



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Metodologia automática em fluxo-batelada baseada
em análise de imagens digitais para determinação de
N-acetil-L-cisteína em formulações farmacêuticas**

Rosinaldo Telis de Lima



João Pessoa – PB / Brasil

Novembro/2018



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Metodologia automática em fluxo-batelada baseada em análise de imagens digitais para determinação de N-acetil-L-cisteína em formulações farmacêuticas

Rosinaldo Telis de Lima*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química na área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida

Coorientador: Dr. Osmundo Dantas Pessoa Neto

* Bolsista: CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

João Pessoa – PB / Brasil

Novembro/2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732m Lima, Rosinaldo Telis de.

Metodologia automática em fluxo-batelada baseada em
análise de imagens digitais para determinação de
N-acetil-L-cisteína em formulações farmacêuticas /
Rosinaldo Telis de Lima. - João Pessoa, 2018.
90 f.

Orientação: Luciano Almeida.

Coorientação: Osmundo Neto.

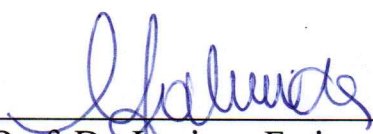
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. analisador automático em fluxo-batelada. 2. imagens
digitais. 3. N-acetil-L-cisteína. 4. formulações
farmacêuticas. I. Almeida, Luciano. II. Neto, Osmundo.
III. Título.

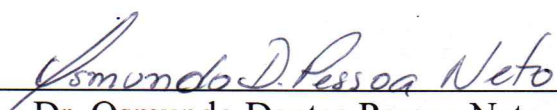
UFPB/CCEN

Metodologia automática em fluxo-batelada baseada em análise de imagens digitais para determinação de N-acetil-cisteína em formulações farmacêuticas.

Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno Rosinaldo Telis de Lima e aprovada pela banca examinadora em 22 de novembro de 2018.



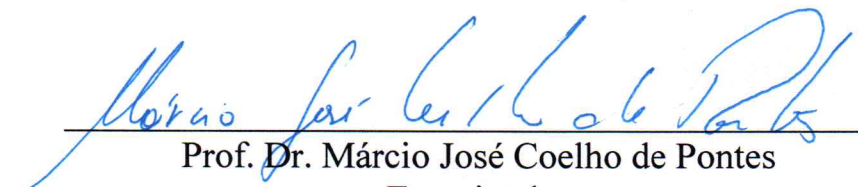
Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida
Orientador/Presidente



Dr. Osmundo Dantas Pessoa Neto
2º. Orientador



Dr. Stefani Iury Evangelista de Andrade
Examinador



Prof. Dr. Márcio José Coelho de Pontes
Examinador

...Porque ter a mente boa não é o bastante; o principal é aplicá-la bem. As maiores almas são capazes tanto das maiores virtudes quanto dos maiores vícios, e aqueles que marcham lentamente podem avançar muito mais, se seguirem o caminho certo, do que os que correm porém dele se afastam.

René Descartes (Discurso sobre o método, parte I)

Dedico este trabalho,

*A Deus, pelo dom da vida e pelo seu amor incondicional;
A minha amada família, meu alicerce, em especial:
aos meus pais, Maria Dalvací Lima e Rosildo Lima, que
me colocaram no mundo e se esforçaram ao máximo,
moveram céus, para me educarem da melhor maneira
possível;
Aos meus avós, Severino Lima e Sebastiana Lopes, e
tias, Dulcineide Lima e Maria Da Guia, que me criaram
com todo amor, numa fase bastante difícil de minha vida
E a minha companheira, Rosineide Laurentino,
pelo apoio de todas as horas.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelos dons da paciência e da sabedoria que foram essenciais para superação de todos os problemas surgidos ao longo desses anos de mestrado.

Aos meus amados pais (Maria Dalvací e Rosildo Lima), irmãs (Rosiane, Raiane e Raniérica) e toda minha família (avós, tios e primos). Amo todos vocês!!

A todos os meus professores do PPGQ, em especial, ao Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo que me deu a oportunidade de fazer parte da família LAQA, onde realizei este trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida, pela preciosa atenção, paciência, compreensão e suporte ao longo desses anos de mestrado. Vitória na guerra! Estamos e estaremos juntos sempre. Obrigado por tudo, professor!!

Ao meu coorientador, Dr. Osmundo Dantas Pessoa Neto, pelo apoio diário e aconselhamentos os quais foram essenciais para a realização deste trabalho. E também a Profa. Dra. Amália Geíza Gama Pessoa, mamãe, pela amizade.

Ao Prof. Ms. Pedro Lemos de Almeida Júnior, por ter me ajudado constante e incansavelmente, principalmente, desenvolvendo o programa *Flowing* e também o acionador de válvulas.

Ao Dr. Welligton da Silva Lyra pelas suas contribuições e, principalmente, por ter me ajudado com o método de referência. “Num corra não, viu?!”. “Vai passar mal”.

Ao Prof. Dr. Márcio José Coelho de Pontes (avaliador da pré-banca e também da banca), a Prof^a. Dr^a. Kátia Messias Bichinho (avaliadora da pré-banca), ao Dr. Stéfani Iury Evangelista de Andrade (avaliador da banca), ao Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva e ao Dr. Welligton da Silva Lyra (suplentes); por terem aceitado avaliar meu trabalho. O meu muito obrigado a vocês!!

A minha companheira, Rosineide Laurentino, por fazer parte de minha vida. Você foi e sempre será essencial em meu viver. Te amo demais meu bem precioso, presente de Deus. Obrigado por tudo!!

Aos meus pais adotivos de Guarabira, dona Joana e seu Francisco, e seus filhos (meus irmãos), João Batista, Denise, Diógenes, Djaciane e José Carlos. Também a seu Beto e dona Joanita. Amo todos vocês!!

Aos amigos do LAQA; em especial, João Batista, Flaviano, Kévila, Wallys, Thyago, Lucas, Eduardo, Jardel, Julys, Willy, Kelly, Daniela, Ana Rosa, Socorro, Amanda, Mayara, Welma, Emanuela, Anabel, Flaviana, Railson, Valber, Juliana, Tássio, Mônica, Layla, Matheus, Rodrigo, Sófacles, Nayara, Stéfani, Welligton e Jayne; pelo companheirismo diário.

Aos meus amigos de graduação; em especial, Alisson, André, Wallisson, Aniely, Tiago, Léo, Mariano, Edriano, Édson, João, Francisco e Renato; pelo companheirismo.

A CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram direto ou indiretamente para a realização deste trabalho. O meu muito obrigado a vocês!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
Capítulo 1 - Introdução.....	18
1.1. Objetivos.....	21
1.1.1. Objetivo geral.....	21
1.1.2. Objetivos específicos.....	21
1.2 Fundamentação teórica.....	22
1.2.1 Adulteração de medicamentos.....	22
1.2.2 Importância do controle de qualidade de medicamentos.....	22
1.2.3 Fármaco estudado.....	24
1.2.3.1 Características farmacológicas da NAC e importância de sua determinação.....	24
1.2.3.2 Técnicas analíticas para determinação de NAC.....	25
1.2.3 Sistemas automáticos de análise.....	28
1.2.3.1 Analisadores automáticos discretos.....	29
1.2.3.2 Analisadores automáticos robotizados.....	29
1.2.3.3 Analisadores automáticos em fluxo.....	29
1.2.3.3.1 Analisadores fluxo-batelada.....	30
1.2.4 Sistema de cor RGB: aplicação em métodos analíticos.....	34
1.2.5 Planejamento fatorial.....	40
1.2.6 Calibração univariada.....	42
1.2.6.1 Parâmetros de desempenho analítico.....	42
1.2.6.1.1 Linearidade.....	43
1.2.6.1.2 Limite de detecção.....	43
1.2.6.1.3 Limite de quantificação.....	44
1.2.6.1.4 Precisão.....	44
1.2.6.1.5 Exatidão.....	45
1.2.6.1.6 Análise de variância.....	46
Capítulo 2 - Experimental.....	48

2.1 Preparo das soluções utilizadas nas análises.....	49
2.1.1 Preparo das amostras.....	49
2.2 Planejamento fatorial 2^3 com ponto central.....	50
2.3 Determinação de NAC em formulações farmacêuticas.....	51
2.3.1 Método de referência.....	51
2.3.2 Montagem do sistema automático proposto.....	52
2.3.2.1 Programa computacional de controle, aquisição e tratamento de dados.....	56
2.4 Procedimento automático.....	58
Capítulo 3 - Resultados e discussão.....	61
3.1 Estudo e otimização dos parâmetros operacionais e químicos do sistema.....	62
3.1.1 Parâmetros operacionais.....	62
3.1.1.1 Velocidade de rotação da bomba peristáltica.....	62
3.1.1.2 Vazão nos canais.....	63
3.1.1.3 Região de interesse para captura da imagem.....	65
3.1.2 Parâmetros químicos.....	66
3.2 Avaliação da componente de cor a ser adotada na calibração.....	70
3.2.1 Comparação das linearidades das componentes G e B.....	72
3.3 Validação do método proposto.....	73
3.3.1 Análise de potenciais interferentes.....	73
3.3.2 Adição e recuperação.....	74
3.3.3 Estudo da repetitividade do sinal analítico.....	74
3.3.4 Curva analítica.....	75
3.3.5 ANOVA.....	77
3.4 Aplicação do método proposto nas amostras.....	78
Capítulo 4 - Conclusões.....	80
4.1 Perspectivas.....	81
Referências.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da NAC.....	24
Figura 2 – Classificação dos analisadores em fluxo com base nas condições sob as quais os processos de transferência de massa e reações químicas ocorrem em fluxo.....	30
Figura 3 – Esquema simplificado com os componentes principais de um FBA. (a) bomba peristáltica; (b) acionador de válvulas; (c) notebook; (d) válvulas solenoides de três vias; (e) câmara de mistura; (f) agitador magnético; (g) detector.....	33
Figura 4 – Cores primárias aditivas e as suas intercepções, resultando nas cores secundárias subtrativas e na cor branca.....	35
Figura 5 – Cubo de cores do modelo de cor RGB.....	36
Figura 6 – Esquema representando uma função que relaciona os fatores às respostas.....	40
Figura 7 – Vista superior do analisador automático em fluxo-batelada para determinação de NAC por imagens digitais. Equipamentos e componentes: (a) câmara de mistura com LED branco na parte superior e barra magnética na parte interna (b) agitador magnético; (c) webcam; (d) bomba peristáltica; (e) acionador de válvulas; (f) placa Arduino Uno; (g) notebook; válvulas solenoides (h) V_1 – válvula de NAC, (i) V_2 – válvula de Fe^{3+} , (j) V_3 – válvula de Fen, (l) V_4 – válvula de H_2O e (m) V_5 – válvula de descarte.....	53
Figura 8 – CM confeccionada em PTFE com janelas de quartzo.....	54
Figura 9 – Diagrama esquemático do circuito eletrônico para interface de controle das válvulas solenoides, agitador magnético e LED branco.....	55
Figura 10 – Modelo da webcam de alta resolução usada para a captura das imagens digitais.....	56
Figura 11 – Interface gráfica do programa <i>Flowing</i>	57
Figura 12 – Diagrama esquemático do analisador automático em fluxo-batelada para determinação de NAC por imagens digitais. Equipamentos e componentes: câmara de mistura (CM) com LED branco na parte superior e barra magnética na parte interior;	

agitador magnético (AM); webcam; bomba peristáltica (BP) e válvulas solenoides (V1-V5).....58

Figura 13 – Curvas de calibração referentes à vazão das válvulas solenoides: (a) do analito NAC, vazão $0,1037 \text{ ml.s}^{-1}$ (Válvula 1); (b) do reagente Fe^{3+} , vazão $0,1509 \text{ ml.s}^{-1}$ (Válvula 2); (c) do complexante o-fenantrolina, vazão $0,1404 \text{ ml.s}^{-1}$ (Válvula 3) e (d) da água de limpeza, vazão $0,1035 \text{ ml.s}^{-1}$ (Válvula 4).....64

Figura 14 – Tamanhos das janelas que foram estudados para captura das imagens: (a) janela de área menor com localização espacial (X,Y) de 245×170 e tamanho 11×10 pixels; (b) janela de área média com localização espacial (X,Y) de 232×170 e tamanho 16×38 pixels e (c) janela de área maior com localização espacial (X,Y) de 223×166 e tamanho 24×58 pixels.....65

Figura 15 – Dependência do sinal analítico com área da janela selecionada para detecção.....66

Figura 16 – Superfície de resposta do modelo linear para os fatores $[\text{Fe}^{3+}]$ e pH, mantendo-se o fator [Fen] fixo em seu nível superior.....70

Figura 17 - Componentes individuais (a) R, (b) G, (c) B e (d) norma do vetor RGB versus as concentrações associadas aos tempos de acionamento da válvula de NAC.....71

Figura 18 – Comparação da linearidade das componentes G e B do vetor RGB.....72

Figura 19 – Estudo da repetibilidade para as soluções padrão de NAC de concentrações (a) $8,0 \times 10^{-5}$ e (b) $1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($n=10$).....75

Figura 20 – Curva analítica de absorvância associada a componente B do vetor RGB versus concentração do analito.....76

Figura 21 – Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo de calibração.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – ANOVA para o ajuste de um modelo pelo MMQ.....	47
Tabela 2 – Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial.....	50
Tabela 3 – Etapas do procedimento automático para determinação de NAC nas amostras.....	60
Tabela 4 – Estudo das velocidades de rotação da bomba peristáltica.....	63
Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial 2^3 com ponto central e absorbâncias do complexo.....	67
Tabela 6 – Efeitos do planejamento fatorial 2^3 com ponto central.....	68
Tabela 7 – Estudo dos potenciais interferentes na determinação de NAC em amostras comerciais empregando o sistema proposto.....	73
Tabela 8 – Resultados do estudo de adição e recuperação de NAC adicionado a cinco amostras comerciais utilizando o sistema em fluxo proposto (n=3).....	74
Tabela 9 – Resultados obtidos da ANOVA para validação do modelo de calibração utilizando o método proposto.....	77
Tabela 10 – Resultados dos testes F para falta de ajuste e significância de regressão.....	78
Tabela 11 – Determinação de NAC em amostras comerciais adquiridas em comércio local da cidade de João Pessoa-PB.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM: Agitador magnético

ANOVA: *Analysis of variance* (Análise de Variância)

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BP: Bomba peristáltica

BPF: Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos

CCD: *Charge-Coupled Devices* (Dispositivo de Carga Acoplada)

CM: Câmara de Mistura

CMOS: *Complementary Metal-Oxide Semiconductor* (Semicondutor Complementar de Óxido Metálico)

CAP: Captopril

DIB: *Digital Imaging on Based* (Baseado em Imagens Digitais)

DIB-FBA: *Digital image-based flow-batch analyzer* (Analisador Fluxo-Batelada Baseado em Imagens Digitais)

DIB-FES: *Digital images based flame emission spectrometry* (Espectrometria de Emissão em Chama Baseada em Imagens Digitais)

DMPD: *N,N*-dimetil-*p*-fenilenodiamina

DPR: Desvio padrão relativo

E_R: Erro relativo

FBA: *Flow-Batch Analyser* (Analisador Fluxo-Batelada)

Fen: 1,10-Fenantrolina

FIA: *Flow injection analysis* (Análise por Injeção em Fluxo)

GC: *Gas Chromatography* (Cromatografia Gasosa)

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

LED: *Light Emitting Diode* (Diodo Emissor de Luz)

LOD: *Limit of detection* (Limite de detecção)

LOQ: *Limit of quantification* (Limite de quantificação)

MMQ: Método dos mínimos quadrados

MQ_{ep}: Média quadrática para o erro puro

MQ_{faj}: Média quadrática para a falta de ajuste

MQ_r: Média quadrática residual

MQ_{reg}: Média quadrática para a regressão

NAC: N-acetil-L-cisteína

OMS: Organização Mundial da Saúde

PF: Polícia Federal

PRA: Pararosanilina

PTFE: Politetrafluoretileno

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RGB: *Red, Green and Blue* (Vermelho, Verde e Azul)

RSD: *Relative standard deviation* (Desvio Padrão Relativo)

SQ_{ep}: Soma quadrática para o erro puro

SQ_{faj}: Soma quadrática da falta de ajuste

SQ_r: Soma quadrática residual

SQ_{reg}: Soma quadrática de regressão

SQ_t: Soma quadrática total

QD: *Quantum dots* (Pontos Quânticos)

V₁: Válvula de NAC

V₂: Válvula de Fe(III)

V₃: Válvula de Fen

V₄: Válvula de H₂O

V₅: Válvula de descarte

RESUMO

Título: Metodologia automática em fluxo-batelada baseada em análise de imagens digitais para determinação de N-acetil-L-cisteína em formulações farmacêuticas

É de suma importância a realização do controle de qualidade nas indústrias farmacêuticas para conferir aos medicamentos qualidade, segurança, eficácia e credibilidade junto ao mercado consumidor. Um dos parâmetros de qualidade mais importantes nas análises de rotina de uma indústria farmacêutica é a análise quantitativa do princípio ativo encontrado no medicamento, visto que estas indústrias devem obedecer às Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diante disso, propõe-se um analisador automático em fluxo-batelada baseado em análise de imagens digitais para determinação de N-acetil-L-cisteína em formulações farmacêuticas. O sistema automático proposto utiliza uma webcam de alta resolução para captura das imagens digitais do produto da reação colorimétrica. Esta reação envolve duas etapas: 1) reação do analito com Fe(III) para gerar Fe(II) e em seguida 2) complexação do Fe(II) com a 1,10-Fenantrolina. As soluções analíticas foram preparadas *on-line* e todos os processos analíticos foram realizados simplesmente mudando os parâmetros operacionais do aplicativo de controle. A componente de cor ótima do estudo foi a B, com resposta linear na faixa de trabalho de $8,08 \times 10^{-5}$ a $1,85 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O modelo de calibração foi validado através de análises de variância para falta de ajuste e significância de regressão, realizadas após análise gráfica dos resíduos deixados pelo modelo. Os limites de detecção e quantificação e a frequência analítica foram estimados como sendo, respectivamente; $2,18 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹; $7,26 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e 30 h⁻¹. Os resultados obtidos através do método proposto foram comparados com os do método de referência. Ao aplicar o teste t-pareado, a um nível de 95% de confiança, verificou-se que ambos os métodos não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si em termos de exatidão. Diante disso, pode-se afirmar que a metodologia proposta é confiável, de baixo custo, rápida e apresenta baixo consumo de reagentes e amostras.

