

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Desenvolvimento de procedimento em fluxo
com detecção espectrofotométrica para
análise de bromoprida em medicamentos
e/ou fluido biológico**

Liliane Spazzapam Lima

Dissertação de Mestrado

2009

LILIANE SPAZZAPAM LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO EM
FLUXO COM DETECÇÃO
ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA ANÁLISE DE
BROMOPRIDA EM MEDICAMENTOS E/OU
FLUIDO BIOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Química.

Orientadora: Prof. Dra. Helena Redigolo Pezza

Co-orientador: Leonardo Pezza

Araraquara
2009

DADOS CURRICULARES

Liliane Spazzapam Lima

1. Dados Pessoais

1.1 Nascimento: 23/06/1983

1.2 Nacionalidade: Brasileira

1.3 Naturalidade: Araraquara

1.4 Estado Civil: Solteira

1.5 Filiação: Pai: Álvaro Lima

Mãe: Rosa Maria Spazzapam Lima

2. Formação Acadêmica

2.1. Graduação

Licenciatura em Química

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

Instituto de Química – Araraquara

Período: 2002 a 2006

2.2. Pós-Graduação

Mestrado em Química Analítica

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

Instituto de Química – Araraquara

Período: 2007 a 2009

3. Artigos publicados

3.1. LIMA, L. S.; WEINERT, P. L.; LEMOS, S. C.; SEQUINEL, R.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. A environmentally friendly reflectometric method for ranitidine determination in pharmaceuticals and human urine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 71, p. 1999-2004, 2009.

3.2. GOTARDO, M. A.; LIMA, L. S.; SEQUINEL, R.; RUFINO, J. L.; PEZZA L.; PEZZA, H. R. A simple spectrophotometric method for the determination of methyldopa using *p*-Chloranil in the presence of hydrogen. *Eclética Química*, v. 33, n. 3. p. 7-12, 2008.

3.3. GASPARINI, F.; LIMA, L. S.; WEINERT, P. L. ; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. A simple and green analytical method for formaldehyde determination. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 19, n. 8, p. 1531-1537, 2008.

4. Trabalhos apresentados em Congresso

4.1. LIMA, L. S.; WEINERT, P. L. PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determinação de cloridrato de ranitidina em formulações farmacêuticas por espectroscopia de reflectância difusa. 14º ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA – João Pessoa/PB, 2007.

4.2. LIMA, L. S.; WEINERT, P. L. PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determinação espectrofotométrica de ranitidina em formulações farmacêuticas. 13º ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA e 1º CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE QUÍMICA ANALÍTICA – Niterói/RJ, 2005.

4.3. LIMA, L. S.; WEINERT, P. L. PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determinação espectrofotométrica de ranitidina em formulações farmacêuticas. XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – Araraquara/SP, 2005.

4.4. LIMA, L. S.; PEZZA, H. R.; RIBEIRO, P. R. S.; TOGNOLLI, J. O.; PEZZA, L. Determinação espectrofotométrica de captopril em formulações farmacêuticas. XVI CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – Ilha Solteira/SP, 2004.

DEDICATÓRIA

À Deus,

Por me dar forças nos momentos mais difíceis e otimismo SEMPRE

Aos meus pais, Álvaro e Rosa

Por todo amor, luta e apoio para que eu chegasse até aqui

Às minhas irmãs, Cristiane e Viviane

Pela torcida e pelo apoio que sempre me deram

Aos meus sobrinhos, Gabriel, Matheus, Vitória e Giovane

Por toda alegria e esperança que sempre me transmitem

Ao meu namorado, José Renato

Por todo amor e companheirismo em todas as horas e pela felicidade que agregou ainda mais em minha vida

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de mestrado;

À Profa. Helena Redigolo Pezza pela orientação, oportunidade e confiança em mim depositada;

Ao Prof. Leonardo Pezza pela co-orientação e cooperação;

Ao Prof. Massao Ionashiro pelo incentivo, conselhos e sincera amizade;

Ao Prof. Fernando Fertoni por sua indicação, que me trouxe a trabalhar aqui;

Ao Prof. João Olímpio Tognolli pela paciência e auxílio no início de minha caminhada científica;

Aos membros da banca examinadora pela atenção e avaliação crítica deste trabalho;

Aos amigos do Grupo Fritz Feigl: Sahra, Patrícia, Mara, Fabrícia, Aline, Paulo, Fernanda, Luciana, Rodrigo, José Rufino, Mayra, Marcão, Fritz e Tiago, pelas risadas e companheirismo;

Aos amigos do Grupo LATIG: Emanuel, Elias, Adriano, Cláudio, Patrícia, Beatriz e Gilbert, também pelas risadas e ótima convivência;

À Sandrinha pelo auxílio no laboratório e principalmente pela amizade;

Aos funcionários da biblioteca, seção de pós-graduação e do Departamento de Química Analítica pela atenção e gentileza com que sempre me atenderam.

RESUMO

No presente trabalho foi desenvolvido um procedimento em fluxo com detecção espectrofotométrica para determinação de bromoprida em diferentes matrizes. O método desenvolvido é baseado na reação, em linha, entre a bromoprida e o reagente cromogênico *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC) em meio de HCl diluído, que resulta em um produto violeta de $\lambda_{\text{máx}} = 565 \text{ nm}$. Foi empregado meio micelar (Dodecil sulfato de sódio - SDS) no sistema reacional, o que proporcionou significativo aumento da sensibilidade da reação (13,6 vezes). Os parâmetros experimentais foram otimizados através de planejamento fatorial de experimentos e de acordo com as condições ótimas indicadas, reagiu-se em linha: 525 μL de solução de bromoprida (em diferentes concentrações) com 201 μL de *p*-DAC ($4,52 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $3,59 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), ambos impulsionados através do percurso analítico (47 cm) por uma solução de SDS ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$) numa vazão de $2,63 \text{ mL min}^{-1}$. Uma relação linear ($r = 0,9998$) foi observada na ampla faixa de $3,63 \times 10^{-7}$ a $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (125 ppb a 10 ppm). Os limites de detecção e de quantificação foram 36,9 e 123 ppb, respectivamente. O método desenvolvido foi satisfatoriamente aplicado na determinação de bromoprida em medicamentos e urina fortificada, com boas recuperações (97,2 – 103,8 % para as formulações farmacêuticas e 98,2 – 102,2 % para as amostras biológicas) e

sem requerer etapa de pré-tratamento para qualquer tipo de amostra. O método apresentou vantagens como rapidez, simplicidade, confiabilidade, baixo consumo de reagentes e geração mínima de resíduos, sendo, portanto um método ambientalmente amigável para determinação de bromoprida, de acordo com os princípios da Química Verde.

Palavras-chave: análise por injeção em fluxo, espectrofotometria, bromoprida, medicamentos, urina.

ABSTRACT

In this work, it was developed a procedure to flow with spectrophotometric detection for determination of bromopride in different matrices. The developed method is based in the reaction, on-line, between the bromopride and chromogenic reagent, *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (*p*-DAC), in diluted acid medium, that results in a purple product ($\lambda_{\text{max}} = 565 \text{ nm}$). Micellar medium (Sodium dodecyl sulfate - SDS) in the reaction system, which provided a significant increase of the sensitivity of the reaction (13.6 times). The experimental parameters were optimized by factorial design of experiments and according to the optimal conditions indicated 525 μL of the bromopride solutions (in different concentrations) was reacted with 201 μL of the *p*-DAC solution ($4.52 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ in $\text{HCl } 3.59 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), both carried through of the coiled reactor (47 cm) by SDS solution (0.02 mol L^{-1}) at a flow rate of 2.63 mL min^{-1} . A linear relationship was observed in the range of 3.63×10^{-7} to $2.90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. The limits of detection and quantification were 36.9 and 123 ppb, respectively. The developed method was successfully applied in the determination of bromopride in drugs and spiked urine, with excellent accuracies (97.2 – 103.8 % to pharmaceutical formulations and 98.2 – 102.2 to biological samples) and without request step of pretreatment for any type of sample. The method presented advantages as rapidity, simplicity,

reliability, low consumption of reagent and minimal generation of waste.

Therefore, it is an environmental friendly method to bromopride determination, according to the Green Chemistry's principles.

Keywords: flow injection analysis, spectrophotometry, bromopride, drugs, urine.

LISTA DAS ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura da bromoprida.....	18
Figura 2. Estrutura do <i>p</i> -dimetilaminocinamaldeído.....	38
Figura 3. Espectros de absorbância do produto colorido da reação entre a bromoprida e o <i>p</i> -DAC (0,17%) na presença e na ausência do surfactante (<i>b</i> = 1,00 cm).....	40
Figura 4. Diagrama esquemático do sistema em fluxo utilizado. BP: bomba peristáltica; IC: injetor comutador manual; C: solução carregadora; A: soluções padrão ou amostras; R: reagente; L1: alça de amostragem; L2: alça de reagente; x: ponto de confluência; BR: bobina reacional; E: detector (espectrofotômetro); D: descarte. A seta e o quadrado pretos representam respectivamente, a direção e posição do injetor comutador para a posição de injeção de amostra.....	42
Figura 5. Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial fracionário.....	46
Figura 6. Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo.....	49
Figura 7. Superfície de resposta otimizada com sua respectiva curva de nível para medidas de absorbância em 565 nm em função das variáveis: concentração de <i>p</i> -DAC e volume da alça da amostra. Foi utilizada bromoprida $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em cada experimento. Equação da superfície: $Z = 0,46 + 203,66 X - 24114,50 X^2 + 3,02 \times 10^{-4} Y - 4,04 \times 10^{-7} Y^2 + 0,03 XY$	51

Figura 8. Diagrama da curva analítica (Br: branco; a: $3,63 \times 10^{-7}$; b: $7,26 \times 10^{-7}$; c: $1,45 \times 10^{-6}$; d: $2,18 \times 10^{-6}$; e: $2,90 \times 10^{-6}$; f: $5,80 \times 10^{-6}$; g: $1,16 \times 10^{-5}$; h: $1,74 \times 10^{-5}$; i: $2,32 \times 10^{-5}$; j: $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)...... 53

Figura 9. Curva analítica, em triplicata, obtida após tratamento matemático dos resultados. Equação da reta:

$A = -0.01544 + 3,602 \times 10^4 C$, com $r = 0,9998$ 55

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1. Metodologias descritas na literatura para determinação de bromoprida em matrizes diversas.....	19
Tabela 2. Volumes tomados da solução estoque de bromoprida e as respectivas concentrações das soluções de trabalho.....	33
Tabela 3. Massas de <i>p</i> -DAC e volumes de HCl tomados e as respectivas concentrações finais das soluções de trabalho.....	34
Tabela 4. Variáveis experimentais estudadas e seus respectivos níveis.....	44
Tabela 5. Matriz codificada do planejamento fracionário.....	45
Tabela 6. Matriz do planejamento fatorial completo.....	48
Tabela 7. Matriz do planejamento composto central.....	50
Tabela 8. Valores de $A_{565\text{ nm}}$ obtidos segundo a metodologia proposta...	54
Tabela 9. Determinação de bromoprida em amostras comerciais pelo método proposto.....	57
Tabela 10. Resultados de recuperação de bromoprida adicionada em formulações farmacêuticas.....	58
Tabela 11. Comparação dos valores de absorbância obtidos pela análise de padrões e amostras de urina.....	59
Tabela 12. Determinação de bromoprida em urina pelo método proposto.....	60
Tabela 13. Resultados de recuperação de bromoprida adicionada em urina fortificada.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

