

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**PEDRO MARCOS FRUGERI**

**DETERMINAÇÃO DE SULFATO DE ESTREPTOMICINA EM  
AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS POR  
ANÁLISE EM FLUXO**

**ALFENAS/MG**

**2013**

**PEDRO MARCOS FRUGERI**

**DETERMINAÇÃO DE SULFATO DE ESTREPTOMICINA EM  
AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS POR  
ANÁLISE EM FLUXO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química da Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Química Analítica.  
Orientador: Prof. Dr. Pedro Orival Luccas

**ALFENAS/MG**

**2013**

Frugeri, Pedro Marcos.

Determinação de sulfato de estreptomicina em amostras de medicamentos veterinários por análise em fluxo / Pedro Marcos Frugeri. - 2013.

80 f. -

Orientador: Pedro Orival Luccas

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Estreptomicina. 2. Análise de Injeção de Fluxo. 3. Análise Multivariada. I. Luccas, Pedro Orival. II. Título.

CDD: 543

PEDRO MARCOS FRUGERI

**DETERMINAÇÃO DE SULFATO DE ESTREPTOMICINA EM  
AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS POR  
ANÁLISE EM FLUXO**

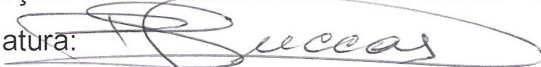
A banca examinadora abaixo-assinada aprova a  
Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Química pela Universidade Federal de Alfenas.  
Área de Concentração: Química Analítica.

Aprovada em:

Prof. Dr. Pedro Orival Luccas

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - Instituto de Química

Assinatura:



Prof. Dr. André Fernando de Oliveira

Instituição: Universidade Federal de Viçosa - Instituto de Química

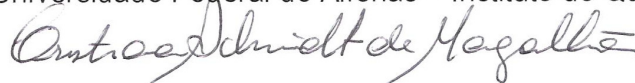
Assinatura:



Profa. Dra. Cristiana Schmidt Magalhães

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – Instituto de Química

Assinatura:



Dedico esse trabalho a minha família,  
pelo apoio e compreensão em todos os  
momentos, principalmente nas ausências.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me proporcionou essa grande experiência.

Ao Prof. Dr. Pedro Orival Luccas, pela orientação, confiança, amizade e por ter me aceitado nas condições de tempo para realizar este trabalho.

Ao Instituto de Química da UNIFAL pela oportunidade concedida.

Ao Prof. Dr. Célio Wisniewski, pela ajuda no desenvolvimento dos equipamentos.

A todos os professores, funcionários e colegas do Curso de Pós - Graduação em Química.

A minha família por todo amor e compreensão pela ausência em vários momentos. Em especial aos meus filhos, Enzo que por inúmeras vezes me acompanhou nas aulas e Ana Clara que ficava sempre me esperando.

Aos voluntários da Brinquedoteca da UNIFAL, que sempre acolheram o meu filho Enzo com muito carinho.

Aos colegas da UNIFAL, Ayla pela enorme contribuição e disposição, Fagner, Graziela, Juan e Ronaldo pela convivência agradável ao longo destes dois anos.

Aos amigos, companheiros e estagiários da Jofadel Ind. Farmacêutica, Fabiana Luiz, Éryka Alexandre, Carolina, Juliano, Bruno, Aline e Andressa que sempre colaboraram na minha ausência.

A todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

*“Através da dúvida chegamos  
ao questionamento e através  
do questionamento chegamos  
à verdade”.*

Pierre Abelárd, 1127.

## RESUMO

A presente dissertação descreve um sistema de análise em fluxo para determinação de estreptomicina em amostras de medicamentos veterinários. O método baseia-se na hidrólise alcalina da estreptomicina, seguida da reação da guanidina produzida com íons ferro II formando um composto colorido que é detectado espectrofotometricamente no comprimento de onda em 520 nm. Para avaliação dos efeitos tanto dos fatores químicos quanto os de fluxo, foi realizada uma triagem utilizando planejamento fatorial fracionário de dois níveis. Para obtenção dos valores ótimos, foi efetuado um Planejamento Matriz de Doehlert. A faixa de resposta linear foi de 60 mg L<sup>-1</sup> até 1500 mg L<sup>-1</sup>, a curva analítica apresentou a equação: Abs. = 0,011 + 4,721x10<sup>-4</sup> ( L mg<sup>-1</sup>) estreptomicina, com coeficiente de correlação de 0,9874. Os limites de detecção e quantificação foram de 18 mg L<sup>-1</sup> e 63 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, a frequência analítica foi de 30 determinações por hora. Quanto à seletividade do método, testou-se a influência dos principais concomitantes de medicamentos veterinários e estes não apresentaram interferência significativa. As amostras de medicamentos veterinários foram apenas diluídas e inseridas no sistema FIA para a determinação. A exatidão foi verificada aplicando-se método de comparação: quatro amostras de medicamentos da linha veterinária foram analisadas e os resultados da concentração de estreptomicina foram condizentes (*teste-t pareado, p= 0,05*) com os obtidos com o método oficial por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Palavras-chave: Sulfato de estreptomicina, Sistema de análise em fluxo, Otimização multivariada.

## ABSTRACT

This work describes a flow analysis system for the determination of streptomycin in veterinary medicines samples. The method is based on alkaline hydrolysis of streptomycin followed by reaction with produced guanidine ions with iron (II) forming a colored compound that is detected spectrophotometrically at a wavelength of 520 nm. To assess the effects, both chemical factors as the flow, we performed a screening using fractional factorial design of two levels. To obtain the optimal values, one Doehlert Planning Matrix was made. The linear response range was 60 mg L<sup>-1</sup> to 1500 mg L<sup>-1</sup>, the analytical curve equation:  $Abs = 0.011 + 4.721 \times 10^{-4} (L \text{ mg}^{-1})$  streptomycin, with a correlation coefficient of 0.9874. The limits of detection and quantification were 18 mg L<sup>-1</sup> and 63 mg L<sup>-1</sup> respectively, the reading frequency was 30 samples per hour. As to the selectivity of the method, we tested the influence of the major concomitant of veterinary drugs and these showed no significant interference. Samples of veterinary drugs were diluted and only inserted into the FIA system for the determination. The accuracy was verified applying the method of comparison, four samples of the line veterinary medicines were analyzed and the results were consistent concentration of streptomycin (*t-test*,  $p = 0.05$ ), with the ones obtained with the method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

,

Keywords: streptomycin sulfate, System flow analysis, Multivariate optimization.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Actinobacteria conhecida como actinomicetos dos sub grupo dos estreptomicetos	16
Figura 2-	Ação bactericida do sulfato de estreptomicina contra <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
Figura 3 -	Estrutura química dos antibióticos aminoglicosídeos	20
Figura 4 -	Espectro no infravermelho do sulfato de estreptomicina	22
Figura 5	Primeiro analisador em fluxo desenvolvido por Leonardo Skeegs em 1947	24
Figura 6 -	Sistema de análise em fluxo mostrando as quatro partes do sistema FIA: propulsão dos fluidos, injeção da amostra, bobina reacional e sistema de detecção	25
Figura 7	Dispositivos comerciais mais utilizados para propulsão dos fluidos: (a) bomba de pistão; (b) bomba peristáltica, (c) bomba de seringas.	26
Figura 8 -	Injetor proporcional utilizado nos experimentos para determinação de estreptomicina	27
Figura 9 -	Representação de um sistema FIA	30
Figura 10 -	Dispersão da amostra no sistema FIA	31
Figura 11 -	Determinação do valor da dispersão no sistema FIA	32
Figura 12 -	Representação esquemática de um sistema FIA por confluência	33
Figura 13-	Diagrama de blocos interligando os fatores às respostas	35
Figura 14-	Distribuição dos pontos experimentais de uma matriz de Doehlert para otimização de dois fatores	40
Figura 15-	Diagrama de fluxo para aplicação de Planejamento Doehlert na otimização de método analítico	45
Figura 16-	Esquema geral do amostrador automático e o injetor comutador usado no método de análise em fluxo para determinação de estreptomicina	47
Figura 17-	Esquema da célula para análise em fluxo	48
Figura 18-	Modelo esquemático do sistema de análise em fluxo para determinação de sulfato de estreptomicina por confluência	51

Figura 19-	Varredura espectral do composto obtido a partir da reação com $1\text{gL}^{-1}$ com solução de NaOH $0,5\text{ mol L}^{-1}$ e sulfato de ferro amoniacal 2,5% (m/v)	57
Figura 20-	Representação do Diagrama de Pareto para os fatores estudados; a significância dos mesmos foi avaliada com erro padrão de 5%	60
Figura 21 -	(a)-Comparação das previsões dos dois modelos com os valores observados no modelo linear; (b) - Comparação das previsões dos dois modelos com os valores observados no modelo quadrático.	65
Figura 22 -	Gráfico dos resíduos com a comparação das previsões dos dois modelos (a) modelo linear e (b) modelo quadrático	66
Figura 23 -	(a) - Superfície de Resposta relacionando a concentração de $\text{Fe}^{+2}$ com o comprimento da bobina reacional $B_1$ ; (b) - Superfície de Resposta relacionando a concentração de $\text{Fe}^{+2}$ com o comprimento da alça de amostragem; (c) - Superfície de Resposta relacionando o comprimento da bobina reacional $B_1$ com o comprimento da alça de amostragem.	68
Figura 24-	Curva analítica para determinação de estreptomicina por sistema em fluxo	70
Figura 25-	Sinais transientes em triplicatas, obtidos empregando o sistema FIA das soluções de referência de estreptomicina nas concentrações de (1) $3,15 \times 10^{-2}\text{ gL}^{-1}$ ; (2) $6,3 \times 10^{-2}\text{ gL}^{-1}$ , (3) $2,5 \times 10^{-1}\text{ gL}^{-1}$ ; (4) $5,0 \times 10^{-1}\text{ gL}^{-1}$ ; (5) $7,5 \cdot 10^{-1}\text{ gL}^{-1}$ ; (6) $1,0\text{ gL}^{-1}$ ; (7) $1,25\text{ gL}^{-1}$ e (8) $1,50\text{ gL}^{-1}$ .	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Planejamento Fatorial de dois níveis para dois fatores, três fatores e quatro fatores.	37
Tabela 2-	Matriz de Doehlert para dois, três e quatro fatores.	41
Tabela 3-	Condições operacionais do cromatógrafo para análise da estreptomicina (HPLC)	49
Tabela 4-	Níveis dos fatores no Planejamento Fatorial Fracionário $2^{5-1}$	52
Tabela 5-	Níveis codificados e reais da matriz de Doehlert para três fatores	53
Tabela 6-	Conjunto de Experimentos do Planejamento Matriz de Doehlert	54
Tabela 7-	Matriz e resultados do Planejamento Fatorial de dois níveis $2^{5-1}$	59
Tabela 8-	Conjunto de experimentos e resultados do Planejamento Matriz de Doehlert	62
Tabela 9-	Análise de Variância (ANOVA) para o Modelo Linear do Planejamento Matriz de Doehlert	63
Tabela 10-	Análise de variância (ANOVA) para o Modelo Quadrático Planejamento Matriz de Doehlert para regressão múltipla	64
Tabela 11-	Valores otimizados no Planejamento Matriz de Doehlert	69
Tabela 12-	Determinação da concentração de sulfato de estreptomicina em amostras de medicamentos veterinários empregando o sistema por análise em fluxo proposto	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AA</b>	- Alça de Amostragem
<b>ANOVA</b>	- Análise de Variância, do inglês Analysis of Variance
<b>C</b>	- Confluência
<b>CCD</b>	- Planejamento Composto Central
<b>CENA-USP</b>	- Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo
<b>CL</b>	- Detector quimioluminométrico
<b>CR<sub>1</sub></b>	- Concentração do reagente 1
<b>CR<sub>2</sub></b>	- Concentração do reagente 2
<b>CV</b>	- Coeficiente de Variação
<b>ET-ASS</b>	- Espectrometria de absorção atômica eletrotérmica
<b>FIA</b>	- Análise por injeção em fluxo, do inglês Flow injection analysis
<b>FL</b>	- Frequência de Leitura
<b>GL</b>	- Graus de Liberdade
<b>GF-AAS</b>	- Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de alta eficiência, do inglês: High Performance Liquid Chromatography
<b>ICP-MS</b>	- Espectrometria de massa acoplado a plasma induzido
<b>LD</b>	- Limite de Detecção
<b>LQ</b>	- Limite de Quantificação
<b>MQ</b>	- Média Quadrática
<b>R1</b>	- Bobina de aquecimento 1
<b>R2</b>	- Bobina reacional 2
<b>RSD</b>	- Desvio Padrão Relativo, do inglês: Relative standard deviation
<b>RSM</b>	- Metodologia de Superfície de Resposta, do inglês Methodology Response Surface
<b>SQ</b>	- Soma Quadrática
<b>UNIFAL-MG</b>	- Universidade Federal de Alfenas - MG
<b>USP</b>	- United States Pharmacopeia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Estreptomicina</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Métodos para identificação, caracterização e quantificação de estreptomicina</b>	<b>20</b>
2.2.1	Métodos Microbiológicos para determinação de estreptomicina	23
<b>2.3</b>	<b>Sistema em fluxo</b>	<b>23</b>
2.3.1	Análise por injeção em fluxo	23
<b>2.4</b>	<b>Otimização multivariada de processos em química analítica</b>	<b>34</b>
2.4.1	Planejamento fatorial de dois níveis	36
2.4.2	Planejamento Matriz de Doehlert	39
2.4.3	Aplicações da Matriz de Doehlert em Química Analítica	42
2.4.4	Análise de superfície de respostas	43
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	<b>Instrumentação e acessórios</b>	<b>47</b>
<b>5.2</b>	<b>Reagentes</b>	<b>49</b>
5.2.1	Preparo das amostras farmacêuticas	50
<b>5.3</b>	<b>Estudos preliminares</b>	<b>50</b>
5.3.1	Espectro de absorção molecular	50
<b>5.4</b>	<b>Sistema de análise em fluxo</b>	<b>51</b>
<b>5.5</b>	<b>Procedimento de otimização</b>	<b>52</b>
5.5.1	Planejamento Matriz de Doehlert	53

<b>5.6</b>	<b>Figuras de Mérito</b>	<b>54</b>
5.6.1	Faixa de resposta e linearidade	54
5.6.2	Limites de Detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	55
5.6.3	Frequência de Leitura (FL)	56
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
<b>6.1</b>	<b>Estudos preliminares</b>	<b>57</b>
<b>6.2</b>	<b>Otimização multivariada</b>	<b>58</b>
6.2.1	Planejamento Fatorial de dois níveis ( $2^{5-1}$ )	58
6.2.2	Planejamento Matriz de Doehlert	62
6.2.3	Otimização por Planejamento Matriz de Doehlert para três fatores	63
<b>6.3</b>	<b>Método de superfície de resposta</b>	<b>67</b>
<b>6.4</b>	<b>Figuras de mérito</b>	<b>69</b>
<b>6.5</b>	<b>Efeito dos interferentes no sistema on-line de detecção</b>	<b>70</b>
<b>6.6</b>	<b>Aplicação e teste de exatidão</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Através da história, a humanidade tem utilizado drogas para tratar doenças, tanto com finalidades sociais ou religiosas. Sir William Osler (1849-1919), um eminente educador médico do final do século XIX, declarou que “uma compulsão para ingerir medicamentos talvez seja o grande aspecto que distingue as pessoas dos outros animais” (GIRIO et al., 2005).

Sem dúvida, a descoberta das drogas se deu mediante ao processo de tentativa e erro, à medida que as pessoas experimentavam diversas substâncias de origem vegetal, animal e mineral existentes em seu ambiente como fontes potenciais de medicamento (STOLKER; BRINKMAN, 2005).

Na atividade pecuária, os medicamentos veterinários têm sido amplamente utilizados e administrados como aditivos em água ou nos alimentos dos animais destinados ao consumo humano, com o intuito de prevenir o aparecimento de doenças. Além disso, agentes promotores do crescimento, como os hormônios, e determinados medicamentos veterinários são aplicados para estimular o crescimento dos animais, o que pode ser considerada uma prática excessiva no uso desses medicamentos (STOLKER; BRINKMAN, 2010).

A presença de medicamentos veterinários pode exercer alguns efeitos na qualidade da carne do animal como alimento humano. Por exemplo, o uso de agentes promotores de crescimento leva a um aumento na velocidade de lipólise gerando uma decomposição química de triacilgliceróis e conseqüente diminuição de gordura com efetiva perda no sabor do alimento. A retenção de água também é verificada com o uso dessas substâncias, onde o resultado é uma carne dura e pouco suculenta (TOLDRÁ; REIG, 2006).

Devido ao crescimento da população humana é notável também o crescimento na produção de alimentos como carnes bovinas, suínas e etc. Assim, o controle de qualidade de medicamentos e alimentos exige o desenvolvimento de técnicas analíticas rápidas, precisas e exatas. Nesse contexto os sistemas de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) tem se destacado como uma das alternativas promissoras para suprir a demanda de amostras como as de medicamentos, alimentos e análises clínicas. A vantagem desta técnica resultou em um número significativo de publicações, onde podem ser citados alguns métodos usando análise em fluxo para determinação de Li (lítio), Al (alumínio) e Fe (ferro) em amostras de refrigerantes e

bebidas alcoólicas com LQ  $1,4 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $1,59 \text{ ng L}^{-1}$  e  $425 \text{ ng L}^{-1}$  respectivamente, usando detector ICP-MS (BIANCHI et al., 2003), análise de Cu (cobre), Al (alumínio), Fe (ferro) e Mn (manganês) em fígado bovino, com LQ de  $3,10 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $4,80 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $2,70 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $3,30 \text{ ng L}^{-1}$  respectivamente, usando como detector absorção atômica (NAGAOSA; SAKATA, 1998), análise de dipirona em formulações farmacêuticas com LQ  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , usando como detector espectrofotômetro (DIAS et al., 2006), análise de fluoxetina utilizando nitroprussiato de sódio, com LQ  $0,15 \text{ mg L}^{-1}$  monitorado em espectrofotômetro (SHAH et al., 2008), determinação de N - acetilcisteína em amostras comerciais de medicamentos, através da reação de oxidação com Fe (III), produzindo Fe (II) e monitorado em espectrofotômetro com LQ de  $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (Suarez, 2009).

Os sistemas por análise em fluxo vêm se consolidando como uma técnica analítica prontamente para atender a rotina no controle de qualidade principalmente de fármacos. Isto pode ser confirmado pelo grande número de artigos publicados nas últimas décadas e até mesmo a Farmacopeia Americana (USP, 2005), preconiza o emprego de um sistema de análise em fluxo com detecção espectrofotométrica para determinação indireta de iodeto empregando a reação com ácido arsenoso e Ce (IV).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Estreptomicina

Nos anos de 1930 e 1940, a descoberta da penicilina estimulou a pesquisa e o desenvolvimento de outros antimicrobianos. Em 1943, Schatz e colaboradores descobriram e isolaram um grupo particular de fungo, *Streptomyces griseus* (FIGURA 1), que produzia a estreptomicina, um potente agente antimicrobiano ativo contra vários micro-organismos aeróbicos gram-positivos (SILVA, 1994).



Figura 1 - Actinobacteria conhecida como actinomicetos, ocorre amplamente no solo, onde desempenham relevante papel biológico, representante do subgrupo dos estreptomicetos são muito comuns na terra (*Streptomyces griseus* - MTCC 9723, isolado do solo).

Fonte: GIRIO, 2005.

No seguimento veterinário, a estreptomicina foi um dos primeiros antibióticos utilizados contra a leptospirose em bovinos e é considerada, uma das melhores opções de tratamento (GIRIO et al., 2005). O tratamento é muito eficiente, pois diminui a fonte de infecção, com a eliminação do portador renal (GERRITSEN et al., 1994).

Os aminoglicosídeos são importantes antibióticos usados no tratamento de muitas infecções bacterianas graves. A maioria dos aminoglicosídeos é produzida por micro-organismos, enquanto outra parte é semissintética. Entre os produzidos por

micro-organismo, a estreptomicina apresenta um bom espectro de atividade antibacteriana, mas é muito tóxica, e há muitas bactérias resistentes a ela (SILVA, 1994).

Os aminoglicosídeos são agentes antimicrobianos usados frequentemente no tratamento de doenças em seres humanos e animais, causados por bactérias aeróbicas gram-positivas e gram-negativas, não sendo ativos contra bactérias anaeróbicas devido ao bloqueio de sua ação sobre essas condições (GETEK; VESTAL; ALEXANDER, 1991).

A partir da estreptomicina, o primeiro antibiótico aminoglicosídeo isolado, vários outros estudos levaram ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos como, por exemplo, a neomicina a partir da *Streptomyces kanamyceticus* e da gentamicina a partir do *Micronospora purpurea* (GETEK; VESTAL; ALEXANDER, 1991; ISOHERRANEM, 1999).

