

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA ANALÍTICA

**SISTEMA DE MULTICOMUTAÇÃO EM FLUXO PARA A DETERMINAÇÃO
ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ÁCIDO ACETILSALICILICO EM FÁRMACOS.**

HELSON SOUZA DE LIMA

São Luís – MA

2014

HELSON SOUZA DE LIMA

**SISTEMA DE MULTICOMUTAÇÃO EM FLUXO PARA A DETERMINAÇÃO
ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ÁCIDO ACETILSALICILICO EM FÁRMACOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Ridvan Nunes Fernandes

São Luís – MA

2014

Lima, Helson Souza de

Sistema de multicomutação em fluxo para determinação espectrofotométrica de ácido acetilsalicílico em fármacos/ Helson Souza de Lima. – 2014.

57f.

Impresso por computador (fotocópia).

Orientador: Ridvan Nunes Fernandes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós - Graduação em Química, 2014.

1. Ácido acetilsalicílico 2. Análise em fluxo 3. Multicomutação I. Título

CDU 547.587.1

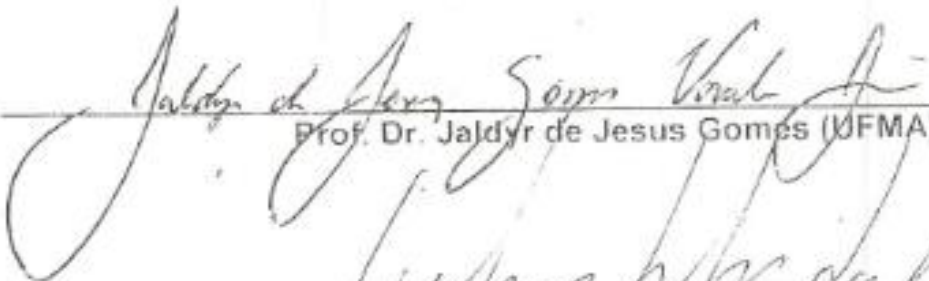
Titulo: "Sistema de multicomutação em fluxo para determinação espectrofotométrica de ácido acetilsalicílico em comprimidos".

Helson Souza de Lima
Aprovado em 30 de maio de 2014

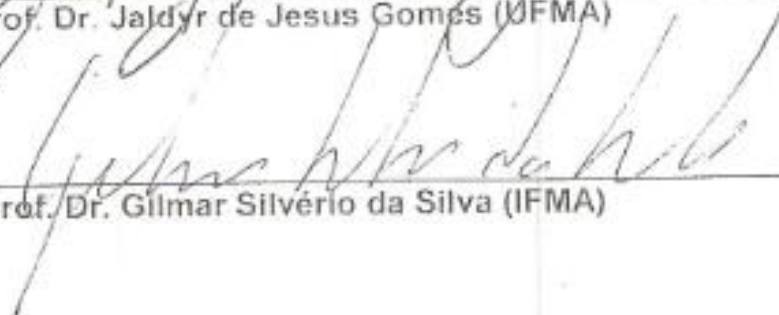
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Ridvan Nunes Fernandes (Orientador DEQUI- UFMA)



Prof. Dr. Jaldyr de Jesus Gomes (UFMA)



Prof. Dr. Gilmar Silvério da Silva (IFMA)

*“Nossa maior fraqueza está em
desistir. O caminho mais certo de
vencer é tentar mais uma vez.”*

Thomas Edison.

*A minha Mãe Maria Regina pelos
Exemplos e ensinamentos deixados...*

Eu dedico.

AGRADECIMENTOS

- A Deus sobre tudo pelo dom da vida a mim concedido;
- Aos meus pais Maria Regina e Manoel Meneses e meus irmãos Wanderson e José Henrique pelo amor, compreensão e suporte dados durante todo o esses anos dentro da Universidade e ao longo da minha vida;
- A minha noiva Maria Do Carmo por ser minha companheira, minha cúmplice meu porto seguro. Pelo incentivo constante, carinho, presença e bom humor que certamente tornaram esse trabalho muito mais agradável;
- Ao meu orientador professor Dr. Ridvan Nunes Fernandes pela amizade, orientação, apoio e paciência indispensável;
- Ao LPAA, pela infra-estrutura e materiais indispensáveis para realização dos experimentos;
- A Central Analítica e a Eletroquímica pelo apoio fornecido;
- Aos amigos do LPAA Paulo Roberto, Anderson, Kayne, Manoel, Marcos e Eduardo pela contínua colaboração na elaboração do presente trabalho, principalmente pela grande amizade cultivada nestes anos de convivência;
- Aos meus amigos do mestrado Roberto Pereira, Layse Naira, Leandro Lima, Railson, Deyvid Pires, Marcos Moura, Wellington Lyra pela ajuda prestada durante o desenvolvimento deste trabalho;
- Aos professores Adeilton Maciel e Jaldyr Varela por todos os comentários e sugestões durante a pré-defesa;
- A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para tornar possível este trabalho;

Muito Obrigado!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (1) Salicilina, (2) Ácido Salicílico e (3) Ácido Acetilsalicílico. ^[17]	18
Figura 2: Reação de formação do ácido acetilsalicílico. ^[20]	19
Figura 3. Perfil do sinal transiente tipicamente obtido em FIA e ilustração do gradiente de concentração (dispersão) na zona de amostra. ^[51]	23
Figura 4. Arranjo de um sistema de análises em fluxo por multicomutação com válvulas solenóides por aspiração. V ₁ - V ₃ - válvulas solenóides, A - amostra, R ₁ - reagente, Ca - solução transportadora, R - reator, B - bomba peristáltica, D- sistema de detecção, W - descarte e AB amostragem binária. ^[51]	27
Figura 5. Arranjo de um sistema de análises em fluxo por multicomutação com válvulas solenóides por bombeamento. V ₁ - V ₃ - válvulas solenóides, A - amostra, R ₁ - reagente, Ca - solução transportadora, R - reator, B - bomba peristáltica, D - sistema de detecção, W – descarte, AS - amostragem simultânea e AB - amostragem binária. ^[51]	28
Figura 6. Reação de hidrólise do AAS (A) seguido da complexação do ânion salicilato com ferro (III) (B).....	32
Figura 7. Módulo de análise do sistema em fluxo proposto. T ₁ , T ₂ e T ₃ Intervalos de tempo de acionamento das válvulas V ₁ , V ₂ e V ₃ respectivamente.....	33
Figura 8. Efeito da solução transportadora sobre o sinal analítico na faixa de concentração de AAS de 25 a 100 mg.L ⁻¹	35
Figura 9. Efeito da solução transportadora (A) H ₂ O e (B) 0,1 mol.L ⁻¹ HNO ₃ sobre a estabilidade da linha de base em 80 medidas consecutivas. Sinais analíticos obtidos com solução de referência 50mg.L ⁻¹ de AAS.....	36
Figura 10. Efeito da concentração do HNO ₃ sobre o sinal analítico na faixa de concentração de AAS de 25 a 100 mg.L ⁻¹	37
Figura 11. Efeito da vazão sobre o sinal analítico na faixa de concentração de AAS de 25 a 100 mg.L ⁻¹	38

Figura 12. Efeito do reator sobre o sinal analítico na faixa de concentração de AAS de 25 a 100 mg.L ⁻¹	39
Figura 13. Efeito do numero de ciclos sobre o sinal analítico na faixa de concentração de AAS de 25 a 100 mg.L ⁻¹	40
Figura 14. Efeito da concentração do reagente trinder sobre o sinal analítico na faixa de concentração de AAS de 25 a 100 mg.L ⁻¹	41
Figura 15. Efeito do tempo de acionamento da válvula (V3) de inserção do reagente de Trinder sobre o sinal analítico. Solução de referência de AAS 50 mg.L ⁻¹	42
Figura 16. Efeito do tempo de acionamento da válvula (V ₂) de inserção da amostra sobre o sinal analítico. Solução de referência de AAS 50 mg.L ⁻¹	43
Figura 17. Sinais transientes relativos à solução de referência de AAS 25 mg.L ¹ para 12 determinações sucessivas.....	45
Figura 18. Curva analítica para determinação de AAS em comprimidos.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características das curvas analíticas utilizando água e HNO ₃ como da solução transportadora.....	35
Tabela 2. Condições otimizadas e características analíticas do método proposto para determinação de AAS.....	44
Tabela 3. Resultados com os respectivos desvios padrão da determinação de AAS pelo método proposto e pelo método de referência.....	47
Tabela 4. Resultados do teste de recuperação na determinação de AAS nas amostras farmacêuticas pelo método proposto.....	48

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um procedimento analítico empregando o processo de multicomutação para determinação de ácido acetilsalicílico em comprimidos. O procedimento se baseia na reação de Trinder, onde o ácido salicílico, proveniente da hidrólise alcalina do ácido acetilsalicílico, reage com íons Fe^{3+} , formando um complexo de cor púrpura, monitorado espectrofotometricamente em 525nm. O sistema de multicomutação desenvolvido empregou 3 válvulas solenóides de três vias para controlar a manipulação das soluções, uma bomba peristáltica para a propulsão dos fluidos, e um detector espectrofotométrico que opera na região do visível. Na otimização do sistema proposto fizeram-se o estudo da solução transportadora, vazão, reator, número de ciclos, concentração do reagente Trinder, tempo de acionamento das válvulas solenóides que apresentaram os respectivos valores ótimos: HNO_3 como solução transportadora, $3,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 80cm, 12 ciclos, $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 0,1 s para a válvula de inserção reagente e 0,5 s para a válvula de inserção da amostra. O sistema apresentou uma faixa de reposta linear entre 25-100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AAS ($R= 0,999$), com RSD de 0,91% ($n=4$), frequência de amostragem de 72 determinações por hora com um limite de detecção de 0,57 mg L^{-1} e limite de quantificação de 1,89 mg L^{-1} . Os resultados obtidos com teste de recuperação variaram entre 97 e 99%. Na comparação de métodos, o teste t de Student não apresentou diferença significativa, uma vez que o $t_{\text{cal}} = 0,91$ foi menor que o $t_{\text{tal}} = 2,78$ ao nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: Ácido acetilsalicílico, Análises em fluxo, Multicomutação.

ABSTRACT

In this work was developed an analytical procedure employing multicommutation for the determination of acetylsalicylic acid in tablet. The procedure is based on the Trinder reaction, wherein the salicylic acid from the hydrolysis of acetylsalicylic acid is reacted of iron (III), forming a purple complex, monitored spectrophotometrically at 525nm. The multicommutation developed system employed three solenoid valves for solution management and a peristaltic pump for the fluid propulsion, and spectrophotometric detection working in the visible range. The optimization of the proposed system have been made to study the carrier solution, flow rate, reactor, numbers of cycle, Trinder reagent concentration, studies of opening time of solenoid valves that optimal values respectively. HNO₃ as carrier solution, 3.5 ml . min⁻¹, 80cm, 12 cycles, 10 g.L⁻¹, 0.1 s for the valve insert reagent and 0.5 s for the insertion of the sample valve. The system provided linear response: range between 25-100 mg.L⁻¹ of AAS (R = 0.999), with RSD 0.91% (n = 4), good sampling frequency of 72 determination per hour. detection limit (LD) of 0.57 mg.L⁻¹ and quantification limit (LQ) of 1.89 mg.L⁻¹. The results obtained with recovery test ranged between 97 and 99%. In a comparison of methods, the test t of Student has not presented relevant difference, once the $t_{cal.} = 0,91$ were smaller than $t_{tab.} = 2.78$ at a 95% confidence level.

Key-words: Acetylsalicylic acid. Flow analysis. Multicommutation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Ácido acetilsalicílico (AAS)	17
3.1.1 Breve Histórico	18
3.1.2 Procedimentos Analíticos	20
3.2 Análise em Fluxo	22
3.2.1 Análise em Fluxo Segmentado (SFA)	22
3.2.2 Análise por Injeção em Fluxo (FIA).....	23
3.2.3 Análise em Fluxo Monossegmentado (MSFA).....	24
3.2.4 Análise por Injeção Sequencial (SIA).....	25
3.2.5 Análise em Fluxo Multicomutado (MCFA).....	25
3.2.6 - Análise em Flow-Batch ou Analisador Fluxo-Batelada (FBA)	29
3.2.7 Analisadores em fluxo para a determinação de ácido acetilsalicílico.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 - Reagentes e Soluções.....	31
4.2 Preparo das amostras	31
4.3 Equipamentos	32
4.4 Metodologia	32
4.5 Módulo de análise.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Dimensionamento do Sisitema em fluxo	34
5.1.1 Efeito da Solução transportadora.....	34
5.1.2 Efeito da concentração de ácido nítrico (HNO ₃)	37
5.1.3 Efeito da Vazão	37
5.1.4 Efeito do reator	38
5.1.5 Efeito do numero de ciclos.....	39

5.1.6 Efeito da concentração do reagente Trinder	40
5.1.7 Estudo do Tempo de acionamento das válvulas solenóides	41
5.2 Estudo da repetibilidade	45
5.3 Características Analíticas Obtidas	46
5.5 Teste De Recuperação	48
6. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

Os fármacos são substâncias responsáveis desde o alívio de dores e ou sintomas, até a cura de doenças crônicas. A utilização dessas substâncias pela humanidade para alívio de dores se dá desde tempos imemoriais. E para esta finalidade recorria-se ao uso de plantas. Posteriormente o rápido avanço dos conhecimentos fitoquímicos levou a descoberta dos analgésicos. Desta forma, muitas substâncias ativas foram conhecidas e introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje como medicamentos. Um clássico exemplo foi síntese do ácido acetilsalicílico em 1897.

O ácido acetilsalicílico, também conhecido como AAS ou Aspirina, foi a primeira droga sintética a ser comercializada. Esse fármaco é um medicamento comum encontrado com facilidade em todas as farmácias do mundo. É indicado como analgésico, antipirético e anti-inflamatório no tratamento de febres reumáticas, crises de gota e artrites reumáticas.