Palavras-chave: analisador automático em fluxo-batelada, imagens digitais, N-acetil-L-cisteína, formulações farmacêuticas.

ABSTRACT

Title: Automatic flow-batch methodology based on digital image analysis for determination of N-acetyl-L-cysteine in pharmaceutical formulations

It is of paramount importance to carry out quality control in the pharmaceutical industry in order to give quality, safety, efficacy and credibility to the consumer market. One of the most important quality parameters in the routine analysis of a pharmaceutical industry is the quantitative analysis of the active principle found in the medicine, since these industries must comply with the Good Manufacturing Practices of Medicines established by the National Sanitary Surveillance Agency. Therefore, it is proposed an automatic flow-batch methodology based on digital image analysis for the determination of N-acetyl-L-cysteine in pharmaceutical formulations. The proposed automatic system uses a high resolution webcam to capture the RGB data of the digital images of the colorimetric reaction product. This reaction involves two steps: 1) reaction of the analyte with Fe(III) to generate Fe(II) and then 2) complexation of Fe(II) with 1,10-phenanthroline. All analytical solutions were prepared online and all analytical processes were performed simply by changing the operational parameters of the control application. The optimum color component of the study was a B, with a linear response in the working range of 8.08×10^{-5} to 1.85×10^{-4} mol L⁻¹. The calibration model was validated through analyzes of variance for lack of fit and regression significance, performed after a graphical analysis of the residuals left by the model. The limits of detection and quantification and the analytical frequency were estimated to be, respectively; 2.18×10^{-6} mol L⁻¹; 7.26×10^{-6} mol L⁻¹ and 30 h⁻¹. The results obtained through the proposed method were compared with those of the reference method. When applying the t-paired test at a 95% confidence level, it was found that both methods did not present statistically significant differences in terms of accuracy. Therefore, it can be stated that the proposed methodology is reliable, low cost, fast and presents low consumption of reagents and samples.

Keywords: automatic flow-batch methodology, digital images, N-acetyl-L-cysteine, pharmaceutical formulations

Capítulo 1

Introdução



1 Introdução

Nos últimos anos, tem-se observado que a indústria farmacêutica continua em crescimento, reflexo do fato de novos produtos serem lançados quase que diariamente no mercado. Em paralelo a esse crescimento, está o mercado dos medicamentos falsificados e/ou adulterados. A falsificação de medicamentos e sua comercialização tem se tornado uma prática extremamente lucrativa para os fraudadores, com baixo risco de repressão por parte das autoridades policiais em comparação ao tráfico de drogas e está associada a organizações criminosas internacionais (HURTADO et al., 2014). O uso desses produtos ilegais pode causar danos ao tratamento dos pacientes, como por exemplo, a utilização de medicamento sem o princípio ativo ou com a dosagem diferente da especificada no rótulo, podendo comprometer o tratamento de suas enfermidades (OMS, 2018). O problema pode se agravar mais ainda quando os produtos são adulterados ou sintetizados utilizando substâncias químicas tóxicas, proibidas no processo de fabricação dos medicamentos, o que pode causar danos ainda mais sérios aos pacientes podendo até mesmo levá-los à morte (WHO, 2018a).

Diante disso, pode-se afirmar que é de suma importância a realização do controle de qualidade nas indústrias farmacêuticas para conferir aos medicamentos qualidade, segurança, eficácia e credibilidade junto ao mercado consumidor. De fato, o controle de qualidade de medicamentos atualmente é parte do processo de industrialização, sendo considerado a etapa mais importante da fabricação (ROCHA et al., 2014).

Um dos parâmetros de qualidade mais importantes nas análises de rotina de uma indústria farmacêutica é a análise quantitativa do princípio ativo encontrado no medicamento, visto que estas indústrias devem obedecer às Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF) estabelecidas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (ANVISA, 2010a). Especificamente, a determinação de N-acetil-L-cisteína (NAC) em formulações farmacêuticas é de suma importância, visto que é necessário garantir que o teor deste princípio ativo esteja de acordo com o valor especificado no rótulo do medicamento. Porém, as técnicas de análises quantitativas mais comumente utilizadas nos laboratórios de rotina e nas indústrias são lentas e laboriosas, pois envolvem inúmeras etapas de processamento analítico. Além disso, são procedimentos que requerem grandes quantidades de solventes e

reagentes, no caso dos métodos volumétricos, e alto custo por análise e pessoal qualificado para a manipulação analítica, no caso dos métodos baseados em cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ANDRADE, 2011). Particularmente, os métodos oficiais preconizados pela Farmacopeia Brasileira para determinação de NAC em amostras comerciais são: CLAE e titulação iodométrica (ANVISA, 2010b)

Uma alternativa para minimizar esses inconvenientes é a utilização de analisadores automáticos em fluxo acoplados a técnicas de detecção mais acessíveis e de baixo custo. Dentre estes analisadores merece destaque o analisador em fluxo-batelada (em inglês *Flow-Batch Analyser* - FBA), que alia as características favoráveis dos analisadores em fluxo com as dos analisadores em batelada. A característica mais importante do FBA é a utilização de uma câmara de mistura (CM) em sua estrutura, a qual possibilita a realização de grande parte dos processos analíticos como o pré-tratamento, homogeneização e reações químicas. Além disso, o FBA também permite integrar o sistema de detecção à sua própria CM, tornando o processo de análise ainda mais rápido (DINIZ et al., 2012). Em determinações com detecção por imagens digitais, podem ser acoplados à CM webcams ou smartphones, equipados com sensores baseados em CCD (do inglês: *Charge-Coupled Devices*) ou em CMOS (do inglês: *Complementary Metal-Oxide Semiconductor*), em um ambiente com iluminação controlada (ANDRADE, 2012). Essas técnicas de detecção utilizam geralmente o sistema de cor RGB (do inglês: *Red Green Blue*) onde os valores de cada canal destas cores primárias variam de 0 a 255 com 8 bits de resolução (BYRNE et al., 2000).

Existem na literatura diversos métodos analíticos empregando detecção baseada em imagens digitais como alternativas viáveis e simples para análises quantitativas de fármacos em amostras de medicamentos, tais como: captopril (RAVAZZI et al., 2018); diclofenaco de sódio, dipirona sódica e gluconato de cálcio (LYRA et al., 2011); catecolaminas (SIMA; CASONI; SÂRBU, 2013) e carbonato de lítio (LYRA et al., 2009).

Diante disso, neste trabalho de pesquisa é proposta uma metodologia automática em fluxo-batelada baseada em análise de imagens digitais para determinação de NAC em formulações farmacêuticas, utilizando como sistema de detecção uma webcam de alta definição.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia automática em fluxo-batelada baseada em análise de imagens digitais para determinação de NAC em formulações farmacêuticas, utilizando como sistema de detecção uma webcam de alta definição.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ◆ Montar, adaptar e utilizar um sistema FBA com uma webcam de alta definição acoplada, como sistema de detecção;
- ◆ Construir uma estrutura de iluminação baseada no uso de LED branco de alto brilho para controle de luminosidade dentro de CM;
- ◆ Estudar os parâmetros operacionais e químicos do sistema de análise;
- ◆ Avaliar a metodologia proposta com base em parâmetros de desempenho analítico;
- ◆ Aplicar e validar a metodologia proposta nas amostras de medicamentos com base em um método de referência.

1.2 Fundamentação Teórica

1.2.1 Adulteração de medicamentos

Conforme define a Organização Mundial da Saúde (OMS), medicamento falsificado trata-se de um produto embalado e etiquetado indevidamente, de maneira deliberada e fraudulenta, em que não se respeita sua fonte ou identidade. Estão sujeitos à falsificação tanto os medicamentos de referência quanto os genéricos e similares, podendo conter substâncias proibidas ou não, estarem sem o princípio ativo ou com quantidade diferente da especificada no rótulo, evidenciando assim, alterações e adulterações em sua fórmula original (WHO, 2018b).

Conforme descreve o relatório divulgado pela OMS em 2015, 10% dos medicamentos comercializados em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, como o Brasil, é de baixa qualidade ou falsificado. Essa estatística é bastante alarmante e chama atenção para um mercado clandestino que movimenta cerca de US\$ 30 bilhões por ano no mundo (WHO, 2018a). No Brasil, são frequentes as apreensões de medicamentos irregulares, porém nenhum órgão envolvido nesse assunto, seja a Polícia Federal (PF) ou a ANVISA, sabe estimar a gravidade do problema (CARVALHO, 2017). Este relatório, também afirma que 19% dos produtos farmacêuticos vendidos no país são ilegais: falsificados, adulterados ou roubados, o que na maioria dos casos significa que podem ter sido violados ou estão com validade vencida, por exemplo (CARVALHO, 2017). O uso de tais produtos pode agravar doenças e levar à morte, além do fato de algumas substâncias usadas no preparo dessas formulações adulteradas provocarem alergias graves (WHO, 2018a). Esses medicamentos, oriundos do Paraguai, China e Índia, são facilmente vendidos em feiras, bancas de ambulantes, pela internet e, inclusive, nas farmácias. A matéria-prima, que contém o princípio ativo, é manipulada em estabelecimentos clandestinos, em condições inadequadas de higiene e qualidade, geralmente elaborada na dosagem incorreta, ou até mesmo, misturada a outras substâncias (RODRIGUES, 2015).

1.2.2 Importância do controle de qualidade de medicamentos

O controle de qualidade é definido como um conjunto de operações (programação, coordenação e execução) com o objetivo de verificar e assegurar que

os produtos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos pela ANVISA, sempre através de algum tipo de análise e medição. Este termo diz respeito ao processo de constantemente se tentar fabricar um produto perfeito com base em um conjunto de normas cuja implementação sugere a obrigação de um empenho organizado de todos os funcionários, a fim de evitar ou eliminar erros em cada uma das fases da produção (ROCHA et al., 2014).

Nas indústrias farmacêuticas, o controle de qualidade é de suma importância para garantir segurança, eficácia e credibilidade aos medicamentos junto ao mercado consumidor. Para isso, as indústrias farmacêuticas necessitam cumprir as determinações impostas pela ANVISA, definidas pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de 16 de abril de 2010, que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF) de uso humano (ANVISA, 2010a).

As BPFs são definidas como um conjunto de normas obrigatórias que estabelecem e padronizam procedimentos e conceitos de qualidade para os produtos, processos e serviços, visando atender aos padrões mínimos estabelecidos por órgãos reguladores governamentais nacionais e internacionais, cuja obrigação é zelar pelo bem-estar da sociedade (ANVISA, 2010a).

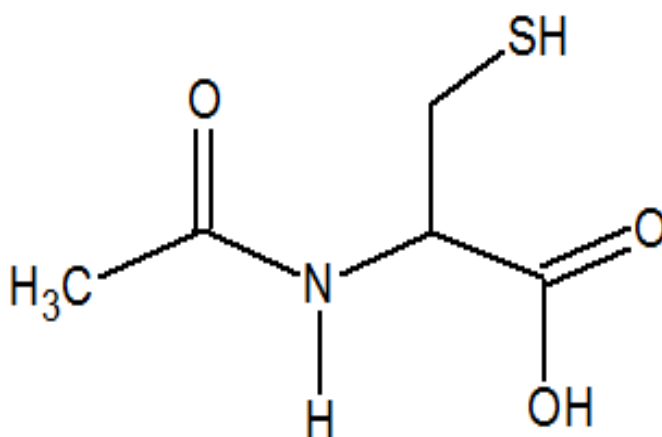
Dentre esse conjunto de normas obrigatórias, destaca-se o artigo 208 do inciso II da RDC nº 17, que estabelece que o rótulo de um medicamento e o documento que o acompanha deve conter informações de concentração, data de fabricação, data em que o lacre foi aberto, condições de armazenamento e, quando aplicável, prazo de validade e número de controle (ANVISA, 2010a).

A determinação da concentração do princípio ativo no medicamento é feita corriqueiramente nos laboratórios das indústrias farmacêuticas, de forma que estejam sempre de acordo com as BPFs estabelecidas pela ANVISA. O número diário de análises para os diversos lotes de cada medicamento é normalmente grande e isso gera demandas de tempo de análise e utilização de grandes quantidades de amostras para testes. Isso encarece o processo de controle de qualidade, o qual depende também do método de referência adotado.

1.2.3 Fármaco estudado

O fármaco estudado neste trabalho foi a *N*-acetil-*L*-cisteína (NAC) ou simplesmente acetilcisteína, que é um derivado do aminoácido *L*-cisteína, cuja estrutura molecular é mostrada na **Figura 1**.

Figura 1 – Estrutura molecular da NAC.



Fonte: ANVISA (2010b)

1.2.3.1 Características farmacológicas da NAC e importância de sua determinação

A NAC exerce intensa ação mucolítico-fluidificante das secreções mucosas e mucopurulentas, despolimerizando os complexos muco-proteicos e os ácidos nucleicos que dão viscosidade ao escarro e às outras secreções, além de melhorar a depuração muco-ciliar. Estas atividades tornam a NAC particularmente adequada para o tratamento das afecções agudas e crônicas do aparelho respiratório caracterizadas por secreções mucosas e mucopurulentas densas e viscosas (ANVISA, 2017).

Além disso, este fármaco exerce ação antioxidante direta, sendo dotada de um grupo tiol livre (–SH) nucleofílico em condições de interagir diretamente com os grupos eletrofílicos dos radicais oxidantes. De particular interesse é a recente demonstração de que a NAC protege a alfa-1-antitripsina, enzima inibidora da elastase, de ser inativada pelo ácido hipocloroso (HClO), potente agente oxidante

que é produzido pela enzima mieloperoxidase dos fagócitos ativados (ANVISA, 2017).

A estrutura de sua molécula lhe permite atravessar facilmente as membranas celulares. No interior da célula, a NAC é desacetilada, ficando assim disponível a *L*-cisteína, aminoácido indispensável para a síntese da glutathiona (GSH). O GSH é um tripeptídeo extremamente reativo que se encontra difundido por igual nos diversos tecidos dos organismos animais e é essencial para a manutenção da capacidade funcional e da integridade da morfologia celular, pois é o mecanismo mais importante de defesa intracelular contra os radicais oxidantes (tanto exógenos como endógenos) e contra numerosas substâncias citotóxicas, incluindo o paracetamol. O paracetamol exerce sua ação citotóxica pelo empobrecimento progressivo de GSH. A NAC desempenha um de seus principais papéis mantendo níveis adequados de GSH, contribuindo, assim para a proteção celular. Portanto este fármaco também é um antídoto específico para intoxicação por paracetamol (ANVISA, 2017).

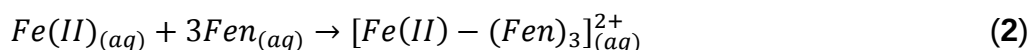
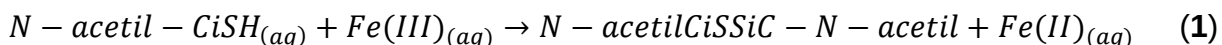
Além das informações supracitadas, é de suma importância a análise quantitativa deste medicamento para garantir que o teor do princípio ativo esteja de acordo com o valor especificado no rótulo e na receita. Essa responsabilidade com a dose justifica-se pelo conceito de disponibilidade sistêmica, comumente conhecida como biodisponibilidade, que é o termo utilizado para descrever a proporção do fármaco administrado que atinge a circulação sistêmica e que, portanto, está disponível para distribuição até o local de ação. Nesse sentido, é importante ressaltar que as doses precisam ser rigorosamente obedecidas para que se consiga perfis de disponibilidade sistêmica ideais para o fármaco prescrito e administrado (GIMENES et al., 2010).

1.2.3.2 Técnicas analíticas para determinação de NAC

Há na literatura diversos métodos analíticos para determinação de NAC os quais utilizam diferentes técnicas de detecção. Dentre estas técnicas, destacam-se: amperometria (CORREA et al., 2018), CLAE (GATTI et al., 2017), espectrofluorimetria (LIMA et al., 2014), espectrofotometria (WEN et al., 2017), voltametria (KARIMI-MALEH et al., 2017) e quimioluminescência (SAMADI-MAYBODI et al., 2017).

Dando ênfase aos métodos indiretos para determinação de NAC, que empregam em sua maioria reações colorimétricas, muitos são os trabalhos encontrados na literatura. Nos próximos parágrafos serão descritos de maneira sucinta alguns destes.