A neomicina, descoberta em 1949, devido a sua intensa nefro e ototoxicidade impediram seu uso por via parenteral. É muito utilizada na forma de creme dermatológico, é indicada para o tratamento e profilaxia das infecções da pele de qualquer natureza, inclusive traumática ou ferida cirúrgica. A paramomicina (1956) já apresentava potência muito reduzida para ser usada por via sistêmica. A canamicina (1957) apresentou bom desempenho e embora não fosse atóxico, era bem tolerado por via parenteral. Foi usada contra bactérias gram-negativa. A gentamicina (1963), um dos mais importantes aminoglicosídeos, tem tolerabilidade razoável e é ativa contra muitas espécies bacterianas, inclusive a *Pseudomonas aeruginosa*. A tobramicina (1968), a sisomicina e a ribostamicina (1970) com aplicação terapêutica, a lividomicina (1971), a verdomicina (1972) e assim por diante descobriram-se outros aminoglicosídeos também de origem natural (ISOHERRANEN; SOBACK, 1999).

A atividade antimicrobiana mostrada na Figura 2 dos aminoglicosídeos é baseada na habilidade dos mesmos em inibir a síntese de proteína dos micro-organismos, resultando em uma rápida concentração dependente da ação bactericida, vale ressaltar que os outros agentes antimicrobianos que afetem a síntese de proteína são apenas bacteriostáticos (MARZO; DALBO, 1998).

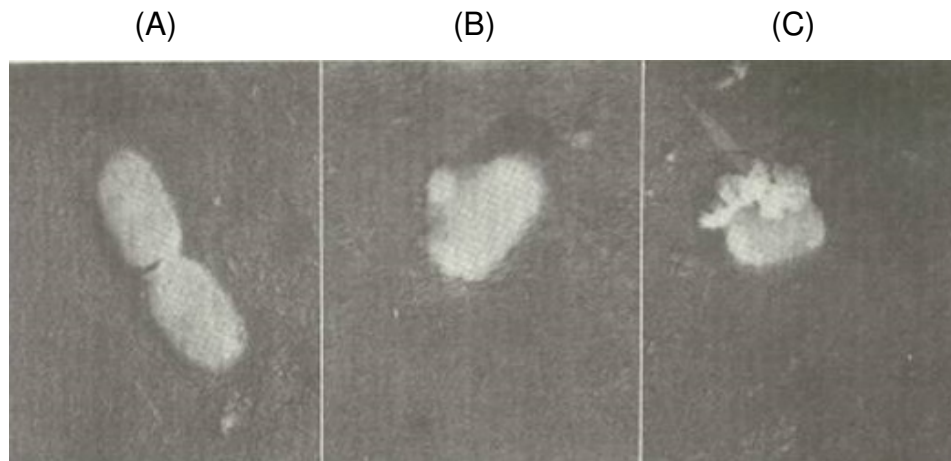


Figura 2 - Ação bactericida da estreptomicina contra *Klesbsiella pneumoniae* demonstrada pelo sombreamento. Acima em A, divisão celular normal (14200 x). Em B desintegração celular (16400 x) após 18 horas de exposição à estreptomicina (0,05 mg/L). Em C, maior desintegração (14800 x).  
Fonte: GIRIO, 2005.

Na medicina veterinária os aminoglicosídeos são amplamente utilizados no tratamento de infecções por bactérias, como por exemplo, enterites e mastites, sendo também (MARZO; DALBO, 1998) adicionados à comida para a prevenção de doenças e para promover o crescimento dos animais. Os mais comumente utilizados são a gentamicina, neomicina, dihidroestreptomicina e estreptomicina. Há uma grande preocupação com os resíduos desses antibióticos em alimentos devido a sua toxicidade, uma vez que todos os membros desse grupo são nefro e ototóxicos (GETEK; VESTAL; ALEXANDER, 1991; ISOHERRANEM; SOBACK, 1999; STEAD, 2000).

Os antibióticos aminoglicosídeos são caracterizados pela presença de um anel aminociclitol (um hidroxíciclohexano amino substituído) ligado a dois ou a mais aminoácúcares por ligações glicosídicas (FIGURA 3) (GIRIO, 2005).

A resistência aos aminoglicosídeos pelos micro-organismos pode ocorrer por três mecanismos: produção de enzimas que causam a inativação do antibiótico; alteração na permeabilidade da membrana microbiana à droga; alteração na proteína receptora do ribossomo bacteriano (SETNY; TRYLSKA, 2009).

O principal mecanismo de resistência encontrado clinicamente é a produção de enzimas que inativam o aminoglicosídeo. Essas enzimas microbianas atuam através de fosforilação, adenilação ou acetilação de grupos hidroxila ou amino específicos,

anulando o efeito do fármaco. Os genes dessas enzimas são adquiridos através de mecanismos bacterianos (como conjugação e transformação). Hoje em dia, há grande preocupação com cepas de *Enterococos* resistentes a aminoglicosídeos através desse mecanismo (GIRIO, 2005).

Outro mecanismo comum de resistência é a incapacidade do fármaco de penetrar na membrana citoplasmática. Isso ocorre devido a uma mutação ou deleção da proteína porina ou qualquer outra proteína envolvida no sistema de transporte de membrana. Além disso, tal processo pode ser relacionado a condições de crescimento bacteriano, já que o transporte de aminoglicosídeos através da membrana é um processo ativo, dependente do oxigênio. Assim, bactérias anaeróbias estritas e facultativas que crescem em condições anaeróbias são resistentes (GETEK; VESTAL; ALEXANDER, 1999).

A estreptomicina se torna muito importante, principalmente quando utilizada associada à outros antibióticos (GOODMAN, 1996). Esta associação é feita principalmente com benzilpenicilina potássica e benzilpenicilina procaína, onde se obtém uma rápida absorção, e ao mesmo tempo uma absorção lenta devida associação com benzilpenicilina benzatina (GOODMAN, 1996).

O uso tópico dos aminoglicosídeos também pode causar intoxicação quando aplicados a grandes feridas, queimaduras ou úlceras cutâneas por longos períodos. Mesmo sendo o primeiro antibiótico que atuou de forma importante e decisiva no tratamento da meningite tuberculosa e na tuberculose pulmonar, quando administrada em altas doses, e por tempo prolongado, apresenta uma toxicidade sobre o sistema nervoso, que se manifesta, por perturbações no sentido do equilíbrio e em menor escala, sobre o aparelho auditivo (GIRIO, 2005).

A Figura 3 ilustra as estruturas químicas da estreptomicina e da dihidroestreptomicina.

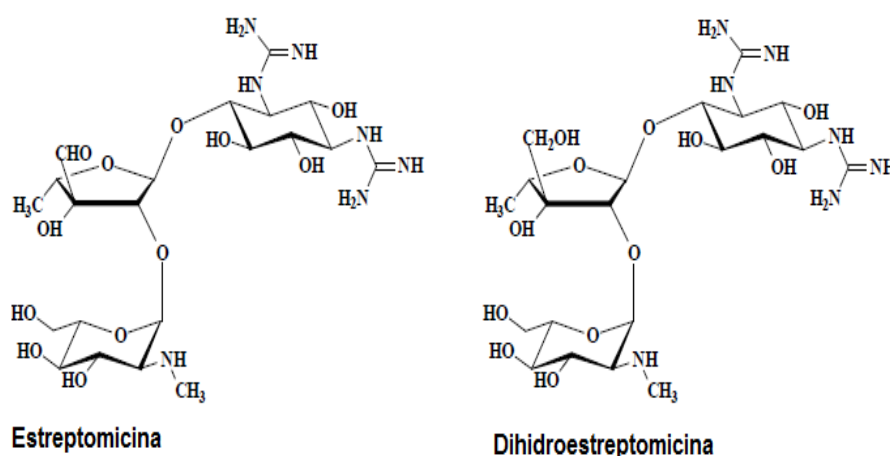


Figura 3 - Estrutura química dos antibióticos aminoglicosídeos.  
Fonte: GIRIO, 2005.

## 2.2 Métodos para identificação, caracterização e quantificação de estreptomicina

Na literatura, quando se trata de determinação de estreptomicina, o método analítico mais antigo, foi o desenvolvido por Schenck e Spielman (1945), onde a estreptomicina foi solubilizada em meio alcalino originando o maltol. Boxer et al., (1947) determinaram a estreptomicina, fazendo reagir o maltol com o cloreto férrico e medindo a coloração vermelho púrpura em 550 nm. Dentre os métodos indicados, os mais utilizados para a determinação de estreptomicina são por cromatografia de camada fina, cromatografia líquida de alta eficiência e pode ser feito principalmente por espectrofotometria molecular (JAGER, 2001).

Por cromatografia gasosa, têm sido poucos os métodos desenvolvidos para a análise de aminoglicosídeos, isto se atribui pelo fato desses compostos não serem voláteis o suficiente ou serem termicamente instáveis, sendo necessários estágios de derivação para após serem analisados (KENNEDY et al., 1998).

A Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010), cita como método recomendado a espectrofotometria, onde ocorre a formação de maltol pela hidrólise da estreptose em meio alcalino a quente e após, reação com sulfato de ferro (II) em meio ácido.

Para formulações farmacêuticas contendo estreptomicina e dihidroestreptomicina, esta técnica por espectrofotometria não é seletiva, neste caso pode ser utilizado com o reagente fenólico de Folin e Ciocalteau (1947), tornando a reação mais sensível. Como a dihidroestreptomicina não pode formar maltol, esta

reação é específica para a estreptomicina, podendo, quantificar este antibiótico mesmo em presença da dihidroestreptomicina. As Farmacopeias Francesa e Portuguesa indicam este processo para a dosagem da estreptomicina em formulações farmacêuticas que a contenham em conjunto com dihidroestreptomicina. Outra opção, seria separação dos dois fármacos usando a também cromatografia de par iônico em fase reversa, onde o ácido hexanossulfônico pode ser usado como um reagente para formação do par iônico, usando solução aquosa de acetonitrila (STEAD, 2000).

É possível também quantificação da estreptomicina utilizando a reação da glucosamida com acetilacetato a quente (KOROLKOVAS, 1988).

Resultados também são obtidos na identificação e separação de estreptomicina quando feita por cromatografia de troca iônica, cromatografia de fase reversa, cromatografia de fase normal e eletroforese capilar. A aplicação destes métodos pode ser feita em amostras de formulações farmacêuticas, matérias primas, ou mesmo ainda para análise de resíduos em alimentos (BHUSHAN; ARORA, 2001).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em função da sua sensibilidade e seletividade, é a técnica analítica mais empregada na análise de aminoglicosídeos (STEAD, 2000).

Utilizando técnicas de derivação desses compostos, também viabiliza o desenvolvimento de métodos com a utilização de detectores como espectrofotometria na região do ultravioleta e/ou espectroscopia de fluorescência, sendo que os aminoglicosídeos não possuem grupos cromóforos (CARSON; HELLER, 1998).

Os aminoglicosídeos podem ser determinados também, através da formação de complexos entre os grupos amínicos e cobre (II), Yang e Tomellini (2001), propuseram um método por HPLC com detecção indireta por fluorescência, baseado na destruição pelo antibiótico, do complexo de cobre (II) com L-triptofano (L-Trp), o (Cu-Trp<sup>2+</sup>), é fluorescente, ocorrendo a diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração do aminoglicosídeo no meio.

Jaguer (2001) quantificou em formulações farmacêuticas injetáveis, a concentração de estreptomicina por cromatografia gasosa, utilizando-se da hidrólise do antibiótico e fazendo a extração do maltol em clorofórmio, após usando a derivatização, formando o silil-éter do maltol e quantificando, utilizando naftaleno como padrão.

Wallingford e Ewing observaram que a mobilidade eletroforética da estreptomicina é influenciada por borato. Isto se deu através da complexação do borato com as hidroxilas da estreptomicina, tornando viável a determinação de estreptomicina por eletroforese capilar, a partir da complexação com borato e detecção direta com UV (KUHN et al.,1991).

Também existem artigos publicados propondo métodos de análises para determinação de estreptomicina e controle de impurezas em amostras de antimicrobianos empregando técnicas como: espectrometria de massa (GETEK; VESTAL; ALEXANDER, 1991), espectrofluorimetria (GIRIO, 2005), espectroscopia na região do infravermelho, UV-visível e ressonância magnética (SILVA, 1994).

Alguns métodos analíticos recentes relatam sensibilidade melhor para determinação de estreptomicina por LC-MS/MS, onde o limite de quantificação (LQ) para estreptomicina foi de  $2 \mu\text{g Kg}^{-1}$  em mel e  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  em leite (BRUIJNSVOORT et al., 2008), também pode ser caracterizada por espectrofotometria na região do infravermelho, onde as principais bandas observadas foram (FIGURA 4):  $3600\text{-}2500 \text{ cm}^{-1}$  demonstrando a presença de grupos OH, CH e NH;  $1674 \text{ cm}^{-1}$  associada à presença de C=O (aldeídico); em  $1590 \text{ cm}^{-1}$  banda atribuída a  $\text{NH}_2$ ;  $1107 \text{ cm}^{-1}$  banda referente a C–O–C (PESTANA; BALABAN, 2011).

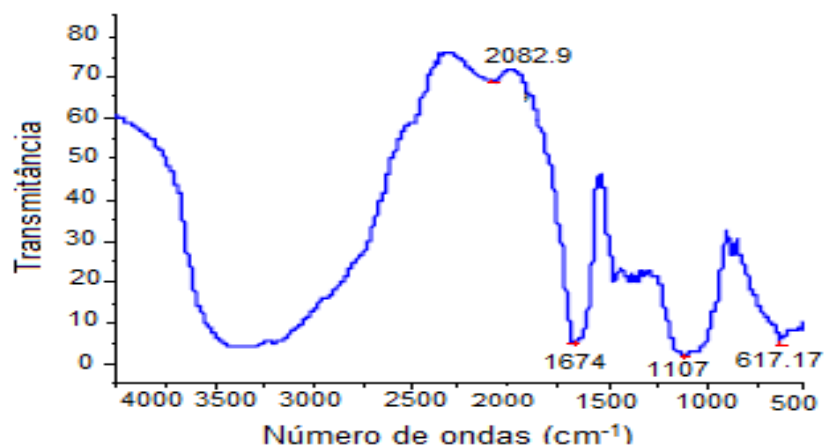


Figura 4 - Espectro no infravermelho do sulfato de estreptomicina.  
Fonte: PESTANA; BALABAN, 2011.

## 2.2.1 Métodos microbiológicos para determinação de estreptomicina

A Farmacopeia Americana (USP, 2007) também cita em uma das suas monografias para preparações farmacêuticas contendo sulfato de estreptomicina, como método recomendado, os ensaios microbiológicos (USP, 2007). Estes métodos podem ser realizados por duas formas diferentes, um por difusão em placa de agar e outro por ensaio turbidimétrico (USP, 2007). No primeiro método são colocados discos de papel impregnados com soluções diluídas do antibiótico em estudo, numa placa de Petri com meio de cultura sólido, previamente semeado com uma determinada bactéria, avaliando se o diâmetro da zona de inibição do crescimento da mesma (halo de inibição), em torno do disco de papel. Este ensaio requer de 12 a 48 horas de incubação, após a qual a inibição da bactéria é medida (USP, 2007). No ensaio turbidimétrico é utilizado um meio de cultura líquido inoculado com uma determinada bactéria, onde vai ser colocada a solução diluída do antibiótico em estudo. Após um período de incubação de 48 horas, mede-se a turbidez da “mistura” presente no tubo para avaliar o crescimento da bactéria. Estes ensaios apresentam várias limitações, como baixa sensibilidade, falta de precisão e de especificidade, além de que são metodologias demoradas e com elevada variabilidade (MEGOULAS, KOUPPARIS, 2005; STEAD, 2000).

## 2.3 Sistema em fluxo

### 2.3.1 Análise por injeção em fluxo

O método de análise em fluxo foi proposto através de uma necessidade, por volta de 1943 Leonard T. Skeegs Jr. trabalhava como responsável técnico em um laboratório de análises clínicas e em função da demanda crescente de amostras, ele desenvolveu o primeiro equipamento para análise em fluxo segmentado para determinação de ureia em amostras de urina (FIGURA 5). Estes sistemas eram caracterizados pela aspiração sequencial de amostras em direção a um percurso analítico, onde era introduzido um fluxo de ar entre as amostras, através de confluência (SKEEGS, 1957). A zona de amostra sofria pouca dispersão, pois era controlada pelas bolhas de ar, pela vazão do fluxo transportador e pela configuração

do percurso analítico. Os reagentes entravam no sistema por confluência e a zona de amostra era conduzida ao detector. O fluxo de ar inserido, antes de chegar no detector era eliminado. Em 1957 Skeegs publicou o primeiro artigo onde descrevia completamente o método automático para a análise colorimétrica e associado aos sistemas fabricados pela Technicon® foi comercializado o primeiro modelo de equipamento para análise em fluxo. Este trabalho empregava uma nova técnica para a determinação da uréia em sangue. Entre 1961 e 1977, este trabalho foi citado 356 vezes (RUZICKA, HANSEN, 1988).



Figura 5 - Primeiro analisador em fluxo desenvolvido por Leonard Skeegs em 1943.  
Fonte: SKEGGS Jr., 1957.

Em 1975, Ruzicka e Hansen, propuseram uma nova técnica para os sistemas de análise por injeção (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*), onde a amostra inserida no percurso analítico não era intercalada pelo fluxo de ar. Introduzido no Brasil em 1976 por pesquisadores do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) (BERGAMIN; REIS; ZAGATTO, 1978; MICRONAL, 1994; RUZICKA; STEWART; ZAGATTO, 1976). A partir de 1977 ocorreu um desenvolvimento muito rápido de FIA em muitos países, com conseqüente expansão dos conceitos envolvidos, o que culminou com o aparecimento dos primeiros analisadores FIA comercialmente disponíveis na Suécia e Estados Unidos (REIS; GINÉ; KRONKA, 1996).

A análise química por injeção em fluxo pode ser definida como um processo de automatização de procedimentos analíticos, no qual a amostra em solução aquosa é introduzida em uma solução carregadora que a transporta em direção ao detector (REIS; GINÉ; KRONKA, 1996). Durante o transporte, a amostra pode receber

reagentes, sofrer reações químicas e passar por etapas de separação, pré-concentração e etc.

Segundo Burguera et al., (1998) os sistemas FIA visando à determinação quantitativa de espécies químicas tem sido proposto como alternativa aos procedimentos convencionais, quando se pretende:

- analisar um grande número de amostras por unidade de tempo (aumentar a frequência analítica);
- minimizar o consumo de amostras e reagentes;
- eliminar algumas possibilidades de contaminação;
- melhorar a precisão dos resultados analíticos;
- diminuir o custo operacional;

Em geral, os sistemas FIA podem ser divididos em quatro partes: propulsão dos fluidos, introdução da amostra, bobina reacional (reatores e acessórios) e detecção, conforme o esquema da Figura 6.

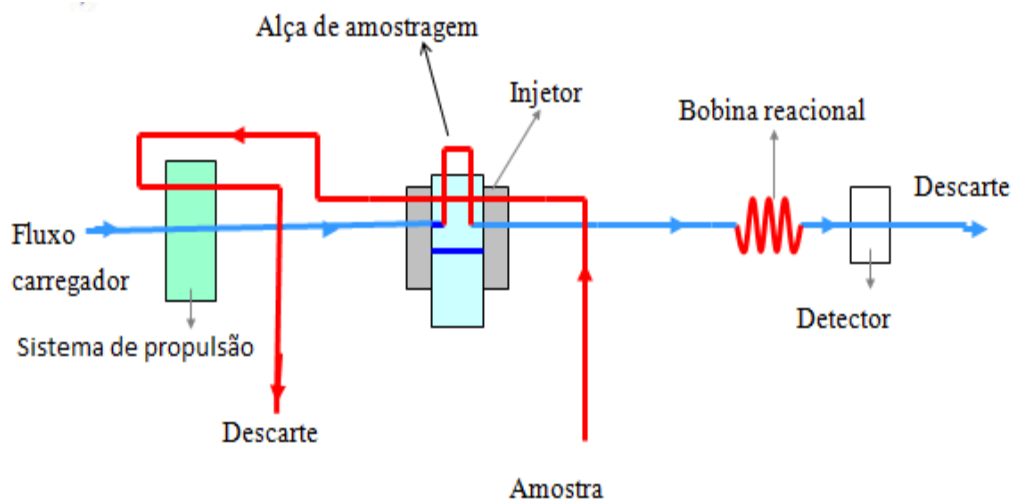


Figura 6 - Sistema de análise em fluxo mostrando as quatro partes do sistema: propulsão dos fluidos, Introdução da amostra, bobina reacional e detecção.

Fonte: O autor, 2013.

A propulsão pode ser à vazão ou pressão constante. Quando o sistema de análise trabalha à vazão constante, o meio mais empregado para movimentar a solução carregadora e as soluções dos reagentes, é a bomba peristáltica (FIGURA 7a).