A determinação do ácido acetilsalicílico em preparações farmacêuticas é importante para a avaliação da sua qualidade. Uma vez que o uso constante do AAS também pode gerar problemas de saúde, principalmente na indução de lesões gástricas,^[1] úlceras e hemorragias, assim como acidentes de intoxicação com crianças, devido à acessibilidade desta droga.

Nos últimos anos tem havido uma crescente preocupação referente à qualidade dos medicamentos, uma vez que a demanda por esses produtos tem aumentado. Os procedimentos adotados em uma indústria farmacêutica para o controle de qualidade desses medicamentos são os métodos descritos pelas farmacopéias.

A maioria dos métodos se mostra pouco prático, visto que necessitam de etapas de pré-tratamento e extração da amostra, aumentando assim o custo do processo e demandam uma grande quantidade de tempo, além de empregarem solventes orgânicos de média ou alta toxicidade.^[2]

Neste contexto, o trabalho aqui proposto tem como principal meta desenvolver um sistema analítico a base de multicomutação em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de ácido acetilsalicílico em comprimidos. Esta estratégia se justifica por tratar-se de um método analítico que se encontra em concordância com as tendências atuais no que tange aspectos econômicos e analíticos, além de menor impacto ambiental, pelo baixo consumo de amostras e reagentes, baixas gerações de resíduos associado à alta frequência de

amostragem, alta sensibilidade, baixo limite de detecção, baixo custo e simples operação, possibilitando a mecanização ou automatização do mesmo.^[3]

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um sistema automatizado, à base de análise por injeção em fluxo utilizando o conceito de multicomutação para determinação de ácido acetilsalicílico em fármacos.

2.2 Objetivos específicos

1. Realizar a montagem de um sistema de análise em fluxo utilizando válvulas solenóides de três vias;
2. Adequar o programa computacional escrito em Quick Basic 4.5 para as finalidades do sistema analítico proposto;
3. Dimensionar o sistema de análise para a determinação de ácido acetilsalicílico
4. Realizar a determinação do ácido acetilsalicílico em comprimidos;
5. Comparar os resultados do método automatizado proposto com a metodologia oficial proposta pela farmacopéia brasileira.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ácido acetilsalicílico (AAS)

Esse fármaco apresenta-se na forma de pó cristalino ou cristais incolores a brancos. Inodoro ou quase inodoro. Solúveis em 1:30 de água e 1:5 em álcool. Possui maior solubilidade em hidróxidos alcalinos, uma vez que a hidrólise descarboxila o H⁺, tornando-se iônico e, portanto, facilmente solúvel em água. A massa molecular do AAS é de 180,16 g.mol⁻¹.^[4-7]

O ácido acetilsalicílico é classificado como uma droga do tipo anti-inflamatório não esteroideal (AINEs) e indicado como agente anti-inflamatório, antipirético, analgésico e antiplaquetário, dependendo do seu esquema posológico.^[9,10] Assim como para prevenção primária de cardiopatia isquêmica, dentre outras indicações.^[11]

O ácido acetilsalicílico vem sendo usado como analgésico e antipirético por centenas de milhares de pessoas desde a sua descoberta há mais de cem anos. Apesar da sua idade, o ácido acetilsalicílico ainda é o padrão para comparação e avaliação de novas substâncias e uma das drogas mais amplamente estudadas.^[12]

O ácido acetilsalicílico vem sendo utilizado na prevenção de eventos tromboembólicos, em doses que variam entre 50-325 mg/dia, e constantemente é alvo de pesquisas e discussões devido ao risco de eventos adversos quando em doses superiores e perda da eficácia terapêutica em baixas doses.^[13]

O uso indiscriminado de fármacos pode trazer danos consideráveis à saúde. O ácido acetilsalicílico mal administrado apresenta efeitos secundários adversos, incluem-se, especialmente para doses elevadas, dores gastrointestinais em alguns indivíduos, úlceras e hemorragias e tinnitus (zumbido nos ouvidos).^[14] Outro efeito secundário, devido ao seu efeito anticoagulante, é uma maior hemorragia em mulheres com menstruação.^[15]

Dentre os riscos de eventos adversos existentes pela administração do ácido acetilsalicílico, a ANVISA^[12] destaca: hemorragia gastrointestinal oculta ou evidente (hematêmese, melena) podendo acarretar anemia por deficiência de ferro, úlcera e perfuração

gastroduodenal. Sendo segundo Korolkovas e França^[16] capaz de potencializar o efeito de hipoglicemiantes.

3.1.1 Breve Histórico

A história do AAS teve início no século V a.C. com Hipócrates, o pai da medicina moderna, que prescrevia preparações com cascas e folhas do salgueiro para o tratamento de febres e para aliviar as dores do parto. Dioscórides, um dos mais notáveis médicos da Antiguidade, que viveu na Grécia no século I da era cristã, receitava emplastos feitos com cascas e folhas do salgueiro para o tratamento de dores reumáticas.^[17]

Na Inglaterra, em 1757, o reverendo Edmund Stone provou o sabor amargo das cascas do salgueiro. Seis anos mais tarde, os resultados de suas observações clínicas mostraram as propriedades analgésicas e antipiréticas do extrato daquela planta.^[18, 19]

A salicilina (Figura 1.1), princípio ativo do salgueiro branco, foi isolada pela primeira vez em 1829 pelo farmacêutico francês Louis Hector Leroux.^[17] A salicilina era um glicosídeo amargo com efeito antipirético que, quando submetida à hidrólise, produzia glicose e álcool salicílico. Este pode ser convertido em ácido salicílico por oxidação no organismo humano ou *in vitro* por manipulação química. As propriedades anti-reumáticas da salicilina assemelham-se muito às do ácido salicílico (Figura 1.2).^[17,18]

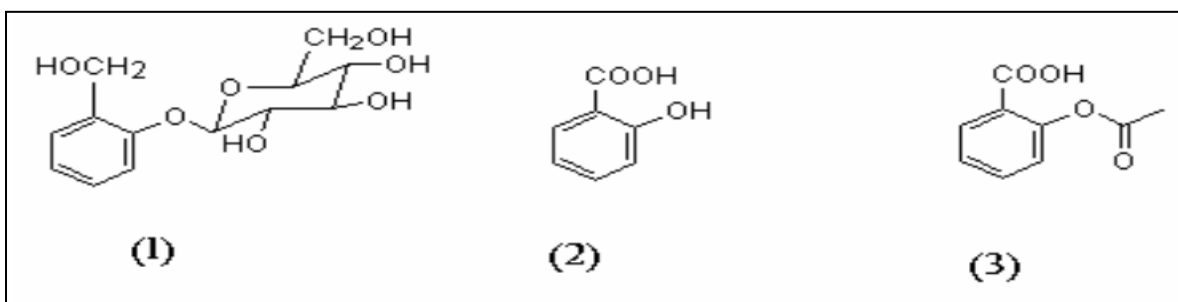


Figura 1: (1) Salicilina, (2) Ácido Salicílico e (3) Ácido Acetilsalicílico.^[17]

Em 1838, o químico italiano Raffaele Piria purificou a salicilina e obteve, por hidrólise e oxidação, o ácido livre.^[17] Em 1859, o célebre químico alemão Hermann Kolbe e

seus alunos sintetizaram o ácido salicílico e seu sal sódico a partir do fenol, pela reação entre o fenóxido de sódio e o dióxido de carbono.

Em 1874, Friedrich von Heyden, um dos alunos de Kolbe, em Dresden, Alemanha, estabeleceu a primeira grande fábrica destinada à produção em larga escala de salicilatos sintéticos.

Em um dos laboratórios da Bayer, no ano de 1897, Felix Hoffman realizou a síntese do ácido acetilsalicílico. O novo medicamento era menos ácido que o ácido salicílico, mas mantinha a propriedade analgésica desejada. ^[17,19] O ácido acetilsalicílico foi obtido a partir da esterificação do ácido salicílico com anidrido acético em presença do ácido sulfúrico que atua como catalisador (Figura 2) ^[20].

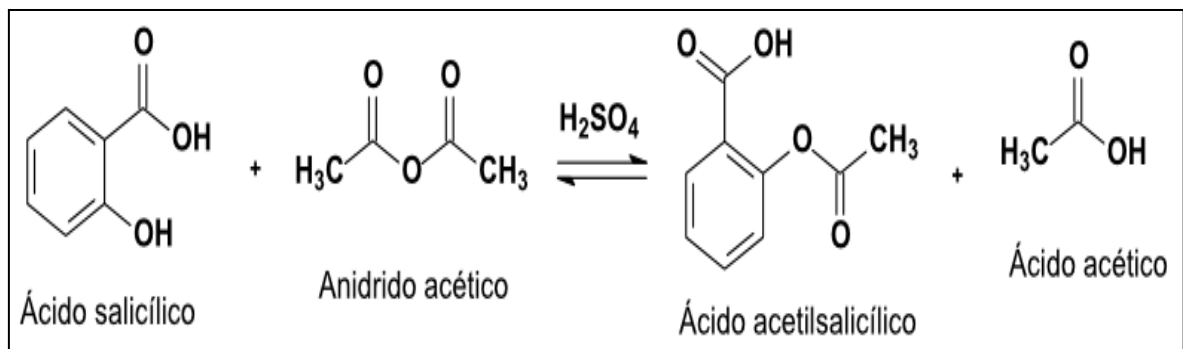


Figura 2: Reação de formação do ácido acetilsalicílico. ^[20]

As propriedades terapêuticas do AAS levaram os laboratórios de pesquisa da Bayer a lançarem o AAS no mercado para competir com os salicilatos naturais, o que ocorreu a partir de 1897 sob o nome de Aspirina®. ^[19] Aspirina deriva de: A de acetil e spirina de "spiric acid", o outro nome em inglês pelo qual era também conhecido o ácido salicílico. "Spiric" por sua vez tem origem em Spiraea, gênero ao qual pertence à *Salix alba*, planta de onde foi isolada a salicilina. Desde então, a medicina passou a dispor da aspirina como uma das mais potentes armas de seu arsenal terapêutico. ^[17]

Após mais de 100 anos de sua descoberta, o AAS continua sendo alvo de inúmeras pesquisas sobre sua aplicação terapêutica como analgésico e antiinflamatório, atuando no controle da febre, na artrite reumatóide e na inibição da agregação plaquetária, ^[19] além de diversos estudos sobre a quimioprevenção do câncer colo retal e de diversos outros cânceres.

3.1.2 Procedimentos Analíticos

A Farmacopéia Brasileira ^[4] recomenda para a determinação de AAS em formulações farmacêuticas o método volumétrico por titulação ácido-base de retorno. Após o tratamento da amostra com excesso de hidróxido de sódio e aquecimento por 10 min. para finalizar a hidrólise, o excesso de hidróxido de sódio é então titulado com solução padrão de ácido clorídrico.

Medidas espectrofotométricas baseadas na reação de Trinder ^[21] também são recomendadas como método de referência para a determinação indireta do AAS como AS. Nesse método o AS reage com íons Fe(III) para formar um complexo de coloração roxa.

Sena e Poppi ^[22] propuseram um procedimento analítico simples e rápido para a determinação simultânea de ácido acetilsalicílico, paracetamol, e cafeína em formulações farmacêuticas com base na calibração multivariada e medições espectrofotométricas UV (210 - 300 nm). Os resultados obtidos para a determinação destes medicamentos em comprimidos comerciais estavam de acordo com os valores especificados pelos fabricantes e a recuperação foi entre 94,7 e 104,5%.

Copolovici *et al.*, ^[23] desenvolveram um método simples de baixo custo, com rápida resposta aplicável à determinação do ácido acetilsalicílico em drogas. O método cinético descrito não precisa de nenhum procedimento de separação preliminar ou conversão de ácido acetilsalicílico de ácido salicílico. Os resultados obtidos usando o método proposto são competitivos com os valores obtidos pelo método espectrofotométrico ou potenciométrica destinado a aplicações médicas ou farmacêuticas.

Akay *et al.*, ^[24] desenvolveram um método de determinação rápida e simultânea de paracetamol e ácido acetilsalicílico e os seus produtos de degradação e impurezas tóxicas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em formas de dosagem farmacêuticas. O método proposto foi linear nas faixas de 0,5-4,0; 0,75-6,0; 0,75-6,0; 1,0-12,0 e 1,0-12,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para o paracetamol, ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, ácido salicílico e p-cloroacetanilida, respectivamente. Os Desvios padrão relativos de repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação foram inferiores a 2%.

Sartori *et al.*, ^[8] descreveram o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação de ácido acetilsalicílico (AAS) em formulações farmacêuticas usando

voltametria de onda quadrada e um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD). O AAS foi determinado diretamente em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, sem a necessidade da etapa de hidrólise alcalina. A curva analítica obtida é linear no intervalo de concentração de AAS de $2,50 \times 10^{-6}$ - $1,05 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Ghulam *et al*,^[25] desenvolveram um método espectrofotométrico UV específico, rápido e simples, com boa sensibilidade para a quantificação simultânea de aspirina e paracetamol em soluções padronizadas e tabletes. O método empregou resolução de equações simultâneas, baseados na medição da absorvência a dois comprimentos de onda, 265 e 257 nm, para a aspirina e o paracetamol, respectivamente. A curva de calibração foi linear para ambos os fármacos numa gama de concentração de $2-64 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Bochenska *et al*,^[26] propuseram a cromatografia em camada delgada de adsorção (NP-TLC) com densitometria na identificação e quantificação de ácido acetilsalicílico em comprimidos. Densitometria foi realizada no modo de absorvência UV a 200 nm. O método apresentado foi validado pela especificidade, variedade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, e robustez. O método de TLC-densitométrica foi também comparado com um método farmacopéico de espectrofotometria - UV para o ensaio de ácido acetilsalicílico e os resultados confirmam que o método pode ser utilizado como um método alternativo.