Um procedimento automático de análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção espectrofotométrica para determinação indireta de NAC em formulações farmacêuticas foi desenvolvido por FORNAZARI et al. (2005). O sistema automático proposto é baseado na reação colorimétrica (**Equações 1 e 2**) que envolve duas etapas: **(1)** reação do analito com Fe(III) para gerar Fe(II) e em seguida **(2)** reação do Fe(II) com a 1,10-Fenantrolina (fen) para formar $[Fe(II)-(fen)_3]^{2+}$ como produto. Este complexo é monitorado em 510 nm e tem coloração laranja-avermelhada. Sob as condições analíticas ótimas, a linearidade da curva analítica para NAC variou de $3,5 \times 10^{-6}$ a $4,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O limite de detecção foi estimado em $6,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e recuperações entre 98,5 a 110% foram obtidas.



KUKOC-MODUN et al. (2016) desenvolveram um método automático empregando um analisador FIA para determinação espectrofotométrica indireta de NAC em formulações farmacêuticas. O procedimento proposto é baseado na redução do reagente Cu(II)-neocuproína para Cu(I)-neocuproína com o NAC em solução tampão Britton-Robinson (pH 3,0). A absorvância máxima do complexo amarelo formado, Cu(I)-neocuproína, é monitorada em 458 nm. A região linear da curva analítica foi estabelecida no intervalo de concentração de 6×10^{-7} a 4×10^{-5} mol L⁻¹ de NAC, com alta sensibilidade, como pode ser atestado no modelo linear obtido ($y = 3,89 \times 10^3 x - 0,0015$) com limite de detecção de $9,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. O método proposto é sensível o suficiente para permitir a determinação de quantidades próximas de nmol de NAC utilizando instrumentação de baixo custo (em comparação com um HPLC, por exemplo) com uma frequência analítica de 120 h⁻¹.

GILJANOVIĆ et al. (2011) propuseram um método que utiliza um analisador FIA com detecção espectrofotométrica para a determinação indireta de NAC em amostras comerciais. Este método é baseado na reação da NAC com íons Pd²⁺ e

apresentam faixa linear de trabalho no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ a $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Para a NAC, o limite de detecção foi $5,84 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e o desvio padrão relativo foi de 1,67 a 4,11%. Na reação da NAC com Pd²⁺ há a formação de complexos de Pd²⁺ com relações molares 1:1 e 1:2, dependendo das proporções das concentrações analíticas de NAC. Na comparação do método proposto com a determinação espectrofotométrica clássica, foi utilizado o mesmo reagente na forma de sal (PdCl₂), e foi observado as seguintes vantagens: (a) tempo de análise mais curto e (b) utilização de um menor volume de amostra e reagentes. Assim, o método proposto é de baixo custo e mais rápido quando comparado ao método clássico para a determinação de NAC nas amostras.

Um analisador FBA com detecção por imagens digitais para determinação espectrofluorimétrica indireta de NAC em formulações farmacêuticas foi desenvolvido por LIMA et al. (2014). O sistema proposto baseia-se nas interações superficiais entre a NAC e pontos quânticos (do inglês: *quantum dots* - QDs) de telureto de cádmio (CdTe), que resultam no aumento proporcional da intensidade de fluorescência com a concentração do analito. Neste procedimento, seletos de comprimento de onda não são necessários para o processo de excitação e emissão devido ao espectro de excitação ser alargado, a reação ser seletiva e específica entre QDs de CdTe e NAC e existir um modelo matemático para o tratamento das imagens digitais. O limite de detecção e o desvio padrão relativo foram estimados em $0,14 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $< 1,4\%$ ($n = 5$), respectivamente. A exatidão foi avaliada através do teste de recuperação (98,5-102,8%). A robustez do método foi avaliada por comparação intra- e inter-dias, utilizando o método volumétrico de referência a um nível de 95% de confiança. O sistema apresenta robustez satisfatória, alta frequência analítica (153 h^{-1}) e consumo reduzido de reagentes químicos.

Uma desvantagem dos três últimos métodos descritos quando comparados ao primeiro é que estes últimos empregam como reagentes metais pesados, agentes tóxicos de massa atômica elevada que geram danos ao meio ambiente e à vida humana, uma vez que as principais fontes de exposição a esses metais são os alimentos (VERDE, 2013). O método descrito por FORNAZARI et al. (2005) é baseado na reação de formação do $[\text{Fe(II)}-(\text{fen})_3]^{2+}$, um clássico complexo de transferência de carga que é de suma importância para análise quantitativa de Fe(II), visto que apresenta alta absorvidade molar (SKOOG et al., 2006). Portanto, este método será adotado no presente trabalho.

1.2.4 Sistemas automáticos de análise

Nas últimas décadas tem-se observado um crescente interesse por parte dos analistas, em desenvolver métodos automáticos de análise com o intuito de simplificarem os procedimentos analíticos, de forma a realizarem um número cada vez maior de determinações analíticas, mantendo os custos em valores aceitáveis. Além disso, a implementação de metodologias automáticas apresenta algumas outras vantagens (HOLLER et al, 2009; LIMA, 2010), tais como:

- **Baixa intervenção humana** - substituição do operador em tarefas de rotina ou perigosas, como por exemplo, aquelas que envolvem a manipulação de substâncias tóxicas ou explosivas, resultando em maior segurança e prevenção de erros subjetivos;
- **Aprimoramento do desempenho analítico** - particularmente em relação ao aumento significativo na precisão e exatidão dos resultados;
- **Gestão de reagentes químicos** - minimiza o consumo de reagentes químicos, implicando na diminuição dos custos por análise, como também na redução da produção de resíduos gerados, condizente com a química verde.

As análises químicas automatizadas têm encontrado aplicações em diversas áreas, mas foi na área de análises clínicas onde a elevada demanda diária por diagnósticos rápidos, de qualidade e para várias espécies químicas incentivou a sua implantação e consolidação em nível mundial. Hoje grande parte das análises químicas e bioquímicas de rotina e demanda em laboratórios industriais, governamentais, ambientais, farmacêuticos, forenses e acadêmicos são realizados em sistemas parcial ou totalmente automáticos (HOLLER et al., 2009; LIMA, 2010).

Esses sistemas são divididos em três grandes grupos: analisadores automáticos discretos, analisadores automáticos robotizados e analisadores automáticos em fluxo (ZAGATTO et al., 2002).

1.2.4.1 Analisadores automáticos discretos

Têm como principal característica, a utilização de dispositivos mecânicos para o transporte da amostra até o sistema de detecção. A amostra é armazenada em recipientes individuais e os equilíbrios físicos e químicos são alcançados permitindo explorar a máxima sensibilidade dos métodos. Isso é importante principalmente quando as determinações envolvem reações de cinética lenta, sendo necessário um tempo maior de reação para que os equilíbrios físico e químico sejam alcançados (HOLLER et al., 2009).

1.2.4.2 Analisadores automáticos robotizados

Apresentam complexidade mecânica e custos de aquisição e manutenção maiores que os analisadores discretos. Sua principal característica é realizar manipulações analíticas utilizando braços mecânicos robotizados, isso os torna importantes durante a realização de procedimentos analíticos que exigem o emprego de substâncias tóxicas, radioativas e/ou explosivas, evitando a exposição do analista nessas situações (HOLLER et al., 2009; ZAGATTO et al., 2002).

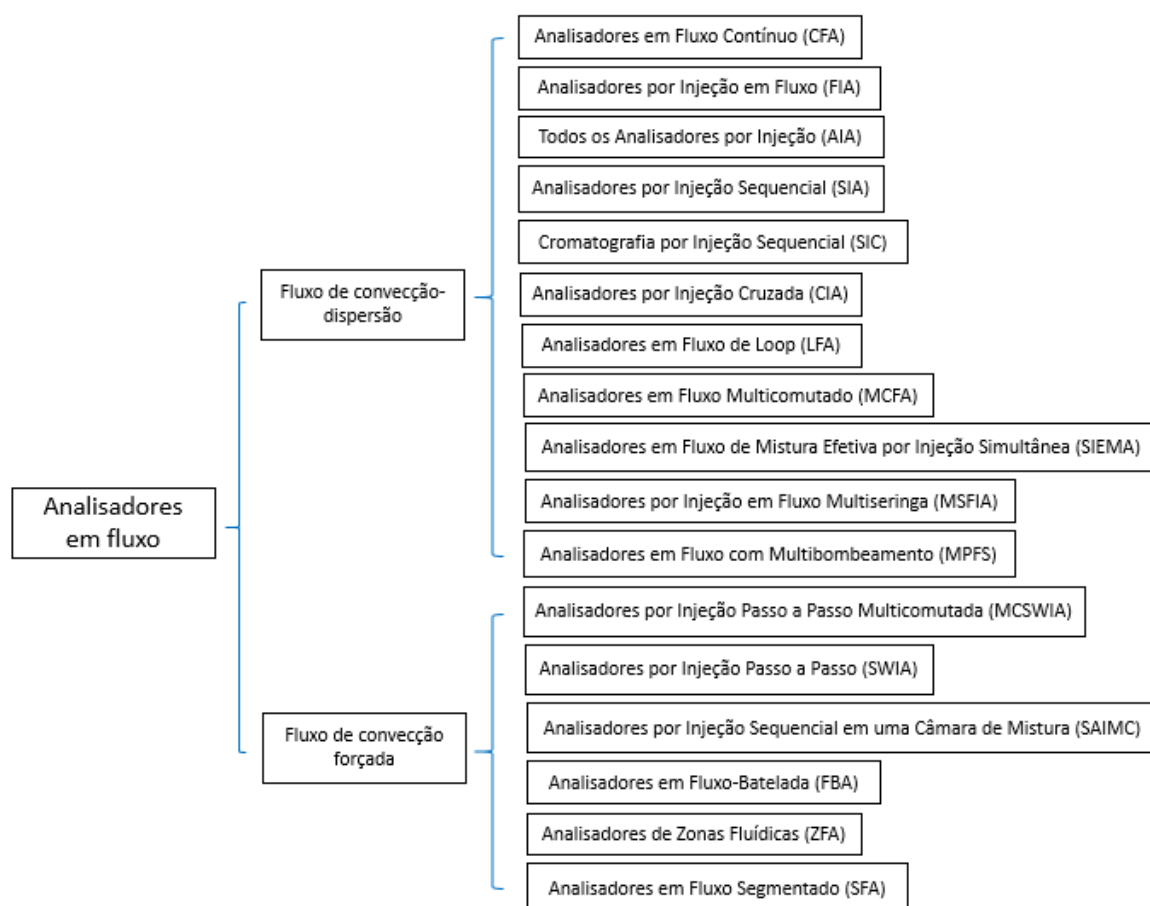
1.2.4.3 Analisadores automáticos em fluxo

Estes tipos de analisadores vêm sendo utilizados em laboratórios de análises de rotina, substituindo os analisadores automáticos discretos e robotizados por apresentarem uma instrumentação simples, menor intervenção do analista, menor consumo de reagentes e amostra, obtendo uma maior frequência analítica, sem comprometer a precisão, e às vezes, até aumentando a sensibilidade dos métodos (HOLLER et al., 2009; ZAGATTO et al., 2002). Nesses analisadores, a introdução e processamento da amostra, bem como o processo de detecção, ocorrem em fluxo (ZAGATTO et al., 2009).

A IUPAC (do inglês: International Union of Pure and Applied Chemistry) e algumas referências encontradas na literatura (ZAGATTO et al., 2002; ZAGATTO et al., 2009) classificam os analisadores em fluxo de acordo com algumas características, tais como: o modo de inserção da amostra ou reagente e a forma de acondicionamento da amostra até o sistema de detecção. Conforme o diagrama

apresentado na **Figura 2**, VAKH et al. (2016) classificam os analisadores em fluxo com base no fluxo de convecção-dispersão e no fluxo de convecção forçada.

Figura 2 – Classificação dos analisadores em fluxo com base nas condições sob as quais os processos de transferência de massa e reações químicas ocorrem em fluxo.



Fonte: (VAKH et al., 2016).

1.2.4.3.1 Analisadores em fluxo-batelada

Desde 1999 o FBA, desenvolvido por HONORATO et al., vêm sendo empregado para implementação de diversos procedimentos e métodos de análise química tais como: titulações (CARNEIRO et al., 2000; HONORATO et al., 1999), pré-tratamento da amostra para ajustá-la ao pH (HONORATO et al., 2001) ou à salinidade (CARNEIRO et al., 2002) adequada do meio de análise, adições de analito (ALMEIDA et al., 2003), preparação de soluções multicomponentes para calibração multivariada (SANTANA et al., 2000) e análises *screening* (LIMA et al.,

2004). O transporte dos reagentes e das amostras e o monitoramento do sinal analítico ocorrem de forma similar aos analisadores automáticos em fluxo, já o processamento da amostra é realizado em uma câmara de mistura, tal como nos analisadores em batelada. Essa combinação de características dos analisadores em fluxo (alta velocidade analítica, baixo consumo de amostra e reagentes, baixo custo de montagem e facilidade de automatização) e dos analisadores em batelada (universalidade de aplicações, robustez e versatilidade) fornece ao FBA, vantagens como: altas precisão e exatidão, alta velocidade analítica, baixo custo por análise, baixo consumo, baixa manipulação e contaminação de reagentes e amostras e geração de pouco resíduo para o meio ambiente.

No FBA, amostra(s) e reagente(s) são aspirados e bombeados para uma CM, na qual ocorre a homogeneização destas substâncias, que é realizada por meio de uma barra magnética de agitação e um agitador magnético. Após o processamento da reação, a mistura é bombeada para o detector. Em alguns casos, a detecção é realizada dentro da própria câmara de mistura, pelo fato de suas características permitirem a adaptação de detectores como: uma webcam ou smartphone na própria CM para a aquisição de imagens ou vídeos digitais. Já o procedimento de controle é efetuado com auxílio de um microcomputador, que garante a reprodutibilidade e velocidade nas aplicações.

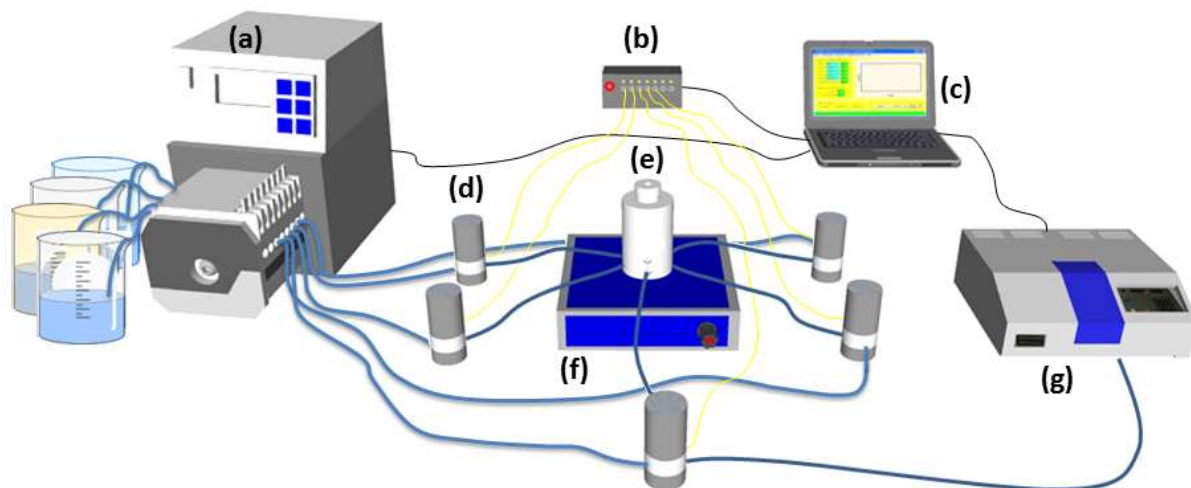
Todo o processo acima descrito pode ser rapidamente realizado usando quantidades mínimas de amostra e reagentes, com grande precisão e exatidão. De maneira geral, os FBAs apresentam as seguintes características (DINIZ et al., 2012):

1. Usam válvulas solenoides de três vias para direcionar os fluidos e uma câmara aberta para mistura, reação, preparação de soluções de calibração, adições de padrão e exploração de gradientes de concentração, tornando esses sistemas robustos, simples e de baixo custo de manutenção;
2. Funcionam apenas sobre rigoroso controle do microcomputador, garantindo precisão no tempo de acionamento das válvulas e, consequentemente, nos volumes dos fluidos adicionados na câmara;
3. A adição da amostra, reagentes, soluções-padrão, tampão, diluentes, indicadores, etc. na câmara aberta é feita em fluxo usando um processo

de multicomutação simultânea e/ou intermitente dos fluidos de acordo com o método analítico desenvolvido;

4. A amostra é processada em batelada, assim, as medidas podem ser realizadas explorando a máxima sensibilidade, pois os equilíbrios físico e químico do processo analítico podem ser alcançados e a dispersão ou diluição da amostra pode ou não ocorrer;
5. A medida do sinal analítico é geralmente feita em fluxo, mas pode ser realizada diretamente na câmara aberta;
6. Métodos clássicos bem estabelecidos são mais fáceis de serem automatizados usando estes sistemas que com outros sistemas de análise em fluxo;
7. São analisadores que oferecem muita flexibilidade às metodologias, que podem ser modificadas para se adaptar a um tipo de amostra. Por exemplo, pode-se trabalhar em uma ampla ou estreita faixa de concentrações das amostras, mudando apenas os parâmetros operacionais em seu software de controle;
8. São analisadores muito versáteis (caráter multitarefa) porque, sem alterar as configurações físicas do sistema, permitem, mudando apenas os parâmetros do software de controle, a implementação de diferentes processos analíticos (titulação, adições de analito, preparação de soluções analíticas, análise *screening* etc.);
9. Permitem explorar gradiente de concentração linear ou não linear das amostras e/ou dos reagentes.