UV	Ultravioleta
VIS	Visível
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
FIA	Análise por injeção em fluxo
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
CETESB	Companhia Estadual de Tecnologia e Saneamento Básico e Defesa do Meio Ambiente
ppm	Partes por milhão
ppb	Partes por bilhão
<i>p</i>-DAC	<i>p</i> -dimetilaminocinamaldeído
RSD	Desvio padrão relativo
b	Caminho óptico
A	Absorbância
C	Concentração
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
CREMESP	Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

Capítulo I. Introdução.....	17
I.1. Bromoprida.....	18
I.2. Revisão bibliográfica – Métodos analíticos para determinação de Bromoprida.....	19
I.3. Automação de sistemas analíticos	20
I.3.1. Análise por injeção em fluxo (FIA).....	21
I.3.2. Configurações de sistemas.....	22
I.4. Química Verde.....	23
I.5. Ambientes micelares em Química Analítica	25
Capítulo II – Justificativa e Objetivos.....	27
Capítulo III – Parte Experimental.....	30
III.1. Equipamentos, reagentes e preparo de soluções.....	31
III.1.1. Equipamentos.....	31
III.1.2. Reagentes	32
III.1.3. Preparo de soluções.....	32
Capítulo IV – Metodologia, resultados e discussões.....	37
IV.1. Utilização do <i>p</i>-DAC como reagente cromogênico	38
IV.2. Utilização de surfactante na reação	40
IV.3. Utilização de sistema em fluxo.....	41
IV.4. Otimização dos parâmetros envolvidos na reação.....	42
IV.4.1. Triagem das variáveis	43
IV.4.2. Metodologia da superfície de resposta.....	49
IV.5. Construção do diagrama e da curva analítica	52
IV.6. Efeito dos excipientes	55
IV.7. Aplicações analíticas e validação do método desenvolvido	56
IV.7.1. Análise das amostras comerciais	56
IV.7.2. Estudos de adição e recuperação em medicamentos	57
IV.7.3. Determinação direta de bromoprida em urina.....	59
IV.7.4. Estudos de adição e recuperação em urina.....	60
Capítulo V. Conclusões.....	62
Capítulo VI. Referências.....	64

Capítulo I. Introdução

I.1. Bromoprida

A bromoprida, 4-amino-5-bromo-N-[2-(dietilamino)etil]-2-metoxibenzamida (Figura 1), apresenta ponto de fusão 151-155°C, é praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em acetona, etanol e éter etílico; é ligeiramente solúvel em acetronitrila e solúvel em soluções diluídas de ácidos (REYNOLDS, 1996).

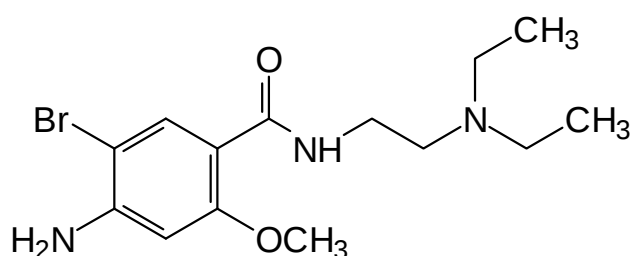


Figura 1. Estrutura da bromoprida.

A bromoprida pertence à classe dos antieméticos, sendo indicada para o alívio dos distúrbios da motilidade gastrointestinal, situações de refluxo gastroesofágico, náuseas de qualquer natureza, vômitos e para facilitar procedimentos radiológicos do trato gastrointestinal (BULÁRIO ELETRÔNICO DA ANVISA, 2008; MELO, 2001/02).

A bromoprida apresenta ação normalizadora da motricidade do estômago, duodeno e jejuno, reconduzindo o tônus e a peristalse aos padrões fisiológicos em todos os casos em que ocorram alterações desse sistema. Normaliza também o esvaziamento incompleto ou tardio das vias biliares e possui atividade antiemática completa, atuando em nível central e periférico (MELO, 2001/02).

Esse medicamento foi um dos primeiros a ser produzido na forma de genérico, tendo em vista o seu consumo acentuado pela população

(CREMESP, 2001), porém poucos métodos para sua determinação são descritos na literatura.

I.2. Revisão bibliográfica – Métodos analíticos para determinação de Bromoprida

Levantamento bibliográfico foi feito nas principais bases de dados sobre os métodos analíticos publicados nas revistas científicas de maior circulação para a quantificação de bromoprida em diferentes matrizes. Poucas publicações, no entanto, envolvendo a determinação do fármaco são encontradas na literatura (WANG; ZHANG, 1984; BRODIE; CHASSEAUD; ROONEY, 1984; NAZARE et al., 2005). A Tabela 1 relaciona os três métodos utilizados para a determinação de bromoprida.

Tabela 1. Metodologias descritas na literatura para a determinação de bromoprida em matrizes diversas.

Método	Amostra	Faixa de linearidade	LOD	LOQ	Referência
Espectrofotometria UV	Comprimidos	6 a 16 ppm	-	-	WANG; ZHANG,1984
CLAE	Plasma e urina	-	2 ppb	-	BRODIE; CHASSEAUD; ROONEY, 1984
CLAE/ Espectrometria de massa	Plasma	1 a 100 ppb	-	1 ppb	NAZARE et al., 2005

De acordo com a tabela anteriormente apresentada, pode-se verificar que apenas um trabalho se refere à quantificação de bromoprida em formulações farmacêuticas (WANG; ZHANG,1984). Este, no entanto, apresenta

significantes limitações, visto que é baseado em absorção espectrofotométrica na região UV, apresentando baixa seletividade, já que uma ou mais bandas de compostos insaturados absorvem nessa região do espectro, restringindo sua aplicação a preparações farmacêuticas simples.

As outras duas publicações envolvem a determinação do fármaco em fluidos biológicos e usam para tanto, cromatografia líquida de alta eficiência (BRODIE; CHASSEAUD; ROONEY, 1984; NAZARE et al., 2005) e/ou espectrometria de massas (NAZARE et al., 2005), ambas envolvem ainda, etapas de extração e o uso de grandes quantidades de solventes, o que tornam esses métodos laboriosos e grandes geradores de resíduos.

É importante ressaltar ainda, a inexistência, nas principais farmacopéias (Americana, Brasileira e Britânica), de métodos oficiais para a análise de bromoprida.

I.3. Automação de sistemas analíticos

A crescente demanda por análises clínicas e laboratoriais tem aumentado significativamente a busca por procedimentos analíticos automatizados.

Esses procedimentos oferecem grandes vantagens como operações em condições repetitivas, uma vez que eliminam a interferência humana, minimização de contaminações, aumento da frequência analítica, sistemas confiáveis operando 24 horas por dia, além do controle a distância dos processos, características freqüentemente requeridas para controle de processos industriais (ZAGATTO; OLIVEIRA; COLLINS, 1999).

I.3.1. Análise por injeção em fluxo (FIA)

A análise por injeção em fluxo é a versão mais usual em português do título em inglês “Flow Injection Analysis” de onde foi derivada a sigla FIA internacionalmente conhecida.

O processo de análise química por injeção em fluxo tem como conceito básico a inserção de uma alíquota de amostra em um fluido carregador que a transporta do ponto de injeção até a unidade de detecção. Este processo de análise foi proposto em 1975 por Jaromir Ruzicka, que na época era professor na Universidade Técnica da Dinamarca (REIS, 1996).

No sistema desenvolvido por Ruzicka (RUZICKA; HANSEN, 1975), com o auxílio de uma seringa, uma alíquota de amostra era inserida no fluxo transportador e os reagentes eram inseridos continuamente por uma bomba peristáltica a vazão constante em pontos de confluência, onde ocorria a interação reagente/amostra que, em seguida, era bombeada até o detector permitindo a obtenção de um sinal transiente. A versatilidade do sistema pôde ser observada pela determinação potenciométrica de amônio e espectrofotométrica de fosfato, sendo que ambos sistemas apresentaram linearidade satisfatória, seguindo a equação de Nerst para a potenciometria e a lei de Lambert-Beer para a espectrofotometria. Os sistemas também apresentaram repetibilidade nas análises e boa frequência analítica (DAMETTO, 2007). Por essas qualidades, os sistemas por injeção em fluxo foram caracterizados por sua simplicidade e viabilidade.

Os sistemas em fluxo, em geral, podem ser divididos, basicamente, em quatro partes: propulsão dos fluidos, injeção da amostra, reação e detecção (REIS; GUINÉ; KRONKA, 1989).

A propulsão dos fluidos pode ser à vazão ou à pressão constantes. Quando o sistema de análise trabalha à vazão constante o recurso utilizado para movimentar o fluido carregador e as demais soluções é a bomba peristáltica. Quando se trabalha à pressão constante, dispositivos de ação gravitacional são utilizados como propulsores.

O injetor é o dispositivo fundamental do sistema, uma vez que é através dele que a amostra é inserida no percurso analítico.

A bobina de reação é onde ocorrem as interações necessárias à detecção da espécie de interesse.

A unidade de detecção é onde as leituras e os sinais são obtidos e pode ser qualquer um dos detectores utilizados em Química Analítica, como espectrofotômetros UV/VIS, espectrofotômetros de absorção e emissão atômica, potenciômetros e condutivímetros (REIS; GUINÉ; KRONKA, 1989).

I.3.2. Configurações de sistemas

I.3.2.1. Sistema em linha única

O sistema de injeção em fluxo em linha única é o modelo mais elementar. Nessa configuração, a mistura da amostra com o reagente ocorre exclusivamente por dispersão, enquanto a mesma é transportada em direção ao detector. Apresenta como principal desvantagem o consumo relativamente alto de reagente, uma vez que a solução carregadora, neste caso, é o próprio reagente (REIS, 1989; REIS, 1996).

I.3.2.2. Sistemas em confluência

As limitações do sistema em linha única foram resolvidas adotando-se a adição do reagente por confluência. Desta forma o reagente é adicionado logo após o injetor, permitindo que cada fração da amostra receba a mesma quantidade de reagente (REIS, 1989). Embora nesta configuração o reagente não tenha mais a função de carregador, seu consumo ainda é relativamente elevado, uma vez que é bombeado na linha mesmo sem o processamento da amostra.

I.3.2.3. Sistemas com zonas coalescentes

O problema do desperdício de reagente pôde ser resolvido com o desenvolvimento dos sistemas com zonas coalescentes. Este consiste na introdução simultânea de um volume de amostra e reagente por fluxos carregadores diferentes que os transportam até o ponto de confluência para que ocorra a reação e posteriormente, a detecção. Sendo assim, volumes de reagente e amostra, convenientemente estabelecidos, são liberados apenas no momento da leitura (BERGAMIN-FILHO et al., 1978).

Essa diminuição do consumo de reagentes com conseqüente minimização na geração de resíduos, faz com que os métodos em fluxo com zonas coalescentes sejam mais limpos e se enquadrem nas exigências da Química Verde (ROCHA; NÓBREGA; FATIBELLO-FILHO, 2001; LENARDÃO et al., 2003).

I.4. Química Verde

Questões ambientais vêm sendo atualmente, uns dos principais motivos de preocupação mundial, visto a quantidade de catástrofes ambientais

ocorridas nos últimos tempos. Conferências internacionais como a ECO-92, a Cúpula Mundial sobre Desenvolvimento Sustentável (RIO+10) e o Protocolo de Kyoto são exemplos dessa preocupação.