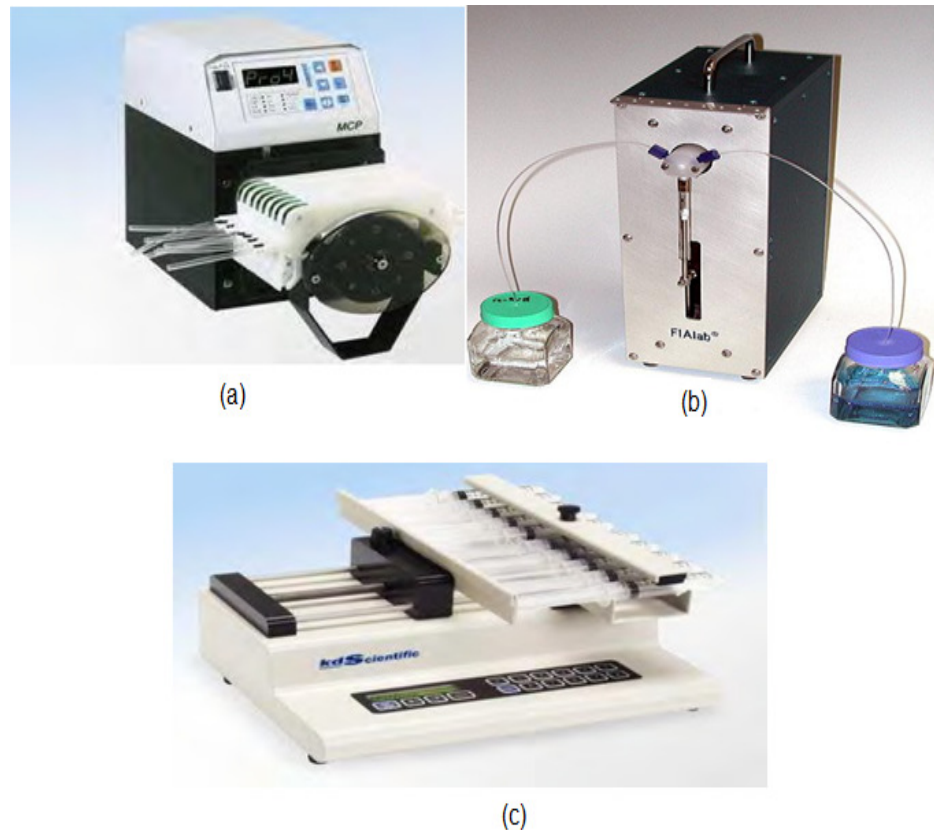


Figura 7- Dispositivos comerciais mais utilizados para propulsão dos fluidos: (a) bomba de pistão; (b) bomba peristáltica, (c) bomba de seringas.

Fonte: FIAlab - 2500, 2008.

As bombas de pistão, que são utilizadas em cromatografia, também são utilizadas em FIA como sistema de propulsão (FIGURA 7b). Outro dispositivo relacionado, é a bomba seringa (FIGURA 7c) que libera fluxos de poucos volumes, em alguns casos mililitros por minuto, que tem como vantagem um fluxo livre de pulsação.

Outros dispositivos utilizados na propulsão dos fluidos e sistema FIA são baseados em gravidade em sistema à pressão constante (ROCHA; REIS, 2000), pressão gasosa (LYDDY-MEANNEY et al., 2002) bombas de membranas (WEEKS; JOHNSON, 1996), bombas de aquário (GRUDPAN et al., 1993) microbombas dinâmicas (LASER; SANTIAGO, 2004; WOIAS, 2001).

O injetor é o dispositivo do sistema FIA que introduz a amostra no percurso analítico que consiste no espaço onde a solução carregadora transporta a amostra para o detector (KRUG et al., 1983; RUZICKA; HANZEN, 1998; RUZICKA, 2000).

Os injetores mais comuns são os de válvulas rotatórias, que foram desenvolvidos por Ruzika e Hansen (RUZICKA; HANSEN, 2000), o injetor proporcional, desenvolvido pelos pesquisadores do CENA-USP, e as válvulas solenóides de três vias, muito usadas em sistemas com multicomutação (REIS et al., 1996).

A Figura 8(a) representa o desenho esquemático do injetor comutador proporcional, enquanto a Figura 8(b) apresenta um injetor comutador automatizado feito em Teflon<sup>®</sup>. Já o injetor proporcional mostrado na Figura 8(c) é muito versátil e de fácil construção, constituído de três peças de acrílico, sendo duas fixas e uma móvel. A peça central pode ser deslocada em relação às laterais, um passo para frente ou para trás. Por meio desse movimento, o injetor coleta a amostra e a insere no percurso analítico.

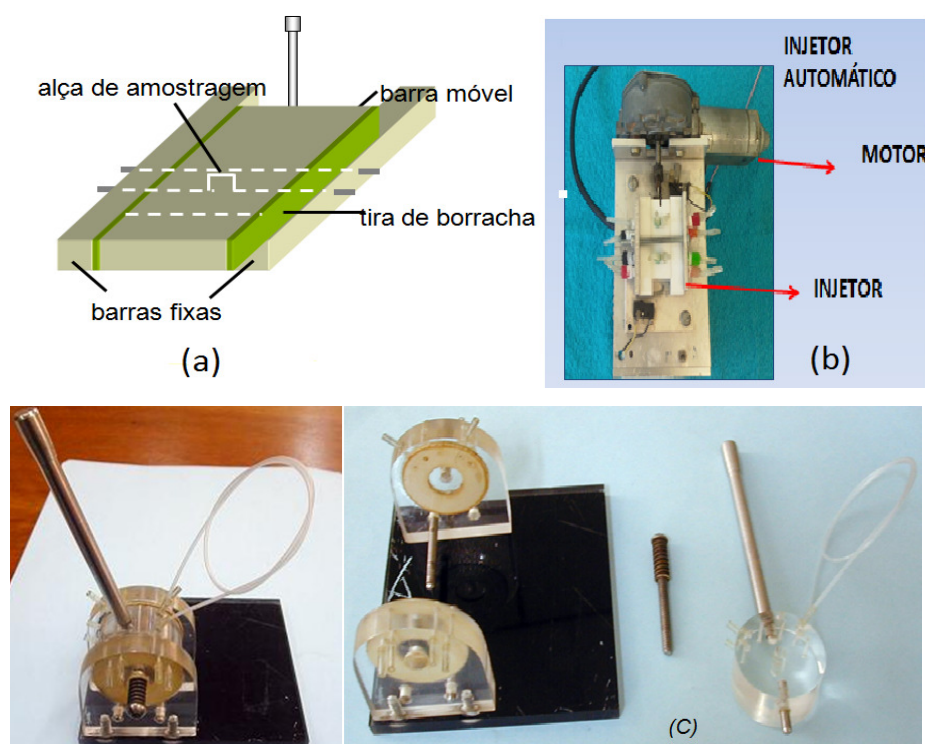


Figura 8 – Injetor proporcional utilizado nos presente trabalho (a) desenho esquemático; (b) modelo utilizado nos experimentos; (c) injetor proporcional manual.

Fonte: LIMA, 2009.

Ao longo do percurso analítico ocorrem as reações químicas necessárias à detecção da espécie de interesse. Assim, seu dimensionamento está relacionado com o tempo de permanência da amostra, e, portanto, com as vazões do carregador e dos

reagentes. O tempo de permanência médio no percurso analítico é o intervalo de tempo transcorrido entre a injeção da amostra e o instante de obtenção do sinal máximo. O aumento desse percurso pode diminuir o sinal, o que ocorre devido ao processo de dispersão (LAPA et al., 2002). A dispersão consiste no efeito causado pelas interações que ocorrem na parte frontal e final da zona de amostra com o fluxo que a transporta.

O efeito da dispersão sobre a magnitude do sinal analítico pode ser dividido em dois grupos. O primeiro está relacionado aos parâmetros intrínsecos do módulo de análise, como viscosidade dos fluidos, rugosidade das paredes internas da tubulação, coeficientes de difusão das espécies envolvidas, entre outros. O segundo grupo está relacionado ao dimensionamento do sistema, que podem ser livremente modificados, como volume da amostra injetado, dimensões do percurso analítico (presença de câmeras de separação, por exemplo), dimensões do detector, etc. (IMANDI et al., 2007).

O tempo de permanência da amostra aumenta com o percurso analítico, o que resulta em diminuição na frequência analítica (número de determinação por hora). O tempo de permanência da amostra pode ser aumentado, diminuindo-se a vazão do carregador, quando for necessário tempo mais longo para o desenvolvimento da reação (RUZICKA; HANSEN, 2000).

Quanto aos detectores usados nos sistemas em fluxo, têm sido empregados praticamente, todos aqueles usuais e não usuais em química analítica (LUNDBACK, 1983). No trabalho desenvolvido por Tomsú et al., (2004), onde o sulfametoxazol e o trimetropin foram quantificados simultaneamente usando detector espectrofotométrico, Kronka et al., (1996) utilizaram também espectrofotômetro como detector para análises de ortofosfato em águas naturais. Já Boni et al., (2011) utilizaram um detector amperométrico para análise de dipirona, enquanto Nascimento et al. (2008), analisaram Al (alumínio) e Fe (ferro) em fluidos de hemodiálise, usando o reagente de violeta de solocromo com LD de  $1,40 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $1,80 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente, usando detector de absorção atômica eletrotérmica (ET-AAS). Minami et al., (2004), analisou Al (alumínio) e Ca (cálcio) em compostos de carbono e silicões, com LD de  $0,60 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $0,15 \mu\text{g g}^{-1}$  usando como detector espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF-AAS). Pinto et al., (2005) determinaram indometacina em amostras farmacêuticas, com LD de  $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ , usando detector fluorimétrico, Marques et al., (2005), para a análise de caverdiol também em

formulação farmacêutica com LD de  $8,7 \text{ mg L}^{-1}$  usou um detector quimioluminométrico (CL).

Métodos FIA diferem dos métodos tradicionais com relação a não obrigatoriedade de obtenção de equilíbrio químico. Nos sistemas FIA, o intervalo de tempo disponível para desenvolvimento das reações envolvidas é rigorosamente mantido para todas as amostras e soluções padrões. Economiza-se então o tempo que seria gasto para complementação das reações químicas e abre-se perspectiva de controle de interferências e de utilização de método analítico que conduz a formação e quantificação de espécie instável (CALATAYUD, 1995).

Efeitos de contaminação são minimizados, já que não há contato direto entre a atmosfera do laboratório e os locais onde processam as diversas etapas do método analítico (RUZICKA; HANSEN, 2000).

Como as condições de dispersão da amostra, o tempo disponível para desenvolvimento das reações químicas e parâmetros das reações tais como pH, quantidades de reagentes adicionados, temperatura, etc, também são controlados (KONDER, 2002; PENDELA et al., 2009).

Sabe-se que métodos automatizados de análise fornecem resultados mais precisos do que o método manual correspondente, pois exige a intervenção mais frequente do operador (CALATAYUD, 1995).

Nos sistemas FIA efetuam a inserção de amostras líquidas (em geral 10 a 500  $\mu\text{L}$ ) usualmente em um fluido carregador não segmentado, o qual escoar através de tubulação da ordem de 0,8 mm de diâmetro interno.

Uma zona de amostra muito bem definida e reprodutível é estabelecida (FIGURA 9), a qual é transportada até uma unidade de medida (D). No percurso analítico podem ocorrer os diversos processos requeridos pelo método de análise, tais como diluição controlada, adição de reagentes (ponto x da Figura 9), tamponamento, diálise, extração por solvente, troca iônica, etc. Quando a zona processada de amostra atinge o detector, um sinal transiente é originado, o qual é geralmente registrado em forma de pico (FIGURA 9), cuja área ou altura de pico é proporcional à concentração da espécie química a ser determinada. Posteriormente a amostra é descartada (W) (KONDER, 2002; PENDELA et al., 2009).

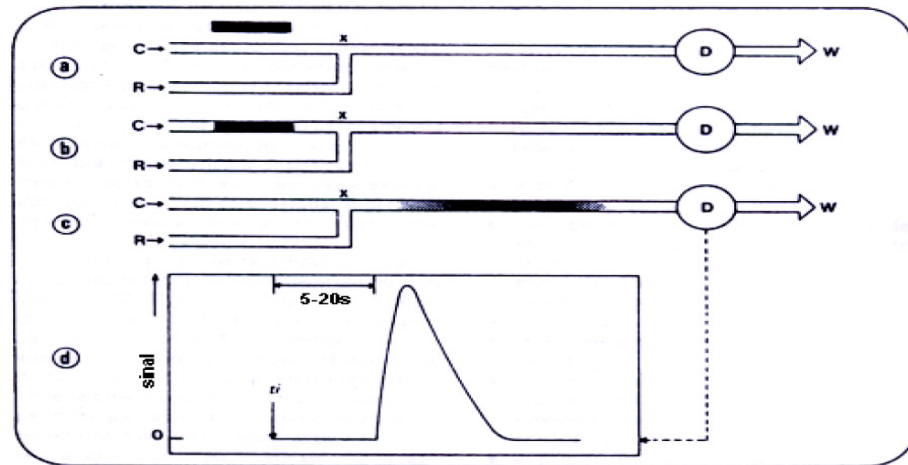


Figura 9 - Representação de um sistema FIA. Após ser selecionado um volume de solução da amostra (a), o mesmo é introduzido em uma solução transportadora de amostras (b). Imediatamente, forma-se uma zona de amostra a qual sofre dispersão contínua enquanto é transportada em direção ao detector D (c). No ponto X ocorre adição de um ou mais reagentes. O sinal medido pode ser registrado (d),  $t_i$  = instante de injeção da amostra.

Fonte: KONDER, 2002.

Como o tempo médio de residência das amostras no sistema FIA é, em geral da ordem de 20 a 50 segundos, os sistemas FIA fornecem sempre uma resposta rápida, o que é frequentemente imprescindível em análises de rotina. A Figura 9 indica, ainda, que após um intervalo de tempo bastante curto, usualmente de 10 a 30 segundos, o sinal analítico desaparece, ou seja, efeitos de memória são eliminados. Então, altas frequências analíticas, em geral de até 50 determinações por hora, constituem outra das características favoráveis dos sistemas FIA. Nestas condições, o fluxo é laminar (FIGURA 10 (a)), sendo que a lâmina de líquido próxima à parede da tubulação é quase estática, ao passo que aquela mais central se desloca com uma velocidade linear de aproximadamente o dobro da velocidade média do fluido. A injeção da amostra origina uma zona de amostra muito bem definida, a qual sofre um processo contínuo de dispersão no fluido carregador à medida que é empurrada pelo mesmo em direção ao detector. Como o fluxo é laminar, na ausência de difusão, a zona de amostra assumiria a distribuição indicada na Figura 10(b). Após a dispersão no percurso analítico, apresentaria uma rabeira pronunciada Figura 10(c). Isso geraria um efeito inaceitável de memória devido à interpenetração de amostras sucessivas (VALE, 2004). Felizmente, a difusão sempre ocorre em sistemas reais, modificando benéficamente a zona de amostra. Assim, uma espécie química situada em A

(FIGURA 10(b)) tende a difundir-se para regiões que estão fluindo com menor velocidade, ao passo que, se essa espécie estiver originalmente em B, sua difusão radial em direção a uma região fluindo rapidamente provoca uma diminuição na rabeira da zona de amostra, diminuindo assim o efeito de contaminação entre amostras (FIGURA 10(c)). É interessante observar que o desconhecimento da magnitude deste fenômeno de prevenção de uma dispersão acentuada induziu à utilização de fluxos segmentados com bolhas de ar durante muitos anos (ADANS et al., 2000).

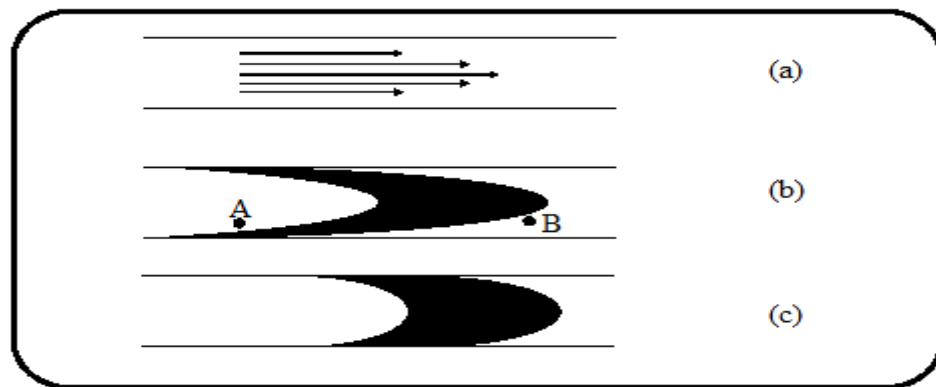


Figura 10 - A dispersão da amostra, (a) Distribuição parabólica das velocidades lineares em fluxo laminar, (b) Dispersão em ausência de difusão, (c) Dispersão em presença de difusão.

Fonte: ADANS et al., 2000.

A dispersão em FIA é um processo físico-químico dependente de vários parâmetros, não podendo, portanto, ser quantificada em termos de um único valor. Tem sido frequentemente descrita por equações matemáticas cada vez mais elaboradas. Entretanto, sob o ponto de vista prático um único valor indicador que exprimisse a extensão da dispersão seria de enorme valia. Neste sentido a avaliação da diluição no centro da zona de amostra tem um valor prático muito grande. Desta maneira, Ruzicka e Hansen (1975), propuseram um índice,  $D$ , o qual denominou número de dispersão:

$$D = C_0/C \quad (1)$$

Onde,  $C_0$  é a concentração inicial da amostra e  $C$  é a concentração no centro da zona da amostra após o processo de dispersão, ou concentração na região da zona de amostra correspondente ao máximo do pico registrado (HSIAO, 2001).

No sistema FIA mais simples, em linha única (FIGURA 11), o valor D pode ser determinado como a razão entre as medidas relativas à amostra injetada (altura de pico) e a amostra em situação de volume infinito (altura do patamar registrado), desde que os sinais analíticos sejam linearmente proporcionais às concentrações (BELAL et al., 2001).

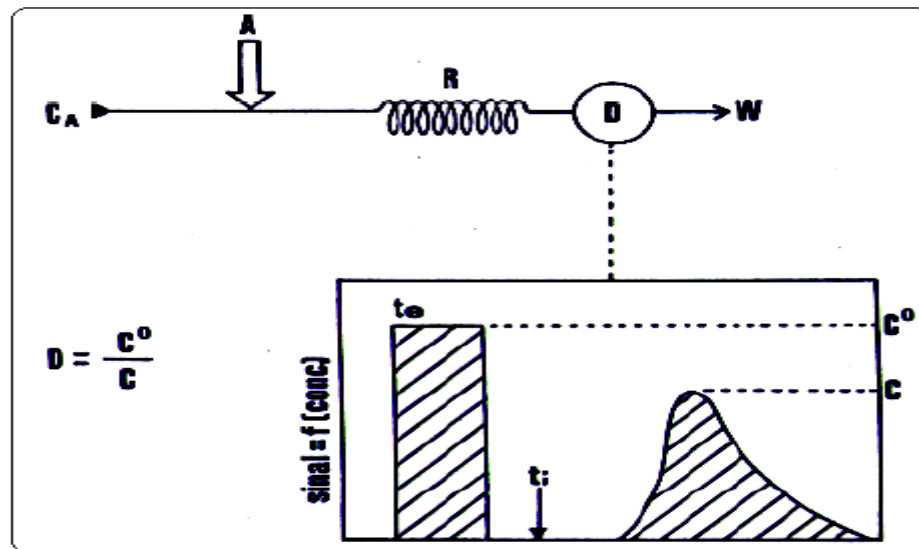


Figura 11 - Determinação do valor D. Inicialmente, uma solução colorida A simulando a amostra é colocada em CA, sendo registrado um patamar correspondendo a  $C_0$ . Posteriormente, CA é restaurado e a solução A é injetada, sofrendo dispersão no reator R, atingindo o detector espectrofotométrico D originando um pico cuja altura reflete a concentração C da porção mais concentrada da zona de amostra.

Fonte: BELAL et al., 2001.

Considerando-se apenas o valor D, a dispersão em FIA pode ser classificada como limitada (entre 1 e 2), média (entre 2 e 10) e grande (maior que 10).

O sistema de linha única é o sistema mais simples (FIGURA 6), o qual não apresenta pontos de confluência no percurso analítico. O fluido transportador é geralmente uma solução quimicamente inerte, cuja função principal é transportar a amostra injetada até a unidade de detecção, promovendo dispersão controlada da amostra e, posteriormente, limpando o percurso analítico. Eventualmente, o fluido transportador pode ser uma solução a qual reage com a amostra devido ao fenômeno de dispersão. Sistemas de linha única são frequentemente empregados em conexão com espectrometria de absorção atômica, potenciometria e outros métodos que não requerem adição de reagentes ou naqueles envolvendo alta diluição da amostra (REIS; KRONKA, 1996).

As limitações do sistema em linha única foram resolvidas, adotando-se a adição do reagente por confluência. O reagente adicionado por confluência logo após o injetor permite que cada fração da amostra receba a mesma quantidade de reagente. Evidentemente, adição sequencial de reagentes pode ser conseguida em sistemas em confluência (FIGURA 12).