3.2 Análise em Fluxo

A acentuada demanda de amostras laboratoriais a serem analisadas em diversas áreas, por exemplo, clínicas, ambientais e farmacêuticas, tem contribuído, nas últimas décadas, para uma crescente demanda por métodos rápidos, com baixos custos de análises e diminuição da intervenção do operador. Essa demanda propiciou à investigação e desenvolvimento de vários tipos de equipamentos automatizados para aumentar a precisão e exatidão nas análises. [27]

Dentre as formas de automação de procedimentos analíticos, temos a análise em fluxo. Sendo os métodos automáticos de análise mais utilizados em procedimentos analíticos. Este fato deve-se, sobretudo, à elevada versatilidade destas técnicas, uma vez que o mesmo equipamento base permite efetuar um elevado número de montagens adaptáveis às necessidades de cada determinação analítica, o que se traduz em baixos custos de instalação e manutenção, sendo, também, fáceis de operar e controlar. Além disso, apresentam reduzido consumo de amostras, reagentes e tempo de análise.

Estes métodos podem ser classificados como: [28,29]

- Análise em Fluxo Segmentado (SFA);
- Análise por Injeção em Fluxo (FIA);
- Análise em Fluxo Monosegmentado (MSFA);
- Análise por Injeção Sequencial (SIA);
- Análise em Fluxo Multicomutado (MCFA);
- Análise em Flow-Batch ou Analisador Fluxo-Batelada (FBA)

3.2.1 Análise em Fluxo Segmentado (SFA)

Esta técnica que recebeu o nome de Analisador em Fluxo Contínuo (do Inglês: *Continuous Flow Analysis - CFA*), foi proposto pela primeira vez em 1957 por Skeggs. [30] Hoje em dia estes sistemas são conhecidos como Analisador em Fluxo Segmentado (do inglês: "*Segmented Flow Analysis – SFA*"). [31,32] Estes analisadores são caracterizados pela intersecção da zona da amostra por várias bolhas de ar. Estas intersecções dividem o fluxo em

pequenos segmentos, proporcionando o estabelecimento do equilíbrio químico mais rapidamente quando o reagente é adicionado a eles e uma elevada taxa de amostragem. A função das bolhas é evitar a contaminação cruzada entre as amostras, impedir a dispersão e facilitar a mistura da amostra com os reagentes. ^[33]

3.2.2 Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

A técnica proposta por J. Ruzicka e E. H. Hansen ^[34] foi introduzida na literatura em 1975 e baseia-se na injeção da amostra em um fluxo carregador não segmentado, que transporta esta amostra em direção ao detector, durante este processo a amostra sofre dispersão, e formam gradientes de concentração, originando sinais transientes (Figura 3) registrado de forma contínua por um detector e quantificado, usualmente, em relação à altura máxima. Sendo que sua altura pode estar ligada a concentração inicial do analito em interesse. ^[35] Durante o percurso em direção ao detector, a amostra passa por vários processos analíticos necessários à análise, porém como no transporte a amostra sofre dispersão, o equilíbrio físico e químico geralmente não é atingido. Portanto, a sensibilidade do método é menor do que a obtida em um analisador robotizado ou em batelada.

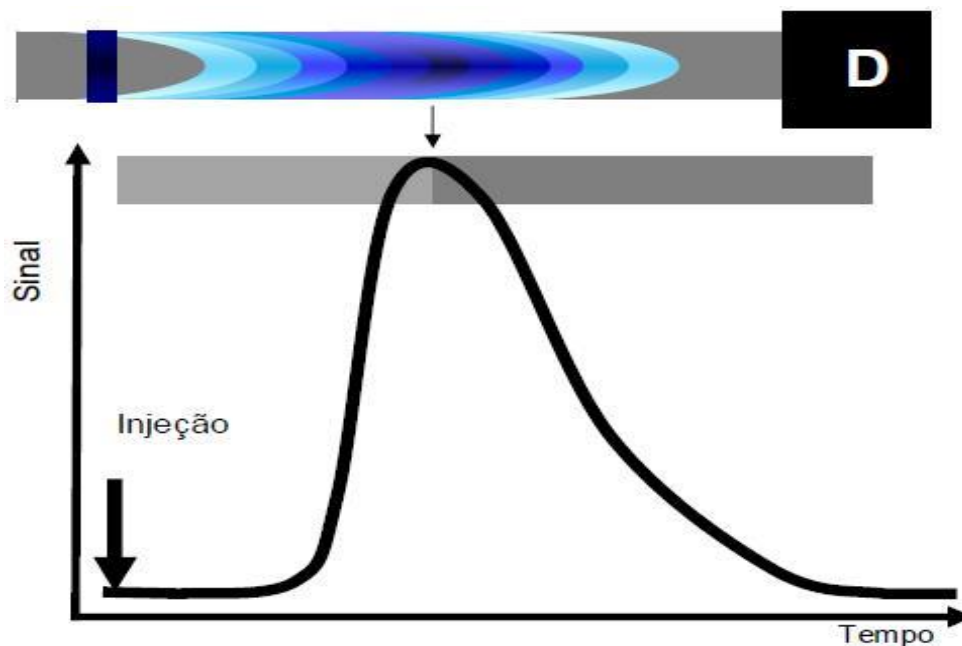


Figura 3. Perfil do sinal transiente tipicamente obtido em FIA e ilustração do gradiente de concentração (dispersão) na zona de amostra. ^[51]

Os componentes básicos de um sistema FIA são:

- Sistema de propulsão de fluidos: usualmente emprega-se uma bomba peristáltica, [36] bombas de seringa, [37,38] pela gravidade [39,40] e mini-bomba solenóide; [41]
- sistema de injeção: introduz as amostras e, em alguns casos, reagentes. Pode ser empregado para a seleção de vazões, introdução de componentes e redirecionamento do fluxo. Exemplos incluem válvulas de seis vias [42] e o injetor proporcional; [43,44]
- percurso analítico: espaço pelo qual o fluido transportador conduz a zona de amostra desde o injetor até o sistema de detecção. As reações químicas necessárias para a detecção do analito ocorrem durante o transporte;
- sistema de detecção: utilizados detectores usuais em química analítica.

A alta reprodutibilidade, elevada frequência de amostragem, baixo custo de análise, baixo consumo de amostra e reagentes e minimização do envolvimento do analista, são características que garantem a facilidade de implementação e expansão desse sistema como processo automático nos laboratórios de análise.

3.2.3 Análise em Fluxo Monossegmentado (MSFA)

O primeiro trabalho empregando esta técnica, foi desenvolvido por Pasquini e Oliveira^[45] (1985) e recebeu o nome de Análise em Fluxo Monossegmentado (do Inglês *MonoSegmented Flow Analysis – MSFA*). O sistema MSFA foi proposto como um híbrido do SFA com o FIA,^[46] agregando a boa reprodutibilidade e exatidão, alta velocidade analítica, versatilidade, baixo consumo de reagentes e amostra e baixo custo por análise dos analisadores FIA com a alta sensibilidade, menor intercontaminação com maior tempo de residência dos analisadores segmentados por bolhas. Estes Analisadores automáticos são caracterizados pela intersecção da zona da amostra entre duas bolhas de ar. Estas bolhas minimizam a dispersão da zona da amostra, permitindo longos tempos de residência, e impedem a intercontaminação das amostras.

Os analisadores MSFA, tomando como base os analisadores FIA, apresentam uma maior frequência analítica em metodologias envolvendo reações lentas porque eles permitem

um maior tempo de residência da amostra, com baixa perda de sinal analítico devido à dispersão e com desprezível intercontaminação.

3.2.4 Análise por Injeção Sequencial (SIA)

A análise por injeção sequencial (SIA, do inglês “Sequential Injection Analysis”) teve a sua origem em 1990 com J. Ruzicka e G. Marshall ^[47] e surge da necessidade de implementação de metodologias mais versáteis, robustas, fiáveis e flexíveis, que impliquem baixa manutenção e não envolvam reconfiguração do sistema na automatização de procedimentos analíticos complexos. ^[48]

Nesses analisadores, geralmente é usada uma válvula *multi – port* (válvula SIA) na aspiração sequencial de volumes precisos de soluções (amostras, reagentes, tampões, etc.) para um tubo de armazenamento, ^[49] onde se inicia a reação e em seguida, o produto formado é bombeado para o detector.

A metodologia SIA apresenta por sua vez uma elevada versatilidade, devido à possibilidade de se recorrer a um maior número de reagentes (há válvulas seletoras com mais de 20 portas), associada à utilização eficiente das soluções, registrando-se ainda um reduzido consumo de amostra e reagentes, com pouca geração de resíduos. É ainda de salientar o fato de em SIA, não se necessitar de se efetuar reconfigurações físicas do sistema, bastando alterar para esse efeito o programa informático utilizado. ^[50]

A principal desvantagem do SIA é o ritmo de amostragem mais baixo devido ao armazenamento das soluções no reator de armazenamento e ao tempo que a válvula seletora necessita para fazer a comutação entre as diferentes posições.

3.2.5 Análise em Fluxo Multicomutado (MCFA)

A análise em fluxo por multicomutação (MCFA, do inglês “Multicommutation in Flow Analysis”), é uma metodologia relativamente recente em análise de fluxo, proposta em meados da década de noventa por Reis *et al.* ^[52] Consiste na inserção da amostra e reagente num fluido transportador recorrendo, geralmente, ao uso de dispositivos de comutação, tais

como válvulas solenóides de três vias, (válvulas eletromecânicas ativadas por um solenóide), com atuação independente e controladas por computador. Este aspecto possibilita a comutação, garantindo elevada flexibilidade bem como facilidade e versatilidade na manipulação de amostras. ^[53,54] Quase sempre presentes na multicomutação, as válvulas solenóides são consideradas um dispositivo muito importante nesta metodologia. ^[55]

O princípio básico de funcionamento da válvula consiste na aplicação de uma diferença de potencial de alguns volts, abrindo canal alternativo, o qual é fechado logo após o interrompimento da corrente elétrica.^[56] Cada válvula atua como um comutador de cada fluido e os volumes inseridos são definidos pelo tempo de abertura e vazão da bomba peristáltica (Equação 1). O tempo de abertura mínimo recomendado para as válvulas solenóides é de 0,1 s; tempos menores comprometem a repetibilidade.

$$V_s = \varphi \cdot t_i \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

V_s = Volume de inserção das soluções (μL)

φ = Vazão ($\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$)

t_i = Tempo de acionamento das válvulas (s)

Esse processo permite automatizar os procedimentos analíticos através do controle na inserção das alíquotas das amostras e das soluções no percurso analítico de forma intercalada, denominada amostragem binária. Essa estratégia facilita a homogeneização da zona da amostra com a solução de reagente até o detector.

A grande vantagem do uso da multicomutação e amostragem binária é o consumo mínimo de reagente e consequente redução na geração de resíduos. Essa característica faz da multicomutação uma alternativa aos sistemas FIA clássicos, através de processos químicos limpos, ^[57,58] que respondem aos princípios da Química Verde.

Na análise em fluxo por multicomutação, a inserção das alíquotas de amostra e reagente pode realizar-se num único canal onde ocorrem as reações químicas, bastando, para isso, posicionar o dispositivo de propulsão após o detector (Figura 4), funcionando em modo de aspiração, e seleccionar as posições das válvulas. De salientar que na maioria dos trabalhos com multicomutação existe apenas um dispositivo para aspiração das soluções, o que é vantajoso a nível económico, mas proporciona pressão negativa dentro do sistema, promovendo o aparecimento de bolhas gasosas.

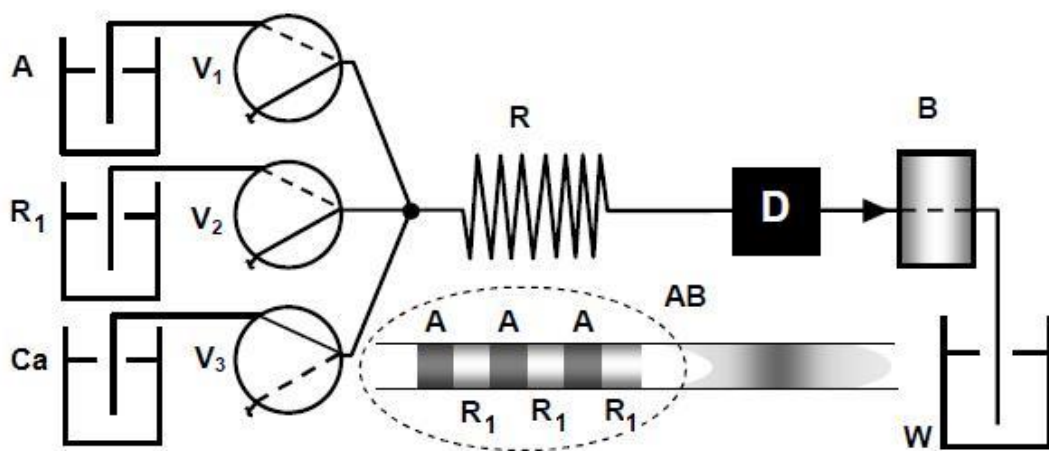


Figura 4. Arranjo de um sistema de análises em fluxo por multicomutação com válvulas solenóides por aspiração. $V_1 - V_3$ - válvulas solenóides, A - amostra, R_1 - reagente, Ca - solução transportadora, R - reator, B - bomba peristáltica, D- sistema de detecção, W - descarte e AB amostragem binária. ^[51]

Em alternativa, o sistema de propulsão poderá ser colocado antes das válvulas de comutação, funcionando como dispositivo de impulsão (Figura 5), ^[59] contribuindo para a redução do aparecimento de bolhas de ar no sistema, devido à pressão positiva. Contudo, neste tipo de configuração a complexidade do sistema aumenta devido à necessidade de utilizar um canal para cada solução de amostra e reagente e, conseqüentemente, o custo do equipamento envolvido também se torna mais elevado. Este fato é ultrapassado utilizando bombas peristálticas multicanal, as quais permitem a recirculação das soluções diminuindo o seu consumo.