Figura 3 – Esquema simplificado com os componentes principais de um FBA. (a) bomba peristáltica; (b) acionador de válvulas; (c) notebook; (d) válvulas solenoides de três vias; (e) câmara de mistura; (f) agitador magnético; (g) detector.



Fonte: DINIZ et al. (2012).

Na **Figura 3** é apresentado um diagrama esquemático de um sistema FBA típico, que é constituído normalmente de cinco partes essenciais:

1. Um **sistema de propulsão**, que impulsiona os fluidos por todo o percurso analítico do sistema.
2. Um **sistema de condução dos fluidos** conectando fisicamente todos os elementos que compõem o percurso analítico.
3. Um **sistema de comutação**, que utiliza válvulas solenoides de três vias para direcionamento dos fluidos ora para a câmara de mistura, ora para os respectivos recipientes de origem.
4. Uma **câmara de mistura ou reação**, onde adições de alíquotas de amostra, reagentes, soluções analíticas, tampão, diluentes, indicadores etc., são feitas através do sistema em fluxo.

5. Um **sistema de detecção**, que permite o monitoramento de uma dada propriedade da amostra ou de seu produto, fornecendo informações qualitativas e/ou quantitativas sobre a matriz.

1.2.4 Sistema de cor RGB: aplicação em métodos analíticos

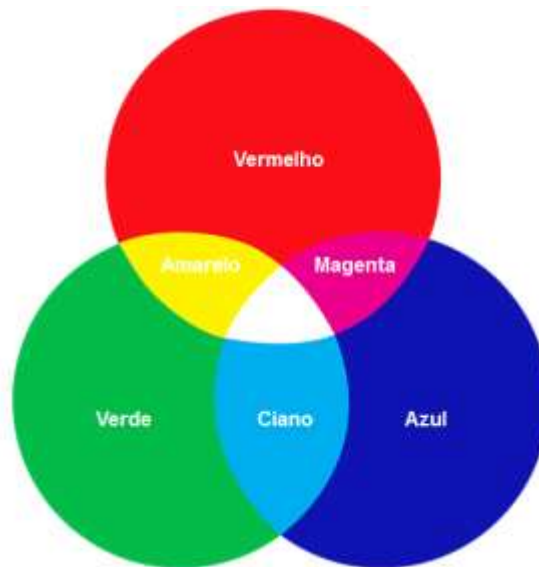
O modelo de cor RGB (*Red* – vermelho, *Green* - verde, *Blue* - azul) baseia-se na tricromaticidade do sistema visual humano, em que todas as cores do espectro visível percebidas pelo olho humano decorrem da combinação, em diferentes proporções, dos comprimentos de onda em torno do vermelho, verde e azul (BATISTA, 2014; LOPEZ-MOLINERO et al., 2010).

As cores vermelho, verde e azul são denominadas cores primárias aditivas, pois a partir da combinação aditiva destas em diferentes proporções obtêm-se as demais cores do espectro visível, inclusive a cor branca, resultado da adição das três cores primárias em intensidade máxima (BERNS, 2000). As somas das cores primárias aditivas duas a duas e de igual intensidade resultam nas cores secundárias amarelo, ciano e magenta (LEÃO, 2005), assim:

- Amarelo = vermelho + verde
- Ciano = verde + azul
- Magenta = vermelho + azul

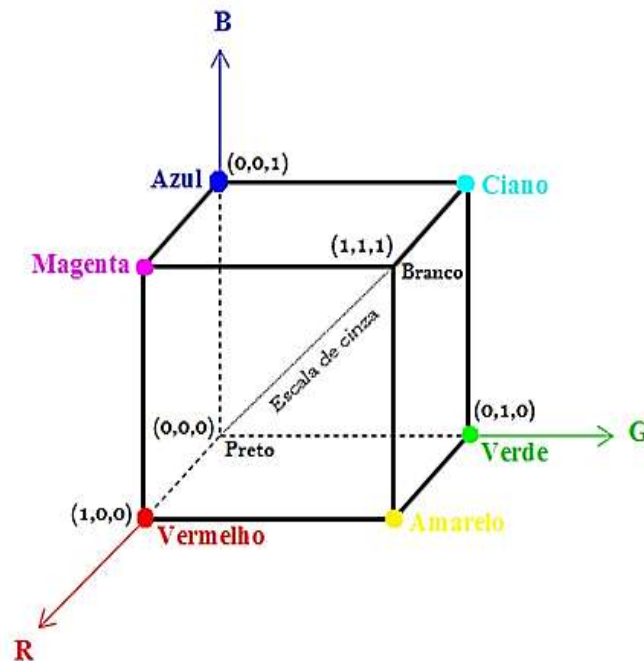
Na **Figura 4** estão apresentadas as cores primárias aditivas e suas interseções formando as cores secundárias, de modo que a interseção das três cores primárias aditivas forma a cor branca, que é composta por todos os comprimentos de onda da luz visível.

Figura 4 – Cores primárias aditivas e as suas interseções, resultando nas cores secundárias subtrativas e na cor branca.



Fonte: <http://joanamarcia1997.blogspot.com.br/> (2018).

O modelo de cor RGB pode também ser representado por um subespaço cúbico (**Figura 5**) com sistema de coordenadas cartesianas tridimensional, onde: as cores primárias aditivas correspondem às arestas do cubo coincidentes com os eixos, e as cores secundárias correspondem às arestas localizadas entre os eixos do sistema de coordenadas cartesianas tridimensionais. (MARQUES et al., 1999).

Figura 5 – Cubo de cores do modelo de cor RGB.

Fonte: <http://imgarcade.com/1/rgb-color-cube/> (2018).

Os vértices do cubo correspondem às intensidades máximas das cores primárias e secundárias, sendo que o vértice localizado na origem (0, 0, 0) corresponde ao preto e o vértice localizado no ponto com as coordenadas de maior valor (1, 1, 1) corresponde à cor branca, como era de se esperar, já que o preto corresponde à ausência de cor e o branco à máxima contribuição de todas as cores. O segmento de reta formado pelos pontos que une a origem (0, 0, 0) ao ponto máximo (1, 1, 1) corresponde à escala de cinza, que em termos de cor, varia de intensidades do preto ao branco. Nesse sentido, as demais cores do modelo RGB correspondem aos pontos (R, G, B) contidos na região interior do cubo, formados pelas diferentes combinações das cores primárias aditivas (BERNS, 2000).

De acordo com a **Figura 5**, o cubo de cores possui valores normalizados e as cores são definidas por vetores partindo da origem (0, 0, 0) com valores variando de 0 a 1. Entretanto, por conveniência, considera-se que cada cor é um ponto do cubo de cores, com valores de coordenadas cartesianas variando de 0 a 255 (BENEDETTI, 2013)

Em uma imagem digital, cada pixel carrega uma informação de cor chamada de profundidade de cor. Comumente, em um modelo de cor RGB, a profundidade de

cor de um pixel é de 24 bits, sendo 8 bits para cada componente R, G e B, que corresponde a 256 diferentes tonalidades para o vermelho (R), verde (G) e azul (B), gerando aproximadamente 16,7 milhões de possibilidades de tons diferentes de cor. (ALBUQUERQUE et al., 2006; AZEVEDO et al., 2003; BERNIS, 2000). Assim, têm-se:

- Preto = (0,0,0)
- Branco = (255,255,255)
- Vermelho = (255,0,0)
- Verde = (0,255,0)
- Azul = (0,0,255)
- Ciano = (0,255,255)
- Magenta = (255,0,255)
- Amarelo = (255,255,0)

Matematicamente, no modelo RGB, as cores são dadas pela **Equação 1** (MARQUES et al., 1999).

$$C = r.R + g.G + b.B \quad (1)$$

onde R, G e B são as intensidades das respectivas cores vermelho, verde e azul, que compõem a cor C, e r, g e b são os coeficientes tricromáticos (ALBUQUERQUE et al., 2006; MARQUES et al., 1999), que fornecem a proporção percentual das cores vermelho, verde e azul, e são dados pelas **Equações 2, 3 e 4**, respectivamente.

$$r = \frac{R}{R+G+B} \quad (2)$$

$$g = \frac{G}{R+G+B} \quad (3)$$

$$b = \frac{B}{R+G+B} \quad (4)$$

Os coeficientes r , g e b são normalizados, portanto, a soma dos três coeficientes é sempre igual a 1, conforme a **Equação 5**.

$$r + g + b = 1 \quad (5)$$

A maioria dos métodos analíticos baseados no uso de imagens digitais emprega o modelo de cor RGB. O uso deste padrão como resposta analítica está fundamentado no fato de que os valores de RGB variam proporcionalmente com a cor em uma reação colorimétrica. Este efeito pode, muitas vezes, estar associado à variação da concentração de uma substância de interesse e, é baseado neste princípio que as análises baseadas em imagens digitais são empregadas em química analítica quantitativa (BENEDETTI, 2013).

Matematicamente, a potência radiante da luz emergente que passa através de um meio absorvente é diretamente proporcional a norma do vetor RGB, que é calculada em função dos valores médios de R, G e B (LYRA et al., 2009), conforme a **Equação 6**.

$$\|v_{RGB}\| = \sqrt{\bar{R}^2 + \bar{G}^2 + \bar{B}^2} \quad (6)$$

Onde $\|v_{RGB}\|$ é a norma do vetor RGB e $\bar{R}$, $\bar{G}$ e $\bar{B}$ são valores médios de R, G e B respectivamente.

Na literatura são descritos vários modelos matemáticos baseados na norma do vetor RGB das imagens digitais para a obtenção de respostas analíticas em diversas determinações. A seguir são descritos de forma sucinta alguns desses modelos.

ALMEIDA et al. (2018) propuseram uma expressão empírica em forma análoga à Lei de Lambert-Beer (**Equação 7**) para determinação automática em fluxo-batelada de sulfito total em amostras de vinagre por análise de imagens digitais.

$$A = -\log\left(\frac{\|v_{RGB}\|}{\|v_{RGB}\|^0}\right) \quad (7)$$

Onde A é a absorbância do complexo pararosanilina(PRA)-formaldeído-sulfito, $\|v_{RGB}\|$ é a norma do vetor RGB que é diretamente proporcional à potência radiante da luz emergente que passa através de um meio absorvente e $\|v_{RGB}\|^0$ proporcional à potência radiante que é emergida no meio com a ausência de espécie absorvente.

LYRA et al. (2009) propuseram a utilização de uma webcam como um novo sistema de detecção em espectrometria de emissão em chama baseada em imagens digitais (DIB-FES). Neste método, foi realizada uma abordagem matemática visando a correlação linear entre o valor RGB da imagem digital e a concentração do analito na amostra. A norma " $\| \quad \|$ " do vetor RGB é calculada através da **Equação 8**.

$$\|v_{RGB}\| = \sqrt{\bar{R}_{s-b}^2 + \bar{G}_{s-b}^2 + \bar{B}_{s-b}^2} \quad (8)$$

Onde $\bar{R}_{s-b}$, $\bar{G}_{s-b}$ e $\bar{B}_{s-b}$ são os termos relacionados as diferenças entre $\bar{R}_s$, $\bar{G}_s$ e $\bar{B}_s$, que são os valores médios das respectivas componentes R, G e B para todos os pixels das imagens digitais das soluções analíticas e amostras e $\bar{R}_b$, $\bar{G}_b$ e $\bar{B}_b$, que são os valores médios de R, G e B para o branco.

KOHL et al. (2006) realizaram um procedimento simples no qual o princípio da absorção foi demonstrado através de análise de imagens digitais capturadas por um scanner e uma câmera digital. A resposta analítica, absorbância (A), foi estimada a partir da **Equação 9**.

$$A = -\log(I/I_0) \quad (9)$$

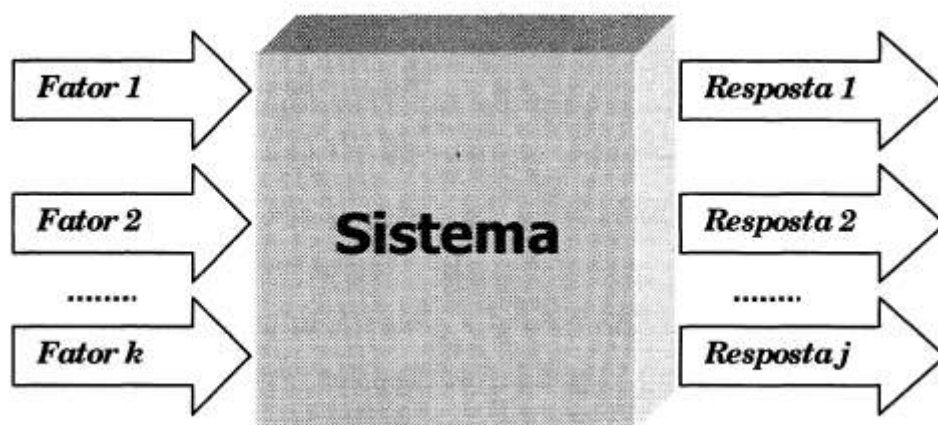
Onde I e I_0 são as normas do vetor RGB associadas apenas a valores médios da componente azul (B) obtidos a partir de imagens digitais de soluções padrão de um corante alimentício amarelo e da solução do branco, respectivamente.

1.2.5 Planejamento fatorial

O planejamento fatorial é uma importante ferramenta estatística para estudar o efeito conjunto de vários fatores sobre uma resposta de interesse, no qual estão envolvidos k fatores (ou variáveis), sendo cada um deles presente em diferentes níveis. O caso mais simples é aquele em que cada fator k está presente em apenas dois níveis. Na realização de um experimento com k fatores em dois níveis, são feitas $2 \times 2 \times \dots \times 2$ (k vezes) = 2^k observações da variável resposta e, portanto, este planejamento é do tipo fatorial 2^k (SILVA, 2008).

Na **Figura 6** é apresentado um esquema no qual se pode observar um certo número k de fatores atuando sobre o sistema em estudo, produzindo as respostas 1, 2, ..., j . O sistema atua como uma função desconhecida das variáveis de entrada, os fatores, e produz como saída as respostas observadas. O objetivo do planejamento fatorial é descobrir essa função, ou obter uma aproximação satisfatória para ela. Conhecendo esta função, o analista poderá escolher as melhores condições de operação do sistema.

Figura 6 – Esquema representando uma função que relaciona os fatores às respostas.



Fonte: NETO et al. (2001).

Esta ferramenta estatística é do tipo simultânea, em que as variáveis de interesse que realmente apresentam influência significativa na resposta são avaliadas ao mesmo tempo. Para isso, é necessário primeiramente definir um

domínio experimental escolhendo as variáveis e níveis a serem estudadas no planejamento (NETO et al., 2001).

Algumas definições importantes no tocante ao planejamento fatorial são as seguintes:

- **Fatores ou variáveis independentes** – são parâmetros que podem ser variados no sistema, tais como: concentração dos reagentes, pH, temperatura etc.;
- **Níveis** – é o grau ou faixa de variação que um fator sofrerá;
- **Resposta ou variável dependente** – é a variável de interesse que sofre influência dos diferentes fatores.

Segundo NETO et al. (2001), alguns cuidados devem ser tomados para que se possa obter o máximo de informações possível na realização do planejamento fatorial. Dentre estes, destaca-se a necessidade da realização de replicatas para que se possa estimar o erro experimental. Estas replicatas devem ser autênticas, devendo representar adequadamente o domínio experimental no qual o planejamento fatorial foi desenvolvido. Outro cuidado que se deve ter é no que se refere à realização dos experimentos. É importante que todos os ensaios e replicatas previstos no desenvolvimento do planejamento sejam feitos de forma aleatória. Estes cuidados visam evitar distorções estatísticas que possam comprometer a qualidade dos resultados obtidos e dos efeitos calculados para as variáveis estudadas.

Nos planejamentos fatoriais em que as variáveis são estudadas em dois níveis é comum codificá-los usando os sinais (+) para o nível superior e (–) para o nível inferior. A atribuição destes sinais aos níveis é feita de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados, além de permitir esquematizar o planejamento na forma de matriz de planejamento. Esta codificação de variáveis, embora pareça desnecessária, é de grande ajuda quando se realizam os cálculos para determinar qual a influência das variáveis estudadas e das suas interações no sistema.

Os efeitos são definidos como a variação ocorrida na resposta quando se muda o fator de um nível inferior (–) para um nível superior (+), e podem ser classificados em duas categorias: efeitos principais e efeitos de interação.

Para o cálculo dos efeitos, além da codificação das variáveis é necessário incluir mais colunas na matriz de planejamento. O conteúdo destas colunas representa o efeito de interação entre as variáveis e é obtido levando-se em consideração os sinais já atribuídos às variáveis envolvidas.

1.2.6 Calibração univariada

A calibração univariada é o processo de ajuste de uma função matemática que relaciona uma propriedade medida por um instrumento a outra que não pode ser medida instrumentalmente. Em química analítica, a propriedade que geralmente se pretende estimar é a concentração de uma espécie química de interesse ou analito (PIMENTEL; NETO, 1996).

Com a construção da curva analítica é possível inferir se o modelo proposto possui precisão, exatidão e aplicabilidade. O modo mais empregado para a correlação entre a curva obtida e os valores pretendidos é através da estimativa pelo método dos mínimos quadrados (MMQ), descrito matematicamente pela **Equação 10** (PIMENTEL; NETO, 1996).

$$y = b_0 + b_1x \quad (10)$$

Sendo y a variável dependente, x a variável independente e b_0 e b_1 os coeficientes linear e angular, respectivamente.