A partir da confluência somam-se as vazões do carregador e do reagente, então a amostra é distribuída em um espaço maior que o ocupado anteriormente, o que corresponde a uma diluição. Neste caso, a amostra ocupa uma maior fração do percurso analítico, o que é equivalente ao emprego de uma alça de amostragem mais longa, e isso aumenta a dispersão. É conveniente que se conheça em que extensão a intensidade do fluxo confluyente afeta a magnitude da medida.

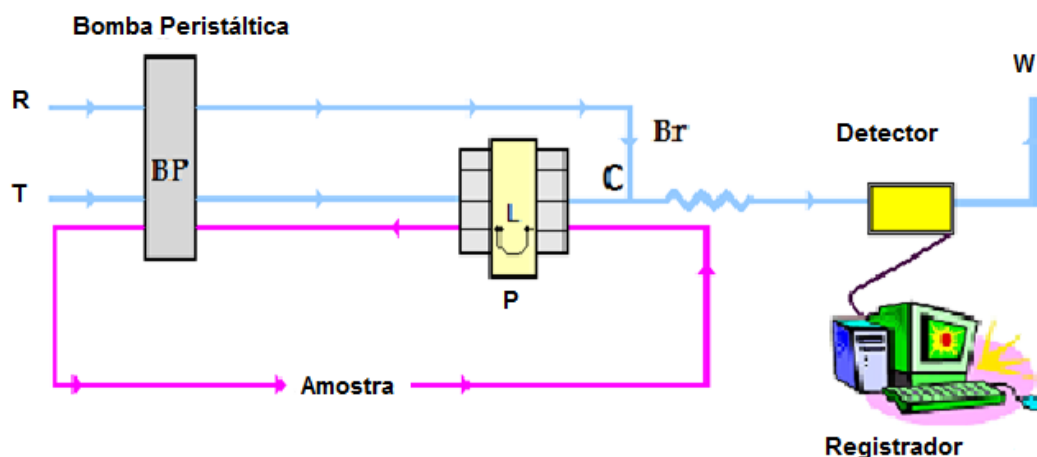


Figura 12 - Representação esquemática de um sistema de análise por injeção em fluxo por confluência, T: fluxo carregador; R: reagente; BP: bomba peristáltica; I: injetor; L: alça de amostragem; Br: bobina reacional; A: amostra; C: entrada de reagente em confluência; detector; W: descarte; registrador.

Fonte: O autor, 2013.

Nos últimos anos têm surgido novas técnicas de análise em fluxo, dentre estas se destacam: a análise por injeção em fluxo multisseringa (MSFIA, *Multi-Syringe Flow Injection Analysis*) proposta em 1999 pelo Grupo de Química Analítica, Automação e Meio Ambiente do Departamento de Química da Universidade das Ilhas Baleares (CERO; PONS, 2006; RUZICKA, 2000). Os sistemas Lab-on-valve (LOV) proposto

por Ruzicka (RUZICKA; HANSEN, 1988) e o sistema multibomba (MPFS, Multi-Pumping Flow System) proposto por Lapa (LAPA et al., 2002).

Pesquisas são realizadas no sentido de aperfeiçoamento de técnicas e métodos de análises, visando à minimização da intervenção humana na manipulação de soluções e conseqüentemente, com a diminuição de erros resultantes de diferentes fontes. Os elevados números de amostras laboratoriais em áreas como análises clínicas e ambientais, aliados à necessidade de técnicas rápidas e confiáveis operando durante longos períodos, levaram a crescente necessidade de automatizar procedimentos analíticos (RUZICKA; HANZEN, 1975).

A automação dos sistemas de análise em fluxo tem se mostrado atraente por melhorar o desempenho do método. Segundo Pasquini e Faria, quatro pontos nos sistemas FIA são passíveis de serem automatizados: (1) injeção da amostra, (2) apresentação de amostra para a análise, (3) controle do detector e (4) a aquisição dos dados de interface (BERGAMIN; REIS; ZAGATTO, 1978).

As vantagens marcantes obtidas com automação estão na economia, visto que instrumentos automatizados tendem a diminuir os custos no laboratório, oferecem maior reprodutibilidade dos resultados, além de possibilitarem uma velocidade de aquisição maior quando comparado aos sistemas manuais. A melhoria na precisão pode ser conferida à alta reprodutibilidade no tempo das seqüências de operação dos instrumentos automatizados (RUZICKA; HANSEN, 1975).

## **2.4 Otimização univariada e multivariada de processos em química analítica**

Quando se pretende desenvolver uma metodologia analítica, a escolha do planejamento experimental depende do estudo a ser realizado, como as limitações e as condições do experimento em estudo.

Uma das primeiras etapas a fazer no planejamento de um experimento, é determinar quem são os fatores e quem são as respostas de interesse, conforme mostrado na Figura 13, para o sistema que se deseja estudar.

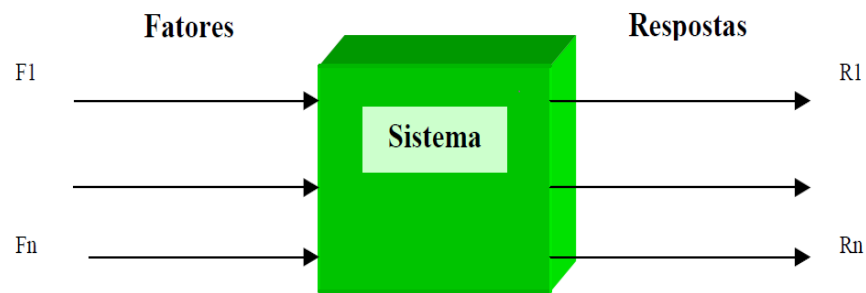


Figura 13 - Diagrama de blocos interligando os fatores às respostas.  
Fonte : Barros Neto; Scarmínio; Bruns, 1995.

Para que um planejamento não seja inviável, é necessário conhecer as condições do sistema, sua complexidade, número de fatores envolvidos, limitações impostas. Um planejamento construído através de informações adicionais pode produzir modelos que descrevam melhor os parâmetros do sistema. A otimização destes parâmetros experimentais é um fator importante e, possivelmente, uma das etapas mais críticas do trabalho científico. Nesta etapa do processo são consumidos tempo e grande quantidade de reagentes e trabalho, principalmente em se tratando de uma otimização univariada (BARROS; NETO; SCARMINIO, 1996).

A técnica univariada, classificada como um método sequencial, onde, fixam-se os fatores que estão sendo estudados em um certo nível, menos um deles. O fator não fixado é variado até que se encontre a melhor resposta, passando então este fator a ser fixado e um novo fator é variado. O processo é repetido até que todos os fatores tenham sido adequados para fornecer a melhor resposta. A otimização univariada, tem o inconveniente de não só consumir tempo, reagentes, como também negligencia as interações existentes entre os fatores. Os resultados obtidos podem não corresponder às condições que resultam a um valor ótimo verdadeiro. Dentro dos sistemas químicos. Geralmente os fatores estão diretamente correlacionados, interagindo por meio de mecanismos que geram efeitos simultâneos ou contrários. Quando tal fato é ignorado, o processo de otimização apresenta pouco valor (IMANDI et al., 2007). Quando um processo é desenvolvido por otimização univariada, um ciclo de variações de experimento não é suficiente para definir precisamente o melhor resultado (ótimo). Assim, devem ser realizados tantos ciclos quantos forem necessários até avaliar que não ocorre melhora no resultado da medição (EIRAS; CUELBAS; de ANDRADE, 1994).

Este tipo de procedimento (otimização univariada) é provavelmente o método de otimização mais comum em química. A otimização aplicada aos métodos analíticos tem passado por mudanças perceptíveis. A utilização de técnicas multivariadas no desenvolvimento de procedimentos analíticos, vem se difundindo e demonstrando sua utilidade em diversos campos da ciência, principalmente nos estudos envolvendo processos biotecnológicos, processos químicos, sínteses orgânicas, psicologia e otimização de processos industriais (ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

Nos métodos de otimização multivariada duas ou mais respostas são relacionadas com o fator de interesse. Esses métodos possibilitam análises mesmo estando na presença de interferentes e determinações simultânea, fazendo com que seja uma alternativa, quando métodos univariados não podem ser aplicados (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2003).

As principais vantagens da otimização multivariada em relação a univariada são: o menor número de experimentos requeridos, menor tempo de execução, menor consumo de reagentes e maior confiabilidade nos resultados (SKOOG; WEST; HOLLER, 1996).

#### 2.4.1 Planejamento Fatoriais de Dois Níveis

Os planejamentos fatoriais de dois níveis são utilizados em experimentos iniciais, quando se deseja estudar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência, sendo que em cada conjunto de experimentos, onde são investigadas todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável (BARROS NETO et al., 1996). Em um planejamento fatorial, a influência de todos os fatores experimentais e de suas interações, podem ser estudadas. Se os fatores são explorados em 2 níveis é possível codificá-los usando os sinais (+), para o nível superior e (-), para o nível inferior, podendo ser incluído um nível zero (0) como centro nos quais todos os fatores estão em seu valor médio. Com as combinações dos  $k$  fatores investigados em dois níveis, têm-se um planejamento composto de  $2^k$  experimentos.

Os conjuntos de experimentos são executados de forma aleatória para não interferir nos resultados através de interpretações erradas. Os planejamentos fatoriais de dois níveis para 2, 3 e 4 fatores experimentais estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Planejamento Fatorial de dois níveis para dois fatores (a), três fatores (b) e quatro fatores (c).

Exp	Fatores Experimentais								
	2 Fatores		3 Fatores			4 Fatores			
	X <sub>1a</sub>	X <sub>2a</sub>	X <sub>1b</sub>	X <sub>2b</sub>	X <sub>3b</sub>	X <sub>1c</sub>	X <sub>2c</sub>	X <sub>3c</sub>	X <sub>4c</sub>
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	+	-	-	+	-	-	-
3	-	+	-	+	-	-	+	-	-
4	+	+	+	+	-	+	+	-	-
5			-	-	+	-	-	+	-
6			+	-	+	+	-	+	-
7			-	+	+	-	+	+	-
8			+	+	+	+	+	+	-
9						-	-	-	+
10						+	-	-	+
11						-	+	-	+
12						+	+	-	+
13						-	-	+	+
14						+	-	+	+
15						-	+	+	+
16						+	+	+	+

Fonte: NETO, 1995.

Através da aplicação do planejamento fatorial, é possível obter informações dos efeitos individuais e das interações de cada fator relacionado ao sistema. Neste caso, o efeito é definido como a mudança ocorrida na resposta quando se passa do nível inferior (-) para o nível superior (+), podendo ser classificado em efeitos principais (causado por um dos fatores) e efeitos de interação (causado pela interação entre fatores, podendo ser de segunda, terceira ou de ordem superior) (ZAMORA et al., 2005).

O número de experimentos é dado por  $2^k$ , e que o número de ensaios necessários para a execução de um planejamento fatorial completo aumenta rapidamente com  $k$ , pode-se dizer que para seis fatores seriam  $2^6 = 64$  ensaios. Assim, quando se deseja apenas fazer uma triagem inicial de muitos fatores, é vantajoso aplicar um planejamento fatorial incompleto (fracionário).

Werkema & Aguiar (1996) e Barros Neto; Scarmínio; Bruns (1995) explicam que os planejamentos fracionários são possíveis e válidos, quando um efeito de uma variável é dependente do nível de outra, diz-se que estas variáveis interagem e é

possível calcular o efeito de interação entre elas. O número de efeitos de interações de ordem elevada aumentar com o número de fatores, esses efeitos podem ser destituídos de qualquer importância experimental por serem, na maioria das vezes, valores pequenos. Além disso, quando o número de fatores aumenta, crescem as chances de que um ou mais fatores não afetem significativamente a resposta, seja por meio dos efeitos principais, seja por meio de efeitos de interações (BARROS NETO; SCARMINIO, 1996).

Os planejamentos fatoriais fracionários ou completos com dois níveis fornecem equações resultantes de primeira ordem (Equação 2) que expressam a relação entre os fatores estudados e a resposta, como segue:

$$Y = a + bA + cB \quad (2)$$

sendo:

- Y é a resposta experimental;
- A e B fatores a serem otimizados;
- a termo independente;
- b e c representam coeficientes dos termos lineares.

Os valores obtidos usando a equação linear mostram apenas uma tendência dos efeitos dos fatores na resposta. Usando estes modelos, fica impossível obter as condições experimentais ótimas (BARROS NETO; SCARMINIO, 1996).

Utilizando as funções polinomiais de segunda ordem, é possível obter maior e melhor informação que os modelos de ordem primária, pois elas definem a influência dos fatores a serem otimizados sobre a resposta, possibilitando ainda a obtenção de um ponto ótimo. Para ser possível a determinação do ponto ótimo há a necessidade de que a função polinomial contenha termos quadráticos de acordo com a equação quadrática (equação 3) demonstrada abaixo (BARROS NETO; SCARMINIO, 1996).

$$Y = a + bA + cB + dA^2 + eB^2 + fAB \quad (3)$$

onde, *d* e *e* são os coeficientes dos termos quadráticos e *f* é o coeficiente do termo de interação, onde os termos são semelhantes aos da equação 02.

Com o intuito de se obter a condição ótima experimental e de posse dos resultados obtidos na etapa de triagem, realizam-se planejamentos mais completos que fornecem equações quadráticas. Os dois principais planejamentos utilizados são: (a) planejamento com ponto central mais estrela (CCP), também conhecido como planejamento estrela (BARROS NETO; SCARMINIO, 1996) e (b) planejamento ou matriz de Doehlert (RUZICKA, 2000). A aplicação destes planejamentos inclui um grupo de técnicas matemáticas/estatísticas, que permite selecionar a combinação de níveis ótimos na obtenção da melhor resposta para uma dada situação através de modelos matemáticos de segunda ordem (BARROS NETO; SCARMINIO, 1996).

#### 2.4.2 Planejamento de Doehlert

A otimização utilizando a Matriz de Doehlert é uma opção bastante interessante para planejamentos de segunda ordem, pois é necessário um menor número de experimentos quando comparado ao planejamento CCD para atingir a região ótima. Além de ser uniforme, seus pontos experimentais são igualmente espaçados em círculos, esferas ou hiperesferas concêntricas (DOEHLERT, 1970). Neste planejamento o número de níveis não é o mesmo para todas as variáveis. Por exemplo, em um planejamento Doehlert com duas variáveis, uma variável será estudada em 5 níveis enquanto a outra em 3, formando um hexágono. Esta propriedade permite a livre escolha de quais fatores serão avaliados em um número maior ou menor de níveis (DOEHLERT, 1970). O planejamento usando matriz de Doehlert apresenta uma estrutura adequada para a aplicação da MSR (superfície de resposta) permitindo a estimativa dos parâmetros do modelo quadrático e a construção de planejamentos sequenciais.

O planejamento matriz de Doehlert (TEÓFILO; FERREIRA, 2006), tem uma propriedade característica importante com relação ao número de níveis que cada fator possui. Com quatro fatores, por exemplo, o número de níveis são: 5, 7, 7 e 3. Assim é possível avaliar os fatores considerados mais importantes, ou seja, que apresentam efeitos mais pronunciados em um número maior de pontos do espaço estudado (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996).

Para um planejamento Doehlert com 3 fatores ( $k = 3$ ) forma um cuboctaedro (poliedro com faces quadradas e triangulares). São necessários 13 conjuntos de experimentos. Como  $p$  (numero de coeficientes) é 10, o valor de eficiência é de 0,77.

Para um mesmo número de fatores ( $K=3$ ), no planejamento Composto Central, o  $N$  é 15 e  $p = 10$  obtendo assim uma eficiência de 0,6790.

A aplicação do planejamento Doehler mostra-se mais adequado e vantajoso em relação ao planejamento Composto Central, devido principalmente ao menor número de experimentos requeridos e à possibilidade de empregar um número maior e mais extenso de níveis para aqueles fatores mais significativos ou problemáticos. A utilização do planejamento fatorial em conjunto com matriz de Doehlert, vem sendo empregado como uma ferramenta estatística importante no desenvolvimento de métodos analíticos envolvendo a otimização destes sistemas. A Figura 14 representa a distribuição dos pontos para o planejamento Doehlert com dois fatores (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996).

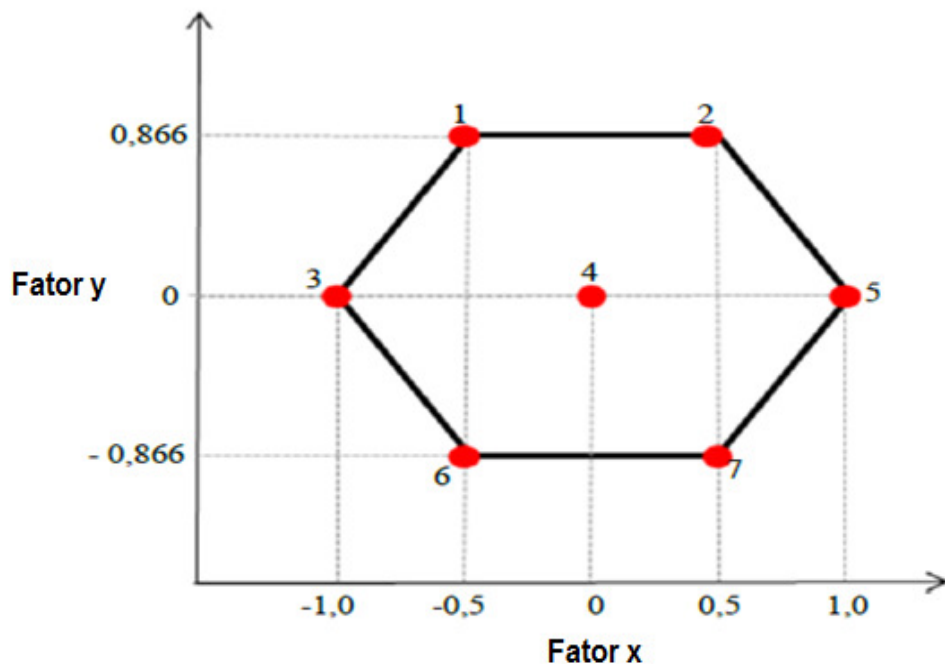


Figura 14 - Distribuição dos pontos experimentais de uma matriz Doehlert para otimização de dois fatores representado por um hexágono regular.

Fonte: LUNDSTEDT et al., 1998.

Na construção do modelo, o número de experimentos ( $N$ ) necessários é dado por  $K^2 + C_0$  onde  $K$  é o número de fatores e  $C_0$  é o número de experimentos no ponto central. Cada modelo é definido de acordo com o número de fatores e os valores codificados da matriz experimental, sendo a relação entre os valores codificados e os reais dado pela Equação 4 (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, 2003).

$$C_i = \frac{(X_i - X_i^0)\alpha}{\Delta X_i} \quad (4)$$

onde o  $C_i$  é o valor codificado para o nível do fator  $i$ ,  $X_i$  é o seu valor experimental,  $X_i^0$  é o valor experimental no ponto central,  $\Delta X_i$  é a distância entre o valor experimental no ponto central e o experimental no nível superior ou inferior e  $\alpha$  é o valor limite codificado para cada fator.

A Tabela 2 demonstra os valores codificados das matrizes do planejamento Doehlert para dois, três e quatro fatores.

Tabela 2 – Matriz de Doehlert para os níveis codificados para dois, três e quatro fatores.

Exp.	Fatores Experimentais – Matriz de Doehlert								
	2 Fatores		3 Fatores			4 Fatores			
	1a	2 <sup>a</sup>	1b	2b	3b	1c	2c	3c	4c
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	1	0	0	1	0	0	0
3	0,5	0,866	0,5	0,866	0	0,5	0,866	0	0
4	-1	0	0,5	0,289	0,817	0,5	0,289	0,817	0
5	-,05	-0,866	-1	0	0	0,5	0,289	0,204	0,719
6	0,5	-0,866	-0,5	-0,866	0	-1	0	0	0
7	-,05	0,866	-0,5	-0,289	-0,817	-0,5	-0,866	0	0
8			0,5	-0,866	0	-0,5	-0,289	-0,817	0
9			0,5	-0,289	-0,817	-0,5	-0,289	-0,204	-0,719
10			-0,5	0,866	0	0,5	-0,866	0	0
11			0	0,577	-0,817	0,5	-0,289	-0,817	0
12			-0,5	0,289	0,817	0,5	-0,289	-0,204	-0,719
13			0	-0,577	0,817	-0,5	0,866	0	0
14						0	0,577	-0,817	0
15						0	0,577	-0,204	-0,719
16						-0,5	0,289	0,817	0
17						0	-0,577	0,817	0
18						0	0	0,613	-0,719
19						-0,5	0,289	0,204	0,719
20						0	-0,577	0,204	0,719
21						0	0	-0,613	0,719

Exp: Número de experimentos.

Fonte : LUNDSTEDT, L et al., ( 1998 p. 40 ).