A atividade química é freqüentemente relacionada, direta ou indiretamente, à maioria desses chamados “desastres ambientais”, embora outras atividades humanas também exerçam papel importante na degradação e poluição ambientais (LENARDÃO et al., 2003). Essa relação ocorre, em geral, porque muitos procedimentos químicos envolvem a utilização de reagentes tóxicos ou a produção de resíduos perigosos. Paradoxalmente, até mesmo algumas metodologias analíticas empregadas para investigar e/ou monitorar problemas ambientais geram resíduos tóxicos, resultando em impactos ambientais. Sendo assim, a quantidade e a periculosidade dos reagentes e resíduos empregados no desenvolvimento de novas metodologias e procedimentos tornam-se tão importantes quanto os outros fatores analíticos (ROCHA; NÓBREGA; FATIBELLO-FILHO, 2001).

Nesse contexto, surge uma nova filosofia de desenvolvimento: a Química Verde (LENARDÃO et al., 2003; ANASTAS, 1999; ANASTAS; KIRCHHOFF, 2002; WORLD COMISSION ON ENVIRONMENT AND DEVELOPMENT, 1987). Esse conceito pode ser encarado como a associação do desenvolvimento da química à busca da auto-sustentabilidade, ou seja, prevê o progresso industrial e tecnológico sem comprometer a capacidade das futuras gerações satisfazerem às suas próprias necessidades (LENARDÃO et al., 2003; SILVA, 2005).

O conceito de Química Verde não é novidade em aplicações científicas e industriais, principalmente, em países com controle rigoroso na emissão de

poluentes, porém, no Brasil, apenas recentemente a questão ambiental passou a ter uma penetração mais efetiva, tanto no dia-a-dia do cidadão comum como nas comunidades científicas.

No estado de São Paulo, a CETESB (Companhia Estadual de Tecnologia e Saneamento Básico e Defesa do Meio Ambiente), órgão responsável pelo estabelecimento e execução de planos de prevenção e controle da poluição, também adota os princípios da Química Verde e desenvolve o Programa de Prevenção à Poluição, no qual enquadra-se qualquer prática, processo, técnica ou tecnologia que vise a redução ou eliminação em volume, concentração e/ou toxicidade dos reagentes e dos resíduos na fonte geradora (COMPANHIA ESTADUAL DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO BÁSICO E DE DEFESA DO MEIO AMBIENTE, 2008). Segundo a CETESB, essas ações podem ser implementadas por qualquer pessoa ou organização que deseje melhorar a qualidade ambiental local e global, incluindo os laboratórios acadêmicos de pesquisas.

1.5. Ambientes micelares em Química Analítica

Os tensoativos ou surfactantes têm importante aplicação em Química Analítica devido, principalmente, à sua capacidade em modificar algumas propriedades reacionais com conseqüente melhoria em sensibilidade e/ou seletividade analítica (ROMERO et al.,1995). As principais características do uso de surfactantes estão relacionadas à formação de ambientes altamente organizados, também conhecidos como ambientes micelares (WEST; HARWELL, 1992; MANIASSO, 2001).

As micelas são agregados moleculares formados pela associação espontânea dos monômeros do surfactante a partir da concentração micelar crítica (CMC) (MANIASSO, 2001).

Os ambientes micelares podem ser empregados principalmente sob dois aspectos. O primeiro se refere à exploração das características do ambiente micelar, formado no meio reacional para a melhoria da sensibilidade e/ou seletividade, com ênfase a reações catalíticas, e o segundo se relaciona a etapas de concentração e/ou separação, onde é possível substituir solventes orgânicos na busca de procedimentos “limpos” do ponto de vista da Química Verde (SILVA, 2005).

Capítulo II - Justificativa e Objetivos

Problemas na qualidade dos princípios ativos (fármacos) presentes em medicamentos produzidos e comercializados no Brasil são freqüentemente relatados, incluindo episódios de falsificação e/ou adulteração, que atingem cerca de 20% dos medicamentos comercializados no país (PASTORE, 1998; SECCO; MANSUR, 2000; FERNANDES; VIEIRA, 2003). Dessa maneira, o desenvolvimento de metodologias e procedimentos analíticos simples, rápidos, de baixo custo e com baixo consumo de reagentes e solventes torna-se evidente não somente para o controle de qualidade desses fármacos, mas também para demonstrar a qualidade do produto.

Diante dessas considerações e da falta de métodos analíticos para determinação de bromoprida, fica clara a viabilidade do desenvolvimento de novas metodologias para a quantificação deste fármaco.

Procedimentos por injeção em fluxo com zonas coalescentes tornam-se muito atrativos no desenvolvimento de metodologias analíticas, uma vez que unem as vantagens da automação com mínima utilização e geração de reagentes e resíduos, tornando esses métodos mais limpos e ambientalmente amigáveis, atendendo aos preceitos da Química Verde.

Dessa forma, os objetivos desse trabalho são:

- O desenvolvimento de procedimento em fluxo para determinação quantitativa de bromoprida em diferentes matrizes;
- Otimização dos parâmetros experimentais através de ferramentas quimiométricas (planejamento fatorial, planejamento composto central e metodologia de superfície de resposta);
- Aplicação da metodologia proposta na determinação do fármaco em formulações farmacêuticas e em fluido biológico;

- Validação da metodologia proposta.

Capítulo III - Parte Experimental

III.1. Equipamentos, reagentes e preparo de soluções

III.1.1. Equipamentos

Para o desenvolvimento do procedimento em fluxo utilizou-se uma bomba peristáltica de quatro canais, Ismatec, modelo IS 7610, com rotação variável (1-50 rpm) acoplada ao sistema de análise modular ASIA da Ismatec (Zurique, Suíça) equipada com tubos de bombeamento de Tygon® com diferentes diâmetros internos e um injetor comutador confeccionado em acrílico, tubos de polietileno de 0,8mm de diâmetro interno para construção da alça de amostragem, bobina de reação e de homogeneização, linhas de transmissão e confluência em acrílico. A detecção foi feita pelo acoplamento, através de uma interface RS 232 de um espectrofotômetro de arranjos de diodo UV/Vis HP 8453A (Hewlett Packard, EUA) equipado com cubeta de fluxo de quartzo com caminho óptico de 1,00cm e volume interno de 80 μ L, (Hewlett Packard, EUA).

Nas medidas volumétricas foram empregadas buretas classe A, vidrarias grau A, micropipetas Brand e Eppendorf. As pesagens foram feitas em balança analítica, modelo AG 204, marca Toledo.

Para tratamento dos dados obtidos foram utilizados microcomputadores com programas de cunho científico.

Todos os equipamentos encontram-se instalados em salas devidamente equipadas, com rede elétrica estabilizada, ar-condicionado e desumidificadores.

III.1.2. Reagentes

Para a realização dos experimentos foram utilizados os seguintes reagentes e solventes:

- a) Bromoprida (99,03%), Deg;
- b) *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC, 98%), Sigma;
- c) Ácido clorídrico, Mallinckrodt;
- d) Dodecil sulfato de sódio (SDS, 99%), Sigma;
- e) Amostras comerciais de bromoprida.

III.1.3. Preparo de soluções

III.1.3.1. Solução de ácido clorídrico

Preparou-se a solução estoque de HCl $1,20 \text{ mol L}^{-1}$ através de conveniente diluição de HCl previamente padronizado (MENDHAM et al., 1988).

III.1.3.2. Solução de bromoprida

- **Solução estoque de bromoprida $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (500 ppm)**

Pesou-se 25,0 mg de bromoprida e solubilizou-se com 10 mL de solução HCl $1,20 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, transferiu-se quantitativamente a solução para balão volumétrico de 50,00 mL, completando seu volume com água desionizada.

- **Solução de trabalho de bromoprida**

Para o preparo da solução de bromoprida $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (10 ppm) tomou-se uma alíquota de 2,00 mL da solução estoque e diluiu-se em água deionizada para balão volumétrico de 100,00 mL. As demais soluções trabalho foram obtidas por conveniente diluição da solução de bromoprida $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os volumes das alíquotas e as concentrações das soluções trabalho estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 2. Volumes tomados da solução estoque de bromoprida e as respectivas concentrações das soluções trabalho.

$V_{\text{solução estoque}} \text{ (mL)}$	Bromoprida (mol L^{-1})	Bromoprida (ppm)
0,125	$3,63 \times 10^{-7}$	0,125
0,250	$7,26 \times 10^{-7}$	0,250
0,500	$1,45 \times 10^{-6}$	0,500
0,750	$2,18 \times 10^{-6}$	0,750
1,00	$2,90 \times 10^{-6}$	1,00
2,00	$5,80 \times 10^{-6}$	2,00
4,00	$1,16 \times 10^{-5}$	4,00
6,00	$1,74 \times 10^{-5}$	6,00
8,00	$2,32 \times 10^{-5}$	8,00

V.1.3.3. Soluções de *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC)

As soluções de *p*-DAC podem ser armazenadas em geladeira por até uma semana, sem que ocorra degradação da mesma, de acordo observado em laboratório.

- **Solução de trabalho de *p*-DAC**

As soluções de trabalho de *p*-DAC foram preparadas solubilizando-se adequadas massas de *p*-DAC em alíquotas de HCl $1,20 \text{ mol L}^{-1}$.

Posteriormente, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 25,00 mL, completando-se o volume com água desionizada. As massas de *p*-DAC, os volumes das alíquotas de HCl e as concentrações finais das soluções estão relacionadas na Tabela 3.

Tabela 3. Massas de *p*-DAC e volumes de HCl tomados e as respectivas concentrações finais das soluções trabalho.

Massa de <i>p</i> -DAC	Volume de HCl	[Solução trabalho] mol L ⁻¹
(mg)	(mL)	<i>p</i> -DAC / HCl
4,3	0,250	$9,82 \times 10^{-4} / 1,20 \times 10^{-2}$
4,3	0,425	$9,82 \times 10^{-4} / 2,03 \times 10^{-2}$
6,8	0,250	$1,54 \times 10^{-3} / 1,20 \times 10^{-2}$
6,8	0,425	$1,54 \times 10^{-3} / 2,03 \times 10^{-2}$
7,5	0,750	$1,71 \times 10^{-3} / 3,59 \times 10^{-2}$
12,5	0,750	$2,85 \times 10^{-3} / 3,59 \times 10^{-2}$
14,0	0,750	$3,20 \times 10^{-3} / 3,59 \times 10^{-2}$
17,5	0,750	$3,99 \times 10^{-3} / 3,59 \times 10^{-2}$
19,8	0,750	$4,52 \times 10^{-3} / 3,59 \times 10^{-2}$
21,0	0,750	$4,79 \times 10^{-3} / 3,59 \times 10^{-2}$
22,5	0,750	$5,14 \times 10^{-3} / 3,59 \times 10^{-2}$

III.1.3.4. Soluções de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

Para o preparo da solução de SDS 0,10 mol L⁻¹ pesou-se cerca de 14 g e solubilizou-se com aproximadamente 300 mL de água desionizada, com o auxílio de um banho de ultrassom, a fim de evitar a formação de espuma. Posteriormente, transferiu-se quantitativamente a solução para balão volumétrico de 500,00 mL e completou-se o volume com água desionizada. As

soluções de SDS 0,01 e 0,02 mol L⁻¹ foram preparadas por adequada diluição da solução de SDS 0,10 mol L⁻¹.