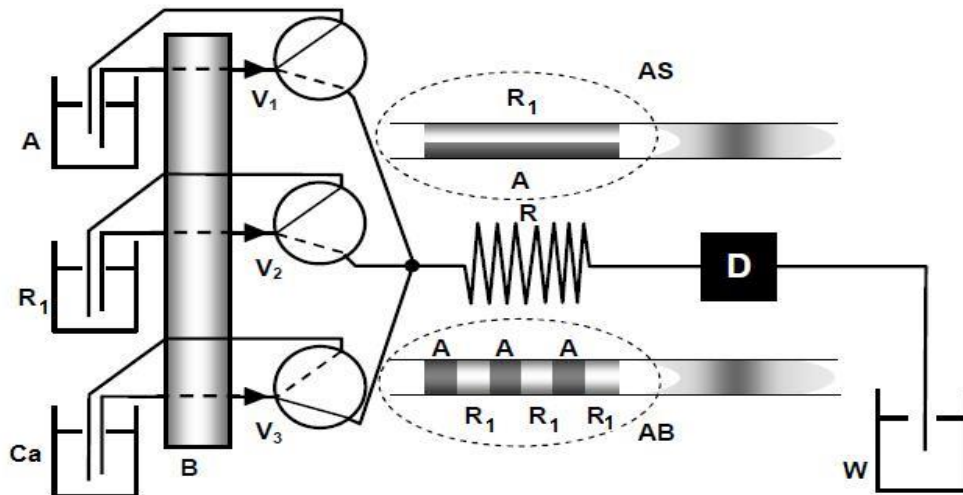


Figura 5. Arranjo de um sistema de análises em fluxo por multicomutação com válvulas solenóides por bombeamento. $V_1 - V_3$ - válvulas solenóides, A - amostra, R_1 - reagente, Ca - solução transportadora, R - reator, B - bomba peristáltica, D - sistema de detecção, W - descarte, AS - amostragem simultânea e AB - amostragem binária. ^[51]

A análise em fluxo por multicomutação permite tornar versátil muitos métodos de análise, assumindo desta forma várias aplicações analíticas sem modificar a estrutura física do módulo de análise. ^[60] A partir da introdução do conceito de multicomutação, ^[52] vários procedimentos analíticos foram implementados utilizando esta ferramenta, envolvendo diferentes matrizes e espécies químicas.

Vieira *et al.*, ^[61] propuseram a determinação fotométrica de amônio na água da chuva utilizando uma abordagem de análise em fluxo por multicomutação e detecção por um fotômetro de LED caseiro acoplado a uma célula de fluxo, além de utilizar um percurso analítico de 100 mm para melhorar a sensibilidade.

Molina-Garcia *et al.*, ^[62] propuseram duas metodologias de análise automática: injeção em fluxo multicomutada e análise por injeção sequencial. Ambas foram aplicadas à análise das quinolonas em formulações farmacêuticas.

Leal *et al.*, ^[63] fizeram uma avaliação de metodologias automatizadas desenvolvidas para medir o arsênico em amostras ambientais e relataram o estado da arte dos métodos mais significativos explorando técnicas de multicomutação em fluxo acoplados a determinação de fluorescência de geração atômica de hidreto.

Santos Andrade *et al.*,^[64] desenvolveram um método baseado em um sistema por multicomutação em fluxo interrompido para determinar simultaneamente sulfametoxazol (SMX) e trimetopim (TMP), em formulações farmacêuticas por voltametria de pulso diferencial (DPV).

Leite *et al.*,^[65] Desenvolveram um sistema de análise em fluxo empregando o conceito de multicomutação para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas empregando-se a inibição da magnitude do sinal gerado pela reação quimiluminescente entre luminol e hipoclorito.

Fatibello-Filho *et al.*,^[66] desenvolveram um método para determinação espectrofotométrico em fluxo de cloro em água usando célula de longo caminho óptico e multicomutação.

Um sistema em fluxo com válvulas solenóides foi proposto por Infante *et al.*,^[67] para a determinação de cianetos dissociáveis por ácidos fracos, com base na reação com o-ftalaldeído (OPA) e glicina originando um derivado altamente fluorescente seguido de detecção espectrofotométrica.

3.2.6 - Análise em Flow-Batch ou Analisador Fluxo-Batelada (FBA)

Esse sistema foi proposto por pesquisadores brasileiros da Universidade Federal da Paraíba, sendo seu primeiro trabalho divulgado por Honorato e colaboradores^[68] em 1999. O sistema em fluxo batelada apresenta como novidade a câmara de mistura, sendo esta feita de Teflon ou acrílico com um volume interno de 0,5 a 2,0 mL. A propulsão dos fluidos geralmente é feita através da bomba peristáltica, enquanto que a adição é realizada através das válvulas solenoides que são acionadas pela interface e controladas pelo microcomputador. Recentemente em 2012 foi lançado um artigo de revisão mostrando as determinações que foram realizadas nesse analisador^[69].

3.2.7 Analisadores em fluxo para a determinação de ácido acetilsalicílico

Fernandes *et al.*^[70] propuseram um sistema de análise por injeção em batelada (BIA), para determinação potenciométrica de ácido acetilsalicílico em comprimidos. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de AAS de $7,5 \times 10^{-3}$ a $7,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, com uma frequência de amostragem de 90 determinações por hora.

Kubota *et al.*^[71] desenvolveram um sistema FIA com detecção potenciométrica para a quantificação de AAS com a sua hidrólise alcalina “*on line*”. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de AAS de $4,0 \times 10^{-3}$ a $4,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e frequência de amostragem de 28 determinações por hora

Paseková e colaboradores^[72] desenvolveram um processo automatizado para a determinação potenciométrica de ácido acetilsalicílico com base em uma análise por injeção sequencial (SIA).

Chagas,^[73] desenvolveu um sistema de análise automática em fluxo monosegmentado acoplado a um forno de microondas para a quantificação de ácido acetilsalicílico em medicamentos. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de AAS de 0,5 a 1,8 g L⁻¹, e frequência de amostragem de 12 determinações por hora.

Richter *et al.*,^[74] desenvolveram uma metodologia simples de baixo custo usando a análise de injeção em fluxo com detecção amperométrica para a determinação simultânea de aspirina e ácido ascórbico em comprimidos efervescentes. Foi obtida uma linearidade no intervalo de concentração de AAS de $1,6 \times 10^{-5}$ a $0,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $0,164 \mu\text{mol L}^{-1}$

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico de pureza e todas as soluções foram preparadas com água deionizada. A vidraria laboratorial utilizada foi previamente mantida por um período de 24h sob uma solução a 10% (v/v) de ácido nítrico. Após esse período a vidraria foi lavada com água destilada e com água deionizada para as análises.

A solução estoque de NaOH (IMPEX) $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo 4,0g dessa base em 100mL de água deionizada.

A solução transportadora de ácido nítrico [HNO_3] (ISO FAR) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ foi preparada pela diluição de 6,42 mL desse ácido com água deionizada, num balão de 1,0L.

A solução de Fe^{+3} (reagente Trinder) foi preparada dissolvendo 1,0g de nitrato férrico [$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$] (ISO FAR) em um balão volumétrico de 100 mL e completando o volume com água deionizada.

A solução estoque de ácido acetilsalicílico (SYNTH) $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo 0,25g desse ácido em 10 mL de solução NaOH $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$, promovendo o aquecimento por 10min em chapa de aquecimento, para obter uma completa hidrólise do AAS. Em seguida transferindo o conteúdo para um balão de 250 mL e aferindo-se com água deionizada. A partir dessa solução, com diluições adequadas, foram preparadas as demais soluções de AAS empregadas neste trabalho.

4.2 Preparo das amostras

Cinco diferentes amostras de comprimidos contendo 500mg de ácido acetilsalicílico, descrita pelo fabricante, foram analisadas. Para cada amostra foram tomados 20 comprimidos, que foram pesados e pulverizados. Uma quantidade adequada de cada amostra foi dissolvida em 10 mL de NaOH $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ promovendo o aquecimento por 10min em chapa de aquecimento, para uma melhor hidrólise do AAS. Eventuais excipientes insolúveis contidos nas amostras foram removidos por filtração simples. Em seguida transferindo o conteúdo para um balão de 100 mL e aferindo-se com água deionizada.

4.3 Equipamentos

Para o sistema proposto, foi utilizado uma bomba peristáltica Ismatec IPC-8, com tubos de propulsão de Tygon para o transporte das soluções, três válvulas solenoides de três vias (NRResearch, West Caldwell, 161T031), tubos de polietileno (0,8 mm d.i), confluência de acrílico de quatro vias, para entrada e saída de amostra, reagente e solução transportadora.

Para aquisição e controle de dados, um microcomputador Pentium II foi acoplado às válvulas solenoides via entrada LPT 1 e ao espectrofotômetro (Femto, modelo 700 plus) via entrada digital RS 232 C. O programa para controle do módulo de análise e aquisição de dados foi desenvolvido em linguagem Quick Basic 4.5.

4.4 Metodologia

Procedimento analítico para a determinação de ácido acetilsalicílico em comprimidos baseou-se na reação de Trinder, ^[21] onde a reação mostrada na Figura 6 entre os íons salicilatos, (formado após hidrólise do ácido acetilsalicílico em meio alcalino) com os íons Fe^{3+} , resulta na formação de um complexo de coloração violeta [Salicilato- Fe^{III}] monitorado espectrofotometricamente com máximo de absorção em torno de 525nm. Acredita-se que a coloração desenvolvida se deva a formação de um íon complexo por interação simultânea entre os grupamentos carboxila e hidroxila do ácido salicílico e o Fe^{3+} . ^[75]

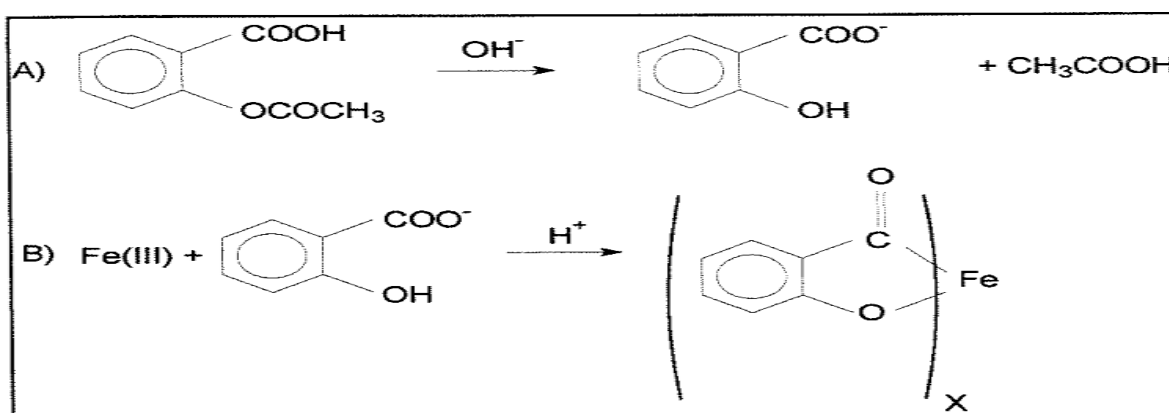


Figura 6. Reação de hidrólise do AAS (A) seguido da complexação do ânion salicilato com ferro (III) (B)

4.5 Módulo de análise

O módulo de análise representado na Figura 6, foi baseado num Sistema de Análise em Fluxo por Multicomutação e empregava válvulas de estrangulamento. A válvula V_1 era do tipo normalmente aberta, assim a solução transportadora (Carregador) fluía continuamente em direção ao detector. Quando o software de controle entra em operação, as válvulas são ligadas e desligadas sequencialmente, conforme indicado no diagrama de tempos mostrado na Figura 7.

Inicialmente, todas as válvulas estão desligadas e a solução transportadora flui continuamente pelo percurso analítico em direção ao detector através da válvula V_1 , formando a linha de base. Durante a etapa de amostragem, a válvula V_2 (amostra) e V_3 (solução do reagente) eram acionadas sequencialmente várias vezes conforme o numero de ciclos de amostragem programado, inserindo alíquotas de amostra e reagente no percurso analítico através da confluência e, ao se encontrarem, reagem com auxílio da bobina helicoidal (reator), onde é formado um complexo de coloração violeta monitorado em 525nm. Na sequência essas válvulas eram desligadas e a solução transportadora fluía novamente através de V_1 , e deslocava a zona da amostra para o detector, resultando num sinal analítico proporcional à concentração de AAS na amostra.

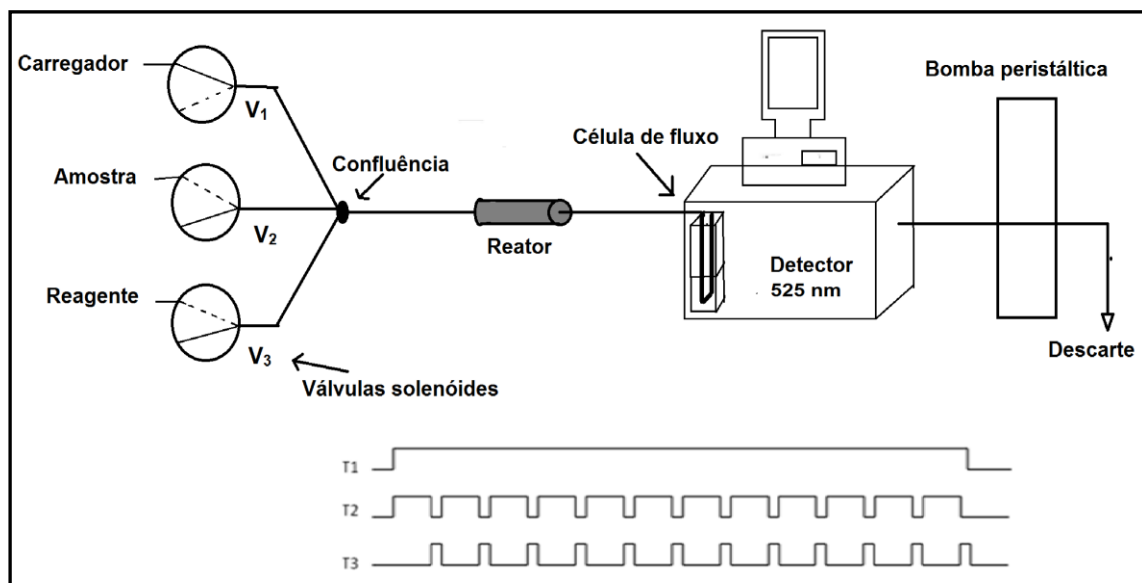


Figura 7. Módulo de análise do sistema em fluxo proposto. T_1 , T_2 e T_3 Intervalos de tempo de acionamento das válvulas V_1 , V_2 e V_3 respectivamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dimensionamento do Sistema em fluxo

Todos os processos de otimização do sistema foram realizados empregando-se o módulo de análise apresentado na Figura 6 com soluções padrão de AAS nas concentrações 25, 50, 75 e 100 mg.L⁻¹.

