloride in milk using sequential injection automated conductimetry. *Food Chem.*, 67, 317-322, 1999.
- SUAREZ, W.T., MADI, A.A., FIGUEIREDO-FILHO, L.C.S. de, FATIBELLO-FILHO, O. Flow-Injection Spectrophotometric System for Captopril Determination in Pharmaceuticals. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18, 1215-1219, 2007.
- TZANAVARAS, P.D., THEMELIS, D.G., ECONOMOU, A., THEODORIDIS, G. Flow and Sequential Injection Manifolds for the Spectrophotometric Determination of Captopril Based on its Oxidation by Fe(III). *Microchim. Acta*, 142, 55-62, 2003.
- TESFALDET, Z.O., VAN STADEN, J.F., STEFAN, R.I. Sequential injection spectrophotometric determination of iron as Fe(II) in multi-vitamin preparations using 1,10-phenanthroline as complexing agent. *Talanta*, 64, 1189-1195, 2004.
- UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, The United States Pharmacopeia: the national formulary: captopril, 25th ed., Rockville, 2002.
- VALCÁRCEL, M. Principles of Analytical Chemistry: a textbook. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2000.
- VALCÁRCEL, M., CÁRDENAS, M.S. Automatización y miniaturización em química analítica. Barcelona: Springer-Verlag, 2000.
- WANG, J., HANSEN, E.H. Coupling on-line preconcentration by ion-exchange with ETAAS A novel flow injection approach based on the use of a renewable microcolumn as demonstrated for the determination of nickel in environmental and biological samples. [Anal. Chim. Acta](#), 424, 223-232, 2000.
- WINTERTON, N. Chlorine: the only green element - towards a wider acceptance of its role in natural cycles. *Green Chem.*, 2, 173-225, 2000.

YAMANE, T., YAMADA, H. Flow-injection spectrophotometric determination of trace iron in various salts. Elimination of blank peak effect and use of 2-(5-nitro-2-pyridylazo)-5-(*N*-propyl-*N*-sulfopropylamino) phenol as chromogenic agent. *Anal.Chim. Acta*, 308, 433-438, 1995.

YAMANE, T., KOSHINO, K. Flow-injection systems for determination of trace manganese in various salts by catalytic photometric detection. *Talanta*, 43, 963-969, 1996.