III.1.3.5. Soluções das amostras comerciais

- **Amostras líquidas**

Preparou-se soluções estoques ($1,45 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) pela conveniente diluição de alíquotas de amostras em 2,00 mL de HCl 1,20 mol L⁻¹. Transferiu-se as soluções, individualmente, para balão volumétrico de 10,00 mL e completou-se o volume com água desionizada.

- **Amostras sólidas**

Vinte comprimidos de cada amostra foram individualmente pesados e em seguida, calculou-se a massa média. Posteriormente, os comprimidos foram finamente triturados em almofariz de ágata e transferidos para um frasco limpo e seco, onde foram homogeneizados.

Para o preparo das soluções estoque ($1,45 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), pesou-se, de cada amostra, uma massa de comprimido equivalente a 25,0 mg de princípio ativo (bromoprida) e solubilizou-se com 10 mL de HCl 1,20 mol L⁻¹. Transferiu-se quantitativamente a solução para balão volumétrico de 50,00 mL e completou-se o volume com água desionizada.

As soluções de trabalho das amostras ($2,90 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) foram preparadas por adequada diluição das soluções estoque com água desionizada.

III.1.3.6. Amostras de urina

Amostras de urina de um indivíduo saudável e que não fez uso de qualquer medicamento foram fortificadas com adequadas alíquotas de solução padrão de bromoprida $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, de maneira a obter uma solução de concentração final $2,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Essa concentração foi estipulada considerando a eliminação do conteúdo nominal de uma dose de bromoprida em 1000 mL de urina (MELO, 2001/02), sendo que apenas 10% da dose administrada é excretada inalterada através da urina (BULÁRIO ELETRÔNICO DA ANVISA, 2008; BRODIE; CHASSEAUD; ROONEY, 1984).

As soluções de bromoprida em urina $3,63 \times 10^{-7}$, $7,26 \times 10^{-7}$, $1,45 \times 10^{-6}$ e $2,18 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas por conveniente diluição da solução padrão $2,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Capítulo IV – Metodologia, resultados e discussões

IV.1. Utilização do *p*-DAC como reagente cromogênico

Estudos preliminares mostraram a formação de um composto colorido (violeta) estável, resultante da reação inédita da bromoprida com o reagente cromogênico *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC).

O *p*-DAC é um composto que apresenta coloração amarela, fórmula molecular $C_{11}H_{13}NO$ e estrutura química apresentada a seguir (Figura 2):

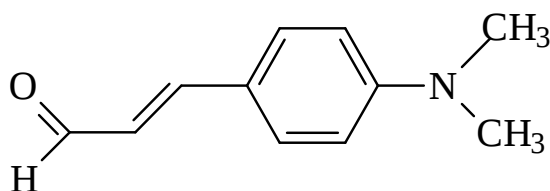
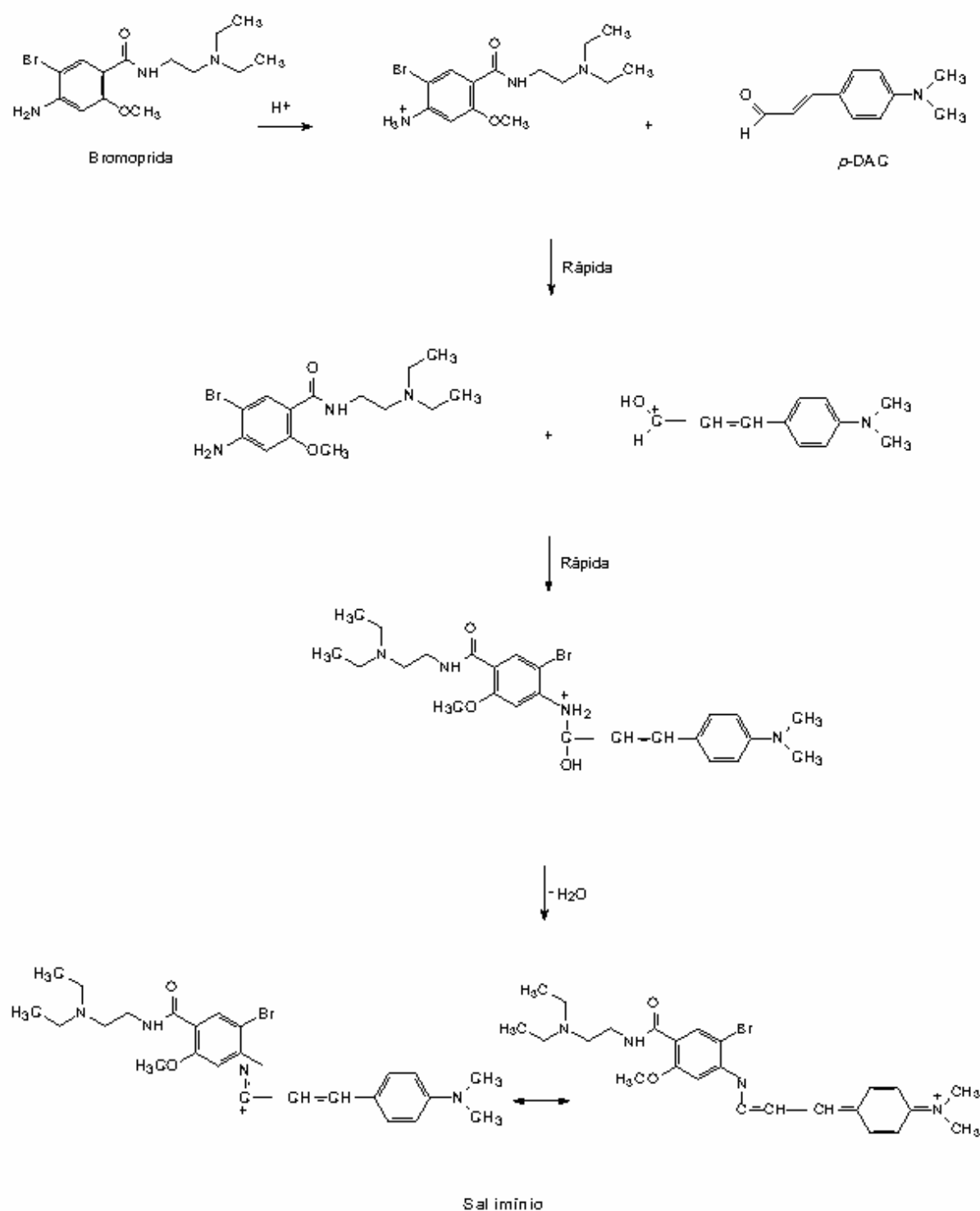


Figura 2. Estrutura do *p*-dimetilaminocinamaldeído.

É um reagente utilizado para a detecção e determinação espectrofométrica de aminas aromáticas ou alifáticas, primárias ou secundárias (SAEED; HAQUE; QURESHI, 1993). A reação entre aminas primárias e *p*-DAC envolve a condensação do grupo amino com o grupo carbonila do reagente (*p*-DAC) produzindo um sal imínio (EL SHERIF et al., 1997). No esquema 1, é apresentado o provável mecanismo para a reação entre *p*-DAC e bromoprida.



Esquema 1. Provável mecanismo da reação entre a bromoprida e o *p*-DAC, em meio ácido.

IV.2. Utilização de surfactante na reação

Em vista das possíveis vantagens inerentes ao uso de surfactantes em algumas reações, testes preliminares com o dodecil sulfato de sódio (SDS) foram feitos com o intuito de verificar o efeito do meio micelar sobre o sistema reacional em estudo.

Para tanto, foram feitos experimentos qualitativos, onde a reação da bromoprida com o *p*-DAC foi promovida na presença e na ausência do surfactante. Pôde-se constatar a viabilidade do uso de SDS na reação, uma vez que proporcionou um aumento significativo na absorbância (13,6 vezes). Os espectros de absorbância dos testes realizados estão representados na Figura 3.

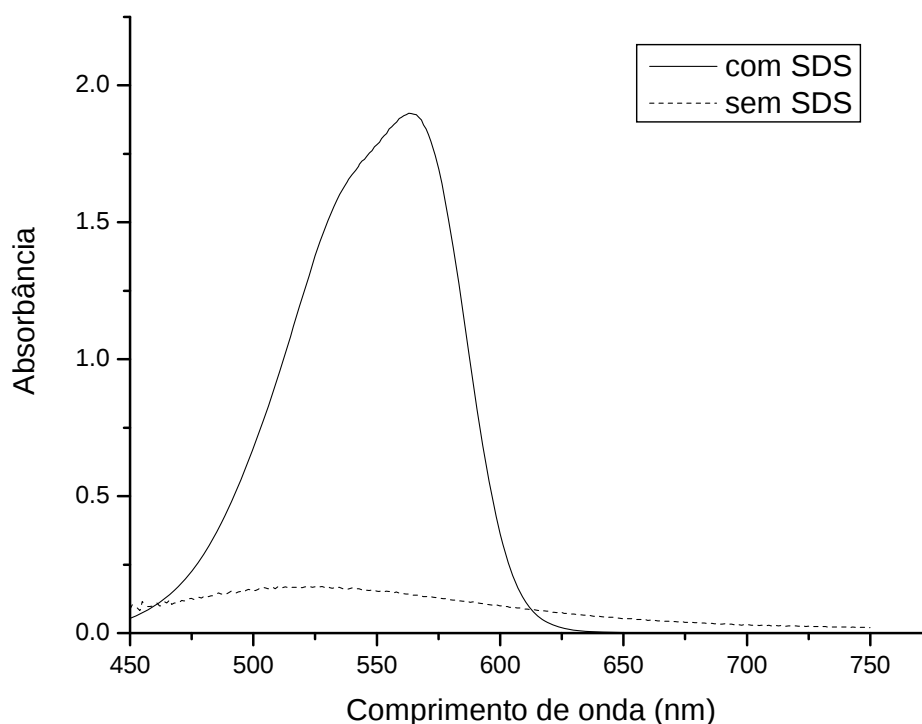


Figura 3. Espectros de absorbância do produto colorido da reação entre a bromoprida ($2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e o *p*-DAC (0,17%) na presença e na ausência do surfactante ($b = 1,00 \text{ cm}$).

Com base na literatura podemos supor que o meio de SDS estabiliza o *p*-DAC protonado e a forma neutra da amina aromática primária (etapa rápida da reação). Dessa maneira, as formas reativas dos reagentes são pré-concentrados nas micelas do surfactante, o que acarreta num aumento significativo da razão de condensação entre ambos, aumentando a sensibilidade do sistema, que pode ser comprovado pelo aumento no valor da absorbância (DORONIN; CHERNOVA; GUSAKOVA, 2005). Essa estratégia viabilizou a aplicação da metodologia proposta para determinação de bromoprida em fluido biológico, visto que apenas 10% da dose administrada é excretada na forma inalterada pela urina (BULÁRIO ELETRONICO DA ANVISA, 2008; BRODIE; CHASSEAUD; ROONEY, 1984).

IV.3. Utilização de sistema em fluxo

A análise por injeção em fluxo (FIA) é um procedimento que permite automatizar a manipulação de soluções, visando economia de tempo e consumo de reagentes e amostras, diminuição do risco de contaminação da amostra durante a operação, aumentando a precisão do método e diminuindo seu custo operacional. Além disso, é caracterizada pela alta simplicidade e versatilidade, podendo ser implementada em qualquer laboratório analítico (REIS; GUINÉ; KRONKA, 1989).

Diante das vantagens inerentes aos sistemas em FIA, foi desenvolvido um procedimento em fluxo para determinação de bromoprida em medicamentos e fluido biológico.