A otimização do sistema foi baseada no método univariado, que consiste em variar um dos parâmetros em estudo e manter os demais constantes. A resposta considerada aceitável para o parâmetro em estudo é aquela que garante um maior ganho e maior discriminação de sinal. Os parâmetros do módulo de análise inicialmente estudados foram: (i) Solução transportadora, (ii) Vazão, (iii) comprimento da bobina de reação [reator], (iv) número de ciclos, (v) concentração do reagente Trinder, (vi) tempo de acionamento das válvulas solenóides.

5.1.1 Efeito da Solução transportadora

Inicialmente os testes foram feitos usando somente água deionizada como solução transportadora. Pôde-se observar que decorrido certo tempo de análise uma cor de tonalidade amarela era adquirida pelo reator e pela cela de fluxo. Este efeito foi associado a uma possível hidrólise do ferro e adesão nas paredes do reator e da cela de fluxo, ^[76] que teria como consequência desfavorável o aumento de ruídos, uma elevação da leitura da linha de base e a necessidade de periodicamente fazer a limpeza do percurso analítico bombeando uma solução ácida. Este efeito foi solucionado substituindo a solução transportadora por uma solução de HNO₃ 0,1 mol.L⁻¹. ^[77]

Na Figura 8 são mostradas os resultados obtidos, cuja apresentação foi em ΔA (leitura da absorbância da amostra menos a leitura da absorbância do branco) em função das concentrações para as curvas analíticas empregando água e a solução de HNO₃ como solução transportadora. Podemos observar que as duas curvas são praticamente paralelas, indicando que não há diferença significativa de sensibilidade.

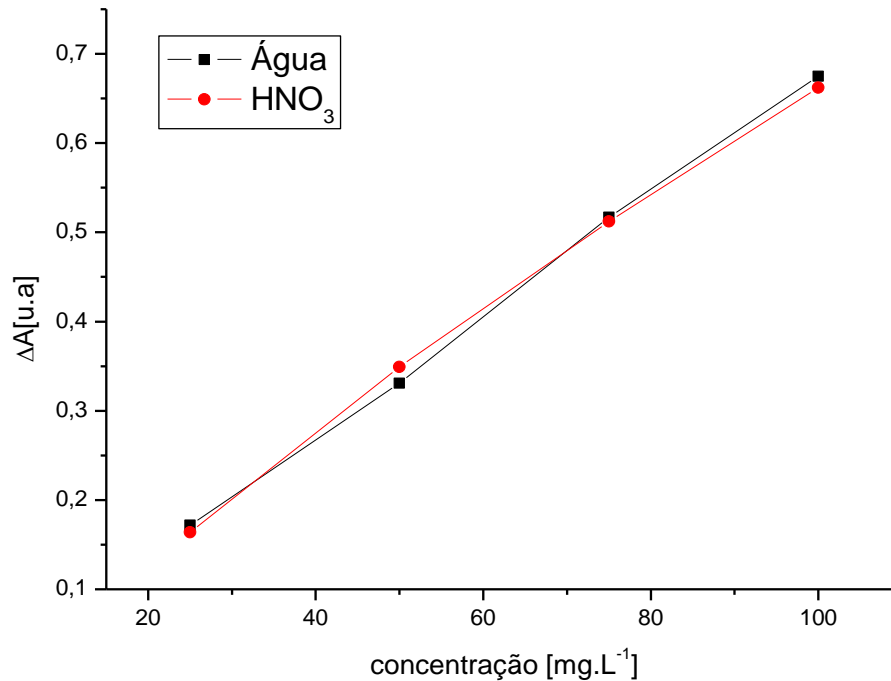


Figura 8. Efeito da solução transportadora sobre o sinal analítico na faixa de concentração de AAS de 25 a 100 mg.L⁻¹.

Na Tabela 1 são apresentadas características das curvas analíticas obtidas empregando a água e a solução de HNO₃ como solução transportadora.

Tabela 1- Características das curvas analíticas utilizando água e HNO₃ como transportador

Solução transportadora	Equação linear	R ^a	LD ^b (mg.L ⁻¹)
Água	$Y = 0,005 + 0,00664 * X$	0,999	0,94
HNO ₃ 0,1 mol. L ⁻¹	$Y = 0,006 + 0,00663 * X$	0,999	0,26

^aR = Coeficiente de correlação linear,

^bLD= Limite de detecção

Com o objetivo de verificar a ocorrência da deriva da linha de base, devido a fatores já mencionados anteriormente, foram realizadas 80 medidas consecutivas com uma solução de referência de 50mg. L⁻¹ de AAS utilizando água e HNO₃ 0,1 mol.L⁻¹ como solução transportadora.

A Figura 9A mostra que decorrido certo tempo de análise ocorre deriva significativa da linha de base utilizando a água como solução transportadora, podendo este fato está associado à hidrólise do ferro e sua deposição nas paredes dos reatores e na cela de fluxo. Este efeito não é perceptível quando usamos uma solução de HNO_3 com o mesmo propósito, (Figura 9B)

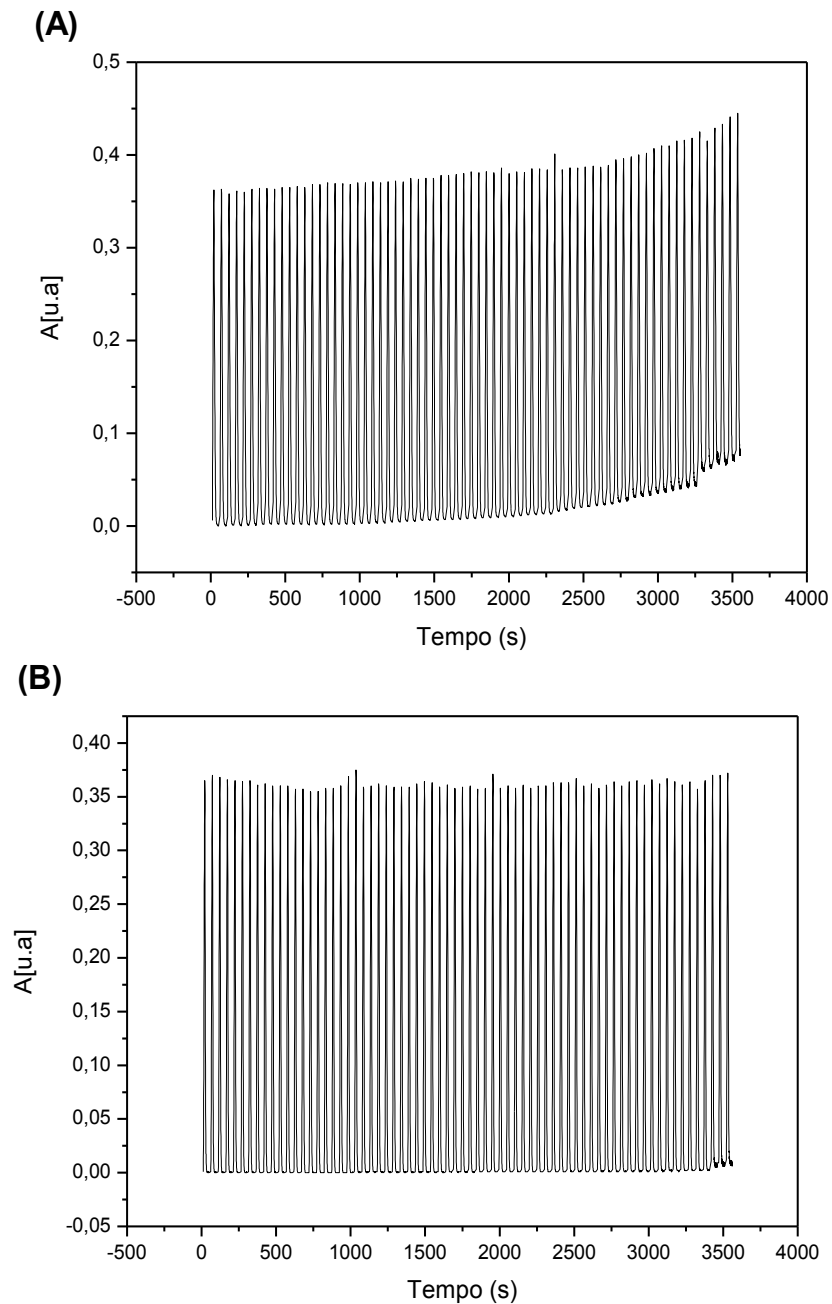


Figura 9. Efeito da solução transportadora (A) H_2O e (B) $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ HNO}_3$ sobre a estabilidade da linha de base em 80 medidas consecutivas. Sinais analíticos obtidos com solução de referência 50mg.L^{-1} de AAS.

5.1.2 Efeito da concentração de ácido nítrico (HNO_3)

O efeito da concentração da solução transportadora de ácido nítrico sobre o sinal analítico foi avaliado entre 0,05 e 0,4 mol. L⁻¹, sendo os resultados apresentados na Figura 10.

De acordo com os resultados, observa-se que não houve variação significativa do sinal analítico no intervalo avaliado, e a concentração definida como ótima foi a de 0,1 mol.L⁻¹ devido a maior magnitude do sinal.

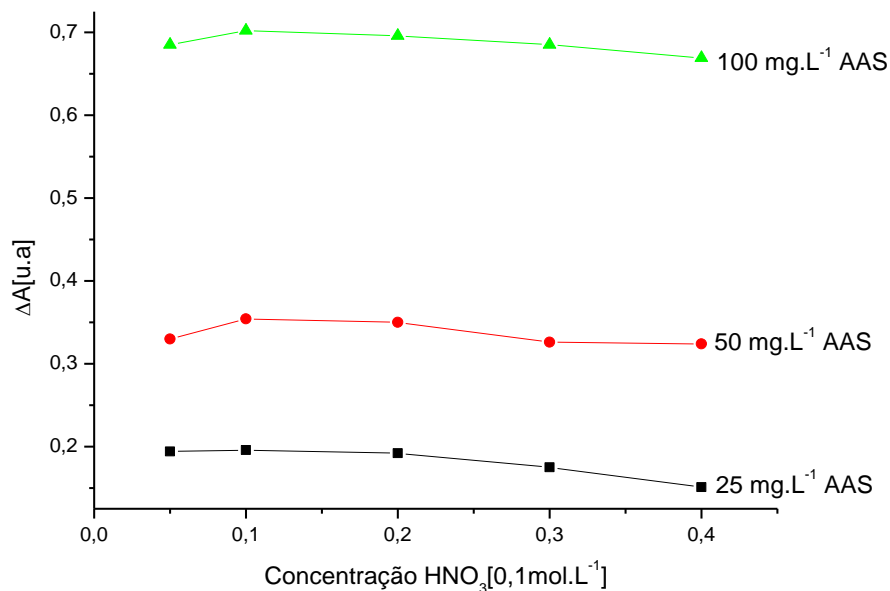


Figura 10. Efeito da concentração do HNO_3 sobre o sinal analítico na faixa de concentração de AAS de 25 a 100 mg.L⁻¹.

5.1.3 Efeito da Vazão

A vazão é um fator de elevada importância para o desenvolvimento das reações, pois permite um maior ou menor tempo de interação entre as substâncias e também o grau de maior ou menor dispersão. Este parâmetro foi otimizado através da variação da rotação nominal da bomba peristáltica, e foi avaliada no intervalo de 2,5 e 4,0 mL.min⁻¹.

Os resultados apresentados na Figura 11 indicam um aumento do sinal analítico entre a faixa estudada. Apesar de a vazão de $4\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ apresentar maior magnitude de sinal, essa não foi definida como ótima para o método por apresentar sinais mal resolvidos quando comparado com os outros experimentos, e instabilidade da linha de base, que pode estar associada ao volume da zona de amostra ser superior ao reator. Sendo assim, a vazão escolhida como ótima para o sistema proposto foi a de $3,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ uma vez que esta vazão proporcionou boa precisão, exatidão e estabilidade da linha base.

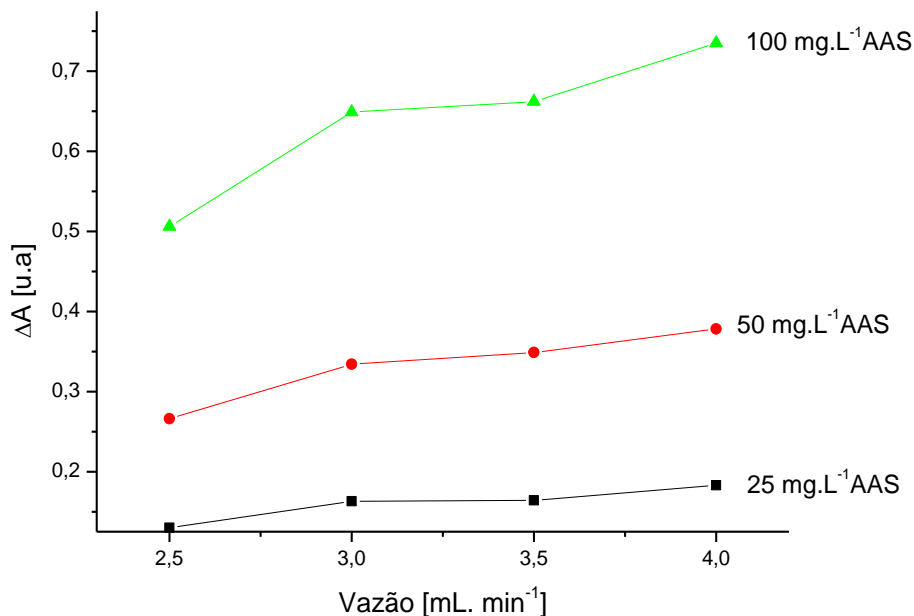


Figura 11. Efeito da vazão sobre o sinal analítico na faixa de concentração de AAS de 25 a $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

5.1.4 Efeito do reator

Chama-se de percurso analítico a distância do ponto de inserção das soluções e o detector. Nele ocorrem as reações químicas necessárias à detecção do analito, as quais se iniciam no momento em que as soluções do carregador, amostra e reagentes entram em contato, a partir da confluência, daí a denominação de reator. Considerando que o comprimento do reator está associado às vazões da solução transportadora, amostra e

reagentes, e que afeta tanto o tempo de residência, como a dispersão da amostra, foi realizado um estudo do efeito deste parâmetro no sistema. Partindo das condições ótimas já adquiridas, este parâmetro foi avaliado para os tamanhos de 60, 80, 100 e 120 cm. Sendo os resultados empregados na Figura 12.