1.2.6.1 Parâmetros de desempenho analítico

O processo de validação é um indicativo de que a técnica analítica empregada possui confiabilidade nas medidas e nos modelos estatísticos envolvidos no processamento. Os procedimentos estatísticos para estimativa dos parâmetros de desempenho analítico e validação do modelo de calibração univariado são descritos de maneira sucinta a seguir.

1.2.6.1.1 Linearidade

A linearidade corresponde a capacidade do método analítico em correlacionar o sinal obtido aos níveis de concentração do analito de forma linear, podendo ser inferida pelo coeficiente de correlação “r”, que consegue descrever a variação em y, a partir da estimativa dos coeficientes de regressão “b₀” e “b₁” (VALDERRAMA; BRAGA; J., 2009).

Para obtenção da curva analítica, a ANVISA recomenda que a linearidade seja determinada por, no mínimo, cinco concentrações diferentes, com critério mínimo de correlação de $r = 0,99$. Ainda, estabelece que sejam descritas a faixa de trabalho, a equação matemática e a regressão linear da curva (ANVISA, 2003). Segundo a EURACHEM (2012), a faixa linear não deve conter valores atípicos que reflitam no critério de correlação. Uma forma de avaliar se as amostras se comportam de forma a contribuir para uma boa regressão é através da avaliação dos resíduos deixados pelo modelo de calibração, devendo estar aleatoriamente distribuídos ao longo da faixa de trabalho (PIMENTEL; NETO, 1996).

1.2.6.1.2 Limite de detecção

O limite de detecção (do inglês *limit of detection*, LOD), normalmente é determinado para estabelecer a menor concentração que um método consegue detectar, podendo ser estimado pelo método baseado em parâmetros da curva analítica, através da **Equação 11**. Para o cálculo, são realizadas 10 replicatas do branco ou da menor concentração do analito (EURACHEM, 2012).

$$LOD = 3 * \frac{s}{a} \quad (11)$$

Onde s é o desvio padrão das medidas do branco e a é o coeficiente angular da curva analítica.

1.2.6.1.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação (do inglês *limit of quantification*, LOQ) é dado pelo nível mais baixo em que um instrumento possui relação sinal/ruído suficiente para que seja possível a quantificação do analito no detector, com um desempenho que garanta a precisão e a exatidão da medida (EURACHEM, 2012). Da mesma forma do LOD, o LOQ também pode ser estimado em função do desvio padrão das medidas do branco e do coeficiente angular da curva, conforme a **Equação 12**.

$$LOQ = 10 * \frac{s}{a} \quad (12)$$

1.2.6.1.4 Precisão

A precisão de um método representa as dispersões nas condições experimentais, podendo ser estimada pelo desvio padrão absoluto (s) de medidas replicatas (EURACHEM, 2012). Este parâmetro deve ser considerado em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Também pode ser expresso através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), através da **Equação 13**, não devendo ultrapassar 5% (NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 1998).

$$DPR(\%) = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \quad (13)$$

Onde s é o desvio padrão amostral e $\bar{x}$ é a média amostral do número total de medidas n .

A repetitividade é uma medida da variabilidade, devendo ter a menor variação dos resultados, realizados por um único analista, em um mesmo equipamento e em um curto espaço de tempo. É recomendado que sejam realizadas nove repetições, podendo haver três níveis de concentração, baixa, média e alta medidas em triplicata (ANVISA, 2003). Ou ainda, que as medidas sejam realizadas pelo mesmo analista, em um mesmo equipamento, em um curto espaço de tempo e com a realização de seis a quinze replicatas para o mesmo nível de concentração. Outras

condições, como diferentes analistas ou diferentes equipamentos também são levados em consideração (EURACHEM, 2012).

Com relação a precisão intermediária, a mesma é realizada pela concordância dos resultados obtidos em diferentes dias, no mesmo laboratório, sendo representada pela concentração média obtida, assim como a estimativa do desvio padrão e o coeficiente de variação obtido com experimentos em diferentes dias. É recomendado que sejam realizadas medidas em, no mínimo, dois dias diferentes e com analistas diferentes (ANVISA, 2003).

1.2.6.1.5 Exatidão

A exatidão é a proximidade dos resultados obtidos comparados a resultados de referência (INMETRO, 2016). Três abordagens podem ser realizadas para expressar a exatidão de um método analítico: análise de materiais de referência, testes de recuperação utilizando amostras fortificadas com níveis de concentrações conhecidas ou comparação dos resultados obtidos com método de referência (EURACHEM, 2012). Utilizando a **Equação 14** pode-se calcular a recuperação nas amostras reais.

$$\text{Recuperação}(\%) = \left(\frac{c_1 - c_2}{c_3} \right) * 100 \quad (14)$$

Sendo c_1 a concentração total medida após a fortificação da amostra com o padrão, c_2 a concentração medida do analito na amostra e c_3 a concentração do padrão adicionado na amostra.

Os valores individuais de recuperação possuem um intervalo de aceitabilidade numa faixa de 80 a 120%, devendo ser avaliada em função da concentração do nível de fortificação (ANVISA, 2003).

O teste t -pareado tem sua implementação baseada no conceito de intervalo de confiança que é calculado em função da média das diferenças entre os valores de concentração, obtidos por dois métodos distintos, para cada par de resultados. O intervalo de confiança para Δ é estimado utilizando a **Equação 15**.

$$\Delta = \bar{d} \pm t_v * s_d / \sqrt{n} \quad (15)$$

Sendo Δ a diferença média verdadeira entre os resultados dos dois métodos, n o número de medidas, s_d o desvio padrão da média das diferenças entre os valores do método proposto e os do método de referência e t_v o ponto de distribuição t correspondente ao grau de liberdade (v) no nível de confiança estabelecido (NETO et al., 2001).

Para que não haja diferença sistemática significativa entre os resultados dos dois métodos a hipótese nula deve estar contida no intervalo de confiança construído. Assim, a hipótese nula não pode ser rejeitada e a média das diferenças ($\bar{d}$) deve ser um ponto da distribuição t com $\Delta=0$. Caso contrário, existe uma diferença sistemática significativa entre os resultados dos métodos no nível de confiança estabelecido.

1.2.6.1.6 Análise de variância

Um modelo de calibração só pode ser usado como ferramenta matemática para calcular estimativas e intervalos de confiança para quantificação do analito em uma determinada amostra, se for capaz de descrever de maneira satisfatória o comportamento dos dados experimentais. Para isso, esse modelo não pode apresentar evidências de falta de ajuste e ainda deve apresentar regressão estatística significativa. A validade do modelo e a significância estatística de regressão são geralmente testadas por intermédio de uma análise de variância (do inglês analysis of variance, ANOVA), cujos elementos são apresentados na **Tabela 1** (PIMENTEL et al., 1996).

Tabela 1 – ANOVA para o ajuste de um modelo pelo MMQ

FONTE	Soma Quadrática	G.L.	Média Quadrática
Regressão	$SQ_{reg} = \sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	$p-1$	$MQ_{reg} = SQ_{reg}/(p-1)$
Residual	$SQ_r = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	$n-p$	$MQ_r = SQ_r/(n-p)$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	$m-p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj}/(m-p)$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum \sum (y_{ij} - y_{im})^2$	$n-m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep}/(n-m)$
Total	$SQ_t = \sum \sum (y_{ij} - y_{im})^2$	$n-1$	

Sendo: índice **i** o nível da variável **x**, índice **j** refere-se as medidas repetidas da variável **y** em um dado nível de **x**, **p** trata-se do número de parâmetros do polinômio do modelo de calibração, **n** é o número total de medidas e **m** é o número de níveis da variável independente **x**.

A validação de modelos de calibração, obtidos pela aplicação do MMQ, consiste na análise de três parâmetros estatísticos: os resíduos, a falta de ajuste e a significância de regressão estatística (NETO et al., 2001).

Na análise de resíduos deixados pelo modelo, verifica-se o comportamento dos erros de previsão em relação aos dados experimentais. No gráfico dos resíduos, é possível identificar o tipo de erro associado aos dados ou estrutura sistemática não descrita pelo modelo. Dessa forma, se os resíduos apresentarem algum perfil tendencioso, este será um indicativo de uma falta de ajuste apresentada pelo modelo. No entanto, se os resíduos se distribuírem aleatoriamente em torno do “zero” teremos apenas erros aleatórios (RIBEIRO et al., 2008).

Quanto ao teste de falta de ajuste, este é utilizado para comparar, para os vários níveis da variável **x**, a média quadrática da falta de ajuste (MQ_{faj}) com a média quadrática devida ao erro puro (MQ_{ep}). Assim, se a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} for menor que o valor do ponto de distribuição **F**, referente aos graus de liberdade de MQ_{faj} e MQ_{ep} , para um nível de confiança de 95%, temos um modelo sem falta de ajuste. Neste caso, estas duas médias quadráticas refletem apenas os erros aleatórios associados aos dados experimentais. Caso contrário, o modelo apresenta falta de ajuste e necessita ser reestimado e revalidado (RIBEIRO et al., 2008).

O teste de significância de regressão compara a razão entre média quadrática associada à regressão (MQ_{reg}) e a média quadrática residual (MQ_r) com o valor do

ponto de distribuição F referente aos graus de liberdade de MQ_{reg} e MQ_r , a um nível de 95% de confiança estatística. Se esta razão for maior que o valor do ponto de distribuição F, tem-se que a regressão é estatisticamente significativa. Do contrário, não se pode considerar uma dependência (linear, quadrática etc.) entre as variáveis do sistema que pode ser descrita pelo modelo de calibração (RIBEIRO et al., 2008).

Capítulo 2

Experimental



2 Experimental

2.1 Preparo das soluções utilizadas nas análises

A descontaminação de vidrarias, recipientes, tubos de bombeamento e da câmara de mistura foi feita com ácido nítrico (HNO_3) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, todo o material foi lavado com água ultra purificada por um sistema Milli-Q Plus® (Millipore, Bedford, MA), com resistividade específica de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a 25°C .

Uma solução estoque de NAC (Sigma®) $9,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se uma massa de $0,0147 \text{ g}$ do padrão em água deionizada, transferindo-a para um balão volumétrico de 100 mL e completando o volume com água deionizada.

Uma solução estoque de Fe^{3+} $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se uma massa de $0,2411 \text{ g}$ do sal sulfato férrico amoniacal dodecahidratado, $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ (Vetec®), em água deionizada, transferindo-a para um balão volumétrico de 100 mL , adicionando 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e completando o volume com água deionizada. Soluções de Fe^{3+} foram preparadas em três níveis de concentração ($4,0 \times 10^{-4}$; $7,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) por diluição de três volumes distintos da solução estoque, sendo que cada um destes volumes foi tamponado em três níveis de pH (2,7; 3,7 e 4,7). Para isso, utilizaram-se soluções tampão Britton-Robinson recém-preparadas. Assim, obteve-se um total de nove soluções de Fe^{3+} para o estudo em fluxo.

Uma solução estoque de 1,10-fenantrolina (fen) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, foi preparada dissolvendo-se uma massa de $0,0991 \text{ g}$ de $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Aldrich®) em ácido clorídrico (HCl) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, transferindo-a para um balão volumétrico de 5 mL e completando o volume com água deionizada. Soluções de fen foram preparadas em três níveis de concentração ($3,0 \times 10^{-3}$; $6,0 \times 10^{-3}$ e $9,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) por diluição de três volumes distintos da solução estoque, totalizando três soluções deste reagente para o estudo.

2.1.1 Preparo das amostras

Cinco amostras de medicamentos contendo NAC foram adquiridas no comércio local da cidade de João Pessoa-PB, Brasil, sendo três destas líquidas (na

forma de xarope) e as outras duas sólidas (na forma de sachê), sendo cinco envelopes de 200 mg de NAC para cada amostra, totalizando uma massa de 2 g de amostra sólida.

Para o preparo das amostras líquidas, cada produto foi submetido a uma purga de nitrogênio por cerca de 2 minutos. Após isso, uma alíquota de 0,367 mL de cada produto foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água deionizada.

Em relação ao preparo das amostras sólidas, a massa contida em cinco envelopes de um mesmo produto, 1 g, foi armazenada em recipiente apropriado. Após isso, uma massa de 0,0147 g (1,5% da massa contida nos cinco envelopes) foi dissolvida em água deionizada e transferida para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água deionizada.

2.2 Planejamento fatorial 2^3 com ponto central

Para avaliação da influência dos parâmetros químicos do sistema; $[\text{Fe}^{3+}]$, $[\text{Fen}]$ e pH; sobre a resposta, absorbância do complexo $[\text{Fe(II)}-(\text{Fen})_3]$, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 com ponto central. A estratégia experimental foi analisar os dados de absorbância, calculados a partir da **Equação 9 (seção 1.2.5)**. Na **Tabela 2** é apresentado o domínio experimental com os fatores estudados e seus respectivos níveis.

Tabela 2 – Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial.

Fator	Nível		
	-1(mínimo)	0(ponto central)	1(máximo)
$[\text{Fe}^{3+}]$ (mol/L)	4×10^{-4}	7×10^{-4}	1×10^{-3}
$[\text{Fen}]$ (mol/L)	3×10^{-3}	6×10^{-3}	9×10^{-3}
pH	2,7	3,7	4,7

Este domínio foi definido com a finalidade de realizar estudos em torno de valores ótimos, univariados, encontrados na literatura (PESSOA-NETO, 2011) relacionados a cada variável envolvida na reação colorimétrica, de modo que por motivos de simetria, esses valores ótimos são os pontos centrais do planejamento. Para esses estudos no sistema automático proposto, mantiveram-se constantes: a concentração de NAC em $9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, a velocidade de rotação da bomba em 60 rpm, a área da região de interesse (RI) para captura da imagem em 1400 pixel^2 e os tempos de acionamento das válvulas de NAC e da água iguais a 4,5 s.

2.3 Determinação de NAC em formulações farmacêuticas

2.3.1 Método de referência

A titulação iodométrica é recomendada pela Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010). Neste procedimento, a amostra contendo NAC é titulada com solução padrão de iodo (I_3^-) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e o ponto final de titulação é determinado utilizando 1 mL de suspensão de amido 1% como indicador. Para a padronização da solução de I_3^- utilizou-se uma solução de tiosulfato de sódio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) padronizada com iodato de potássio (KIO_3) $0,0083 \text{ mol L}^{-1}$. A **Equação 14** foi utilizada para o cálculo da concentração da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ em função do volume médio gasto de solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Enquanto que a **Equação 15** foi utilizada para o cálculo da concentração da solução de I_3^- em função do volume médio gasto de solução padronizada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Equação para o cálculo da concentração de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$:

$$M(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = \frac{6 * M(\text{KIO}_3) * V(\text{KIO}_3)}{V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)} \quad (14)$$

Onde $M(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$ é a concentração molar da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, $V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$ é o volume médio gasto de solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (leitura da bureta), $M(\text{KIO}_3)$ é a concentração molar da solução padrão de KIO_3 ($0,0083 \text{ mol L}^{-1}$) e $V(\text{KIO}_3)$ é o volume de solução de KIO_3 no balão de Erlenmeyer (10 mL).

Equação para o cálculo da concentração de I_3^- :

$$M(I_3^-) = \frac{M(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) * V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)}{2 * V(I_3^-)} \quad (15)$$

Onde $M(I_3^-)$ é a concentração molar da solução de I_3^- , $V(I_3^-)$ é o volume de solução de I_3^- no balão de Erlenmeyer (25 mL), $M(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$ é a concentração molar da solução padronizada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($0,102 \text{ mol L}^{-1}$) e $V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$ é o volume médio gasto de solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (leitura da bureta).

A análise volumétrica de cada amostra é realizada em triplicata e as concentrações de NAC são estimadas a partir da equação titrimétrica (**Equação 16**) que relaciona as quantidades de titulante (I_3^-) e de analito (NAC).

$$M(\text{NAC}) = \frac{M(I_3^-) * V(I_3^-)}{V(\text{amostra})} \quad (16)$$

Onde $M(\text{NAC})$ é a concentração molar de NAC na amostra, $V(\text{amostra})$ é o volume da alíquota da amostra no balão de Erlenmeyer (0,367 mL), $M(I_3^-)$ é a concentração molar da solução padronizada de I_3^- ($0,066 \text{ mol L}^{-1}$) e $V(I_3^-)$ é o volume médio gasto de solução de I_3^- (leitura da bureta).

2.3.2 Montagem do sistema automático proposto

Para a montagem do sistema automático proposto para determinação de NAC foram utilizados os seguintes equipamentos e componentes: uma câmara de mistura; um agitador magnético; uma bomba peristáltica; tubos de bombeamento; cinco válvulas solenoides de três vias; um acionador de válvulas com placa Arduino® integrada; um circuito com LED branco; uma *webcam* e um *notebook*.

Na **Figura 7** são mostrados em detalhes os equipamentos e componentes empregados na montagem do sistema, os quais serão comentados em seguida.

Figura 7 – Vista superior do analisador automático em fluxo-batelada para determinação de NAC por imagens digitais. Equipamentos e componentes: (a) câmara de mistura com LED branco na parte superior e barra magnética na parte interna (b) agitador magnético; (c) webcam; (d) bomba peristáltica; (e) acionador de válvulas; (f) placa Arduino Uno; (g) notebook; válvulas solenoides (h) V_1 – válvula de NAC, (i) V_2 – válvula de Fe^{3+} , (j) V_3 – válvula de Fe^{2+} , (l) V_4 – válvula de H_2O e (m) V_5 – válvula de descarte.



Fonte: Autor.