A resposta experimental obtida a partir dos planejamentos citados acima fornece uma função polinomial que pode ser perfeitamente empregada na construção das superfícies de resposta. Para obtenção das condições de ótimo a partir das superfícies, basta derivar à equação obtida do planejamento em função do fator de interesse e igualar a zero (LUNDSTEDT et al., 1998).

### 2.4.3 Aplicações da Matriz de Doehlert em Química Analítica

Segue abaixo algumas aplicações da Matriz de Doehlert (FIGURA 15) em Química Analítica: análise de sulfetos em água (LIMA, 2009), determinação de cobalto por análise em fluxo (CASSELLA et al., 2001), otimização de procedimentos cromatográficos (BOURGUIGNON, 1993), estudo dos fatores que influenciam a determinação de molibdênio por ETAAS (BENZO et al., 1993), determinação de arsênio em amostras de petróleo (CASSELLA et al., 2001), otimização de um sistema de pré-concentração em linha para a determinação de zinco por ICP - OES (ZOUAGH et al., 2000), otimização de variáveis experimentais em espectrofotometria em fase sólida (MOLINA et al., 1998; NECHAR et al., 1995), otimização de variáveis em determinações espectrofluorimétricas (CAGICAL et al., 2001; GARCIA et al., 2001), estudo de fatores experimentais em uma determinação voltamétrica (FURLANETTO et al., 2000), investigação de efeitos matriz em ICP - OES (GROTTI et al., 2000), entre outros.

Em função da complexidade dos cálculos envolvidos para processar os dados analíticos obtidos, nos ensaios experimentais baseados na matriz de Planejamento Doehlert, como: equação que representa o modelo estatístico, gráficos de superfícies de resposta e determinação das coordenadas do ponto crítico, programas estatísticos podem ser utilizados.

Neste trabalho os dados foram processados manualmente utilizando o Software Excel<sup>®</sup>.

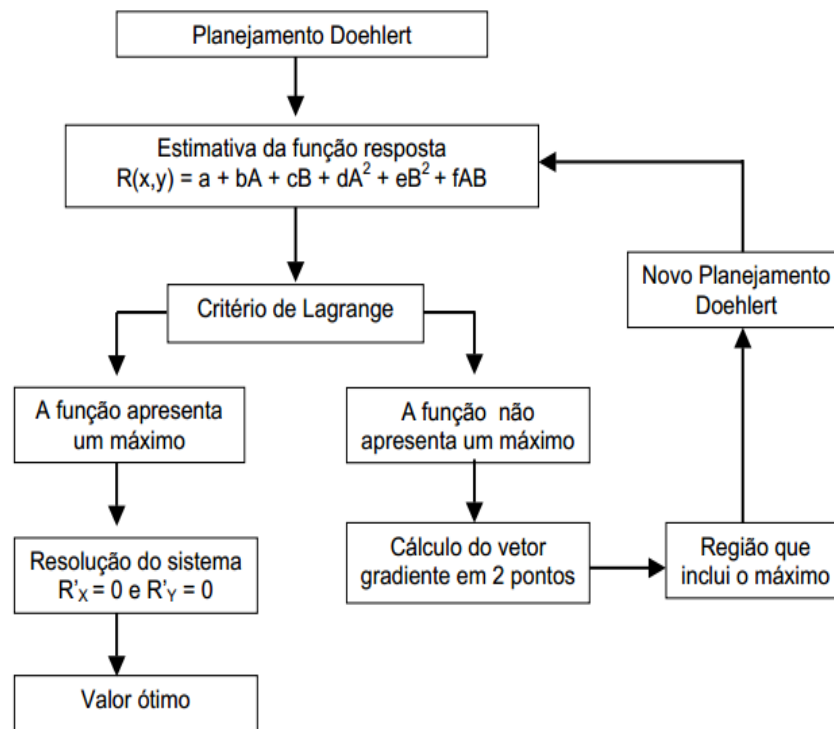


Figura 15 - Diagrama de fluxo para aplicação de Planejamento Doehlert na otimização de métodos analíticos.  
Fonte: BEZERRA, 2003.

#### 2.4.4 Análise de superfície de respostas

A metodologia de superfície de resposta (MSR) apresenta uma grande aplicação na pesquisa, pois é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais, foi introduzida por E.G.P. Box na década de 1950. Ela considera vários fatores em níveis diferentes e as interações correspondentes entre esses fatores e seus níveis, além de utilizar dados quantitativos de um desenho experimental para determinar e ao mesmo tempo solucionar equações multivariadas (BARROS NETO; SCARMINIO, 1996). Essas equações podem ser representadas graficamente como superfícies de resposta, que podem ser usadas de três formas: descrever como as variáveis em teste afetam as respostas; para determinar as interações entre as variáveis em teste; e para descrever efeitos combinados de todas as variáveis em teste sobre a resposta (MONTGOMERY, 1984). A metodologia de superfície de resposta (MSR) é um processo realizado em quatro etapas (BRITO et al., 2008):

1º - Passo: identificar até 05 fatores que sejam críticos para o estudo, neste primeiro instante o pesquisador tem que conhecer (descobrir) os fatores responsáveis pela maior variação de influência no processo;

2º - Passo: Consiste na definição da faixa em que os fatores estão contidos. Se a faixa estabelecida for muito grande, é possível que o ponto ótimo não seja encontrado;

3º Passo: Escolha do desenho apropriado conforme a definição do planejamento. De acordo com o desenho escolhido, é estabelecida uma ordem para a realização dos experimentos. Ao varrer toda a faixa escolhida para realização dos experimentos, enfatiza - se os pontos mais próximos ao ponto médio (ponto central), ao mesmo tempo em que são reduzidos os conjuntos de experimentos;

4º Passo: Analisar os dados obtidos em cada conjunto de experimentos, utilizando um programa computacional apropriado, onde as conclusões dos experimentos poderão ser confirmadas posteriormente na condição de ótima (BRITO et al., 2008).

### 3 JUSTIFICATIVA

A indústria farmacêutica veterinária brasileira está em crescente produtividade, especialmente em relação aos medicamentos que apresentam em suas formulações antibióticos, o que se deve ao seu crescente uso na pecuária.

Assim, novas metodologias para a análise e determinação de princípios ativos são necessárias. Dentre as características desejáveis para as novas metodologias podem ser mencionadas a rapidez, o baixo custo, a precisão e a seletividade. Adicionalmente, a geração de menor quantidade de resíduos (Química Verde) está dentro das diretrizes mundiais para um desenvolvimento sustentável.

Dessa maneira, é de extrema importância o desenvolvimento de um método de análise para determinação de estreptomicina em amostras de antibióticos de uso veterinário, devido ao crescente consumo deste antimicrobiano.

Este fármaco foi selecionado devido à importância farmacológica e por ser de amplo consumo na linha veterinária.

#### **4 OBJETIVOS**

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) utilizando como técnica de quantificação por espectrofotometria molecular na região do visível e técnicas multivariadas como o planejamento fatorial fracionário e matriz de Doehlert na otimização. O método foi utilizado para determinação de estreptomicina em amostras de forma farmacêutica sólida de antibióticos usada para tratamento de animais de pequeno, grande porte e animais silvestres.

## 5 PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Instrumentação e Acessórios

As medidas de massa foram realizadas uma balança analítica Metler Toledo, modelo HD com precisão de  $\pm 0,1$  mg.

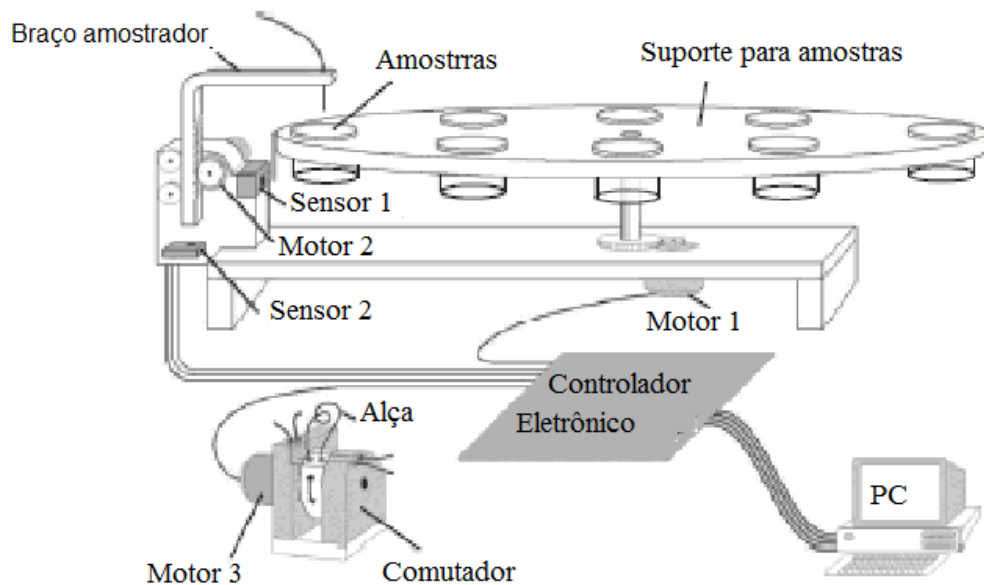


Figura 16 – Esquema geral do amostrador automático e o injetor comutador usado no método de análise em fluxo para determinação de estreptomicina.  
Fonte: FIGUEIREDO et al., (2006).

As medidas no sistema de análise em fluxo foram efetuadas utilizando um espectrofotômetro da Biospectro modelo SP 220 (UV – Visível), e uma cela de fluxo construída no laboratório (FIGURA 17) com 1,0 cm de caminho ótico e com 0,48 mL de volume interno. Para a introdução das amostras empregou-se um auto-amostrador (Figura 16) desenvolvido em nosso laboratório (FIGUEIREDO et al., 2006).



Figura 17 - Célula de fluxo de 0,48mL, confeccionada no Laboratório de química analítica da UNIFAL.

Fonte: O autor, 2013.

Para propulsão dos fluidos empregou-se uma bomba peristáltica Ismatec (Zurique-Suíça) modelo ISM931C de oito canais. Os tubos de propulsão utilizados foram de Tygon<sup>®</sup> de diferentes diâmetros internos.

Foram empregados tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno para confecção das bobinas helicoidais, alças de amostragem e linhas de condução de soluções de referência, amostras e reagentes.

A água utilizada nos experimentos foi purificada em sistema Milli-Q Academic (Millipore).

Para o aquecimento da bobina R<sub>1</sub> (FIGURA 18) no sistema de análise em fluxo, foi utilizado um aquecedor Fisoton modelo 752A.

O equipamento utilizado para o método comparativo foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca Shimadzu modelo LC 20A, com coluna de C<sub>18</sub> de 25 cm x 5,6 mm. Para a fase móvel, foi usado uma solução tampão pH 2,8 de

ácido fosfórico 1,36% v/v (Vetec), acetonitrila 18% v/v (Aldrich), trietanolamina 0,35% v/v (Vetec), sulfato de sódio 0,71% v/v (Vetec) e água. A velocidade de fluxo foi de 0,5mL/minuto, temperatura de 30°C e o volume de amostra de 25 µL. As condições operacionais para CLAE, estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições operacionais do cromatógrafo para análise da estreptomicina.

Parâmetros	Condições HPLC
Coluna	C <sub>18</sub>
Eluente	18% acetonitrila 82% solução solvente
Vazão de fluxo	0,5 mL min <sup>-1</sup>
Temperatura	30°C
Volume injetado	25µL

Fonte: Farmacopeia Americana XXVII,2010.

## 5.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados na execução deste trabalho foram de grau analítico e todas as soluções preparadas em água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Brasil). A fim de minimizar contaminações das amostras, todas as vidrarias foram mantidas em solução de HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) durante 24 h. Posteriormente estas foram enxaguadas com água destilada e secas em ambiente livre de poeira.

Uma solução alcalina (0,5 mol L<sup>-1</sup>) foi preparada pela dissolução de 20 g NaOH (Vetec) em um litro de água.

A solução de sulfato de ferro amoniacal (Vetec) foi preparada em uma concentração de 3,8% (m/v) em meio ácido (ácido sulfúrico 0,5 molL<sup>-1</sup> (Vetec)).

A solução aquosa estoque de estreptomicina na concentração de 1,5 g L<sup>-1</sup> foi preparada a partir de estreptomicina (Sigma Aldrich).

Para os estudos de interferentes, foram preparadas soluções binárias contendo o analito e vários antibióticos (interferentes) comuns, tais como: Benzilpenicilina de potássio, Benzilpenicilina procaína e Benzilpenicilina benzatina, todos eles adquiridos a partir de Sigma Aldrich (Alemanha). As soluções dos interferentes foram preparadas na proporção de 1/1, 1/5, 1/10 e 1/100 de benzilpenicilina de potássio, benzilpenicilina procaína e benzilpenicilina benzatina, respectivamente.

### 5.2.1 Preparo das amostras farmaceuticas

Para a análise de quatro amostras de medicamentos da linha veterinária contendo estreptomicina e os concomitantes, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica e benzilpenicilina benzatina, foram pesadas em balança analítica, massas dos medicamentos contendo exatamente 800 mg de estreptomicina. As massas foram transferidas para balões volumétricos, solubilizadas em água deionizada, sendo seus volumes completados para 1 L, obtendo-se uma solução de concentração de  $800 \text{ mg L}^{-1}$  de estreptomicina.

Alíquotas das amostras foram inseridas no percurso analítico utilizando um injetor comutador automático para determinação da concentração do fármaco por análise em injeção em fluxo.

O método recomendado descrito na Farmacopeia Americana (USP 2007) foi empregado para validar o procedimento em fluxo proposto. Nesse procedimento por CLAE, foram inseridas 25  $\mu\text{L}$  das amostras diluídas na concentração de  $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ .

## 5.3 Estudos Preliminares

### 5.3.1 Espectro de absorção molecular

Efetou-se uma varredura de 400 a 800 nm com intuito de obter o espectro de absorção molecular do analito. Este estudo foi realizado usando soluções de NaOH  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (CR<sub>1</sub>), sulfato de ferro amoniacal 2,5 % (m/v) em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (CR<sub>2</sub>) e estreptomicina na concentração de  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  preparada em meio aquoso. Para essa varredura empregou-se o espectrofotômetro modelo Biospectro SP 220 (UV – Visível).

## 5.4 Sistemas de análise em fluxo

O diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo para determinação de estreptomicina é mostrado na Figura 18.

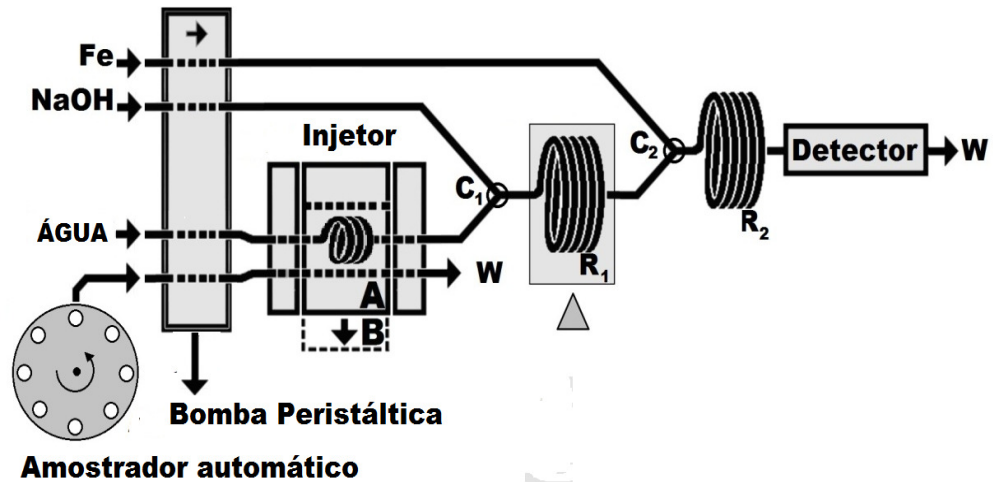


Figura 18 - Modelo esquemático do sistema de análise em fluxo para determinação de estreptomicina, amostrador automático; bomba peristáltica; injetor; A: alça de amostragem (362 cm), vazão de  $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $C_1$ : confluência para adição de NaOH  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  ( $CR_1$ ), vazão de  $2,4 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $R_1$ : bobina de aquecimento (760 cm) mergulhada em banho térmico mantido a temperatura de  $92^\circ\text{C}$ ;  $C_2$ : confluência para adição de sulfato de ferro amoniacal  $3,8 \text{ \% m/v}$  ( $CR_2$ ), vazão de  $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $R_2$ : bobina reacional dos reagentes (100 cm); D: detector; W: descarte da amostra.

Fonte: O Autor, 2013.

Uma alíquota da amostra é injetada no fluxo transportador através de um injetor proporcional. A adição dos reagentes ocorre por confluência. O primeiro reagente NaOH ( $CR_1$ ), é adicionado no ponto  $C_1$  logo após o injetor, permitindo que cada fração da amostra receba porções iguais deste reagente. Em um pH de 12,5 as guanidinas são liberadas da estrutura da estreptomicina. Após, a amostra é encaminhada para um banho térmico mantido a temperatura de  $92^\circ\text{C}$ , onde foi instalada uma bobina  $R_1$  (bobina de aquecimento). No ponto  $C_2$ , é feita a introdução do sulfato de ferro amoniacal ( $CR_2$ ), o qual reage com os íons guanidínicos liberados da estrutura da estreptomicina (SCHENCK; ESPIELMAN, 1945), gerando assim, um complexo colorido com os íons ferro bivalentes que é detectado em  $520 \text{ nm}$  em um espectrofotômetro (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; SCHENCK; ESPIELMAN, 1945).

Todo o processo é controlado por um computador através de software escrito em linguagem Visual Basic ® (FIGUEIREDO et al., 2006).

### 5.5 Procedimento de Otimização

Os fatores pertinentes ao sistema proposto são: concentração da solução de sulfato de ferro ( $CR_2$ ), concentração da solução de hidróxido de sódio ( $CR_1$ ), volume da alça de amostragem, comprimento da bobina de aquecimento ( $R_1$ ), comprimento da bobina reacional dos reagentes ( $R_2$ ), temperatura, vazão de fluxo.

Inicialmente fez se uma revisão bibliográfica para verificar a possibilidade de fixar alguns fatores e diminuir o número de experimentos no estudo. Assim, em todo processo de otimização utilizou-se o sistema de análise em fluxo conforme descrito na Figura 18.

O parâmetro utilizado como resposta analítica foi a altura do sinal transiente de absorbância. Os dados experimentais foram processados no programa STATISTICA 7,0 (Statsoft, Tulsa USA), estabelecendo significância estatística com nível de confiança aleatória 95%.

Na triagem das variáveis do sistema proposto utilizou um planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$ . Os cinco fatores selecionados para estudo foram: concentração da solução de NaOH ( $CR_1$ ), concentração da solução de sulfato de ferro ( $CR_2$ ), volume da alça de amostragem (AA), comprimento da bobina de aquecimento  $R_1$ , comprimento da bobina  $R_2$ . Os valores para os 16 experimentos em duplicata encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Níveis dos fatores no planejamento Fatorial Fracionário  $2^{5-1}$

Sigla	Fator	Níveis	
		Mínimo ( - )	Máximo ( + )
$CR_1$	NaOH molL <sup>-1</sup>	0,25	0,50
$CR_2$	sulfato de ferro (%m/v)	0,50	2,0
AA	Alça de amostragem cm	126	377
$R_1$	Bobina de aquecimento $R_1$ (cm)	250	500
$R_2$	Bobina $R_2$ (cm)	100	300

Fonte: O Autor, 2013.

### 5.5.1 Planejamento Matriz de Doehlert

Após a triagem, verificou-se que três variáveis apresentaram efeitos significativos, essas foram elencadas para a etapa seguinte de otimização. Na otimização das três variáveis foi utilizado um planejamento de Doehlert. O planejamento é mostrado nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Níveis codificados e reais da matriz de Doehlert para três fatores.

<b>Fatores</b>		<b>Níveis Codificados e Reais</b>					
Fe <sup>+2</sup>		-0,817	0	+0,817			
% (m/v)		(3,0)	(3,5)	(4,0)			
Alça	-1	-0,5	0	+0,5	+1		
(cm)	(350)	(375)	(400)	(425)	(450)		
R <sub>1</sub>	-0,866	-0,577	-0,288	0	+0,288	+0,577	+0,866
(cm)	(600)	(650)	(700)	(750)	(800)	(850)	(900)

Valores entre parênteses correspondem aos níveis reais.

Fonte: O Autor, 2013.

Tabela 6 - Conjunto de experimentos do Planejamento Matriz de Doehlert com os níveis codificados

Experimento	Alça	Bobina	[Fe <sup>+2</sup> ]
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	1	0	0
5	0,5	0,866	0
6	0,5	0,289	0,817
7	-1	0	0
8	-0,5	-0,866	0
9	-0,5	-0,289	-0,817
10	0,5	-0,866	0
11	0,5	-0,289	-0,817
12	-0,5	0,866	0
13	0	0,577	-0,817
14	-0,5	0,289	0,817
15	0	-0,577	0,817

Fonte: O Autor, 201.