Os resultados mostram que entre os reatores de 60 a 80 cm não houve uma variação significativa do sinal analítico, e que há um decréscimo do mesmo a partir de 80 cm. Este fato pode estar associado ao efeito de dispersão, pois quanto maior o reator, maior é a dispersão da amostra. Deste modo, foi escolhido o reator de 80 cm de comprimento com volume interno de 400 μ L para a continuação do trabalho. Apesar de o reator de 60 cm apresentar maior magnitude de sinal, o mesmo não apresentou estabilidade da linha de base devido ao volume da zona da amostra (400 μ L) ser superior ao do reator (300 μ L).

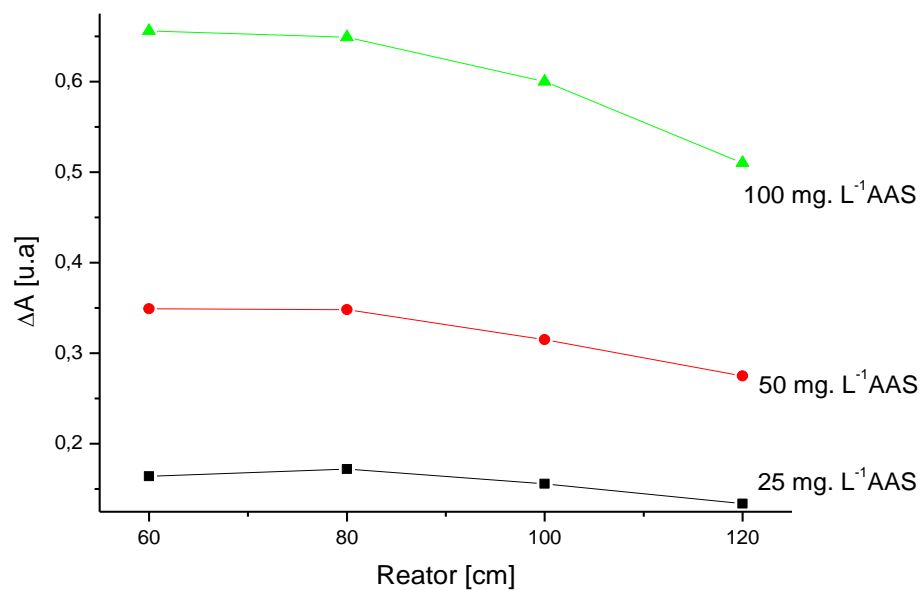


Figura 12. Efeito do reator sobre o sinal analítico na faixa de concentração de AAS de 25 a 100 mg.L⁻¹.

5.1.5 Efeito do numero de ciclos

O numero de ciclos define o volume da zona de amostra, além de ser determinante para o processo de mistura entre reagentes. Então, já definidos solução transportadora, vazão e reator ótimos, fez-se o estudo desse parâmetro utilizando 8, 10, 12 e 14 ciclos de amostragem.

De acordo com o gráfico da Figura 13, quanto ao número de ciclos, houve um aumento do sinal na faixa de 8 a 12 ciclos, devido à menor dispersão da zona de amostra, e mantendo-se praticamente constante para valores maiores. Sendo assim, definiu-se 12 ciclos como condição ótima, pois apresentou uma boa discriminação analítica, sem perda de repetibilidade ao sistema proposto.

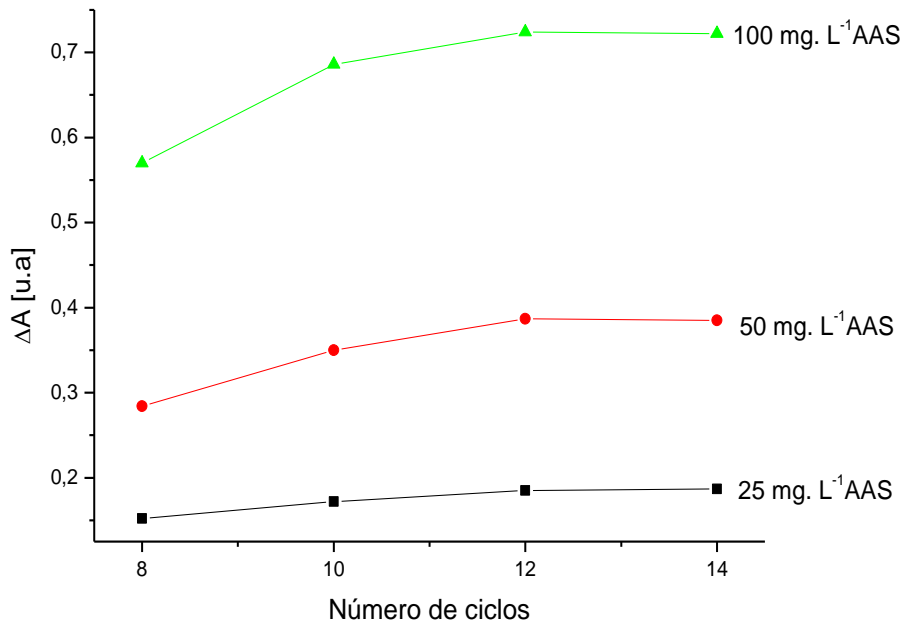


Figura 13. Efeito do numero de ciclos sobre o sinal analítico na faixa de concentração de AAS de 25 a 100 mg.L⁻¹.

5.1.6 Efeito da concentração do reagente Trinder

Uma vez que o Teste Trinder se baseia na formação de um complexo de cor púrpura do AAS com íons ferro (III), provenientes do reagente $[Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O]$. Faz-se necessário o estudo desse parâmetro sobre o sinal analítico.

Os testes iniciais eram feitos com uma concentração de 40g/L, baseado em um artigo em que o AAS era medido com um fotômetro de baixo custo. [78]

Partindo das condições ótimas já adquiridas, estudou-se o efeito da concentração do reagente Trinder, no intervalo de 10 a 50 g. L⁻¹. Observou-se a partir da Figura 14 que o sinal analítico não variou de forma significativa; desta forma o valor de concentração 10g. L⁻¹ foi selecionado afim de minimizar o consumo de reagente.

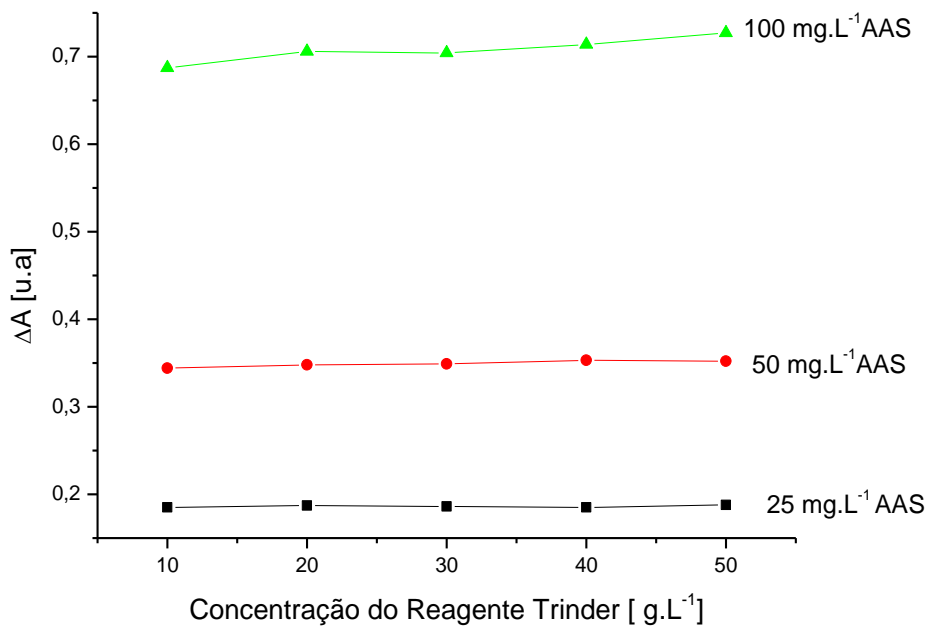


Figura 14. Efeito da concentração do reagente trinder sobre o sinal analítico na faixa de concentração de AAS de 25 a 100 mg.L⁻¹.

5.1.7 Estudo do Tempo de acionamento das válvulas solenóides

Em um sistema de análise em fluxo por multicomutação, os volumes de amostra e reagente adicionados no percurso analítico são feitos pelo acionamento das válvulas solenóides. Por isso faz-se necessário descobrir a relação do tempo de acionamento com o volume adicionado e seu efeito sobre o sinal analítico.

Primeiramente, para o estudo desse parâmetro, o tempo de acionamento da válvula (V₃) de inserção do reagente sobre o sinal analítico foi variado entre 0,1, e 0,5s, o que corresponde a um volume de 5,8 a 29,1 μL mantendo constante o tempo de acionamento da

válvula (V_2) de inserção da amostra em 0,5 s (29,1 μL). Estes experimentos foram feitos usando uma solução de AAS com concentração de 50 mg L^{-1} .

Os resultados na Figura 15 mostram um decréscimo do sinal analítico, devido à diluição da amostra, à medida que foi incrementando o tempo de inserção do reagente. Com o propósito de obter melhor resposta analítica e minimizar o consumo de reagente, o tempo de acionamento definido para a válvula V_3 foi fixado em 0,1 s (5,8 μL).

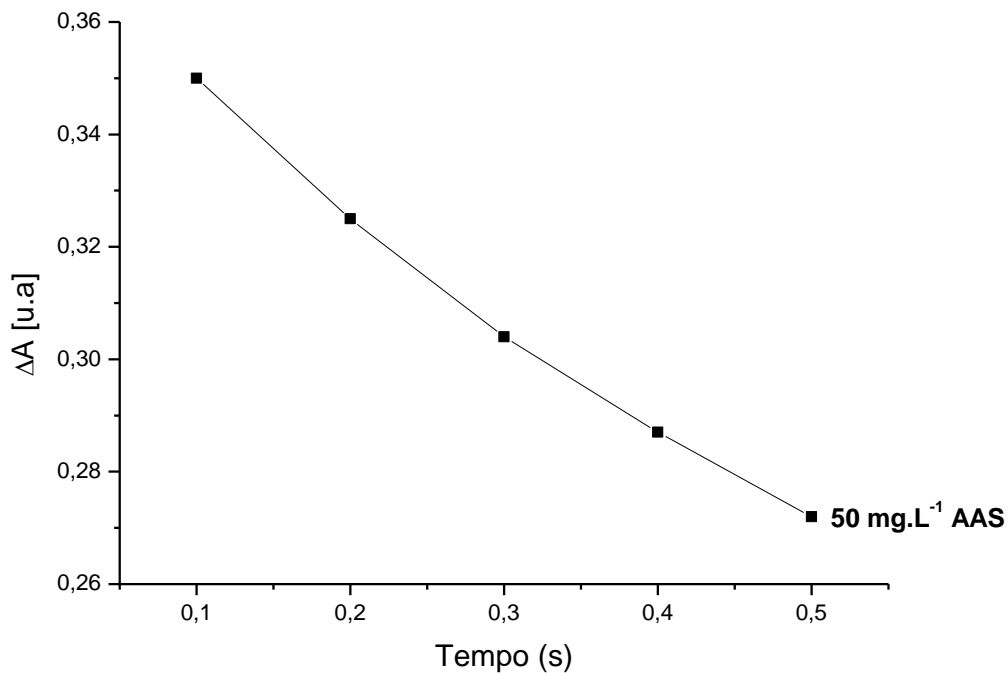


Figura 15. Efeito do tempo de acionamento da válvula (V_3) de inserção do reagente de Trinder sobre o sinal analítico. Solução de referência de AAS 50 mg.L^{-1} .

Após estabelecer o tempo de acionamento da válvula v_3 , partiu-se para a verificação do tempo de acionamento da válvula (V_2) de inserção da amostra sobre o sinal analítico. Nesse estudo variou-se os tempos entre 0,1 e 0,7s, o que corresponde a um volume de 5,8 a 40,8 μL . Estes experimentos foram feitos usando uma solução de AAS com concentração de 50 mg L^{-1} .

A Figura 16 indica que acima de 0,5 s (29,1 μL) há um pequeno aumento do sinal analítico com tendência a estabilização. Em vista desse resultado, este tempo foi escolhido para dar continuidade ao trabalho uma vez que apresentou estabilidade na linha de base.