Na metodologia desenvolvida foi utilizado o sistema com zonas coalescentes com detecção espectrofotométrica, uma vez que um dos

objetivos principais do trabalho é desenvolver um método mais limpo para a quantificação do fármaco. A Figura 4 representa o diagrama esquemático do sistema de fluxo utilizado.

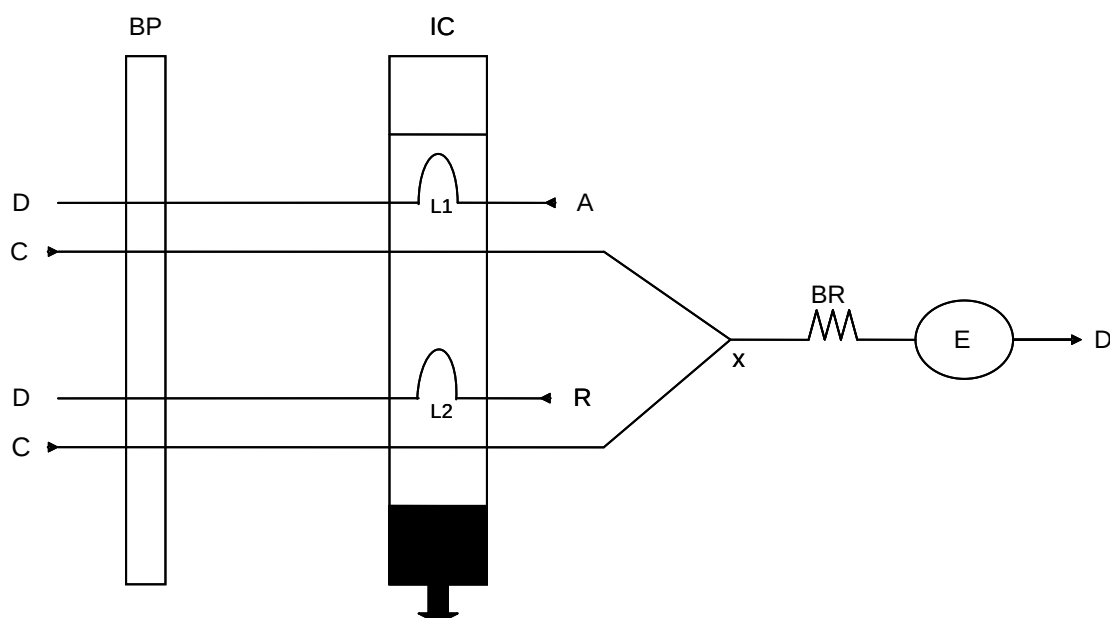


Figura 4. Diagrama esquemático do sistema em fluxo utilizado. BP: bomba peristáltica; IC: injetor comutador manual; C: solução carregadora; A: soluções padrão ou amostras; R: reagente; L1: alça de amostragem; L2: alça de reagente; x: ponto de confluência; BR: bobina reacional; E: detector (espectrofotômetro); D: descarte. A seta e o quadrado pretos representam respectivamente, a direção e posição do injetor comutador para a posição de injeção de amostra.

IV.4. Otimização dos parâmetros envolvidos na reação

A utilização de planejamentos de experimentos baseados em princípios estatísticos é, em geral, a maneira mais eficiente para se estimar os efeitos de vários fatores (ou variáveis) simultaneamente (CALADO; MONTGOMERY, 2003; BARROS; SCARMÍNIO; BRUNS, 1995). Com esta ferramenta é possível extrair do sistema em estudo o máximo de informações úteis com um número mínimo de ensaios. Na prática, isso significa diminuição de horas trabalhadas,

diminuição de gastos de reagentes e mais agilidade no desenvolvimento de novos produtos, processos e métodos, além do melhor entendimento e controle do sistema e conseqüentemente obtenção de resultados mais confiáveis, dentre outras vantagens.

O planejamento de experimentos não propõe uma rota única a ser seguida, mas direciona a condução dos experimentos de forma a atingir a meta estabelecida. Para tanto, é necessário selecionar as variáveis independentes e os níveis em que cada uma será avaliada e projetar o planejamento de experimentos de forma que se possa obter exatamente o tipo de informação desejada.

Nesse trabalho, o planejamento de experimentos foi aplicado no desenvolvimento de um procedimento analítico em fluxo com detecção espectrofotométrica na região de visível para determinação de bromoprida em diferentes matrizes, com o objetivo de obter-se a melhor condição experimental que levará a um valor ótimo para a variável resposta.

IV.4.1. Triagem das variáveis

Foram feitos estudos para estabelecer as condições mais favoráveis, buscando-se obter maior sensibilidade ao experimento. A influência dos efeitos das variáveis químicas (concentrações de SDS, *p*-DAC e ácido clorídrico) e físicas (tamanhos das alças do reagente e da amostra e vazão da solução transportadora) foi estudada utilizando-se planejamento fatorial para sete variáveis em dois níveis, baixo (-) e alto (+).

Um planejamento fatorial em dois níveis é representado por 2^k , onde 2 significa o número de níveis e k o número de variáveis e sua resolução

apresenta o número de ensaios necessários para o planejamento. Nesse planejamento obteve-se uma matriz 2^7 , onde seriam necessários 128 experimentos (sem contar as replicatas). Como este é um número muito elevado de experimentos, optou-se por um planejamento fatorial fracionário, onde é possível identificar as variáveis mais importantes com um número reduzido de experimentos (CALADO; MONTGOMERY, 2003; BARROS; SCARMÍNIO; BRUNS, 1995).

Foi selecionada uma matriz $2^{(7-3)}$, onde foram necessários, por tanto, dezesseis experimentos. As Tabelas 4 e 5 apresentam, respectivamente, as variáveis experimentais em seus respectivos níveis e a matriz do planejamento. Os experimentos foram feitos em duplicata e os resultados analisados utilizando o programa Statistica, versão 6.0. A concentração de bromoprida utilizada em todo planejamento foi de $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 4. Variáveis experimentais estudadas e seus respectivos níveis.

Variáveis	Nível baixo (-)	Nível alto (+)
Concentração de SDS (mol L^{-1})	0,01	0,02
Concentração de <i>p</i> -DAC (mol L^{-1})	$9,82 \times 10^{-4}$	$1,54 \times 10^{-3}$
Concentração de HCl (mol L^{-1})	$1,20 \times 10^{-2}$	$2,03 \times 10^{-2}$
Alça do reagente (μL)	201	402
Alça da amostra (μL)	101	302
Bobina de reação (cm)	37	57
Vazão do carregador (mL min^{-1})	0,875	2,63

Tabela 5. Matriz codificada do planejamento fracionário.

Nº	Variáveis codificadas						
	[SDS]	[p-DAC]	[HCl]	Alça	Alça	Bobina	Vazão
				Reagente	Amostra	Reação	
1	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-	+
3	-	+	+	-	+	-	-
4	+	-	+	-	+	-	+
5	-	+	+	+	-	-	+
6	+	-	+	+	-	-	-
7	-	-	-	+	+	-	+
8	+	+	-	+	+	-	-
9	-	-	+	-	-	+	+
10	+	+	+	-	-	+	-
11	-	+	-	-	+	+	+
12	+	-	-	-	+	+	-
13	-	+	-	+	-	+	+
14	+	-	-	+	-	+	+
15	-	-	+	+	+	+	-
16	+	+	+	+	+	+	+

A Figura 5 (Gráfico de Pareto) representa os efeitos estimados para as variáveis investigadas e se há ou não efeitos de interação significativos entre as mesmas. Neste gráfico o comprimento da barra é proporcional ao valor estimado para o efeito da variável em relação à linha vertical, com uma significância estatística de 95%. Dessa forma, o efeito é mais significativo quanto mais a barra atravessar esta linha vertical.

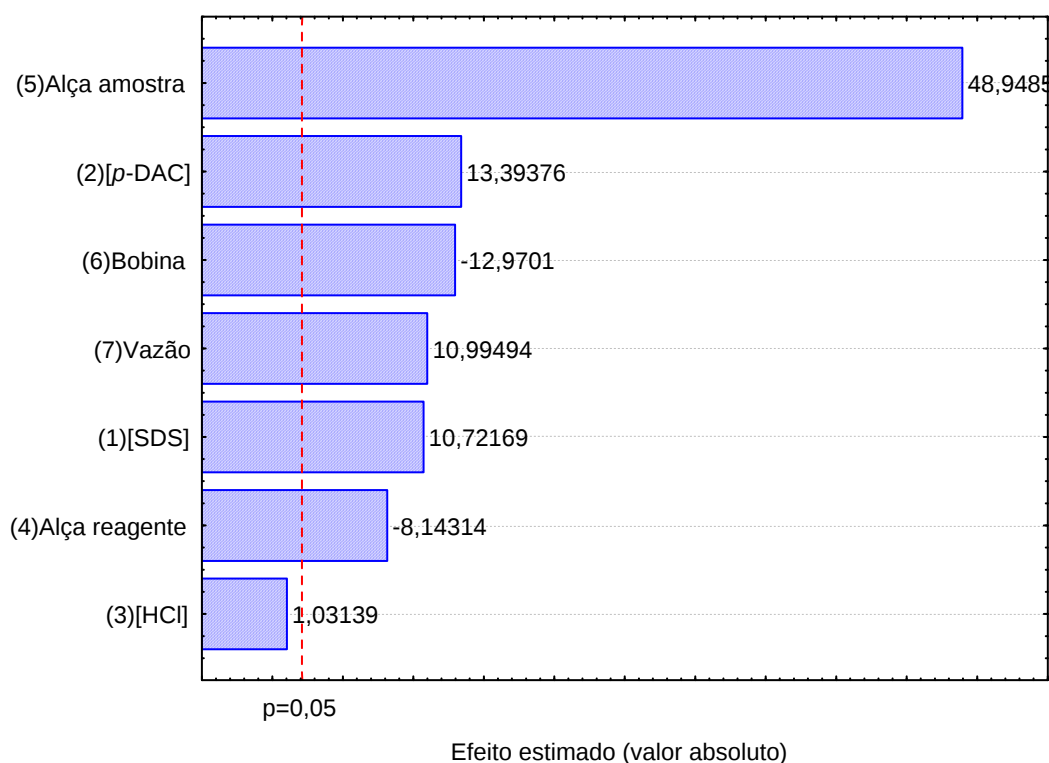


Figura 5. Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial fracionário.

De acordo com o gráfico, podem-se conhecer as variáveis que exercem menor influência sobre o experimento. O volume da alça do reagente, a concentração de SDS e a vazão do carregador foram fixadas. O volume da alça do reagente foi fixado no nível (–) (201 μL), de acordo com o indicado pelo planejamento; a concentração de SDS foi fixada no nível (+) ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$), uma vez que a mesma já se encontrava acima da concentração micelar crítica ($8,30 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$); a vazão do carregador foi fixada no nível (+) ($2,63 \text{ mL min}^{-1}$), tendo em vista que uma vazão superior implicaria num maior gasto de reagente. A seleção dos níveis das variáveis garantiu ao sistema a condição experimental que possibilitasse a melhor resposta.

Embora tenha sido descartada a influência do ácido clorídrico, sua concentração não foi fixada e sim aumentada, uma vez que o *p*-DAC (variável importante), necessitaria de um volume maior de ácido para sua total solubilização. Portanto, a concentração final de ácido utilizada foi de $3,59 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, concentração necessária, determinada experimentalmente, para a solubilização do reagente.