Uma câmara de mistura (CM) confeccionada em PTFE (politetrafluoretileno) com janelas de quartzo (**Figura 8**) foi utilizada para adição dos fluídos, homogeneização e detecção via webcam.

Figura 8 – CM confeccionada em PTFE com janelas de quartzo.



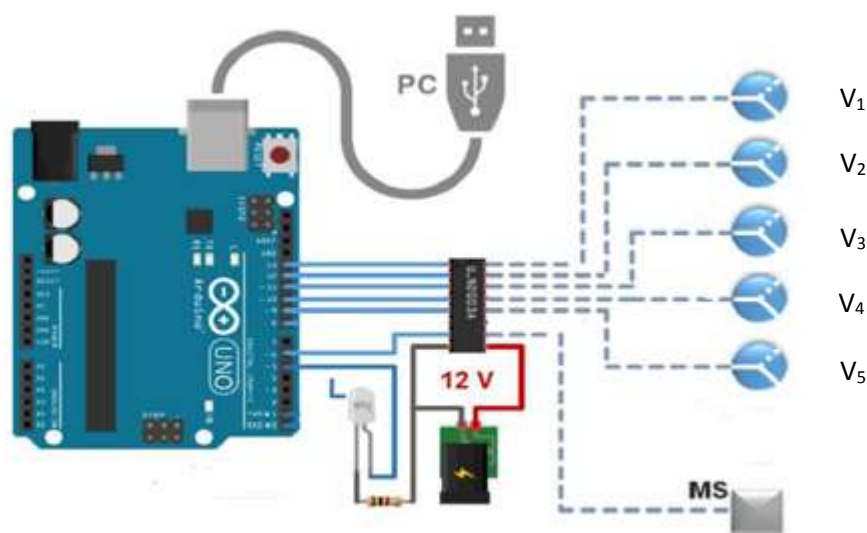
Fonte: Autor.

Esta CM tem formato cilíndrico e volume interno de 3,57 mL, contendo 6 canais de entrada, 1 canal de saída e 3 janelas de quartzo. Uma dessas janelas foi usada para a detecção, para isso, posicionou-se uma webcam de alta resolução frontalmente a esta janela que tem um ângulo de 90° em relação as outras duas. Foi adicionada na parte interna de CM uma pequena barra magnética também confeccionada em PTFE de 5 mm, para promover a homogeneização rápida das soluções. A rotação desta pequena barra foi controlada por intermédio de um agitador magnético (IKA lab disc, modelo *White*). Além disso, com a finalidade de manter a parte interna de CM com luminosidade constante foi posicionado em sua parte superior um LED branco de alto brilho (*Bluecell*) controlado por um dimmer com potenciômetro de 10 K.

Para a propulsão dos fluidos foi empregada uma bomba peristáltica MCP[®] programável equipada com 8 roletes e 10 canais. Cinco desses canais foram utilizados para interligar cinco válvulas solenoides *three-way* da Cole Parmer[®] (modelo EW-01540-13) por intermédio de tubos de bombeamento de *Tygon*[®] e Teflon[®], com a finalidade de comutar os fluidos para CM.

Para o acionamento das válvulas solenoides foi construído um acionador de válvulas, constituído por uma placa Arduino[®] (UNO), contendo um circuito integrado ULN2003A (**Figura 9**), fabricado pela Toshiba, que é um arranjo de oito transistores do tipo *Darlington*, adequados para tolerar alta tensão e corrente. O uso desse dispositivo torna possível o controle independente ou simultâneo, de até 8 portas de saída da placa.

Figura 9 – Diagrama esquemático do circuito eletrônico para interface de controle das válvulas solenoides, agitador magnético e LED branco.



Fonte: ALMEIDA et al. (2018).

As válvulas solenoides são alimentadas com uma tensão de 12 V e são acionadas quando o ULN2003A recebe uma tensão superior a 3,8 V em suas portas de entrada, gerando uma corrente de 150 mA nas portas de saída, onde estão conectadas as válvulas.

O sistema de detecção usado para captura das imagens digitais foi uma webcam de alta definição da Microsoft® LifeCam Cinema (**Figura 10**). Esta webcam foi posicionada frontalmente à janela de quartzo de CM de modo a não haver luz externa interferente. Para a captura das imagens digitais foi definida uma resolução de 1280x720.

Figura 10 – Modelo da webcam de alta definição usada para a captura das imagens digitais.



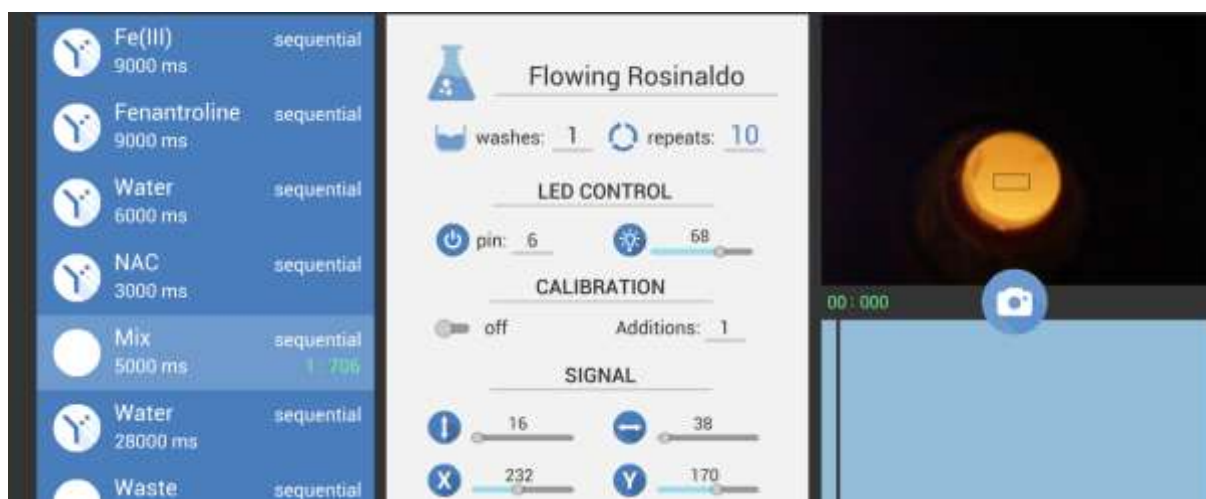
Fonte: <https://www.microsoft.com/accessories/pt-br/products/webcams/lifecam-cinema/h5d-00013> (2018).

Por fim, o acionador de válvulas e a webcam, descritos anteriormente, foram conectados a um notebook ASUS com processador Intel® Core i3 de 1.5 GHz e memória RAM de 2 GB, através das portas de comunicação USB 2.0. Esse interfaceamento permite controlar todo o sistema, desde os comandos enviados ao acionador de válvulas até o monitoramento dos sinais analíticos detectados. Para o gerenciamento do sistema foi desenvolvido um aplicativo de controle, que será discutido em seguida.

2.3.2.1 Programa computacional de controle, aquisição e tratamento de dados

O programa de controle de acionamento das válvulas e aquisição e armazenamento das imagens digitais usado nesse trabalho foi o *Flowing*, cuja interface é apresentada na **Figura 11**. Este programa foi escrito na plataforma *Adobe AIR for Desktop* em linguagem *ActionScript 3.0* pelo nosso grupo de pesquisa.

Figura 11 – Interface gráfica do programa *Flowing*.



Fonte: Autor.

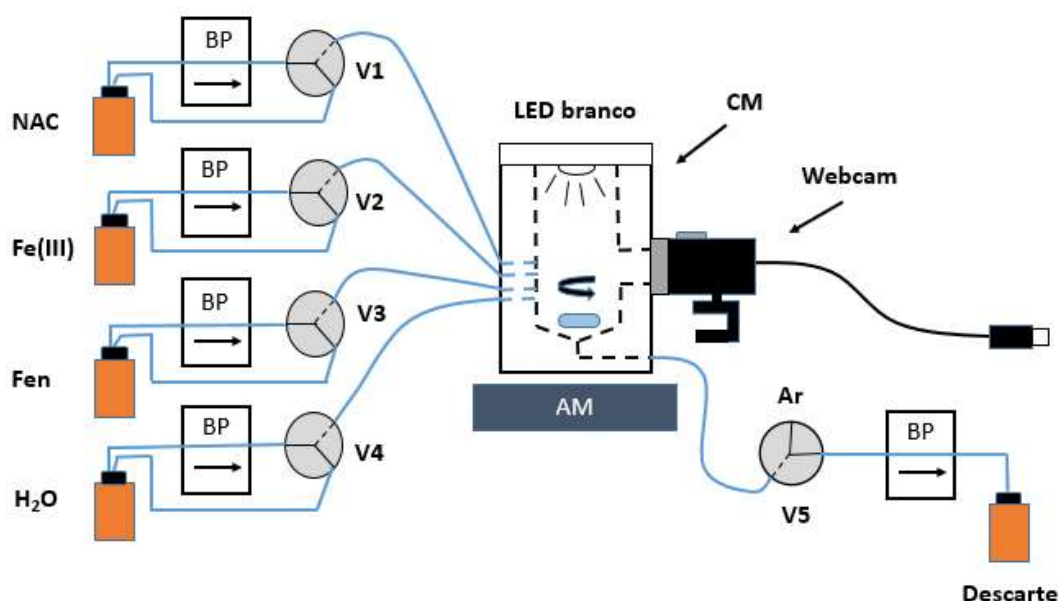
A interface gráfica do programa *Flowing* apresenta as seguintes funções:

- **Controle de tempo de acionamento das válvulas solenoides** – Os tempos definidos para cada etapa foram estabelecidos na escala de milissegundos. Esses valores de tempo possibilitam a adição precisa dos volumes de padrão/amostras e reagentes em CM;
- **Leitura do sinal analítico** – O programa permite a detecção do sinal analítico via webcam, a qual captura a imagem e os valores RGB gerados são armazenados automaticamente na memória do notebook. A partir desses valores, são calculados os valores de absorbância pela Equação 9 (Seção 1.2.5);
- **Procedimentos analíticos** – O programa permite ao analista definir os seguintes parâmetros operações necessários para o procedimento analítico: número de replicadas, número de limpeza de CM, tempo de agitação, seleção do tamanho da região de interesse e controle da luminosidade do LED.

2.4 Procedimento automático

Na **Figura 12** é apresentado um diagrama esquemático do sistema automático fluxo-batelada proposto para determinação de NAC por imagens digitais. O arranjo físico do sistema se manteve inalterado durante todo o processo analítico aplicado.

Figura 12 – Diagrama esquemático do analisador FBA para determinação de NAC por imagens digitais. Equipamentos e componentes: CM com LED branco na parte superior e barra magnética na parte interna; agitador magnético (AM); webcam; bomba peristáltica (BP) e válvulas solenoides (V_1 - V_5).



Fonte: Autor.

A automação do sistema teve como base a reação química colorimétrica que envolve duas etapas: 1) reação (em pH controlado) do analito NAC com Fe(III) para gerar Fe(II) e em seguida 2) complexação do Fe(II) gerado com a Fen para formação do complexo laranja-avermelhado (FORNAZARI et al., 2005), conforme as **Equações 1 e 2 (Seção 1.2.3.2)**.

Antes de qualquer análise, é realizado o preenchimento de todos os canais do sistema. Inicialmente, as soluções dos reagentes e padrão/amostras são aspiradas

de seus respectivos recipientes e bombeadas em direção aos próprios recipientes, ficando assim em fluxo cíclico conhecido como fluxo intermitente. Após isso, as válvulas de V_1 , V_2 , V_3 e V_4 são acionadas, de modo que as respectivas soluções são bombeadas em direção a CM, preenchendo todos os canais localizados entre as válvulas e CM. Por fim, a válvula V_5 é acionada por 30 s, aspirando todo volume de CM para o descarte. Este procedimento deve ser realizado sempre que houver a troca de soluções contidas nos recipientes (padrão/amostras e/ou reagentes).

Para análise do branco, as válvulas V_2 (Fe^{3+}), V_3 (Fen) e V_4 (H_2O) são acionadas sequencialmente com tempo total de 27 s, assim CM é preenchida com um volume total de 3,57 mL e as dez imagens do branco são capturadas e armazenadas durante um intervalo de tempo de 2 s cada.

As soluções analíticas ($8,08 \times 10^{-5}$; $1,07 \times 10^{-4}$; $1,33 \times 10^{-4}$; $1,59 \times 10^{-4}$; $1,85 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) foram preparadas dentro de CM a partir adição de alíquotas da solução padrão estoque de NAC 9×10^{-4} mol L^{-1} e de água. Para isso, as válvulas V_2 (Fe^{3+} 1×10^{-3} mol L^{-1}) e V_3 (Fen 9×10^{-3} mol L^{-1}) permanecem com os seus respectivos tempos de acionamento inalterados em 9 s, enquanto que os tempos de acionamento das válvulas V_1 (padrão de NAC 9×10^{-4} mol L^{-1}) e V_4 (água deionizada) variam proporcionalmente de acordo com a concentração da solução analítica que está sendo preparada, sempre mantendo o volume final de CM constante e igual a 3,57 mL, conforme mostrado na **Tabela 3**. Após cada reação, a imagem do complexo formado é capturada em um intervalo de tempo de 2 s.

Após cada análise, a válvula V_5 é acionada por 30 s, aspirando todo volume de CM para o descarte e depois realiza-se a etapa de limpeza em CM com água deionizada, pressionando o botão “whashes”.

O procedimento para análise de NAC nas amostras em CM é similar à preparação das soluções analíticas. Para isso, o recipiente contendo a solução padrão de NAC deve ser substituído pelo recipiente que contém a solução da amostra diluída previamente.

Tabela 3 - Etapas do procedimento automático para determinação de NAC nas amostras.

Etapa	Procedimento realizado na CM	Válvula	Tempo (s)	Volume (mL)
1 ^T	Adição do padrão/amostra	V ₁	1 - 8 ^P / 4,5 ^A	0,113 – 0,839 ^P / 0,476 ^A
2 ^T	Adição de água deionizada	V ₄	8 - 1 ^P / 4,5 ^A	0,839 – 0,113 ^P / 0,476 ^A
3	Adição do reagente Fe(III)	V ₂	9	1,35
4	Adição do complexante Fen	V ₃	9	1,27
5	Homogeneização	–	5	–
6	Captura e armazenamento da imagem	–	2	–
7	Descarte da solução do complexo	V ₅	30	3,57
8	Adição de água deionizada para limpeza	V ₄	27	3,57
9	Descarte do volume de água	V ₅	30	3,57

^T – etapa realizada em triplicata; ^P – para diluição do padrão; ^A – para diluição da amostra

Como pode ser observado na **Tabela 3**, para a diluição da solução padrão/amostra dentro de CM, o somatório dos tempos de acionamento das válvulas V₁ e V₄ é sempre constante e igual a 9 s e os tempos de acionamento das válvulas V₂ e V₃ também são fixos, 9 s para cada, com a finalidade de manter o volume final em CM sempre constante e igual a 3,57 mL. Para o caso da diluição da amostra dentro de CM, o tempo de acionamento da válvula V₁ é sempre igual ao tempo de acionamento da válvula V₄ (4,5 s), com intuito da diluição ocorrer próximo do ponto central da curva analítica.

Capítulo 3

Resultados e discussão



3. Resultados e discussão

3.1 Estudo e otimização dos parâmetros operacionais e químicos do sistema

Com a finalidade de otimizar a sensibilidade e a reprodutibilidade do sinal analítico, foram feitos estudos dos parâmetros operacionais (de maneira univariada) e químicos (de maneira multivariada) do método proposto.

3.1.1 Parâmetros operacionais

3.1.1.1 Velocidade de rotação da bomba peristáltica

Para avaliar a reprodutibilidade dos volumes de líquidos inseridos na CM em função da velocidade de bombeamento foram investigadas três velocidades de rotação da bomba peristáltica: 30, 45 e 60 rpm. Com estas informações também foi possível avaliar as vazões nos quatro canais investigados, através dos modelos lineares obtidos para as curvas de vazão (**seção 3.1.1.2**). Os resultados são apresentados na **Tabela 4**.