## 5.6 Figuras de Mérito

### 5.6.1 Faixa de resposta e linearidade

O intervalo de concentração onde é possível construir uma curva analítica linear corresponde à faixa de resposta linear. Assim, o intervalo de aplicação de um método analítico pode ser definido como a região da curva analítica compreendida entre a concentração mais baixa, na qual é possível medir determinada espécie quantitativamente (Limite de Quantificação, LQ) até a concentração na qual a curva analítica desvia-se da linearidade (SKOOG; WEST; HOLLER, 1996).

A linearidade pode ser definida como a habilidade que uma metodologia possui de demonstrar que os resultados obtidos, em uma faixa específica, são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Desta forma,

determinou-se a linearidade considerando o coeficiente de determinação, obtido na curva analítica de sulfato de estreptomicina (BRASIL, 2003).

A curva analítica foi construída utilizando uma alça de amostragem de 362 cm de comprimento para a injeção de padrões de sulfato de estreptomicina nas concentrações  $3,15 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ ;  $6,30 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ ;  $2,5 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$ ;  $5,0 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$ ;  $7,5 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$ ;  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ;  $1,25 \text{ g L}^{-1}$  e  $1,50 \text{ g L}^{-1}$ , preparados em meio aquoso.

As condições experimentais otimizadas foram: comprimento da alça de amostragem (AA) 362 cm, concentração da solução de NaOH  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (CR<sub>1</sub>), concentração da solução de sulfato de ferro 3,8 % m/v (CR<sub>2</sub>); bobina de aquecimento R<sub>1</sub> 750cm, Bobina reacional R<sub>2</sub> 100 cm e como solução transportadora água deionizada.

### 5.6.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Na determinação de espécies químicas em baixas concentrações o cálculo dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) é de grande importância para avaliar o desempenho do método analítico. O limite de detecção é definido como a menor quantidade de analito detectável por um método. Podendo ser ainda definido como a menor quantidade que pode ser detectada estatisticamente diferente do branco.

Segundo a IUPAC (*International Union Pure and Applied Chemistry*), matematicamente os cálculos referentes ao limite de detecção e quantificação baseiam-se na razão entre o desvio padrão obtido de dez leituras do branco ( $S_{br}$ ) e o coeficiente angular da equação da curva analítica ( $b$ ), multiplicando-se o valor obtido por três obtém-se o LD (Equação 5) e multiplicando-se por dez o LQ (Equação 6) (INGLE JR; CROUCH, 1988).

$$LD = \frac{3 S_{br}}{b} \quad (5)$$

$$LQ = \frac{10 S_{br}}{B} \quad (6)$$

### 5.6.3 Frequência de Leitura (FL)

A frequência de leitura corresponde ao número de leituras que podem ser realizadas por intervalo de tempo, considerando também o tempo de limpeza inerente ao sistema FIA (CALATAYUD, 1995).

No presente trabalho, para melhores resultados, e em função do tamanho da alça de amostragem, o tempo estabelecido para o enchimento da alça de amostragem foi de 50 segundos e o tempo de leitura e limpeza do sistema de 70 segundos, perfazendo assim, 30 leituras por hora.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Estudos preliminares

Como pode ser observado na Figura 19, foi realizada uma varredura espectral utilizando uma solução contendo  $0,5\text{g L}^{-1}$  de estreptomicina com solução de NaOH  $0,5\text{ mol L}^{-1}$  e sulfato de ferro amoniacal 2,5 % (m/v), inicialmente mostrou uma maior absorbância em uma faixa de comprimento de onda em 520 nm, não sendo detectada interferência provenientes dos próprios reagentes, esse valor foi condizente com o obtido em outros trabalhos (SCHENCK; ESPIELMAN, 1945; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Assim, os experimentos referentes ao desenvolvimento do sistema foram realizados nesse comprimento de onda.

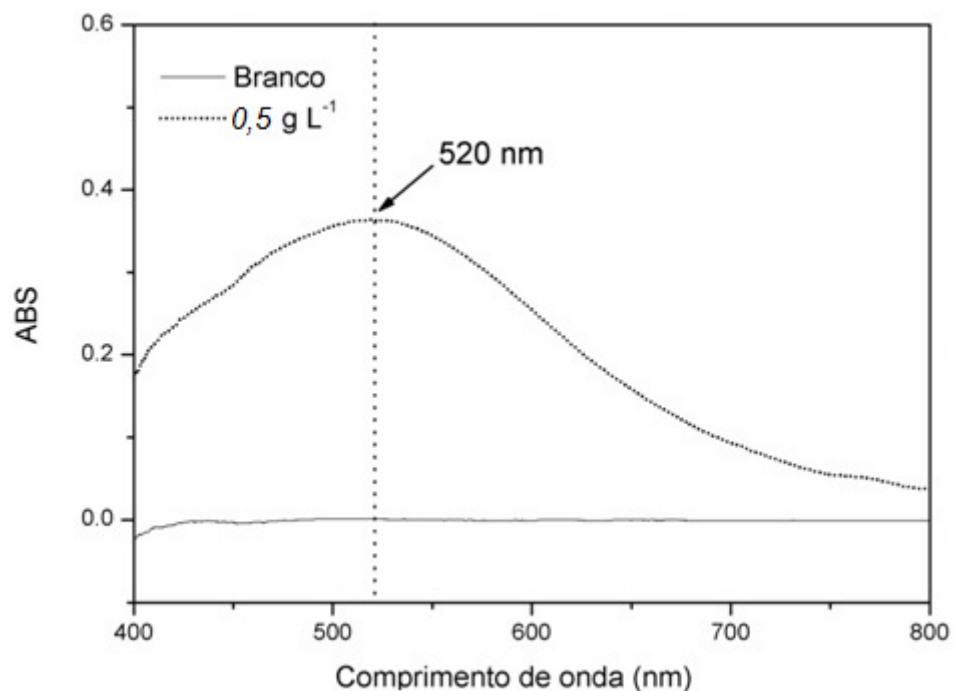


Figura 19 - Varredura espectral do composto obtido a partir da reação com  $0,5\text{ g L}^{-1}$  de estreptomicina com solução de NaOH  $0,5\text{ mol L}^{-1}$  e sulfato de ferro amoniacal 2,5 % (m/v).

Fonte: O Autor, 2013.

## 6.2 Otimização Multivariada

### 6.2.1 Planejamento fatorial de dois níveis ( $2^{5-1}$ )

O planejamento fatorial fracionário de dois níveis ( $2^{5-1}$ ) foi realizado com a intenção de investigar a influência dos fatores químicos no sistema de análise em fluxo, os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Os fatores constituintes do sistema FIA proposto foram: concentração da solução de hidróxido de sódio ( $CR_1$ ), concentração de solução de sulfato de ferro ( $CR_2$ ), volume da alça de amostragem (AA), comprimento da bobina de aquecimento ( $R_1$ ), comprimento da bobina reacional dos reagentes ( $R_2$ ) e temperatura do banho térmico. Dentre esses fatores, e com intuito de facilitar os estudos preliminares, a temperatura do banho térmico foi fixada em 92 °C. Com base em trabalhos anteriores, sabe-se que a eficiência de hidrólise da estreptomicina é diretamente proporcional à temperatura (BRENNAUER et al., 2007), assim, justifica-se o uso de 92 °C que é a temperatura da água em ebulição dentro do laboratório, portanto temperatura maiores exigiriam outro líquido no banho térmico e poderiam propiciar a formação de bolhas nas soluções aquosas do sistema, afetando diretamente o sinal analítico. Os efeitos dos 5 fatores selecionados foram investigados utilizando-se o planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$  envolvendo 16 experimentos em duplicata.

Tabela 7 – Matriz e resultados do planejamento fatorial de dois níveis  $2^{5-1}$  para determinação de sulfato de estreptomicina no sistema de análise em fluxo por confluência.

Ensaio	Fatores					Abs	±	DP
	NaOH/ Mol L <sup>-1</sup>	Fe <sup>+2</sup> /(m/v)	Alça/ μL	Bobina R <sub>1</sub> /(cm)	Bobina R <sub>2</sub> /(cm)			
1	0,25	0,50	126	250	300	0,034	±	0,002
2	0,50	0,50	377	250	100	0,050	±	0,001
3	0,25	2,0	126	250	100	0,049	±	0,002
4	0,50	2,0	377	250	300	0,072	±	0,002
5	0,25	0,50	126	250	100	0,030	±	0,001
6	0,50	0,50	377	250	300	0,104	±	0,001
7	0,25	2,0	126	250	300	0,088	±	0,001
8	0,50	2,0	377	250	100	0,140	±	0,001
9	0,25	0,50	126	250	100	0,050	±	0,003
10	0,50	0,50	377	500	300	0,110	±	0,001
11	0,25	2,0	126	500	300	0,061	±	0,028
12	0,50	2,0	377	500	100	0,171	±	0,001
13	0,25	0,50	126	500	300	0,120	±	0,001
14	0,50	0,50	377	500	100	0,245	±	0,001
15	0,25	2,0	126	500	100	0,185	±	0,007
16	0,50	2,0	377	500	300	0,310	±	0,001

Abs: Absorbância Média

DP: Desvio Padrão

Fonte: O Autor, 2013.

A Figura 20 apresenta o Diagrama de Pareto, as barras horizontais maiores que a linha vertical, dada por  $p = 0,05$ , indicam que o fator é significativo, nota-se, portanto, que todos os fatores estudados apresentam efeitos significativos no intervalo avaliado.

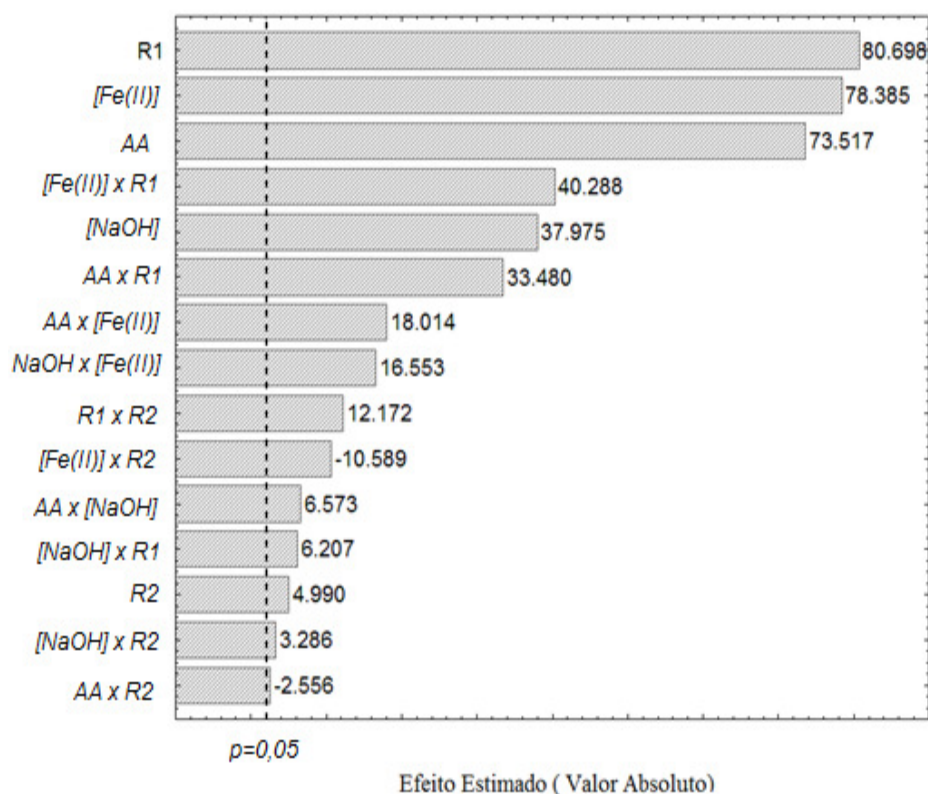


Figura 20 - Representação do Diagrama de Pareto dos efeitos para os fatores estudados, a significância dos mesmos foi avaliada com erro padrão de 5%. Onde: R<sub>1</sub> - bobina de aquecimento, Fe(II) - solução de sulfato de ferro (CR<sub>2</sub>), AA – alça de amostragem, NaOH – solução de hidróxido de sódio (CR<sub>1</sub>), R<sub>2</sub> – bobina reacional.

Fonte: O Autor, 2013.

O fator com maior influência foi o comprimento da bobina de aquecimento R<sub>1</sub>. Observa-se que quando ocorre o aumento no comprimento da bobina R<sub>1</sub> (250 cm para 500 cm) tem-se aumento no sinal analítico, que pode ser notado pelo efeito positivo (80,698). Este fato pode ser explicado pela lenta reação de desprotonação dos grupamentos guanidínicos presentes na estreptomicina pela ação da solução de hidróxido de sódio (CR<sub>1</sub>) (BRENNAUER et al., 2007).

Quanto a alça de amostragem, foi observado um efeito positivo indicando que o melhor sinal ocorre com o comprimento de 377 cm o que era esperado, pois, com o aumento desta variável, tem-se menor dispersão propiciando aumento de sinal.

Efeito positivo também foi observado quando a concentração da solução de hidróxido de sódio foi alterada de 0,25 mol L<sup>-1</sup> para 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Concentrações de solução de hidróxido de sódio da ordem de 0,5 mol L<sup>-1</sup> favorecem a desprotonação dos grupamentos guanidínicos que posteriormente reagirão com ferro (CR<sub>2</sub>) para

formar o complexo colorido. Pode ser visto que o aumento de sinal foi proporcional ao aumento da concentração da solução de hidróxido de sódio, porque ocorre a reação de deslocamento, para formar o produto colorido. Em contrapartida concentrações da solução de NaOH acima de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , acarretaram formação de precipitado, provavelmente pela formação de hidróxido de ferro (II). Assim a concentração da solução de hidróxido de sódio foi mantida em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  para os demais experimentos.

Outra variável estatisticamente significativa e com efeito positivo foi a concentração de sulfato de ferro ( $\text{CR}_2$ ), indicando que concentrações da ordem de 2 % (m/v) favorecem a reação química. Este fato pode ser comprovado pelo deslocamento do equilíbrio para a formação do complexo  $[\text{Gua}_2\text{Fe}]$ , que é responsável pela absorvância (BRENNAUER et al., 2007).

A variável  $\text{R}_2$  (bobina reacional dos reagentes) apresentou efeito muito baixo, provavelmente devido à elevada velocidade da reação entre o ferro e guanidina, não sendo significativa para o sistema, desta forma adotou-se o menor nível, a saber, 100 cm para o comprimento desta bobina.

Para todos os ensaios da Matriz de Doehlert, bem como do planejamento fatorial fracionário, a temperatura do banho foi mantida em  $90^\circ\text{C}$ , com a finalidade de acelerar o desprendimento das guanidinas da amostra e assim favorecer a reação com Fe(II), a temperatura interna na saída do banho térmico foi monitorada em  $65^\circ\text{C}$ . Vale ressaltar que em temperaturas inferiores a  $90^\circ\text{C}$  ocorria suprimento do sinal analítico uma vez que a hidrólise é comprometida. É importante relatar que as possíveis bolhas não afetaram o sinal analítico em função da geometria da cela de fluxo.

Efeito de interação significativo de segunda ordem também pode ser observado em todas as variáveis, o que justifica a utilização de otimização multivariada neste caso.

A análise dos resultados do planejamento fatorial de dois níveis informou que as variáveis alça de amostragem (AA), bobina  $\text{R}_1$  e a solução de sulfato de ferro ( $\text{CR}_2$ ) foram as mais significativas dentro dos intervalos escolhidos, e por isso essas foram elencadas para a etapa seguinte de otimização utilizando o Planejamento Matriz de Doehlert.

### 6.2.2 Planejamento Doehlert

De posse da significância estatística dos fatores investigados no planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$ , foi realizado um planejamento Doehlert para três fatores (Alça de amostragem (AA), bobina R<sub>1</sub> e solução de sulfato de ferro (CR<sub>2</sub>). Os níveis para a montagem do planejamento de Doehlert foram escolhidos tendo em vista, os experimentos de triagem, a revisão bibliográfica realizada, o conhecimento químico do sistema e sua viabilidade. A Tabela 8 apresenta os níveis reais e codificados da matriz de Doehlert.

Tabela 8 - Conjunto de experimentos e resultados do Planejamento Matriz de Doehlert para três fatores.

Ensaio	Fatores			Absorbância média
	Alça de amostragem (cm)	Bobina reacional 1 (cm)	Fe % (m/v)	
1	0 (400)	0 (750)	0 (3,5)	0,98 ± 0,04
2	0 (400)	0 (750)	0 (3,5)	1,10 ± 0,03
3	0 (400)	0 (750)	0 (3,5)	0,99 ± 0,06
4	1 (450)	0 (750)	0 (3,5)	0,90 ± 0,03
5	0,5 (425)	0,866 (900)	0 (3,5)	0,46 ± 0,01
6	0,5 (425)	0,289 (800)	0,817 (4,0)	0,64 ± 0,02
7	-1 (350)	0 (750)	0 (3,5)	0,88 ± 0,03
8	-0,5 (375)	-0,866 (600)	0 (3,5)	0,60 ± 0,02
9	-0,5 (375)	-0,289 (700)	-0,817 (3,0)	0,49 ± 0,02
10	0,5 (425)	-0,866 (600)	0 (3,5)	0,32 ± 0,01
11	0,5(425)	-0,289 (700)	-0,817 (3,0)	0,89 ± 0,04
12	-0,5 (375)	0,866 (900)	0 (3,5)	0,80 ± 0,02
13	0 (400)	0,577 (850)	-0,817 (3,0)	0,69 ± 0,03
14	-0,5 (375)	0,289 (800)	0,817 (4,0)	0,81 ± 0,04
15	0 (400)	-0,577 (650)	0,817 (4,0)	0,70 ± 0,02

Fonte: O Autor, 2013.

Entre parênteses são os valores reais e os demais são os valores codificados.

Fe: concentração da solução de sulfato de ferro (%).

### 6.2.3 Otimização por Planejamento Matriz de Doehlert para três fatores

Os valores de ótimo para concentração da solução de sulfato de ferro ( $CR_2$ ), alça de amostragem (AA) e bobina  $R_1$ , foram otimizados simultaneamente usando planejamento Doehlert (DOEHLERT, 1970).

Os dados obtidos com a realização dos experimentos que compõe a matriz de Doehlert foram avaliados com modelos lineares e quadráticos para a resposta analítica. O modelo linear está representado na equação 7:

$$\text{Abs.} = 0,79 + 0,02.(AA) + 0,19.(R_1) + 0,02.(Fe^{2+}) + 0,27.(AA).(R_1) - 0,44(AA).(Fe^{2+}) + 0,02.(R_1).(Fe^{2+}) \quad (7)$$

Tabela 9 - Análise de variância do modelo linear.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Grau de Liberdade (gl)	Media Quadrática (QM)	F calculado	F tabelado
Regressão	0,2809	6	0,0468	1,0785	3,58
Resíduo	0,3473	8	0,0434		
Falta de ajuste (faj)	0,3384	6	0,0564	12,722	19,32
Erro puro (ep)	0,0089	2	0,0044		
SQ Total	0,6282	14			

% de variação explicada pela regressão: 44,72; máxima % de variação explicada: 98,59 de SQ<sub>total</sub>.  
Fonte: O Autor, 2013.

Os dados de análise de variância (ANOVA) do modelo linear estão apresentados na Tabela 9. A razão entre  $QM_{\text{regressão}} / QM_{\text{resíduo}}$  foi de 1,0785, inferior a  $F(6;8) = 3,58$  (no nível de 95%). Este valor indica que a regressão não é significativa neste nível de confiança.

A equação 8 apresenta o modelo quadrático:

$$\text{Abs.} = 1,02 + 0,02.(AA) + 0,19.(AA)^2 + 0,02.(BR_1) - 0,13.(BR_1)^2 - 0,42.(Fe^{+2}) - 0,34.(Fe^{+2})^2 - 0,27.(AA).(BR_1) - 0,44.(AA).(Fe^{+2}) - 0,09.(BR_1).(Fe^{+2}) \quad (8)$$

A tabela 10 apresenta a análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático:

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de Planejamento Matriz de Doehlert para regressão múltipla.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Grau de Liberdade (gl)	Media Quadrática (QM)	F calculado	F tabelado
Regressão	0,5639	9	0,00627	4,8768	4,772
Resíduo	0,0642	5	0,0128		
Falta de ajuste	0,0554	3	0,0185	4,1635	19,16
Erro puro	0,0089	2	0,0044		
SQ Total	0,6282	14			

% de variação explicada pela regressão: 89,77; máxima % de variação explicada: 98,77 de  $SQ_{total}$ .  
 Fonte: O Autor, 2013.

A ANOVA do modelo quadrático está mostrada na Tabela 10 e confirma a superioridade deste modelo, uma vez que reproduz 89,77% da variação, comparado a 44,71% do modelo linear. Como pode ser observado, o  $QM_{regressão} / QM_{resíduo}$  de 4,8768 é maior que o valor observado no modelo linear (1,0785).