Realizou-se um planejamento fatorial completo para estudar as variáveis mais importantes (volume da alça da amostra, concentração de *p*-DAC e comprimento da bobina de reação). Para tanto, utilizou-se uma matriz 2^3 , onde foram necessários oito experimentos, feitos em duplicata. A Tabela 6 representa a matriz do planejamento e seus respectivos níveis.

Tabela 6. Matriz do planejamento fatorial completo.

Nº	Variáveis não codificadas			Variáveis codificadas		
	[<i>p</i> -DAC] (mol L ⁻¹)	Alça amostra (μL)	Bobina (cm)	[<i>p</i> -DAC] (mol L ⁻¹)	Alça amostra (μL)	Bobina (cm)
1	1,71 x 10 ⁻³	302	32	-	-	-
2	3,99 x 10 ⁻³	302	32	+	-	-
3	1,71 x 10 ⁻³	704	32	-	+	-
4	3,99 x 10 ⁻³	704	32	+	+	-
5	1,71 x 10 ⁻³	302	47	-	-	+
6	3,99 x 10 ⁻³	302	47	+	-	+
7	1,71 x 10 ⁻³	704	47	-	+	+
8	3,99 x 10 ⁻³	704	47	+	+	+

O gráfico de Pareto para esse planejamento está representado na Figura 6.

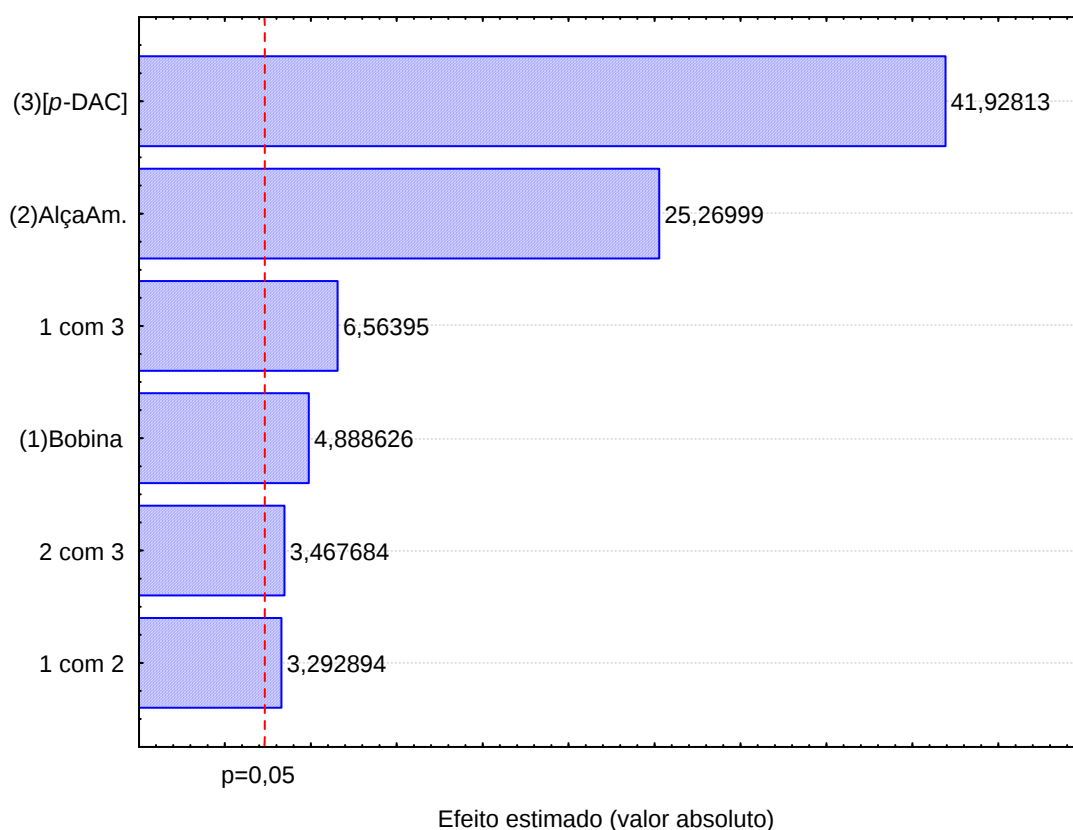


Figura 6. Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo.

De acordo com o gráfico a bobina de reação é a variável que exerce menor influência, portanto seu nível foi fixado no (+) (47 cm), tendo em vista que esta foi a condição que possibilitou a melhor resposta. O gráfico apresenta as interações entre as variáveis, porém estas não são significativas.

IV.4.2. Metodologia da superfície de resposta

Para obtenção da superfície de resposta, que indicaria as condições ótimas para execução da reação, optou-se por realizar um planejamento composto central, através do qual foram avaliadas, em cinco níveis, as variáveis: concentração de *p*-DAC e volume da alça da amostra. Para tanto, doze experimentos foram feitos. As variáveis estudadas em seus respectivos níveis e a matriz utilizada estão apresentadas na Tabela 7. O experimento do

ponto central foi feito em replicatas ($n = 4$) e os resultados analisados utilizando o programa Statistica 6.0.

Tabela 7. Matriz do planejamento composto central.

Nº	Variáveis não codificadas		Variáveis codificadas	
	[p-DAC]	Alça	[p-DAC]	Alça
	(mol L ⁻¹)	Amostra (µL)	(mol L ⁻¹)	Amostra (µL)
1	$3,20 \times 10^{-3}$	460	-	-
2	$4,79 \times 10^{-3}$	460	+	-
3	$3,20 \times 10^{-3}$	746	-	+
4	$4,79 \times 10^{-3}$	746	+	+
5*	$3,99 \times 10^{-3}$	603	0	0
6*	$3,99 \times 10^{-3}$	603	0	0
7*	$3,99 \times 10^{-3}$	603	0	0
8*	$3,99 \times 10^{-3}$	603	0	0
9	$2,85 \times 10^{-3}$	603	-1,41	0
10	$5,14 \times 10^{-3}$	603	1,41	0
11	$3,99 \times 10^{-3}$	402	0	-1,41
12	$3,99 \times 10^{-3}$	804	0	1,41

* ponto central feito em replicatas ($n = 4$).

Observando-se a superfície de resposta juntamente com sua curva de nível (Figura 7), percebe-se que uma região de máximo valor de absorbância situada na área mais escura do gráfico representa as condições ótimas para a realização da reação dos experimentos.

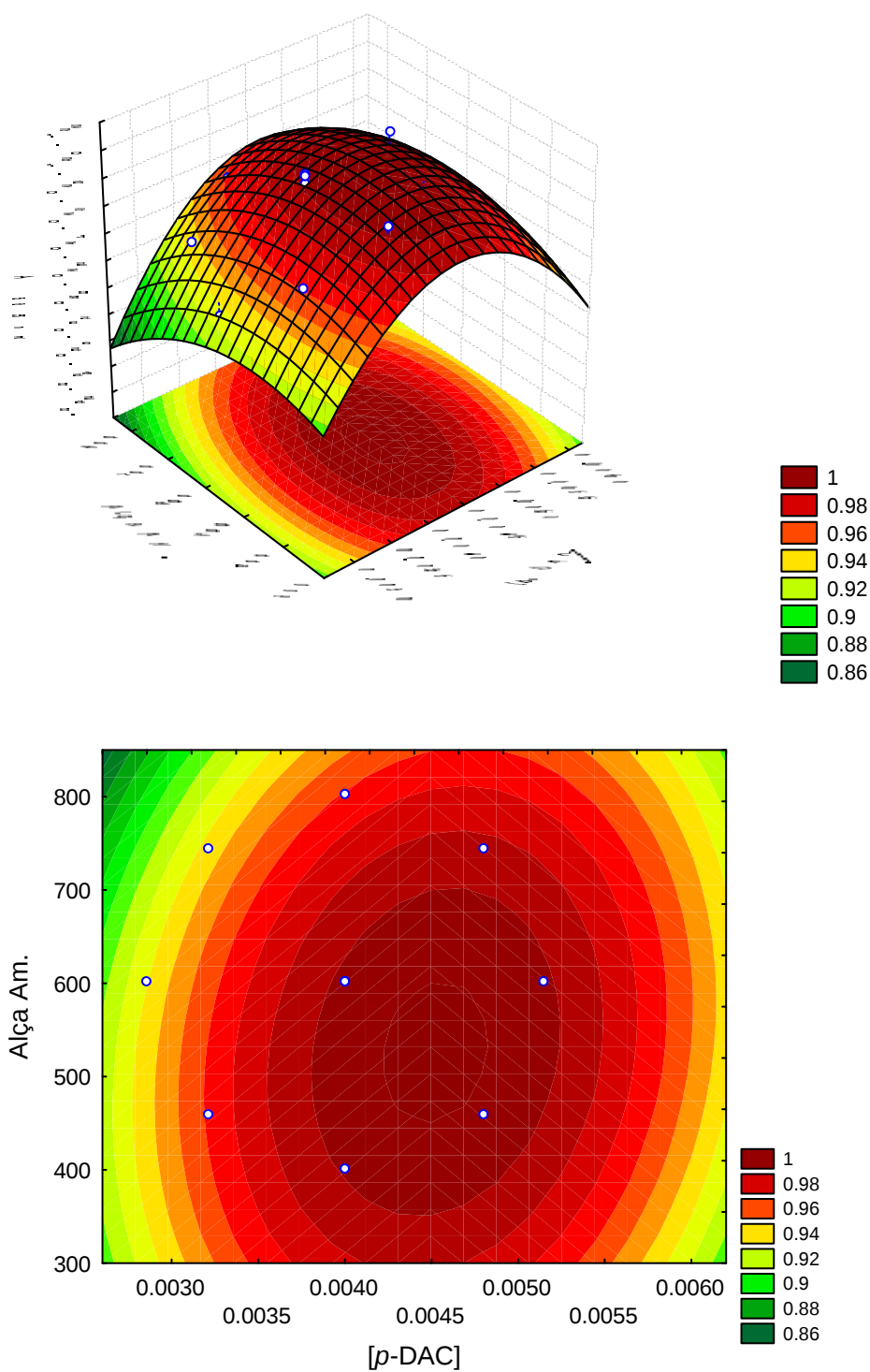


Figura 7. Superfície de resposta otimizada com sua respectiva curva de nível para medidas de absorvância em 565 nm em função das variáveis: concentração de *p*-DAC e volume da alça da amostra. Foi utilizada bromoprida $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em cada experimento. Equação da superfície:
 $Z = 0,46 + 203,66 X - 24114,50 X^2 + 3,02 \times 10^{-4} Y - 4,04 \times 10^{-7} Y^2 + 0,03 XY$.

Depois de concluída toda análise estatística dos dados e obtida a superfície de resposta, as melhores condições experimentais indicadas pelo modelo foram:

- Concentração de *p*-DAC: $4,52 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$;
- Volume da alça de amostra: 525 μL .

IV.5. Construção do fiograma e da curva analítica

Com as condições experimentais otimizadas, verificou-se a faixa de trabalho onde uma relação linear entre a absorbância medida e a concentração de bromoprida era obtida. Foi observada uma relação linear em um amplo intervalo de concentração: $3,63 \times 10^{-7}$ a $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (125 ppb a 10,0 ppm).