Tabelas 4 – Estudo das velocidades de rotação da bomba peristáltica

Válvula V ₁		1s	3s	5s	7s	9s	R ²
30 rpm	DPR (%)	5,0	2,1	1,3	0,9	0,7	1,0000
45 rpm	DPR (%)	5,7	1,4	0,5	0,6	0,5	0,9999
60 rpm	DPR (%)	1,7	0,6	0,4	0,4	0,2	1,0000
Válvula V ₂		1s	3s	5s	7s	9s	R ²
30 rpm	DPR (%)	1,0	0,4	0,7	0,4	0,2	0,9999
45 rpm	DPR (%)	2,4	0,4	0,4	0,2	0,1	1,0000
60 rpm	DPR (%)	0,6	0,2	0,2	0,2	0,2	1,0000
Válvula V ₃		1s	3s	5s	7s	9s	R ²
30 rpm	DPR (%)	3,3	0,9	0,8	0,6	0,5	1,0000
45 rpm	DPR (%)	1,8	0,5	0,5	0,4	0,2	0,9998
60 rpm	DPR (%)	2,0	0,9	0,4	0,2	0,2	0,9999
Válvula V ₄		1s	3s	5s	7s	9s	R ²
30 rpm	DPR (%)	5,0	2,1	1,3	0,9	0,7	1,0000
45 rpm	DPR (%)	5,7	1,4	0,5	0,6	0,5	0,9999
60 rpm	DPR (%)	1,7	0,6	0,4	0,4	0,2	0,9999

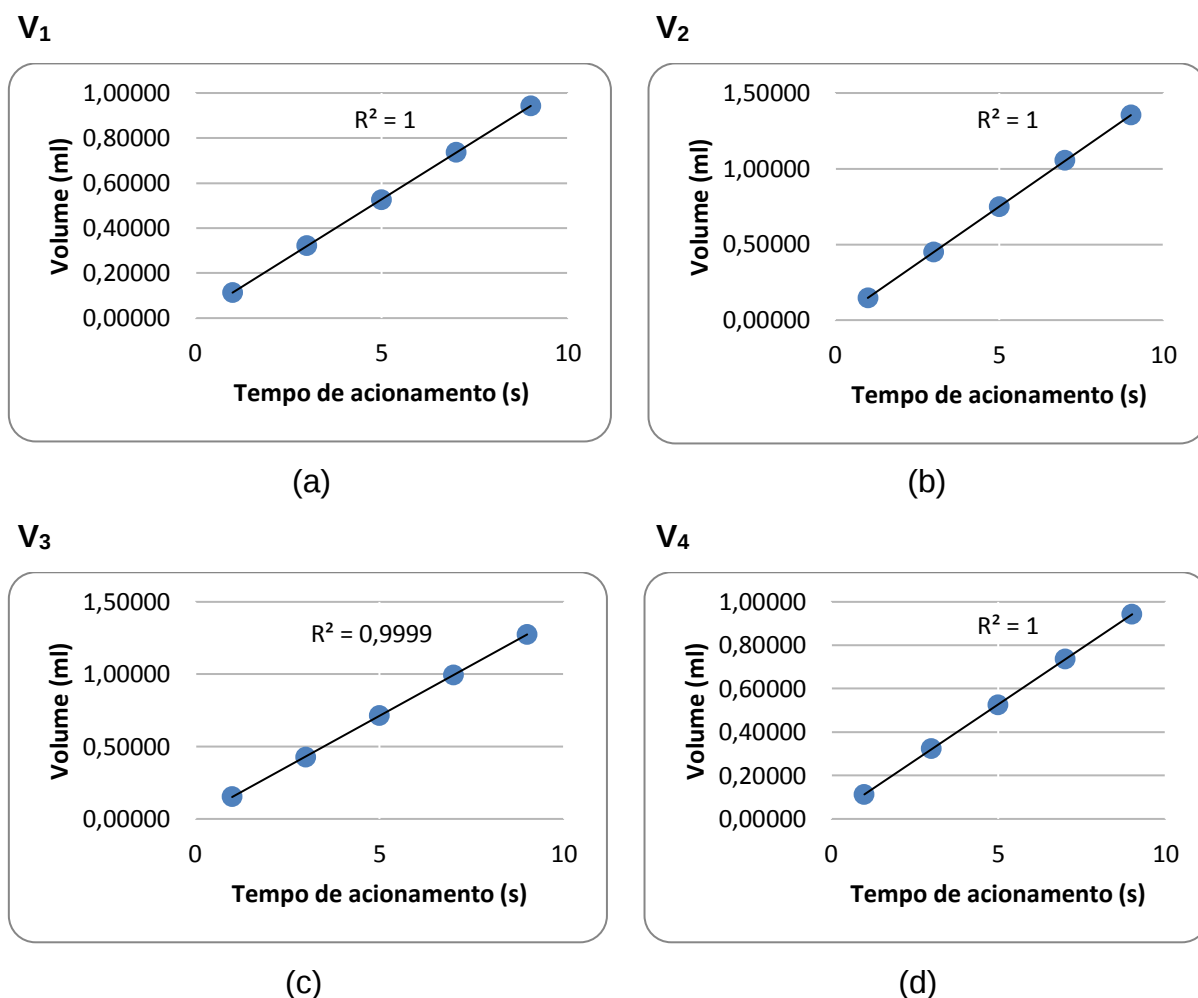
A precisão de bombeamento de volume em todos os canais foi satisfatória, com valores de DPR sempre menores que 6,0 %. Como esperado, os valores de DPR foram sempre maiores em tempos de acionamento de 1,0 s. Há duas fontes de incerteza que contribuem para isso: a pulsação da bomba (causada pelos roletes) e a precisão das medidas de massa de água.

Com base nos dados obtidos nesse estudo, constata-se que a velocidade de 60 rpm apresentou os menores valores de DPR para todos os tempos de acionamento estudados, principalmente para o tempo de 1,0 s. Velocidades de rotação maiores não foram estudadas, pois foi constatado a partir de testes prévios que em velocidades acima de 60 rpm apesar de haver um aumento na frequência analítica tem-se uma diminuição muito acentuada na reprodutibilidade das medidas. Com isso, a velocidade de rotação 60 rpm foi adotada para inserção dos volumes de amostra e reagentes em CM. Foi estabelecido também que 1,0 s e 9,0 s são os respectivos tempos mínimo e máximo de acionamento das válvulas.

3.1.1.2 Vazão nos canais

Esse estudo foi feito utilizando os mesmos procedimentos adotados no estudo da velocidade de rotação da bomba peristáltica, onde foi estabelecida a velocidade de 60 rpm. Na **Figura 13** são apresentadas as curvas de vazão das válvulas solenoides nos tempos de 1, 3, 5, 7 e 9 s. É importante ressaltar que a vazão no canal do descarte foi estimada empiricamente a partir de uma média de tempos de acionamento da válvula do descarte, os quais tiveram valores levemente maiores que o tempo total de todos os procedimentos anteriores ao descarte, para garantir a completa aspiração do volume líquido residual em CM.

Figura 13 – Curvas de calibração referentes à vazão das válvulas solenoides: (a) do analito NAC, vazão $0,1037 \text{ mL s}^{-1}$ (V_1); (b) do reagente Fe^{3+} , vazão $0,1509 \text{ mL s}^{-1}$ (V_2); (c) do complexante o-fenantrolina, vazão $0,1404 \text{ mL s}^{-1}$ (V_3) e (d) da água de limpeza, vazão $0,1035 \text{ mL s}^{-1}$ (V_4).



Fonte: Autor.

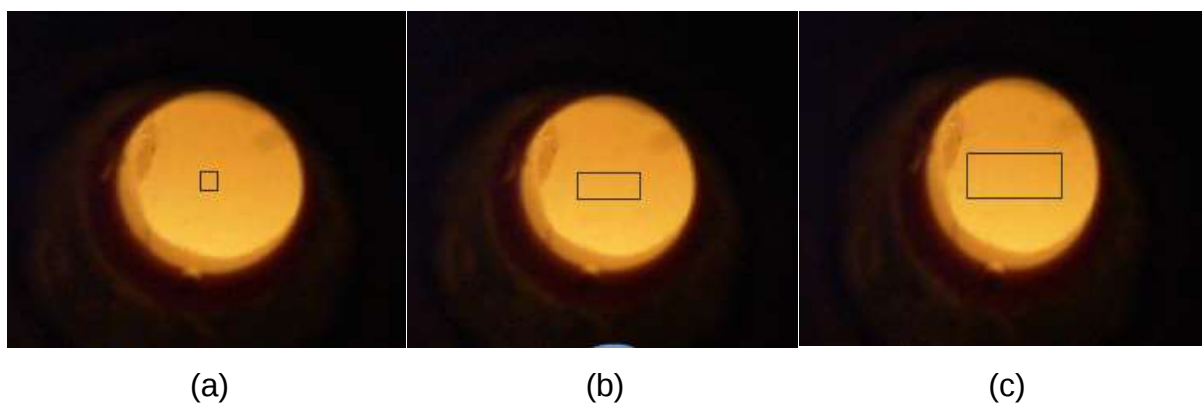
Após as devidas conversões de unidades, foram obtidos os modelos lineares para as curvas de vazão de cada canal, cujas equações foram: $y = 0,1037x + 0,0093$ (Válvula 1); $y = 0,1509x - 0,0044$ (Válvula 2); $y = 0,1404x + 0,0108$ (Válvula 3) e $y = 0,1035x + 0,0091$ (Válvula 4), onde y é volume e x é tempo de acionamento. As linearidades são atestadas pelos valores dos coeficientes de correlação que foram praticamente iguais a 1,0. Em teoria, a inclinação da curva representa numericamente o valor da vazão em um determinado canal, entretanto, é recomendável que se use a equação obtida, pois esta já agrega os resíduos do modelo obtido pelo método dos mínimos quadrados. Estas curvas servirão de base para todos os cálculos que envolvem volume, vazão e tempo, os quais são

fundamentais para o planejamento dos tempos de acionamento das válvulas e consequentemente para as análises.

3.1.1.3 Região de interesse para captura da imagem

Foram analisadas três áreas distintas de janela selecionada para a captura da imagem, conforme mostrado na **Figura 14**. As delimitações das áreas da região de interesse (RI) foram definidas via *Flowing*, mudando os parâmetros de localização espacial (X,Y) e número de pixels nas direções X e Y.

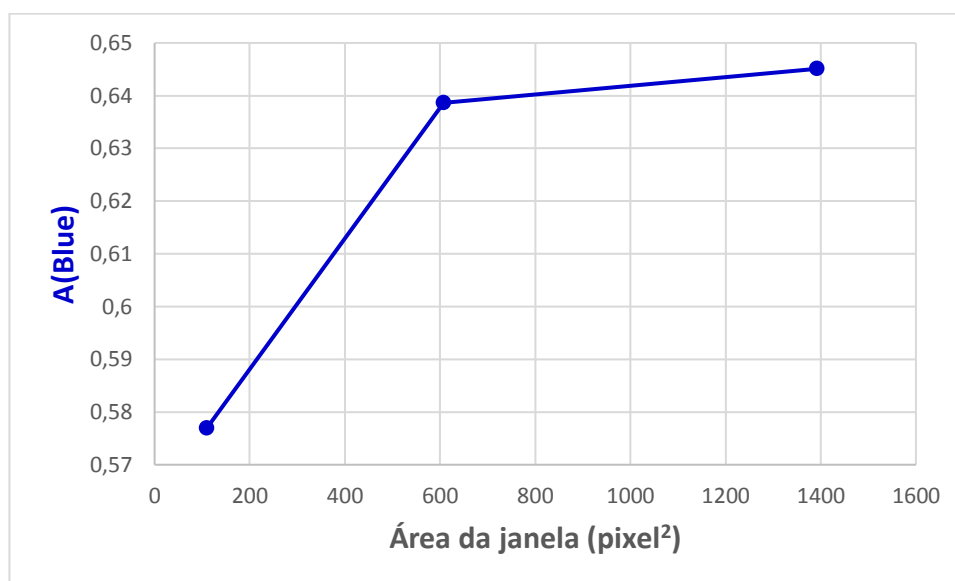
Figura 14 – Áreas das janelas que foram estudadas para captura das imagens: (a) janela de área menor com localização espacial (X,Y) de 245x170 e área 11x10 pixels; (b) janela de área média com localização espacial (X,Y) de 232x170 e área 16x38 pixels e (c) janela de área maior com localização espacial (X,Y) de 223x166 e área 24x58 pixels.



Fonte: Autor.

Para esse estudo, foram realizadas no sistema proposto dez medidas para cada janela, mantendo constantes os seguintes parâmetros químicos e operacionais: [NAC] em $1,33 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Fe}^{3+}]$ em $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, [Fen] em $9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, componente B do vetor RGB e velocidade de rotação da bomba em 60 rpm. Todos os valores de absorvância foram calculados a partir da **Equação 9 (Seção 1.2.5)**. Como se pode observar na **Figura 15**, há uma dependência do sinal analítico (absorvância) com a área da RI.

Figura 15 – Dependência do sinal analítico com a área da janela selecionada para detecção.



Fonte: Autor.

Pode-se notar que, quanto maior a área da RI maior a absorvância do complexo. Áreas maiores não foram estudadas, visto que a variação do sinal analítico médio com a mudança da RI de área média para a RI de área maior foi pequena, cerca de 0,78 %. Com isso, a janela de maior área estudada foi a escolhida para as análises de NAC nas amostras.

3.1.2 Parâmetros químicos

A realização do planejamento fatorial 2^3 com ponto central permitiu obter um total de 12 experimentos em condições diferentes, 8 experimentos do planejamento fatorial 2^3 e mais 4 experimentos do ponto central. O erro padrão foi estimado através de replicatas no ponto central. A resposta avaliada para este planejamento foi a absorvância do complexo $[\text{Fe(II)}-(\text{Fen})_3]$ calculada a partir dos valores da componente B do vetor RGB pela **Equação 9 (Seção 1.2.5)**.

Na **Tabela 5** é apresentada a matriz do planejamento 2^3 com ponto central com todos os experimentos contendo: os fatores estudados, seus respectivos níveis codificados pelos coeficientes de contraste (-1, 0 e 1) e as respostas obtidas.

Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial 2^3 com ponto central e absorvâncias do complexo

Experimento	[Fe ³⁺]	[Fen]	pH	A (Blue)
1	-1	-1	-1	0,406
2	1	-1	-1	0,426
3	-1	1	-1	0,490
4	1	1	-1	0,594
5	-1	-1	1	0,105
6	1	-1	1	0,383
7	-1	1	1	0,097
8	1	1	1	0,374
9	0	0	0	0,423
10	0	0	0	0,349
11	0	0	0	0,383
12	0	0	0	0,384

Para avaliação dos resultados do planejamento fatorial 2^3 com ponto central foram calculados todos os efeitos principais e de interação (**Tabela 6**) através do programa computacional *Statistica* 8.0.

Tabela 6 – Efeitos do planejamento fatorial 2^3 com ponto central

Efeitos	Estimativa $\pm$ erro padrão
Média da interação	0,3679 $\pm$ 0,0086
[Fe ³⁺] (mol/L)	0,1696 $\pm$ 0,0213
[Fen] (mol/L)	0,0590 $\pm$ 0,0213
pH	-0,2392 $\pm$ 0,0213
[Fe ³⁺] x [Fen]	0,02116 $\pm$ 0,0213
[Fe ³⁺] x pH	0,1077 $\pm$ 0,0213
[Fen] x pH	-0,0674 $\pm$ 0,0213

Os resultados indicam que apenas os fatores [Fe³⁺] e pH afetam significativamente a resposta. Observando as **Equações 1 e 2 (1.2.3.2)**, isso se deve provavelmente ao fato de que, em ambiente com pH baixo (ou concentração hidrogeniônica alta), não acontece a hidrólise do Fe³⁺, ou seja, praticamente todos os íons Fe³⁺ estão disponíveis em solução para reagir com o analito NAC. Paralelamente, quanto maior a concentração de Fe³⁺ em solução maior a probabilidade do equilíbrio químico se deslocar no sentido de formação de Fe²⁺, conforme o princípio de Le Châtelier. O fator [Fen] não apresenta efeito significativo porque a fen é apenas o reagente complexante do Fe²⁺ gerado e não interfere significativamente na resposta.

O fator [Fe³⁺] apresentou um efeito significativo e com valor positivo, indicando que a medida em que é empregado em seu nível superior, tem-se um aumento de aproximadamente 0,17 na resposta. Já o fator pH apresentou um efeito significativo, porém, com valor negativo, neste caso este fator em seu nível inferior causa um aumento em torno de 0,24 na resposta.

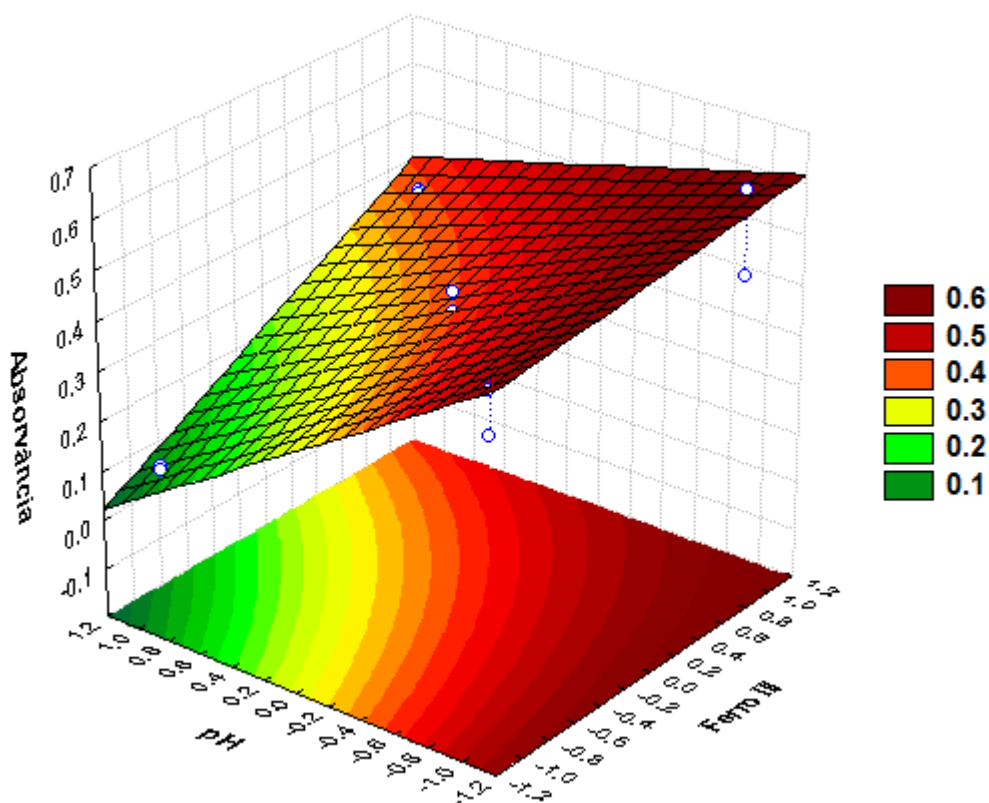
Pela magnitude dos efeitos principais, verifica-se que a resposta é muito mais sensível ao fator pH do que a [Fe³⁺]. Esses dois fatores apresentaram um efeito de interação significativo e positivo, indicando que a medida em que são usados simultaneamente em seus níveis superiores, o aumento na resposta é de 0,10.