Além disso, a razão  $QM_{faj} / QM_{ep}$  de 4,1635 é inferior ao valor crítico de  $F(3;2) = 19,16$  ao nível de 95% de confiança, indicando que não há falta de ajuste no modelo quadrático. O melhor ajuste do modelo quadrático em relação ao linear também pode ser observado nos gráficos das respostas previstas contra as respostas observadas apresentados na Figura 21 (a) e 21 (b), que evidenciam a superioridade do modelo quadrático sobre o linear.

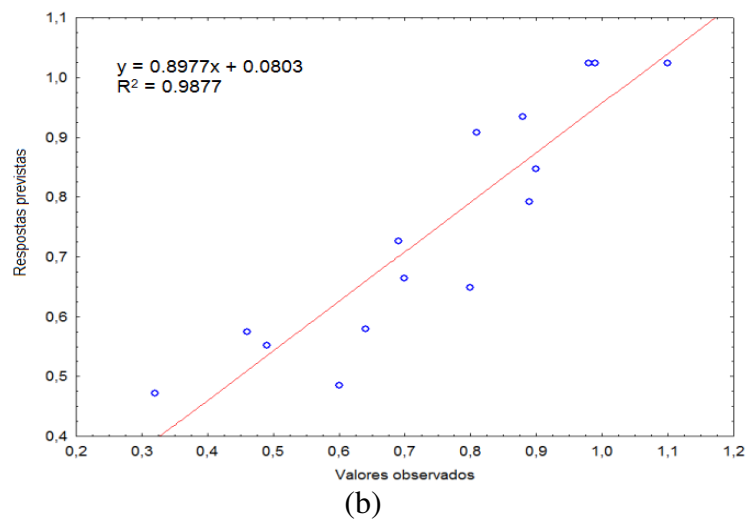
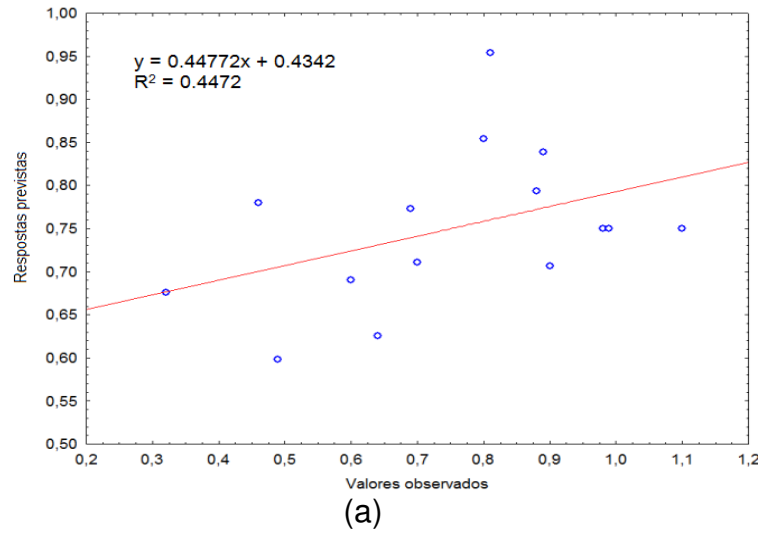


Figura 21 - Comparação das previsões dos dois modelos com os valores observados, (a) Modelo Linear e (b) modelo quadrático.  
Fonte: O Autor, 2013.

Avaliando as Figuras 22(a) e 22(b), gráficos dos resíduos, pode ser observada a melhor distribuição aleatória ao longo do eixo central (0) garantindo maior independência do modelo quadrático, seguindo uma distribuição normal em relação ao modelo linear.

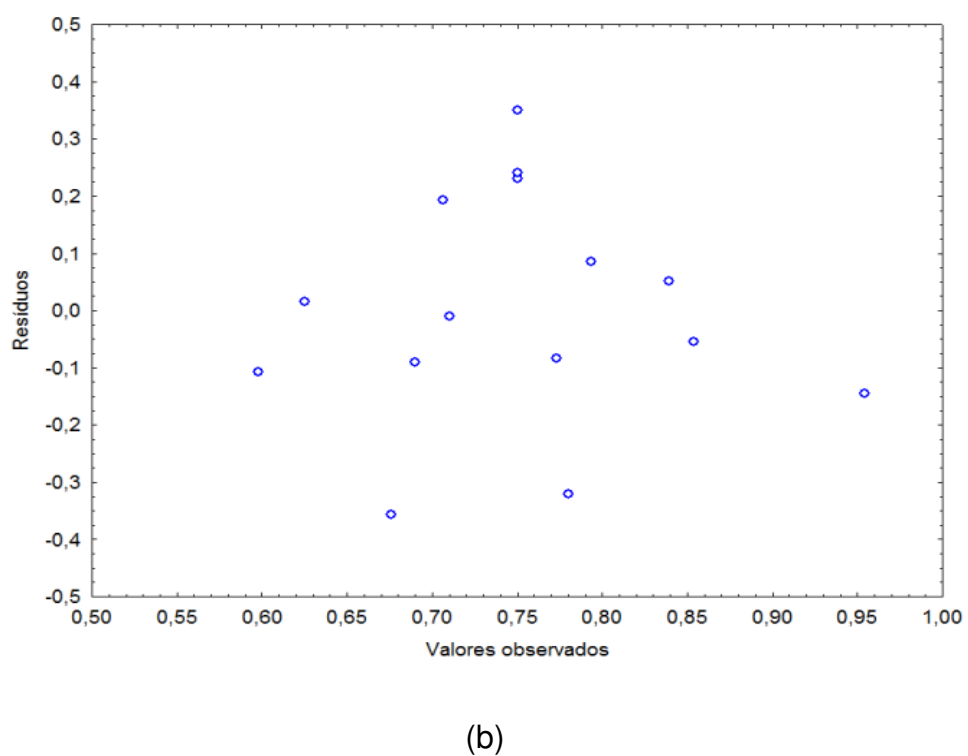
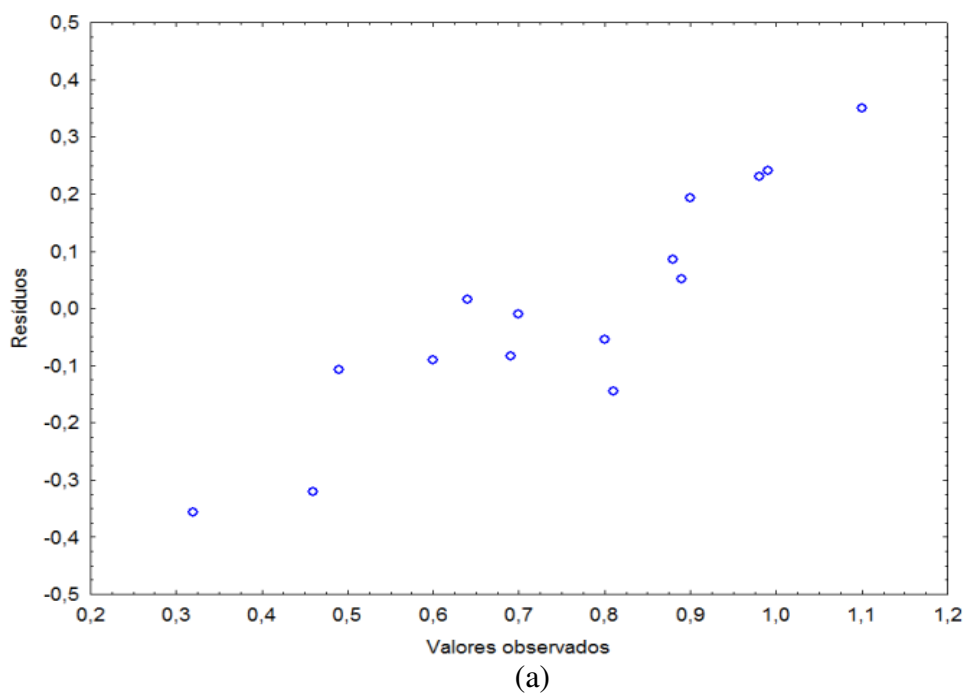


Figura 22 - Gráfico dos resíduos com a comparação das previsões dos dois modelos, (a) Modelo Linear e (b) modelo quadrático.  
Fonte: O Autor, 2013.

### 6.3 Método de superfície de Resposta

A equação 8 apresenta o modelo quadrático validado pela ANOVA, porém como se tem uma resposta e três fatores, é impossível construir superfícies em 4 dimensões. Assim, foram construídas as superfícies de respostas sempre envolvendo dois fatores e mantendo o terceiro fator fixo no ponto central.

A Figura 23 (a) mostra a superfície de resposta para os fatores concentração da solução de sulfato de ferro ( $CR_2$ ) em função do comprimento da bobina  $R_1$ . É possível observar que existe um valor máximo dentro do domínio experimental utilizado. O ponto ótimo para análise de estreptomicina foi em 3,8 % (m/v) para a concentração da solução de sulfato de ferro ( $CR_2$ ) e 750 cm para o comprimento da bobina  $R_1$ .

De acordo com a Figura 23(b), obtida a partir da matriz de Doehlert, observa-se a presença de um valor ótimo para a concentração de sulfato de ferro ( $CR_2$ ) de 3,8% (m/v), ao passo que elevados sinais analíticos podem ser obtidos com comprimentos da alça de amostragem (AA) acima de 460 cm e concentrações de solução de sulfato de ferro ( $CR_2$ ) acima de 4,2 %. Assim, empregou-se a concentração de sulfato de ferro de 3,8 % (m/v), pois foi observado que para concentrações elevadas deste reagente ocorria a formação de um precipitado possivelmente sendo hidróxido de ferro (II), interferindo no sinal analítico e algumas vezes ocasionando o estrangulamento do percurso analítico devido à impregnação deste material na parede interna da tubulação.

A Figura 23 (c) mostra a superfície de resposta construída entre os fatores bobina  $R_1$  e a alça de amostragem (AA), como pode ser observado, existe um valor máximo dentro do domínio experimental utilizado e um aumento do sinal analítico com o aumento da alça de amostragem até 362 cm com o aumento da bobina  $R_1$  até 750 cm.

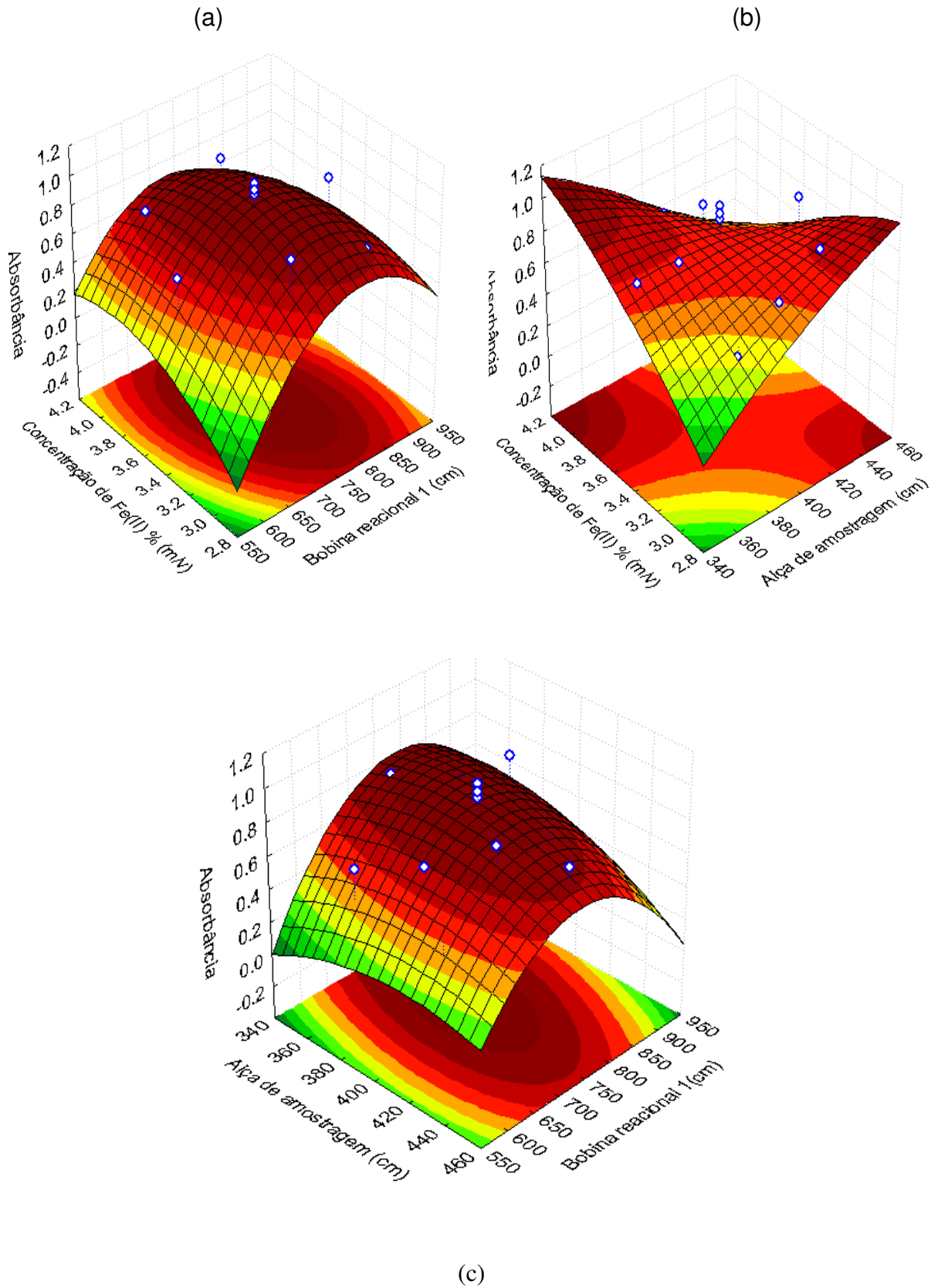


Figura 23 - Superfícies de resposta. (a) relação da concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  (3,8 % (m/v)) comprimento da bobina reacional térmica  $R_1$  de 750 cm, (b) relação da concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  (3,8 % (m/v)) e alça de amostragem: 362 cm, (c) relação do comprimento da alça de amostragem 362 cm com o comprimento da bobina  $R_1$ : 750 cm. Fonte: O Autor, 2013.

A Tabela 11 mostra os valores otimizados com o Planejamento Matriz de Doehlert utilizando as variáveis sulfato de ferro amoniacal, alça de amostragem e bobina reacional térmica.

Tabela 11 - Valores otimizados com o Planejamento Matriz de Doehlert.

<b>Variáveis</b>	<b>Valor Otimizado</b>
Sulfato de ferro amoniacal ( $\text{Fe}^{2+}$ )	3,8 % (m/v)
Alça de amostragem (AA)	362 cm
Bobina reacional térmica $R_1$	750 cm

Fonte: O Autor.

#### 6.4 Figuras de Mérito

A curva analítica (FIGURA 24) para a estreptomicina com o método proposto apresentou a equação:  $\text{Abs} = 0,011 + 4,721 \times 10^{-4} [\text{estreptomicina, mg L}^{-1}]$  com coeficiente de correlação  $r = 0,9874$ . O limite de detecção e limite de quantificação (LONG; WINEFORDNER, 1983) foram de  $18 \text{ mg L}^{-1}$  e  $60 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. A faixa linear de resposta foi de 60 até  $1500 \text{ mg L}^{-1}$ . A frequência de 30 leituras por hora mostrou a rapidez do método proposto. Todas as leituras dos padrões e das amostras foram realizadas em triplicata e o Coeficiente de Variação foi sempre inferior a 6,5%, o que indica uma boa precisão do método.

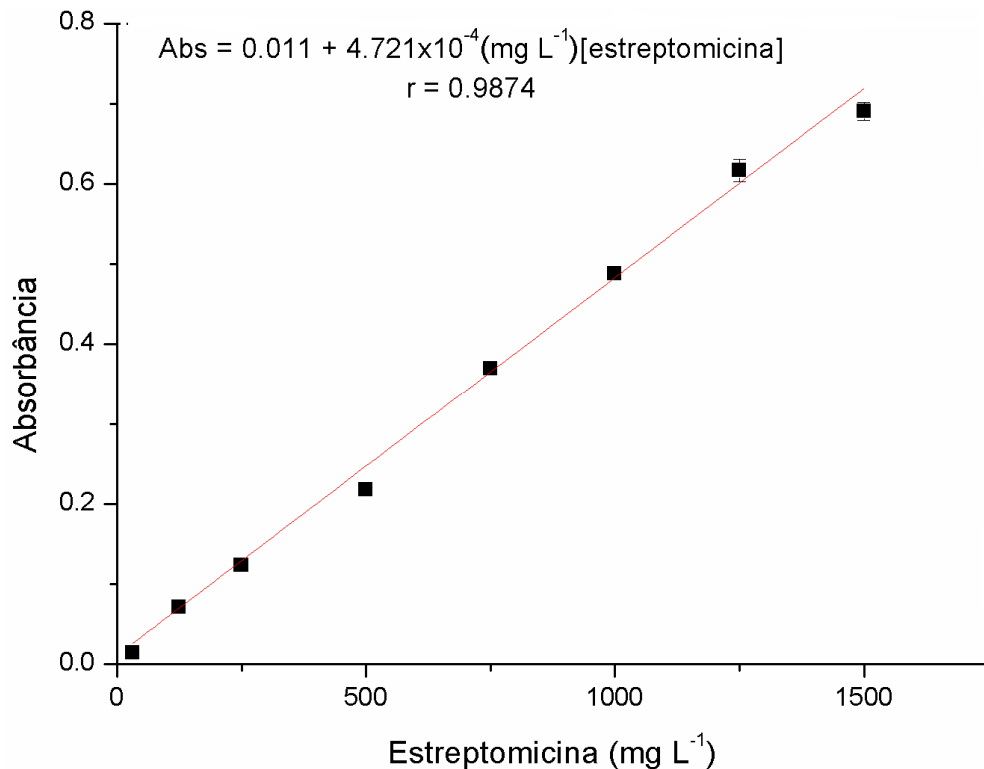


Figura 24 - Curva analítica para determinação de estreptomicina com o sistema FIA proposto.

Fonte: O Autor, 2013.

### 6.5 Efeitos dos interferentes no sistema on-line de detecção

No método proposto, a presença de alguns concomitantes poderia causar perda ou aumento do sinal analítico devido à formação de complexos com o sulfato de ferro, bem como pela formação de compostos insolúveis.

O estudo de interferentes foi conduzido com solução contendo 2 g L<sup>-1</sup> de estreptomicina nas condições previamente otimizadas. Os interferentes foram avaliados nas seguintes proporções 1/1, 1/5, 1/10 e 1/100 (m/m) (analito/interferente). Foi adotado como interferência variação no sinal maior que 10% em comparação com uma solução do mesmo na ausência dos concomitantes. A Figura 26 mostra o percentual de recuperação do sinal analítico para cada interferente. Nota-se que não houve interferência de nenhum concomitante na determinação de estreptomicina. É importante salientar que estes concomitantes foram escolhidos por serem encontrados com maior frequência nos medicamentos veterinários que contêm estreptomicina. Para a benzilpenicilina potássica, na proporção de 1/100 ocorreu à formação de um precipitado não podendo prosseguir com os estudos.

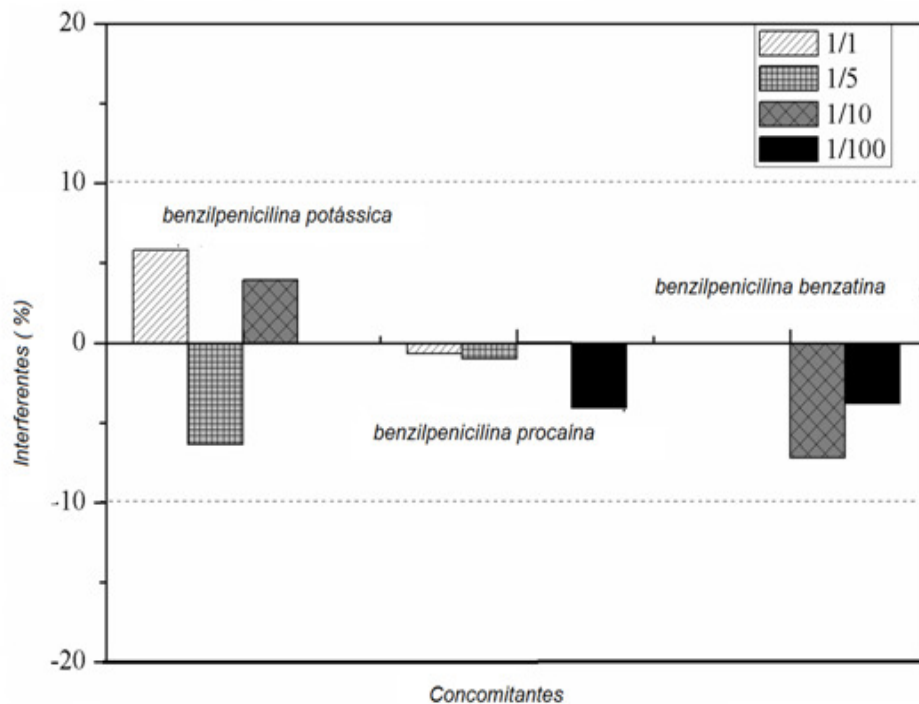


Figura 25 - Estudo dos interferentes na determinação de estreptomicina ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ), usando solução dos interferentes em diversas concentrações.