O fiograma, apresentado na Figura 8, é um conjunto de sinais transientes obtidos nas medidas de absorbância em 565 nm em função do tempo (s). Esses sinais foram obtidos através da reação, em linha, de 525 μL de soluções trabalho de bromoprida (em diferentes concentrações) com 201 μL de *p*-DAC $4,52 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $3,59 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, ambos impulsionados através do sistema por solução de SDS $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, numa vazão de $2,63 \text{ mL min}^{-1}$.

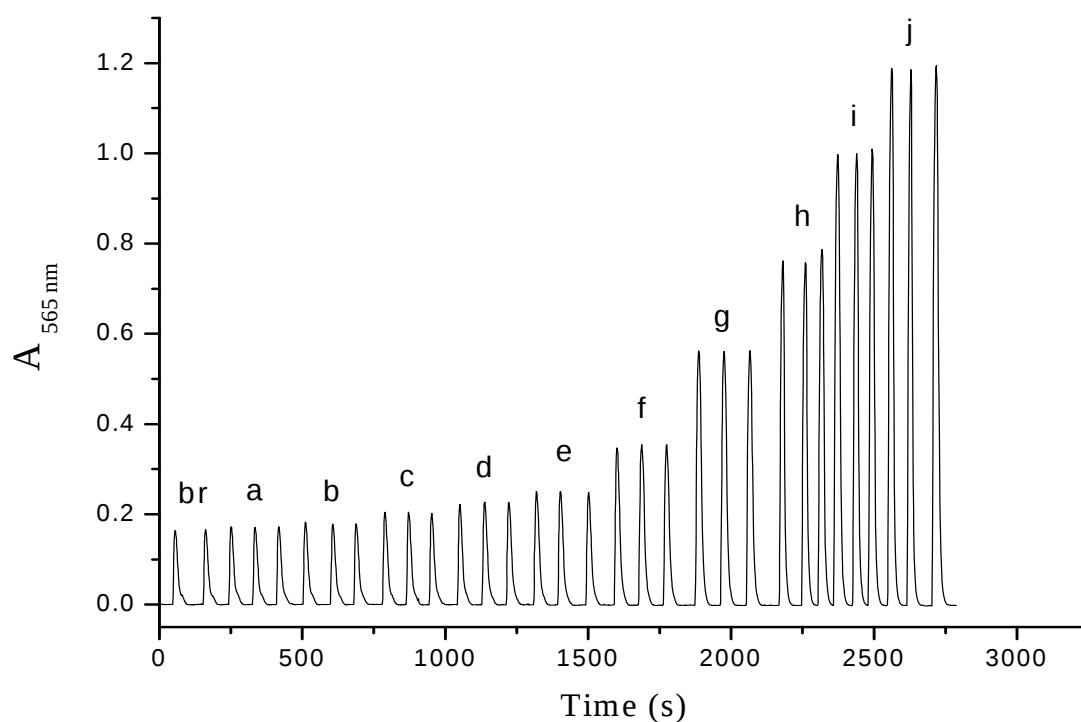


Figura 8. Fiagrama da curva analítica (Br: branco; a: $3,63 \times 10^{-7}$; b: $7,26 \times 10^{-7}$; c: $1,45 \times 10^{-6}$; d: $2,18 \times 10^{-6}$; e: $2,90 \times 10^{-6}$; f: $5,80 \times 10^{-6}$; g: $1,16 \times 10^{-5}$; h: $1,74 \times 10^{-5}$; i: $2,32 \times 10^{-5}$; j: $2,90 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Com os dados obtidos pelo fiagrama construiu-se a curva analítica (Figura 9), colocando em gráfico as $A_{565 \text{ nm}}$ medidas versus a concentração de bromoprida. As concentrações de bromoprida e os respectivos valores de $A_{565 \text{ nm}}$ estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Valores de $A_{565\text{ nm}}$ obtidos segundo a metodologia proposta.

Pontos da curva analítica	$A_{565\text{ nm}}^a$
[Bromoprida] mol L ⁻¹	
1 ($3,63 \times 10^{-7}$)	0,00676 $\pm$ 0,00076
2 ($7,26 \times 10^{-7}$)	0,01490 $\pm$ 0,00212
3 ($1,45 \times 10^{-6}$)	0,03870 $\pm$ 0,00112
4 ($2,18 \times 10^{-6}$)	0,06007 $\pm$ 0,00261
5 ($2,90 \times 10^{-6}$)	0,08484 $\pm$ 0,00101
6 ($5,80 \times 10^{-6}$)	0,18679 $\pm$ 0,00317
7 ($1,16 \times 10^{-5}$)	0,39703 $\pm$ 0,00059
8 ($1,74 \times 10^{-5}$)	0,60362 $\pm$ 0,01278
9 ($2,32 \times 10^{-5}$)	0,83687 $\pm$ 0,00527
10 ($2,90 \times 10^{-5}$)	1,02437 $\pm$ 0,00355

a: média $\pm$ desvio padrão de três determinações.

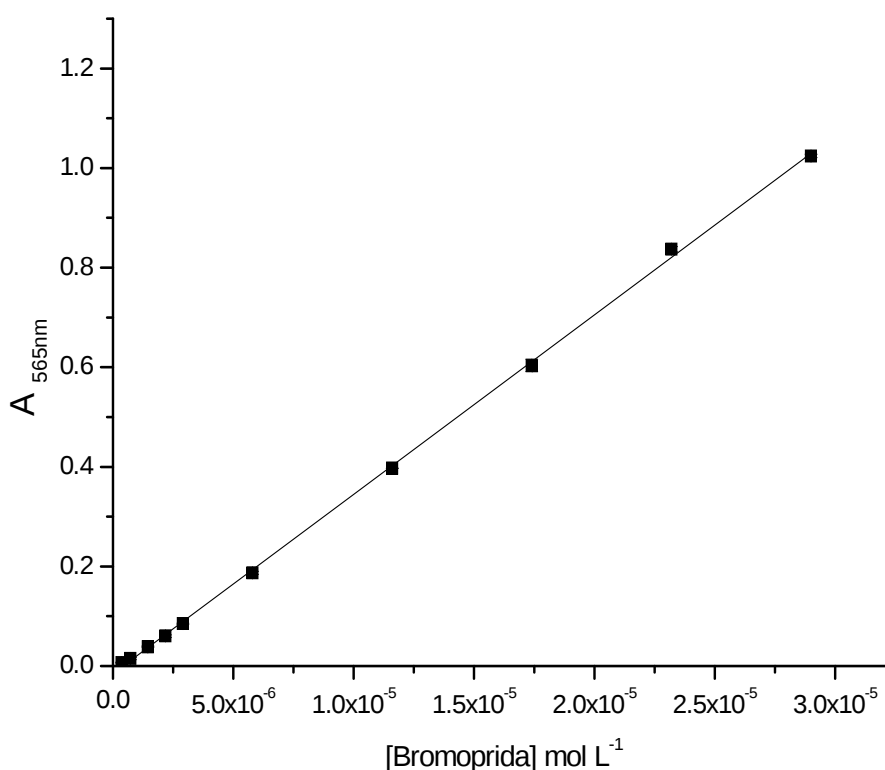


Figura 9. Curva analítica, em triplicata, obtida após tratamento matemático dos resultados. Equação da reta: $A = -0,01544 + 3,602 \times 10^4 C$, com $r = 0,9998$.

Os limites de detecção ($LOD = 3SD_{\text{branco}} / \text{inclinação da reta}$) e quantificação ($LOQ = 10SD_{\text{branco}} / \text{inclinação da reta}$) também foram determinados (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 1998; LONG; WINEFORDNER, 1983) e os valores encontrados foram 36,9 e 123 ppb, respectivamente.

IV.6. Efeito dos excipientes

Para avaliar o uso do método proposto, o possível efeito dos excipientes foi investigado. Tal efeito pode ocorrer em função da presença de alguns excipientes comumente encontrados em formulações farmacêuticas, juntamente com a bromoprida. São eles: sacarina, metilparabeno,

propilparabeno, ácido cítrico, EDTA, glicerina, álcool etílico, ácido clorídrico, metabissulfito de sódio, propilenoglicol, cloreto de sódio, lactose, amido, celulose microcristalina, dióxido de silício, estearato de magnésio, manitol, povidona e talco.

Os testes de interferência foram feitos separadamente e para cada excipiente o teste foi feito em triplicata. Foram usadas duas concentrações de excipientes, sendo uma igual e a outra dez vezes maior que aquela de bromoprida presente na solução.

As soluções foram analisadas segundo a metodologia proposta. Nenhuma interferência foi observada na presença das substâncias testadas, uma vez que se repetiram os valores de absorbância já obtidos.

IV.7. Aplicações analíticas e validação do método desenvolvido

IV.7.1. Análise das amostras comerciais

O método desenvolvido foi aplicado para determinação de bromoprida em seis amostras de medicamentos adquiridas em farmácias locais. Os resultados obtidos pela aplicação do método proposto estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Determinação de bromoprida em amostras comerciais pelo método proposto.

Amostra	Conteúdo nominal ^a	Conteúdo encontrado pelo
		método proposto ^b
A ^c	10	10,1 ± 0,36
B ^c	10	8,82 ± 0,04
C ^d	4	3,89 ± 0,02
D ^d	4	4,05 ± 0,02
E ^d	1	0,96 ± 0,01
F ^e	5	4,64 ± 0,01

a: conteúdo nominal declarado pelo fabricante: mg comprimido⁻¹ para as amostras A e B; e mg mL⁻¹ para as amostras C, D, E e F;

b: valor médio ± desvio padrão de três determinações;

c: amostras sólidas;

d: amostras de soluções orais;

e: amostra injetável.

IV.7.2. Estudos de adição e recuperação em medicamentos

Para validação do método desenvolvido, estudos de recuperação foram feitos por meio do método de adição de padrão. Neste estudo, quantidades conhecidas de bromoprida pura (padrão analítico) foram adicionadas às soluções das amostras pré-analisadas. As quantidades de padrão adicionadas correspondem a 50, 100 e 150% da concentração de bromoprida presente nas amostras ($2,90 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹). A Tabela 10 apresenta as concentrações adicionadas e as recuperações obtidas para cada formulação farmacêutica.

Tabela 10. Resultados de recuperação de bromoprida adicionada em formulações farmacêuticas.

Amostras	[Bromoprida] adicionada (mol L ⁻¹)	[Bromoprida] recuperada (mol L ⁻¹)	Recuperação %
A ^a	0	2,90 x 10 ⁻⁶	-
	1,45 x 10 ⁻⁶	4,32 x 10 ⁻⁶	97,9
	2,90 x 10 ⁻⁶	5,83 x 10 ⁻⁶	101,0
	4,35 x 10 ⁻⁶	7,24 x 10 ⁻⁶	99,8
	$\mu^d = 99,6 \pm 1,3$		
B ^a	0	2,50 x 10 ⁻⁶	-
	1,45 x 10 ⁻⁶	3,93 x 10 ⁻⁶	98,6
	2,90 x 10 ⁻⁶	5,41 x 10 ⁻⁶	100,4
	4,35 x 10 ⁻⁶	6,85 x 10 ⁻⁶	99,9
	$\mu^d = 99,6 \pm 0,8$		
C ^b	0	2,65 x 10 ⁻⁶	-
	1,45 x 10 ⁻⁶	4,12 x 10 ⁻⁶	101,0
	2,90 x 10 ⁻⁶	5,58 x 10 ⁻⁶	100,9
	4,35 x 10 ⁻⁶	6,99 x 10 ⁻⁶	99,7
	$\mu^d = 100,5 \pm 0,6$		
D ^b	0	2,60 x 10 ⁻⁶	-
	1,45 x 10 ⁻⁶	4,05 x 10 ⁻⁶	99,7
	2,90 x 10 ⁻⁶	5,52 x 10 ⁻⁶	100,7
	4,35 x 10 ⁻⁶	6,99 x 10 ⁻⁶	100,9
	$\mu^d = 100,4 \pm 0,5$		
E ^b	0	2,60 x 10 ⁻⁶	-
	1,45 x 10 ⁻⁶	4,11 x 10 ⁻⁶	103,8
	2,90 x 10 ⁻⁶	5,50 x 10 ⁻⁶	99,8
	4,35 x 10 ⁻⁶	6,93 x 10 ⁻⁶	99,5
	$\mu^d = 101,0 \pm 2,0$		
F ^c	0	2,97 x 10 ⁻⁶	-
	1,45 x 10 ⁻⁶	4,38 x 10 ⁻⁶	97,2
	2,90 x 10 ⁻⁶	5,97 x 10 ⁻⁶	103,5
	4,35 x 10 ⁻⁶	7,32 x 10 ⁻⁶	99,9
	$\mu^d = 100,2 \pm 2,6$		

a: amostras sólidas;

b: amostras de soluções orais;

c: amostra injetável;

d: média $\pm$ RSD para seis determinações.