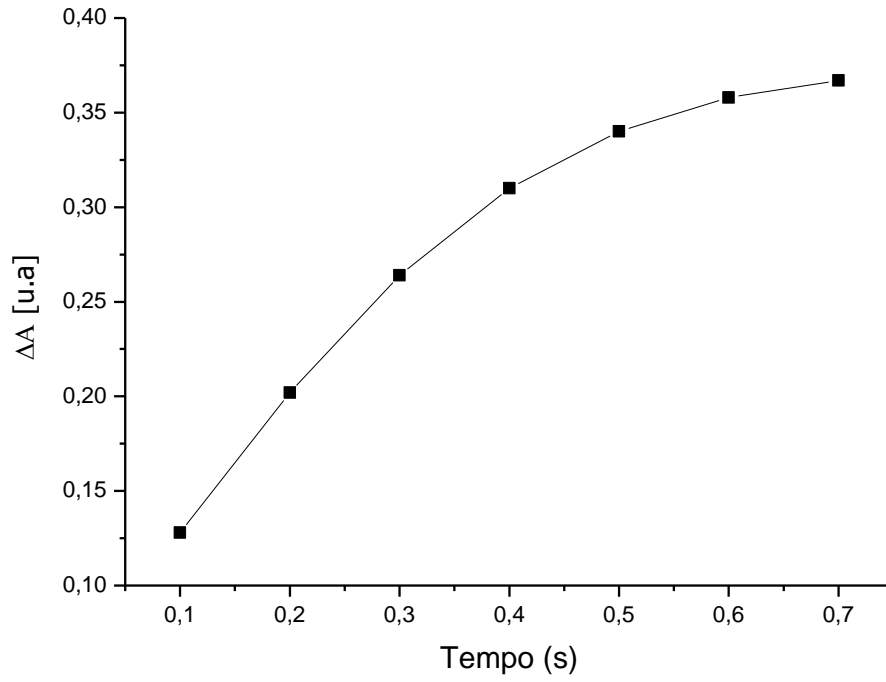


Figura 16. Efeito do tempo de acionamento da válvula (V₂) de inserção da amostra sobre o sinal analítico. Solução de referência de AAS 50 mg.L⁻¹.

Assim, quanto à otimização do sistema em fluxo proposto, os resultados obtidos de um modo geral são apresentados na Tabela 2. Esse estudo permitiu realizar a determinação de AAS em amostras farmacêuticas.

Tabela 2. Condições otimizadas e características analíticas do método proposto para determinação do AAS.

Parâmetros	Valor
Vazão (mL.min ⁻¹)	3,5
Comprimento do Reator (cm)	80
Número de ciclos	12
Tempo de acionamento de V ₂ (s)	0,5
Tempo de acionamento de V ₃ (s)	0,1
Concentração do reagente Trinder (g. L ⁻¹)	10
Volume de resíduos (mL)	2,7
Limite de detecção (mg.L ⁻¹)	0,57
Limite de quantificação (mg.L ⁻¹)	1,89
Frequência analítica (n/h) *	72
Coeficiente de variação (%)	0,91

* Numero de determinações por hora

5.2 Estudo da repetibilidade

Para confirmação analítica do sistema em fluxo proposto, foi realizado o estudo de repetibilidade. Os registros de sinais mostrados na Figura 17 são para 12 determinações sucessivas ($n=12$) de AAS com concentrações de 25 mg.L^{-1} , empregando os parâmetros otimizados, listados na Tabela 2

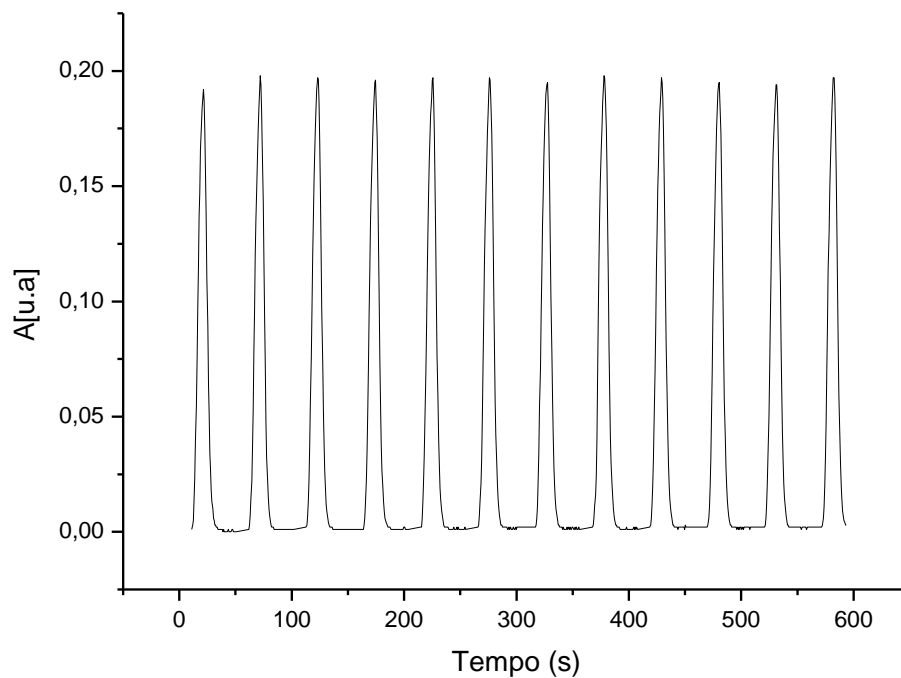


Figura 17. Sinais transientes relativos à solução de referência de AAS 25 mg.L^{-1} para 12 determinações sucessivas.

Os resultados mostraram que este método apresentou boa repetibilidade, com um desvio padrão relativo igual a 0,91% e frequência analítica de 72 determinações por hora. Estes dados indicam a boa performance do sistema como um todo.

5.3 Características Analíticas Obtidas

Após a otimização das variáveis envolvidas no sistema de análises em fluxo, as características analíticas foram estimadas. Na Figura 18 é mostrada uma curva analítica obtida em triplicata, descrita pela equação: $Y = 0,009 + 0,00611X$. O coeficiente de correlação $R = 0,999$ indica uma ótima resposta linear entre 0 a 100 mg.L^{-1} de AAS, portanto, o procedimento proposto obedece a Lei de Beer nesta faixa de concentração. Nestas condições, os limites de detecção (LD), obtido pela equação 2, e quantificação (LQ), obtido pela equação 3, foram estimados em $0,57 \text{ mg.L}^{-1}$ e $1,89 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, ao nível de confiança de 99,7%, para $n = 5$.

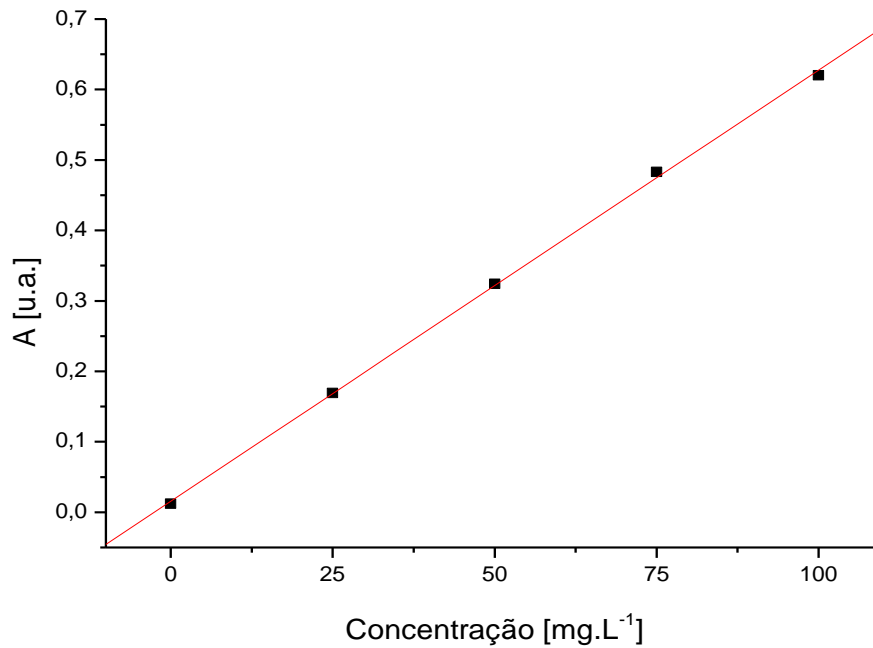


Figura 18. Curva analítica para determinação de AAS em comprimidos.

$$LD = 3.S / b \quad \text{Equação 2}$$

$$LQ = 10.S / b \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

S = Desvio padrão do sinal do branco

b = coeficiente angular

5.4. Análise de Formulações Farmacêuticas

Após as análises das soluções padrões e obtenção da curva analítica, a metodologia automática desenvolvida foi aplicada à determinação de AAS em formulações farmacêuticas e os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o método volumétrico recomendado pela Farmacopéia Brasileira. ^[4]

Cinco amostras de formulações farmacêuticas, designadas A₁, A₂, A₃, A₄ e A₅ foram analisadas no sistema em fluxo otimizado, após diluição manual de 10 vezes. Os resultados estão apresentados na Tabela 3. Observa-se que os resultados obtidos empregando-se o método proposto estão em concordância com os resultados obtidos empregando-se o método de referência.

Aplicando o teste t pareado entre os dados com 95% de confiança, observa-se que não houve diferença significativa para os dados em todas as amostras analisadas, uma vez que o valor de t calculado foi de (0,91) e o valor tabelado (2,78). Tendo em vista que o valor encontrado é menor do que o tabelado, o procedimento proposto possui boa exatidão e apresentou concordância com o método de referência.

Tabela 3. Resultados com os respectivos desvios padrão da determinação de AAS pelo método proposto e pelo método de referência.

Amostra	Teor de AAS (mg / comprimido)		
	Bula	*Método proposto	Método de referência ^[4]
A1	500	504 ± 4,3	499 ± 5,2
A2	500	523 ± 9,4	493 ± 6,7
A3	500	492 ± 2,8	498 ± 9,4
A4	500	540 ± 4,9	496 ± 7,9
A5	500	472 ± 1,4	492 ± 9,7

*Resultados com valores multiplicados pelo fator de diluição

5.5 Teste De Recuperação

O teste de recuperação foi realizado com o objetivo de obter informações sobre possíveis interferências geradas pela matriz dessas amostras sobre a resposta obtida. Para este estudo foram feitos experimentos em triplicata, por meio da adição de alíquotas de soluções padrão de AAS às soluções contendo amostras diluídas das formulações. A Tabela 4 apresenta os resultados dos percentuais de recuperação obtidos.

Tabela 4. Resultados do teste de recuperação na determinação de AAS nas amostras farmacêuticas pelo método proposto.

Amostra	AAS (mg. L ⁻¹)		Recuperação (%)
	Adicionado	Recuperado	
A1	75,4 ± 0,4	73,0 ± 1,5	97
A2	77,3 ± 0,9	76,0 ± 0,8	98
A3	74,3 ± 0,2	73,1 ± 0,8	98
A4	79,0 ± 0,4	78,3 ± 0,8	99
A5	72,2 ± 0,1	71,5 ± 0,5	99

As recuperações variaram entre 97 % a 99 %. Estes valores obtidos indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação do AAS pelo procedimento analítico proposto.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de um procedimento em sistema de análise em fluxo empregando a multicomutação e detecção espectrofotométrica para a determinação de ácido acetilsalicílico em comprimidos, baseado na reação de Trinder. A metodologia apresentou vantagens que os procedimentos empregando multicomutação apresentam com relação à versatilidade, baixo consumo de reagentes e menor geração de resíduos.

Em relação ao módulo de análise desenvolvido, este apresentou uma estrutura simples, com um único canal de bombeamento, assim como de fácil implementação e boa estabilidade, além de permitir a execução de todas as etapas através de programa computacional. A reação de Trinder para determinação de AAS foi utilizada por ser de fácil execução e rápida resposta analítica.

O sistema otimizado permitiu a determinação de AAS de maneira automatizada com características que podem ser consideradas favoráveis: baixo custo operacional, alta frequência analítica (72 determinações por hora), emprego de reagentes de baixa toxicidade (NaOH), geração de pequena quantidade de resíduos por análise (~ 2,7 mL por réplica), assim como desempenho analítico satisfatório: limite de detecção de 0,57 mg.L⁻¹, limite de quantificação de 1,87 mg.L⁻¹ e coeficiente de variância de 0,91%.

As análises das amostras farmacêuticas contendo o AAS, foram concordantes com o procedimento de referência, não apresentando diferença significativa entre os dois métodos estimado com 99,7 % de confiança.

Assim de acordo com esses resultados, o método desenvolvido neste trabalho demonstra ser viável para a aplicação em amostras contendo AAS, sobretudo em análises de rotina, e também como uma alternativa vantajosa comparada com a metodologia de referência, promovida pelo baixo custo em relação a sua implementação e ao consumo de reagentes.

REFERÊNCIAS

1. SHRIVER, D. A.; DOVE, P. A.; WHITE, C. B.; SANDOR, A.; ROSENTHALE, M. E.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1977**,42,75.
2. SARTORI, E. J. R. Determinação voltamétrica de analitos de interesse farmacêutico utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
3. CÓRDOVA, C. M. I. Desenvolvimento de sistemas de análises em fluxo por multicomutação para determinação de poluentes ambientais. Universidade de São Paulo/USP, São Paulo, 2008. (Tese de Doutorado).
4. Brasil. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.904p., 2v/il
5. NRC, *Dietary reference intakes: for vitimin C, vitimin E, selenium and caroteoids.* 2000, Washington, D.C.: NATIONAL Academy Press.
6. DAMMAM, H.G.; SALEKI, M.; TORZ, M.; SCHULZ, H.; KRUPP, S.; SCHURER, M.; TIMM, J.; GESSNER, U.; *Effects of buffered and plain acetylsalicylic acid formultios with and without ascorbic acido n gastric mucosa in healthy subjects.* *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2004, **19**(3): p. 367.
7. CANDELARIO-JALIL, E.; AKUNDI, R.; BHATIA, H; LIEB, K.; APPEL, K; MUNOZ, E; HULL, M; FIEBICH, B., *ascorbic acid enchances the inhibitory effect of aspirin on neuronal cyclooxygenase – 2- mediated prostaglandin E-2 producion.* *Journal of Neuroimmunology*, 2006, 174(1-2): p. 39.
8. SARTORI, E.; ROCHA, R. C.; FATIBELO, O. *Square-Wave Voltamétric Determination of Acetylsalicylic Acid im Pharmaceutical Formulatiois using a Boro-Doped Diamond Electrode Without the Need of Previous Alkaline Hydrolysis Step.* *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2009, **20**(2): p. 360.
9. Rang HP, Dale MM, Pitter JM, Moore PK. *Farmacologia. Eicosanóides.* 5 ed. Elsevier 2003; 15: 263-66.

10. GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
11. GASKEL H. Is there na association between low dose aspirin and anemia (without overt bleeding)?: narrative review. BMC Geruatrucs v. 10, n. 71, p. 1-7, 2010. Disponível em <[httpWWW.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2956719/pdf/1471-2318-10-71.pdf](http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2956719/pdf/1471-2318-10-71.pdf)>. Acessado em 25 fev. 2014.
12. ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária / Ministério da Saúde. Setor Regulado. Registros de medicamentos: Aspirina. 2011. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM%5B25345-1-0%5D.PDF>> Acesso em 25 de fevereiro de 2014.
13. Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Farmacêuticos. Formulário Terapêutico Nacional: Rename 2008. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.
14. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Formulário Terapêutico Nacional 2008: Rename 2006. 1ª Ed. Brasília, DF, 2008; p. 100-102.
15. Aspirin. Wikipedia. 2006. Wikimedia Foundation. 20 Maio 2006 <<http://en.wikipedia.org/wiki/Aspirin>>.
16. KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. Dicionário Terapêutico Guanabara. 14ª ed.,Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2007.
17. Disponível em: <<http://www.s bq.org.br/PN-NET/causo5.htm>>, acessado em 27/02/2014.
18. Gilman, A. G.; Hardman, J. G.; Limbird, L. E. Goodman & Gilman As *BasesFarmacológicas da Terapêutica*. 10ª ed., McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 2003.
19. Agosta, W. C. Medicines and Drugs from Plants. *J. Chem. Ed.* n. 74, p. 857-860, 1997.
20. Disponível em: <[www.dqb.fc.ul.pt/cadeiras/qgb/Microsoft%20Word%20-%20QGB aspirina .pdf](http://www.dqb.fc.ul.pt/cadeiras/qgb/Microsoft%20Word%20-%20QGB%20aspirina.pdf)>, acessado em 27/02/2014.
21. TRINDER, P. "Rapid determination of salicylate in biological fluids". *Biochem. J.* 57: 301, 1954.

22. SENNA, M.M; POPPI, R.J. PLS N-forma aplicado a determinação espectrofotométrica simultânea de ácido acetilsalicílico, paracetamol e cafeína. **Revista de produtos farmacêuticos e análise biomédica**. 34: 27, 2004.
23. COPOLOVICI, L; BUNGAU, S; DRAGAN, F. Determinação de acetilsalicílico em drogas usando um método cinético. **Revista de Chimie**,56: 374, 2005.
24. AKAY,C.; DEGIM, I. T.; SAYAL, A. Rápida e simultânea determinação de ácido acetilsalicílico, paracetamol, e a sua degradação e os produtos de impurezas tóxicas por HPLC em formas de dosagem farmacêuticas. **Revista Turkish de Ciências Médicas**, 38: 167, 2008.
25. GHULAM, M.; ALI K. S.; ARHAM, S. Desenvolvimento de um método espectrofotométrico em UV para determinação simultânea de aspirina e paracetamol em comprimidos. **Pesquisa Científica e Ensaio**s, 6: 417, 2011.
26. BOCHENSKA, P.; ALINA PYKA, A. Determinação de ácido acetilsalicílico em drogas farmacêuticas por TLC densitométrica com detecção por UV. *Jornal da Cromatografia Líquida*, 35: 1346, 2012.
27. MIRANDA, C. E. S. Desenvolvimento de um sistema automatizado de análise em fluxo baseado em multicomutação para pré-concentração de Cd, Ni e Pb em resina de troca iônica com determinação por ICP-AES. Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP, São Paulo, 1998. (Tese de Doutorado).
28. VAN DER LINDEN, W. E. *Pure Appl. Chem.* 66 (1994) 2493
29. ZAGATTO, E. A. G.; VAN STADEN, J. F.; MANIASSO, N.; STEFAN, R. I.; MARSHALL, G. .D. *Pure Appl.Chem.* 74 (2002) 585
30. SKEGGS,L. T., *Clin. Chem.* 46 (2000) 1425.
31. LINDEN, W.E.V., Classification and Definition of Analytical Methods Based on Flowing Media, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, **66: 2493, 1994**.
32. ZAGATTO, E.A.G.; STANDEN, J.F.V.; MINIASSO, N.; STEFAN, R.I.; MARSHALL, G. D. Information essential for characterizing a flow-based analytical system, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, **74: 585, 2002**.

33. CERDÁ, V. Introducción a los Métodos de Análisis en Flujo, SCIWARE, Palma de Maiorca, 2006.
34. REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, E.A.M. Análise química por injeção em fluxo contínuo. *Quimica Nova*, v. 12, p. 82-91, 1989.
35. ROCHA, F. R. P., MARTELLI, P. B., REIS, B. F., 2000, "Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo", *Química Nova*, v. 23, n. 1, pp. 119-125.
36. KARLBERG, B.; PACEY, G. E. Flow injection analysis. A practical guide. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 1989. 372 p.
37. MIRÓ, M.; CERDÁ, V.; ESTELA, J. M. Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications. *Trends in Analytical Chemistry*, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 199-210, 2002.
38. OLIVEIRA, H. M. et al. Multisyringe flow injection system for solid-phase extraction coupled to liquid chromatography using monolithic column for screening of phenolic pollutants. *Talanta*, London, v. 77, n. 4, p. 1466-1472, 2009.
39. VIEIRA, J. A.; RAIMUNDO, I. M.; REIS, B. F. Turbidimetric determination of sulphate employing gravity flow-based systems. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 438, n. 1-2, p. 75-81, 2001.
40. ANDRADE, J. C.; FERREIRA, M.; BACCAN, N. Sistema gravitacional de alimentação de líquidos com vazão constante para uso em análise por injeção em fluxo. *Química Nova*, São Paulo, v. 9, p. 123-128, 1986.
41. ROCHA, F. R.; INFANTE, C. M. C.; MELCHERT, W. R. A multi-purpose Flow System Based on Multi-commutation. *Spectroscopy Letters*, New York, v. 39, n. 6, p. 651-668, 2006.
42. RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 78, n. 1, p. 145-157, 1975.

43. BERGAMIN FILHO, H. et al. Solvent extraction in continuous flow injection analysis: Determination of molybdenum in plant material. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 9-16, 1978.
44. GINÉ, M. F. et al. Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 114, p. 191-197, 1980.
45. PASQUINI, C.; OLIVEIRA, W.A. Monosegmented System for Continuous Flow Analysis. Spectrophotometric Determination of Chromium(VI), Ammonia and Phosphorus. *Analytical Chemistry*, **57**: 2575, 1985.
46. KOLEV, S. D.; MCKELVIE, I. D (Editores), *Comprehensive Analytical Chemistry. Advances in Flow Injection analysis and related techniques*. Amsterdam: Elsevier. 2008.
47. J. Ruzicka, G. D. Marshall, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329
48. J. Ruzicka, *Anal. Chim. Acta* 261 (1992) 3
49. R. E. Taljaard, J. F. van Staden, *Lab. Robotics. Automat.* 10 (1998) 325
50. SOLICH, P.; POLASEK, M. ; KLIMUNDOVA J. ; RUZICKA, J. Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**. 22 (2003) 116-126.
51. CÓRDOVA, C. M. I. Desenvolvimento de sistemas de análises em fluxo por multicomutação para determinação de poluentes ambientais. Universidade de São Paulo/USP, São Paulo, 2008. (Tese de Doutorado).
52. REIS, B. F; GINÉ, M. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron plant digest, *Anal. Chim. Acta*, 293 (1994) 129.
53. ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F.; OLIVEIRA, C. C.; SARTINI, R. P.; ARRUDA, M. A. *Z. Anal. Chim. Acta* 400 (1999) 249
54. FERES, M. A.; FORTES, P. R.; ZAGATTO, E. A. G.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C. *Anal. Chim. Acta* 618 (2008) 1
55. ICARDO, M. C.; MATEO, J. V. G.; CALATAYUD, J. M. *Trends Anal. Chem.* 21

56. DA SILVA, J. A. F.; LAGO, C. L. Módulo eletrônico de controle para válvulas solenóide. *Química Nova*, São Paulo, v. 25, p. 842-843, 2002.
57. LENARDÃO, E. J. "GREEN CHEMISTRY" - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Química Nova*, São Paulo, v. 26, p. 123-129, 2003.
58. SILVA, F. M.; LACERDA, P. S. B.; JUNIOR, J. J. Desenvolvimento sustentável e química verde. *Química Nova*, São Paulo, v. 28, p. 103-110, 2005.
59. OLIVEIRA, C. C.; SARTINI, R. P.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G, *Anal. Chim. Acta* 332 (1996) 173.
60. ROCHA, F. R. P.; REIS, B.F.; LIMA, J.L .F. C.; ZAGATTO, E. A. G., LAPA, R. A. S.; SANTOS, J. L. M.; Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends., *Anal. Chim. Acta*, São Paulo. v.468, n.1, p. 119-131, 2002.
61. VIEIRA, G. P.; CRISPINO, C. C.; PERDIGAO, S. R. W.; Reis, B. F. An environmentally friendly photometric procedure for ammonium determination in rainwater employing a multicommutation approach. *Analytical Methods*, 2013, 5 (2), 489-495.
62. MOLINA-GARCIA, L.; LLORENT-MARTINEZ, E. J.; FERNANDEZ-DE CORDOVA, M. L.; SANTOS, J. L. M.; RODRIGUES, S. S. M.; RUIZ-MEDINA, A. Study of the quenching effect of quinolones over CdTe-quantum dots using sequential injection analysis and multicommutation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, 80 (1), 147-154.
63. LEAL, L.O.; FERRER, L.; FORTEZA, R.; CERDA, V. Multicommutation flow techniques in the hydride generation-atomic fluorescence determination of arsenic. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 30, No. 5, 2011.
64. SANTOS ANDRADE, L.; CARDOZO ROCHA-FILHO, R.; BEZERRA CASS, Q.; FATIBELLO-FILHO, O. A novel multicommutation stopped-flow system for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by differential pulse

- voltammetry on a boron-doped diamond electrode. *Analytical Methods*, 2010, 2 (4), 402-407.
65. LEITE, O. D.; OLIVEIRA, G. G.; JANEGITZ B. C.; BATISTÃO M. B.; SALAMI, F. H.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol pela inibição da reação quimiluminescente do luminol-hipoclorito de sódio em um sistema de análise em fluxo empregando o conceito de multicomutação. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 7, 1755-1759, 2009.
66. FATIBELLO-FILHO, O.; SALAMI, F. H.; BONIFÁCIO, V. G. Determinação espectrofotométrica em fluxo de cloro em água usando célula de longo caminho óptico e multicomutação. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 1, 112-115, 2009.
67. INFANTE, C. M. C.; MASINI, J. C.; ROCHA, F. R. P. A green flow-based procedure for fluorimetric determination of acid-dissociable cyanide in natural waters exploiting multicommutation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (8), 2931-2936, 2008.
68. HONORATO, R.S. *et al.* A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. ***Analytica Chimica Acta***, 396: 91, 1999.
69. DINIZ, P.H.G.D. *et al.* Flow-batch analysis. ***Trends in Analytical Chemistry***, 35: 39, 2012.
70. FERNANDES, J.C.B.; GARCIA, C.A.B.; GRANDIN, L.A.; NETO, G.O. & GODINHO, O.E.S. "Determination of acetylsalicylic acid in tablets with salicylate ion selective electrode in a batch injection analysis system". ***J. Braz. Chem. Soc.***, 9: 249, 1998.
71. KUBOTA, L.T.; FERNANDES, J.C.B.; ROVER JR., L. & NETO, G.O. "Determination of acetylsalicylic acid by FIA-potentiometric system in drugs after on-line hydrolysis". ***Talanta***, 50: 661, 1999.
72. PASEKOVÁ, H.; SALES, M.G.; MONTENEGRO, M.C.; ARAÚJO, A.N.; POLÁŠEK, M.; Determinação potenciométrica de ácido acetilsalicílico por análise por injeção sequencial (SIA), usando um eletrodo de salicilato seletivo tubular. ***Journal of Pharmaceutical e Análise Biomédica***, 24: 1027-1036, 2001.

73. CHAGAS, I. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.
74. RICHTER, E. M.; MIRANDA, J. A.; T, CUNHA, R. R.; GIMENES D. T.; MUNOZ, R. A. A. Determinação simultânea de ácido ascórbico e ácido acetilsalicílico usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica pulsada. *Quim. Nova*, 35; 1459-1463, 2012.
75. ALVARES-ROS, M. C.; SÁNCHEZ-CORTÉS, S. & GARCÍA-RAMOS, J. V. vibrational study of the salicylate interaction with metallic ions and surfaces. *Spectrosc. Acta A*, 56: 2471 - 2477, 2000
76. Miranda, J. C. *Desenvolvimento de um equipamento portátil e de sistema de análises em fluxo empregando multicomutação. Determinação fotométrica de ferro em águas de rios.* 2011.79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Centro de Energia Nuclear na Agricultura . Universidade de São Paulo, Piracicaba.
77. PEREIRA, A. C. *Desenvolvimento de um sistema analítico empregando multicomutação em fluxo para determinação fotométrica de cloreto em amostras de coque de petróleo.* 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de química de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos
78. RODRIGUES, C. T.; TUBINO, M.; ELSHOLZ, O.; SILVA, J. R. F.; LIMA, E. T.; MOREIRA, P. M. G. Medidas do medicamento Ácido Acetil Salicílico (AAS) com Fotômetro de baixo custo. *Revista Intercursos*, 7: 88, 2008.