Fonte: O Autor, 2013.

## 6.6 Aplicação e teste de exatidão

Para verificar a exatidão, o método proposto foi aplicado na determinação de estreptomicina em quatro formulações farmacêuticas de uso veterinário. As amostras foram separadas, pesadas e solubilizadas em meio aquoso, após foram analisadas utilizando o método recomendado na Farmacopeia Americana (USP2007) por HPLC e pelo sistema de análise em fluxo desenvolvido e otimizado. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 12.

Os resultados obtidos confirmam a boa precisão com coeficiente de variação sempre menor que 6,5 %. Aplicando o teste *t* pareado ( $p=0,05$ ), com um nível de confiança de 95%, constata-se que o método proposto não apresenta diferença estatística significativa em relação ao método de referência, confirmando assim a exatidão para as amostras analisadas (Harris, 2005).

Tabela 12 - Determinação da concentração de estreptomicina em amostras de medicamentos veterinários empregando o sistema por análise em fluxo proposto e o método padrão oficial da Farmacopeia Americana.

	<b>Amostras</b>	<b>Método Proposto (g g<sup>-1</sup>)</b>	<b>CLAE (g g<sup>-1</sup>)</b>
	A	0,30 ± 3,81*	0,29 ± 2,00*
<b>Antibióticos</b>	B	0,40 ± 5,67	0,39 ± 3,28
	C	0,37 ± 6,15	0,37 ± 1,56
	D	0,37 ± 2,29	0,37 ± 1,39

\* Valores são mostrados com um intervalo de confiança de 95 % (n=3). CV:%  
 Fonte: O Autor, 2013.

## 7 CONCLUSÕES

Os métodos analíticos cromatográficos comumente empregados para determinação de estreptomicina são caracterizados pelo uso de solventes orgânicos (USP, 2007) e, principalmente por um tempo mais longo de análise.

Os estudos realizados neste trabalho evidenciaram a viabilidade do uso de sistemas de análise por injeção em fluxo para determinação de estreptomicina em formulações farmacêuticas. Como pôde ser visto, o método proposto apresenta várias vantagens, incluindo simplicidade, facilidade de manuseio e adaptação, baixo consumo de amostras/reagentes com 76 mg de hidróxido de sódio, 164 mg de sulfato de ferro e 1,82 mg de estreptomicina por determinação, além de apresentar elevada frequência analítica, o tempo gasto para uma determinação foi de 120 segundos (50 segundos para o enchimento da alça de amostragem e 70 segundos para o tempo do sistema), assim, em uma hora são efetuadas aproximadamente 30 determinações de estreptomicina. Uma vez que os resultados mostraram a ausência de interferência para os concomitantes frequentemente encontrados em amostras deste tipo de medicamento na linha veterinária.

O método foi comparado com CLAE e os resultados estão em concordância, conforme os resultados apresentados na Tabela 12.

O controle de qualidade é fundamental para garantir a qualidade dos medicamentos consumidos. Durante as análises vários parâmetros são avaliados como presença e concentração do princípio ativo, assim, os métodos de análise em fluxo são uma alternativa útil para o controle de qualidade de medicamentos e atende prontamente a rotina na indústria farmacêutica.

A cada dia tem-se o maior aprimoramento dos objetivos propostos pela química limpa e os sistemas de análise em fluxo têm contribuído no desenvolvimento de procedimentos mais limpos, uma vez que a geração de resíduos é menor quando comparado com os métodos convencionais.

Foi observado que alguns métodos existentes, quantificam resíduos de estreptomicina em amostras de alimentos como leite, mel, queijos e maçãs e os limites de detecção e quantificação foram baixos, (HOLZGRABE et al., 2011; HALVATZIS et al., 1994). No método proposto, embora essas características analíticas não tenham sido obtidas, para o método não constitui uma limitação, pois

os teores do princípio ativo nas formulações farmacêuticas são suficientes para o preparo de amostras com concentrações adequadas à leitura.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, E. et al. J. Liquid chromatographic analysis of streptomycin sulfate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 219-226, 2000.

ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, Recommendation for definition, estimation and use of the detection limit. **Analyst**, v. 112, p. 199-204, 1987.

BARROS NETO, B. B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Campinas: Unicamp, 1996.

BELAL, F. et al. Caracterização do fármaco aminoglicosídeo sulfato de estreptomicina por espectroscopia na região do Infra-vermelho, UV- Visível e ressonância magnética nuclear 1 D e 2D. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 435-441, 2001.

BENZO, Z. et al. Experimental and theoretic studies of factors that influence the determination of molybdenum by electrothermal atomic absorption spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 65, p. 1107, 1993.

BERGAMIN, F. H.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G. A new device for improving sensitivity and stabilization in flow-injection analysis. **Analytical Chimica Acta**, v. 97, p. 427- 431, 1978.

BEZERRA, M. **Aplicação de matriz de Doehlert na otimização de um sistema de pré-concentração em linha para determinação de cobre usando espectrometria de absorção atômica com chama**, 2003. 95 fls.(Mestrado em química analítica) Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2003.

BHUSHAN, R.; ARORA, M. Separation of aminoglycosides by normal and reversed phase. **Journal of planar chromatography**, v.14, p. 435-438, 2001.

BIANCHI, F. et al. Use of experimental design for optimisation of the cold plasma ICP-MS determination of lithium, aluminum and iron in soft drinks and alcoholic beverages. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v.17, p. 251-256, 2003.

BONI, A. C.; WONG, A.; DUTRA, R. A. F. Cobalt phthalocyanine as a biomimetic catalyst in the amperometric quantification of dipyrone using FIA. **Talanta**, v. 85, p. 2067-2073, 2011.

BOURGUIGNON, B. Simultaneous optimization of pH and organic modifier content of the mobile phase for the separation of chlorophenols using a Doehlert design. **Journal of Chromatography Part A**, v. 628, p.171, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde- Secretária de Vigilância Sanitária, Boas práticas para a fabricação de produtos farmacêuticos, Brasília: Companhia Brasileira de Artes Gráficas, 1994.

BRENNAUER, A. et al. Guanidine replacement in NPY receptor ligands: Synthesis of N-acylargininamides. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 6996-6999, 2007.

BRITO, E. S. et al. **A Metodologia de superfície de Resposta (MSR) na otimização de processo biológicos: a determinação dos valores de pH e temperatura ótimos para a atividade enzimática** – 2008.

Disponível em:

<http://sbbq.iq.usp.br/arquivos/regional/2002/cdresumos/estendido/001.pdf>. Acesso em: 08 de Jul. 2012.

BRUNNER, R.; MACHEK, G. Análises de misturas de estreptomicina e dihidroestreptomicina, **Antibiótica**, p. 75, 1962.

BRUIJNSVOORT et al. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1058, p. 137-142, 2004.

CAGIGAL, E. et al. Experimental design methodologies to optimise the spectrofluorimetric determination of Loratan and Valsartan in human urine. **Talanta**, v. 54, p. 1121, 2001.

CALATAYUD, J.M. **Flow injection analysis of pharmaceuticals: automation in the laboratory**. London: Taylor & Francis, 1995.

CARSON, M. C.; HELLER, D. N. Confirmation of spectinomycin in milk using ion-pair solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.718, p. 95-102, 1998.

CASSELLA, R. J. et al. Flow injection determination of cobalt after its sorption onto polyurethane foam loaded with 2-(2-thiazolylazo)-p-cresol (TAC). **Talanta**, v. 54, p. 61-67, 2001.

CASSELLA, R.J.; SANT'ANA, O. D.; SANTELLI, R, E. Determination of arsenic in petroleum refinery streams by electrothermal atomic absorption spectrometry after multivariate optimization based on Doehlert design. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 57, p. 1967–1978, 2002.

CERO, V.; PONS, C. Multicommutated flow techniques for developing analytical methods, **TRAC- Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 236-242, 2006.

DIAS, A. B. D. et al. High-sensitivity methods for sequential injection determination of the main constituents of alloys. **Analytica Chimica Acta**, v. 514, p. 253-257, 2004.

DIAS, A.C.B. **Sistemas de análises químicas em fluxo explorando multiimpulsão e detecção espectrofotométrica: aplicação a formulações farmacêuticas e a extratos de solos**, 2006. 143 f. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

DOEHLERT, D.H. Uniform Shell designs. **Applied Statistics**: v.19, p. 231, 1970.

EIRAS, S. P.; CUELBAS, C. J.; de ANDRADE, J. Estudo das interações entre as variáveis de misturas e processos para a técnica de extração por fase única. **Química Nova**, v. 17, p. 39, 1994.

**FARMACOPEIA BRASILEIRA**. 5. ed. São Paulo: Organização Andrei, 2010. p. 112.

FIGUEIREDO, E.C.; MAGALHÃES, C.S; WISNIEWSKI, C. A low cost autosample for flow injection analysis. **Journal of Automated Methods and Management in Chemistry**, v. 2006, p. 1-4, 2006.

FURLANETTO, S. et al. Design experiments to optimize and validade the adsortive stripping voltammetric determination of nimesulide. **Analytica Chimica Acta**, v. 413, p. 229, 2000.

GERRITSEN, M.J. Effective treatment with dihydroestreptomycin of naturally infected cows shedding *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n, 3, p. 339-343, 1994.

GETEK, T.A.; VESTAL, M.L.; ALEXANDER, T.G. Analysis of gentamicin sulfate by hight-performance liquid chromatography combined with thermospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 554, p.191-203, 1991.

GIRIO T.M.S. et al. Uso de estreptomicina na eliminação da leptospirúria em touros (*Bos taurus indicus*) naturalmente infectados pelo sorovar hardjo. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 72, n.2, p. 161-170, 2005.

GROTTI, M.; MAGI, E.; FRANCHE, R. Multivariate investigation of matrix effects in inductively coupled ultrasonic nebulization. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 15, p. 89, 2000.

GRUDPAN, H.; et al. Flow injection analysis usins an aquarium air pump, Fresenius **Journal of Analytical Chemistry**, v. 346, p. 882, 1993.

GOODMAN, A. et al. **The farmacological Basis of Therapeutics**. Gilman AG ed., cap. 43, p. 1029, 1996.

HALVATZIS, S.A. et al. Continuous flow chemiluminometric determination of amiloride and streptomycin by oxidation with N-bromosuccinimide. **Analytica Chimica Acta**, v. 290, p.172-178, 1994.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**, 6. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

HOLZGRABE, U.; NAP, C.J.; KUNZ, N.; ALELING, S. Identification and control of impurities in streptomycin sulfateby high-performance liquid chromatography coupled with mass detection and corana charged-aerosol detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 271-279, 2011.

HSIAO, Y.; KO, J.; LO. Agri. Food Chem. **C. J.**, v. 49, p. 1669-1674, 2001.

IMANDI, S.B. et al. Optimization of médium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. **Enzyme and Microbial Tecnology**, v.40, p. 1367 – 1372, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL ( INMETRO): **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, 2003.Acesso em 15 Jul. 2012.

ISOHERRANEM, N.; SOBACK, S. Chromatographic Methods for Analisis of Aminglycoside Antibiotics: **Journal of AOAC International**, v.82, p. 1017-1045,1999.

JAGER,A.V.;TAVARES, M.F.M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24,n. 3, p. 363-373, 2001.

KENNEDY, D.G. Use of liquid chromatograpy-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. **Journal of Chromatography A**. v. 812, p. 77-98, 1998.

In: KOROLKOVAS, A. ; BURCKHALTER, J.H. (Ed.). Química Farmaceutica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 575-610.

KRONKA, E. A.M.; REIS, B.V. **Análise em fluxo de ortofosfato em águas naturais por espectrofotometria**. Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo – Piracicaba – SP 1996.

KRUG, F. J.; BERGAMIN, F. H. & ZAGATTO, E. A.G. Commutation in flow injection analysis. **Anal, Chim, Acta**, v. 179, p. 103 – 118, 1986.

KRUG, F.J.; REIS, B.F.; GINÉ, M.F.; FERREIRA, J.R.; JACINTHO, A.O. Zone trapping in flow injection analysis: Spectrophotometric determination of flow levels of ammonium ion in natural waters. **Analytical Chimica Acta**, v. 151, p. 39-48, 1983.

KUHN, S.H. et al. Influence of borate complexation on the eletrofforetic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* V. 63, 1991.

LAPA, R.A. S. et al. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities, **Analytica Chimica Acta**, v. 466, p. 125-132, 2002.

LASER, D.J.; SANTIAGO, J.G. A review of micropumps, **Journal of Micromechanics and Microengineering**, 14: R35, 2004.

LIMA, G.F. **Determinação de sulfeto em água com preparo de amostra por análise em fluxo multissegmentado**. 2010.90 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica ) – UNIFAL , Alfenas, 2010.

LIVERMORE, D.M.; WILLIAMS, J.D. **b -Lactams: Mode of Action and Mechanisms of Bacterial Resistance**, **Antibiotics in Laboratory Medicine**. ed., Williams & Wilkins, Lorian V ed., cap. 12, p. 502-503, 1996.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry, Washington**, v. 55, p. 712-724A, 1983.

LUNDBACK, H. Amperometric determination of hydrogen peroxide in pickling baths for copper and copper alloys by flow injection analysis, **Analytical Chimica Acta**, v. 145, p. 189-196, 1983.

LUNDSTEDT, L. et al. Experimental design and optimization **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, p.3-40, 1998.

LYDDY-MEANNEY, A.; et al. A compact flow injection analysis system for surface mapping of phosphate in marine waters. **Talanta**, v.58, p.1043, 2002.

MARQUES, K.L. et al. A multi-pumping flow system for chemiluminescent determination of ammonium in natural waters. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Abingdon, v. 87, p. 77-85, 2007.

MARZO, A.; DAL BO, L. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. **Journal of Chromatography A**, 812, p.17-34, 1998.

MEGOULAS, N.C.; KOUPPARIS, M.A. Development and validation of a novel HPLC/ELSD method for the direct determination of tobramycin in pharmaceuticals, plasma and urine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 290-296, 2005.

MICRONAL, Análises químicas por injeção em fluxo, Meios e Métodos, v. 41, 1984.

MINAMI, H. et al. Simultaneous direct determination of aluminum, calcium and iron silicon carbide and silicon nitride powders by slurry-sampling graphite furnace AAS. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 20, p. 455-459, 2004.

MOLINA, M. F.; NECHAR, F.; BOSQUE-SENDRA, J.M. Determination of zinc in environmental samples by solid-phase spectrophotometry: optimization and validation study. **Analytical Science**, v. 14, p. 791, 1998.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. New York : Wiley, 1984.

MEGOULAS, M.A.N.C; M.A. KOUPPARIS, M.A. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.36, p. 73-79, 2004.

NAGAOSA, Y.; SAKATA, K. Salting-out extraction technique for pretreatment in the liquid chromatographic determination of copper (II), aluminum(III), iron(III) and manganese (II) in biological samples. **Talanta**, Amsterdam, v. 446, p.647-654, 1998.

NASCIMENTO, et al. Al(III) and Fe(III) balance in hemodialysis treatment assessed via fluid analysis by adsorptive stripping voltammetry and UV sample digestion. **Electroanalysis**. New York, v. 20, p. 1078-1084, 2008.

NECHAR, et al. The application of Doelhart designs in the optimization of experimental variables in solid phase spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 316, p. 185, 1995.

PASQUINI, C.; OLIVEIRA, W. A. Monosegmented system for continuous flow analysis Spectrophotometric determination of chromium(VI), ammonia, and phosphorous. **Anal. Chem.**, v. 57, p. 2575 -2579, 1985.

PENDELA et al. LC-MS of streptomycin following desalting of a non - volatile mobile phase and pH gradient. **J.Sep.Sci.**, v. 32, p. 3418-3424, 2009.

PESTANA, E. A.; BALABAN, R. Caracterização do fármaco aminoglicosídeo sulfato de estreptomicina por espectroscopia na região do infravermelho, UV - visível e ressonância magnética nuclear 1D e 2D. **Revista Sapientia**, v. 2, n. 2, 2011.

PINTO, P. C.A.G. A pulsed sequential injection analysis flow system for the fluorimetric determination findamethacin in pharmaceutical preparations. **Analytica Chimica Acta**. Amsterdam, v. 539, p.173-179, 2005.

REIS, B. F. ; GINÉ, M. F. ; KRONKA, E. A. M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**, v.12, p.82, 1996.

ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F. A flow system exploiting multicommutation for speciation of inorganic nitrogen in Waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 409, p. 227, 2000.

RUZICKA J.; HANSEN. E. H. Flow Injection spectrophotometric system for hydrogen peroxide monitoring in photo-fenton. **Flow Injection Analysis**, New York: John Wiley, 1988.

RUZICKA, J. Lab-on-valve: universal microflow analyzer on sequential injection. **Analyst**, v. 125, p. 1053 -1060, 2000.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection analyses : Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, **Analytical Chimica Acta**, v. 78, p.145-157, 1975.

RUZICKA, J.; STEWART, J.W.B.; ZAGATTO, E.A.G. Flow injection analysys : Part IV, Stream sample splitting and its application to the continuous spectrophotometric determination of chloride in brasckish waters. **Analytical Chimica Acta**, v. 81, p. 387-396, 1976.

SANTORO, M. I. R. M. **Introdução ao Controle de Qualidade de Medicamentos**, São Paulo, Atheneu, Cap. 1, 1988.

SCHENCK, J. R. ; SPIELMAN, M. A. **J. Análise de Misturas de estreptomicina e dihidroestreptomicina . Am. Chem. Soc.**, v. 67, p. 2276 ,1945.

SHAH, J. ;JAN, M. R. ;REHMAN, F. Flow injection spectrophotometric determination of fluoxetine in bulk and in pharmaceutical preparations. **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 53(3), p. 1605, 2008.

- SETNY, P.; TRYLSKA, J. Search for Novel Aminoglycoside Derivatives by Combining Fragment-based Virtual Screening and 3D-QSAR Scoring. **J. Chem. Inf. Mode**, v. 49, p. 390-400, 2009.
- SILVA, P. **Farmacologia**, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1024, 1994.
- SKEGGS, L.T.Jr.** An automatic method for colorimetric analysis. **Amer. J. Cin. Pathol.** 28:311-22, 1957.
- SKOOG, D.A.; WEST, D. M.; HOLLER, F.J. **Fundamentals of analytical chemistry**, 7. ed. Flórida: Sauders College Publishing, 1996.
- STEAD, D.A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. **Journal of Chromatography B**, v.747, p. 69-93, 2000.
- STEWART, J.W.B. Flow injection analysis: Part III, Comparison of continuous flow spectrophotometry and potentiometry for the rapid determination of the total nitrogen content in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 81, p. 371-389, 1976.
- STOLKER, A. M.; BRINKMAN, U. A. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals- a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 15-53, 2005.
- SUAREZ, W.T. **Desenvolvimento de procedimento em fluxo envolvendo reatores em fase sólida e microssistema analítico construído com LTCC ( Low Temperature Co-fired Ceramics) para determinação de analitos de interesse farmacêutico**. 2010.180 f. Tese ( Doutorado em Química ) Universidade federal de São Carlos , 2009, São Carlos, 2006.
- TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamento experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v.29, p. 338-350, 2006.
- TOLDRÁ, F. REIG, M. Method for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.17, p. 482-489, 2006.
- TOMSÚ, D. ; LEARDO, M.C.; CALATAYUD, J.M. Automated simultaneous triple dissolution profiles of two drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v.36, p. 548-557, 2004.
- VALE et al. Method development for the determination of nickel in petroleum using line-source and high - resolution continuum-source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 77, p. 131-140, 2004.
- WEEKS, D. A.; JOHNSON, K.S. Solenoid pumps for flow injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 2717, 1996.
- WERKEMA, M.C.C.; AGUIAR, S. **Otimização Estatística de Processos: Como determinar a condição de operação de um processo que leva ao alcance de uma**

**meta de melhoria**, Belo Horizonte – Brasil, Fundação Cristiano Otoni, Série Ferramentas da Qualidade, v. 9, 1996.

WOIAS, P. Micropumps: summarizing the first two decades Proceedings. **International Society for Optical Engineering**, v. 39, p. 4560, 2001.

YANG, M.; TOMELLINI, S.A. Non-derivatization approach to high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for aminoglycoside antibiotics based on a ligand displacement reaction. **J. Chromatogr. A**, v. 939, p. 59-67, 2001.

ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. Classificação e definição de métodos de análises em fluxo (recomendações IUPAC). **Química Nova**, v. 22, p. 143-146, 1999.

ZAMORA P.P.; MORAIS, J. L. D.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 10, p. 106-110, 2005.

ZOUGAGH, M. Application of Doehlert matrix and factorial designs in the optimization of experiment of zinc by flow injection inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 15, p. 1589, 2000.