De acordo com os resultados obtidos apresentados na Tabela 10, observa-se que as médias percentuais de recuperação de bromoprida encontram-se entre 97,2 – 103,8%, evidenciando a boa exatidão do método proposto, além de mostrar que não há interferência de matriz.

IV.7.3. Determinação direta de bromoprida em urina

Foram feitos testes preliminares que indicaram a inexistência de interferentes presentes na urina (uréia e demais componentes) sobre a reação entre a bromoprida e o *p*-DAC, nas condições de trabalho. A Tabela 11 apresenta uma comparação dos valores de absorbância obtidos pela determinação direta de bromoprida em soluções padrões e amostras de urina fortificadas em concentrações equivalentes de bromoprida.

Tabela 11. Comparação dos valores de absorbância obtidos pela análise de padrões e amostras de urina.

Concentração de bromoprida (mol L ⁻¹)	Soluções padrões	Amostras de urina
	A _{565 nm} ± Desvio ^a	A _{565 nm} ± Desvio ^a
0 ^b	0,140374	0,149233
3,63 x 10 ⁻⁷	0,007264 ± 0,000513	0,007787 ± 0,000148
7,26 x 10 ⁻⁷	0,017709 ± 0,000549	0,019373 ± 0,000227
1,45 x 10 ⁻⁶	0,039416 ± 0,000994	0,040100 ± 0,000192
2,18 x 10 ⁻⁶	0,061496 ± 0,002221	0,066138 ± 0,000421
2,90 x 10 ⁻⁶	0,085844 ± 0,000903	0,092141 ± 0,000753

a: desvio padrão para três determinações;

b: branco da reação.

Os valores de absorbância apresentados na Tabela 11 demonstram que a metodologia proposta pode ser diretamente aplicada às amostras de urina contendo bromoprida, descartando qualquer etapa de pré-tratamento.

Sendo assim, a determinação do analito em amostras de urina foi feita de maneira direta, sem qualquer pré-tratamento da amostra. Os resultados obtidos pela aplicação do método proposto estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Determinação de bromoprida em amostras de urina pelo método proposto.

Amostras	[Bromoprida] adicionada	[Bromoprida] encontrado pelo
	(mol L ⁻¹)	método proposto (mol L ⁻¹) ^a
A	$3,63 \times 10^{-7}$	$3,84 \times 10^{-7}$
B	$7,26 \times 10^{-7}$	$7,24 \times 10^{-7}$
C	$1,45 \times 10^{-6}$	$1,33 \times 10^{-6}$
D	$2,18 \times 10^{-6}$	$2,09 \times 10^{-6}$
E	$2,90 \times 10^{-6}$	$2,85 \times 10^{-6}$

a: valor médio para três determinações.

IV.7.4. Estudos de adição e recuperação em urina

Quantidades conhecidas de padrão foram adicionadas às amostras fortificadas de urina ($2,90 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹). A Tabela 13 apresenta as concentrações adicionadas e as recuperações obtidas para cada amostra.

Tabela 13. Resultados de recuperação de bromoprida adicionada em amostras de urina fortificada.

[Bromoprida] adicionada	[Bromoprida] recuperada	Recuperação (%)
(mol L⁻¹)	(mol L⁻¹)	média ± RSD^a
-	$2,70 \times 10^{-6}$	-
$1,45 \times 10^{-6}$	$4,12 \times 10^{-6}$	$98,2 \pm 1,1$
$2,90 \times 10^{-6}$	$5,66 \times 10^{-6}$	$102,2 \pm 1,3$
$4,35 \times 10^{-6}$	$7,02 \times 10^{-6}$	$99,3 \pm 2,0$
$5,80 \times 10^{-6}$	$8,50 \times 10^{-6}$	$100,0 \pm 1,1$

a: n = 3.

Como mostra a tabela anteriormente apresentada, as médias percentuais de recuperação de bromoprida encontram-se entre 98,2 – 102,2%, com RSD não superior a 2,0, evidenciando a boa exatidão do método proposto quando aplicado em amostras de urina.

Capítulo V. Conclusões

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de procedimento em fluxo com detecção espectrofotométrica para determinação de bromoprida em matrizes diversas, baseado na reação inédita entre o fármaco e o reagente cromogênico p-DAC. Foi empregado o surfactante SDS no meio reacional, o que acarretou em um significativo aumento da sensibilidade da reação (13,6 vezes) e proporcionou a aplicação da metodologia na determinação de bromoprida em amostras biológicas.

O método desenvolvido apresentou ampla faixa de linearidade, $125 \mu\text{L L}^{-1}$ a 10 mL mL^{-1} , com bom coeficiente linear, $r = 0,9998$. Os limites de detecção e quantificação foram determinados como sendo $36,9$ e $123 \mu\text{L L}^{-1}$, respectivamente.

Quando aplicada em determinações de amostras comerciais e de urina, a metodologia demonstrou ótima precisão e exatidão, sem requerer qualquer pré-tratamento de qualquer tipo de amostra.

O método apresenta vantagens como rapidez, simplicidade, baixo consumo de reagentes e mínima geração de resíduos, sendo, portanto, um método ambientalmente amigável para determinação de bromoprida, estando de acordo com os princípios da Química Verde.

Capítulo VI. Referências

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Bulário eletrônico da Anvisa**. Disponível em: <<http://bulario.bvs.br/index.php>>. Acesso em: 15 out. 2008.

ANASTAS, P. T. Green chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 167-175, 1999.

ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. Origins, current status, and future challenges of green chemistry. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 9, p. 686-694, 2002.

BARROS, B. N.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2. ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 1995.

BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATO, E. A. G.; KRUG, F. J.; REIS, B. F. Merging zones in flow injection analysis. Part 1. Double proportional injection and reagent consumption. **Analytica Chimica Acta**, v. 101, n. 1, p. 17-23, 1978.

BRODIE, R. R.; CHASSEAUD, L. F.; ROONEY, L. Determination of bromopride in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 310, n. 2, p. 353-360, 1984.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando Statistica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2003.

COMPANHIA ESTADUAL DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO BÁSICO E DE DEFESA DO MEIO AMBIENTE. **Produção mais limpa**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/producao_limpa>. Acesso em: 18 ago. 2008.

CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Metade dos medicamentos mais consumidos já tem genéricos. **Jornal do CREMESP**, v. 18, n. 163, p. 14, 2001.

DAMETTO, R. P. **Desenvolvimento de um sistema de injeção em fluxo para a determinação sequencial de fosfito**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

DORONIN, S. Y.; CHERNOVA, R. K.; GUSAKOVA, N. N. Analytical aspects of reactions of primary aromatic amines with p-dimethylaminocinnamic aldehyde in the

presence of surfactant ions and micelles. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 471-478, 2005.

EL SHERIF, A. A.; WALASH, M. I.; EL-TARRAS, M. F.; OSMAN, A. O. Colorimetric determination of two nonsteroidal anti-inflammatory drugs using p-dimethylaminocinnamaldehyde. **Analytical Letters**, v. 30, n. 10, p. 1881-1896, 1997.

FERNANDES, N.; VIEIRA, T. Por um punhado de dólares. **Revista Época**, n. 265, p. 46-50, 2003.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. "Green Chemistry" : os 12 princípios da Química Verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

LONG, L. G.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712A-724A, 1983.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em Química Analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MELO, J. M. S. **Dicionário de especialidades farmacêuticas**. 30. ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2001. p. 366.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Vogel: análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1988. p. 236- 238.

NAZARE, P.; MASSAROTI, P.; DUARTE, L. F.; CAMPOS, D. R.; MARCHIORETTO, M. A. M.; BERNASCONI, G.; CALAFATTI, S.; BARROS, F. A. P.; MEURER, E. C.; PEDRAZZOLI, J.; MORAES, L. A. B. Validated method for determination of bromopride in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: application to the bioequivalence. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 9, p. 1197-1202, 2005.

PASTORE, K. O paraíso dos remédios falsificados. **Revista Veja**, v. 31, n. 27, p. 40-47, 1998.

REIS, B. F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 19, n. 1, p. 51-58, 1996.

REIS, B. F.; GUINÉ, M. F.; KRONKA, E. A. M. Continuous flow injection chemical analysis. **Química Nova**, v. 12, n. 1, p. 82-91, 1989.

REYNOLDS, J. E. F. **Martindale**: the extra pharmacopeia. 31th ed. London: Royal Pharmaceutical Society, 1996.

ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A.; FATIBELLO FILHO, O. Flow analysis strategies to greener analytical chemistry. An overview. **Green Chemistry**, v. 3, p. 216-220, 2001.

ROMERO, J. S. E.; ALFONSO, E. F. S.; COQUE, G. A.; RAMOS, G. R. Micellar enhanced spectrophotometric determination of organic species. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 29-37, 1995.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses. Part I. New concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, n. 1, p. 145-157, 1975.

SAEED, A.; HAQUE, S.; QURESHI, S. Z. Resin bead detection and spectrophotometric determination of oxyphenbutazone with p-dimethylaminocinnamaldehyde: application to bulk drug and dosage forms. **Talanta**, v. 40, n. 12, p. 1867-1871, 1993.

SECCO, A.; MANSUR, A. Remédios: a CPI dos medicamentos. **Revista Veja**, v. 33, n. 6, p. 46, 2000. Disponível em: <http://veja.abril.com.br/0902200/p_46.html> . Acesso em: 18 set. 2008.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5th ed. New York: Saunders College Publishing, 1998.

SILVA, F. M.; LACERDA, P. S. B.; JONES, J. J. Desenvolvimento sustentável e Química Verde. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 103-110, 2005.

WANG, Q.; ZHANG, F. UV spectrophotometric assay of bromopride. **Yaowu Fenxi Zazhi**, v. 4, n. 4, p. 232-234, 1984.

WEST, C. C.; HARWELL, J. H. Surfactants and subsurface remediation. **Environmental Science and Technology**, v. 26, n. 12, p. 2324-2330, 1992.

WORLD COMISSION ON ENVIRONMENT AND DEVELOPMENT. **Our Common Future**. New York: Oxford University Press, 1987.

ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. Classificação e definição dos métodos de análise em fluxo (Recomendações – IUPAC 1994). **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 143-146, 1999.