Entretanto, como o pH tem um efeito principal negativo, deve-se ponderar ao usá-lo em seu nível superior.

Na **Figura 16** é apresentada a superfície de resposta, na qual os resultados experimentais se ajustam a um modelo linear (**Equação 17**), onde a absorbância A é expressa matematicamente como uma função envolvendo três fatores: pH, $[Fe^{3+}]$ e $[Fen]$. No entanto, para plotar essa superfície tridimensional no *Statistica* 8.0 se fez necessário considerar apenas os dois fatores que têm efeito significativo sobre a resposta, $[Fe^{3+}]$ e pH, mantendo constantes os demais parâmetros químicos e operacionais: $[NAC]$ em $1,33 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[Fen]$ em seu nível superior, velocidade de rotação da bomba em 60 rpm, componente B do vetor RGB e RI de área maior. A ANOVA revelou que a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} foi menor que o valor de F_{tab} . Portanto, não há falta de ajuste do modelo linear a um nível de 95% de confiança, evidenciando assim, a confiabilidade para fazer previsões.

$$A = 0,368 - 0,120xpH + 0,085x[Fe^{3+}] + 0,030x[Fen] + 0,054xpHx[Fe^{3+}] - 0,034xpHx[Fen] \quad (17)$$

Figura 16 – Superfície de resposta do modelo linear para os fatores $[\text{Fe}^{3+}]$ e pH, mantendo-se a $[\text{Fen}]$ em seu nível superior, velocidade de rotação da bomba em 60 rpm e RI de área maior.



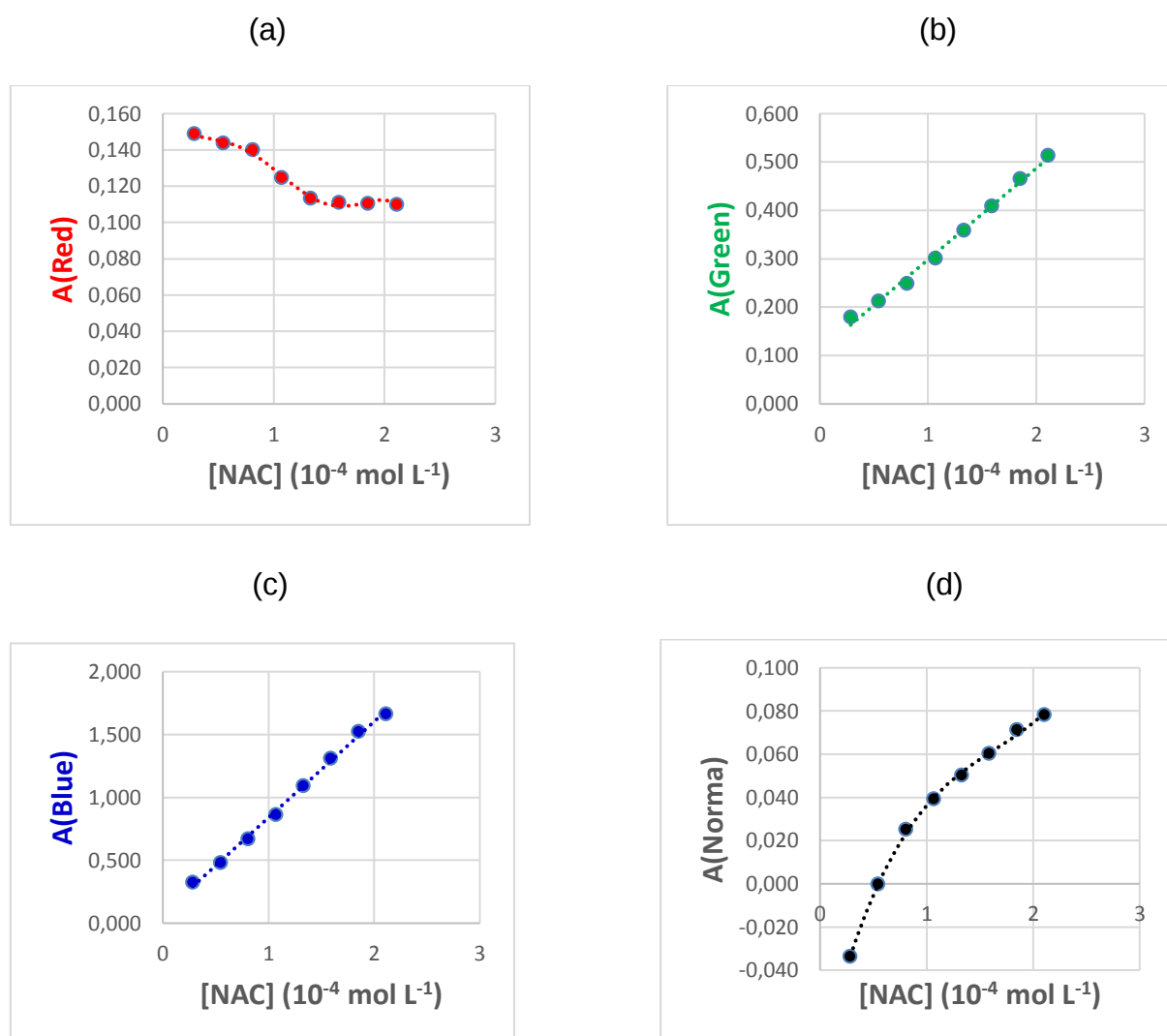
Fonte: Autor.

A superfície de resposta indica a possibilidade de obter uma absorbância de até 0,6. Com o modelo ajustado, a previsão para absorbância é de 0,5923, usando o fator $[\text{Fe}^{3+}]$ em seu nível superior e o pH em seu nível inferior, mantendo o fator $[\text{Fen}]$ fixado em seu nível superior. Este valor é muito próximo do valor 0,5944, obtido experimentalmente, indicando a qualidade do ajuste do modelo linear aos dados.

3.2 Avaliação da componente de cor a ser adotada na calibração

Após a captura da imagem, geração dos dados RGB e armazenamento dos mesmos na memória do notebook, foram calculados os valores de absorbância através da **Equação 9 (Seção 1.2.5)**. Na **Figura 17** são apresentadas as variações dos valores das componentes R, G, B e da norma do vetor RGB em função da $[\text{NAC}]$, que é diretamente proporcional ao tempo de acionamento da válvula V_1 .

Figura 17 – Componentes individuais (a) R, (b) G, (c) B e (d) norma do vetor RGB versus [NAC], que é diretamente proporcional ao tempo de acionamento da válvula V_1 .



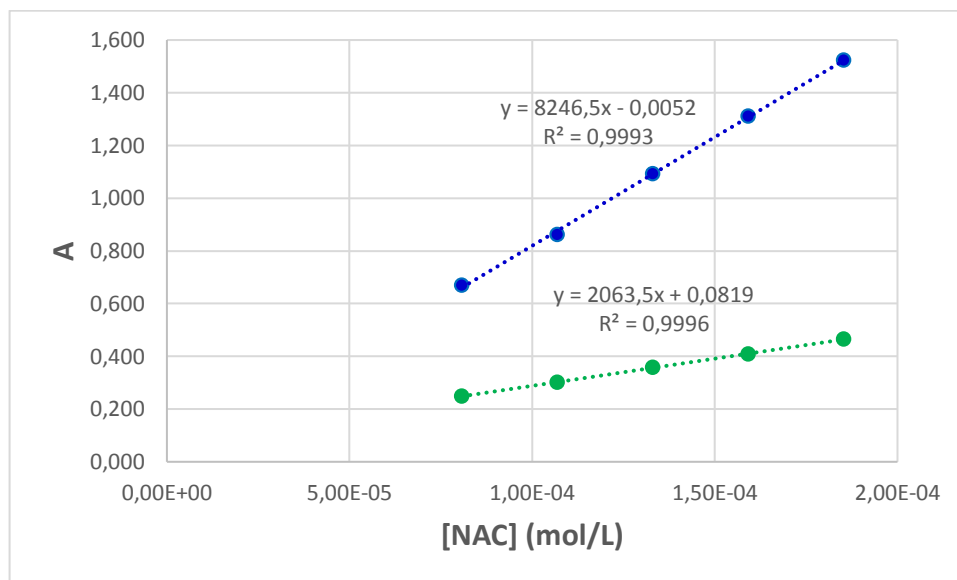
Fonte: Autor.

Analisando de maneira individual cada componente de cor e também a norma do vetor RGB, nota-se que as componentes G e B apresentam comportamento linear em quase todo intervalo de [NAC] estudado. Porém, a componente R e também a norma do vetor RGB apresentam comportamento não linear com curvatura significativa no caso da norma do vetor, além disso, o perfil obtido para a componente R tem comportamento sigmoidal. Isso pode ser justificado pelo fato da cor do complexo formado ser vermelho-alaranjado, com isso a absorção molecular não ocorre na região do vermelho e sim a emissão ou transmitância, que é o inverso da absorbância.

3.2.1 Comparação das linearidades das componentes G e B

Na **Figura 18** é mostrada uma comparação de linearidade das componentes G e B do vetor RGB.

Figura 18 – Comparação da linearidade das componentes G e B do vetor RGB.



Fonte: Autor.

Para a escolha da componente ótima foram avaliados os seguintes parâmetros:

- **Magnitude do coeficiente de determinação (R^2)** - que mede o quanto os dados experimentais estão ajustados ao modelo de regressão linear.
- **Coeficiente angular da reta** – que segundo a IUPAC é uma medida da sensibilidade analítica.

Diante disso, a reta associada a componente B foi a escolhida por apresentar uma maior sensibilidade analítica (cerca de quatro vezes maior), apesar de seu R^2 ser levemente menor. Com isso, essa componente foi a utilizada para a determinação de NAC nas amostras de medicamentos.

3.3 Validação do método proposto

3.3.1 Análise de potenciais interferentes

O efeito de potenciais interferentes na determinação de NAC nas amostras foi avaliado em termos dos principais excipientes normalmente presentes em amostras comerciais deste medicamento. Os seguintes compostos foram avaliados: estearato de magnésio, lactose, benzoato de sódio, amido e sacarina. Para isso, adicionaram-se concentrações de cada excipiente em uma solução contendo determinada concentração de padrão e o sinal obtido foi comparado antes e após a adição dos potenciais interferentes analisados.

Uma solução padrão de concentração $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizada e os potenciais interferentes em concentrações dez vezes superiores. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Estudo dos potenciais interferentes na determinação de NAC em amostras comerciais empregando o sistema proposto

Excipiente	Razão de concentração (excipiente:NAC*)	Variação do sinal (%)
Estearato de magnésio	10:1	2,5
Lactose	10:1	5,0
Benzoato de sódio	10:1	4,2
Amido	10:1	3,3
Sacarina	10:1	3,3

*[NAC] = $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$

De acordo com os resultados, nenhum dos compostos investigados causou uma interferência significativa na determinação do analito. Mesmo os interferentes presentes em concentrações dez vezes maior que a concentração do analito, o maior percentual de interferência foi de apenas 5%.

3.3.2 Adição e recuperação

Foram realizados testes de adição e recuperação para três níveis distintos de concentração de solução padrão do analito ($0,8$; $1,3$ e $1,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em cinco amostras diferentes de NAC. Os resultados foram comparados com os obtidos utilizando soluções padrão do analito na mesma concentração.

Tabela 8 – Resultados do estudo de adição e recuperação de NAC adicionado a cinco amostras comerciais utilizando o sistema em fluxo proposto (n=3)

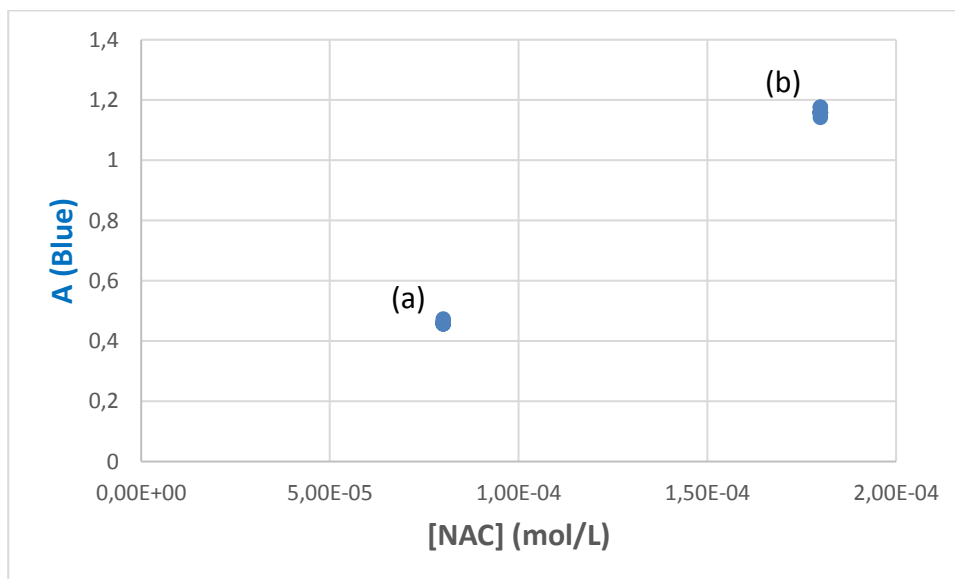
Adição e recuperação			
Amostra	Adicionado (10^{-4} mol L ⁻¹)	Recuperado (10^{-4} mol L ⁻¹)	Recuperação (%)
A1	0,8	$0,820 \pm 0,025$	103
	1,3	$1,28 \pm 0,019$	98,5
	1,8	$1,82 \pm 0,062$	101
A2	0,8	$0,795 \pm 0,023$	99,4
	1,3	$1,34 \pm 0,014$	103
	1,8	$1,85 \pm 0,026$	103
A3	0,8	$0,842 \pm 0,017$	105
	1,3	$1,26 \pm 0,012$	96,9
	1,8	$1,77 \pm 0,082$	98,3
A4	0,8	$0,845 \pm 0,024$	106
	1,3	$1,36 \pm 0,016$	105
	1,8	$1,91 \pm 0,060$	95,5
A5	0,8	$0,818 \pm 0,019$	102
	1,3	$1,35 \pm 0,014$	104
	1,8	$1,71 \pm 0,049$	95,0

De acordo com os dados apresentados na **Tabela 8**, os valores percentuais de recuperação do analito variaram entre 95,0 e 106%, que é uma faixa de recuperação aceitável para o nível de concentração do fármaco. Portanto, não há uma interferência significativa da matriz no procedimento proposto.

3.3.3 Estudo da repetitividade do sinal analítico

Para avaliação da repetitividade dos sinais analíticos no procedimento em fluxo proposto, mostrados na **Figura 19**, realizaram-se dez medidas utilizando as concentrações $8,0 \times 10^{-5}$ e $1,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, que são as respectivas concentrações mínima e máxima da curva analítica.

Figura 19 – Estudo da repetitividade para as soluções padrão de NAC de concentrações (a) $8,0 \times 10^{-5}$ e (b) $1,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (n=10).



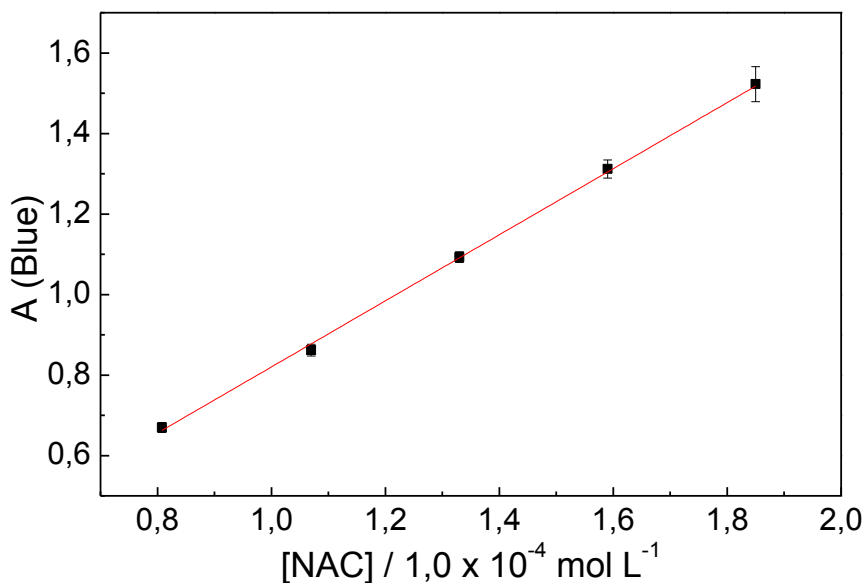
Fonte: Autor.

Nos estudos de repetitividade obtiveram-se desvios padrão relativos (RSD) de 1,1 e 0,7% para as respectivas concentrações a e b de NAC, evidenciando que a precisão das medidas se mantém sob as condições constantes do sistema.

3.3.4 Curva analítica

Para a construção da curva analítica, apresentada na **Figura 20**, utilizou-se um intervalo de concentrações do analito de $8,08 \times 10^{-5}$ a $1,85 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($8,08 \times 10^{-5}$; $1,07 \times 10^{-4}$; $1,33 \times 10^{-4}$; $1,59 \times 10^{-4}$ e $1,85 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). Há claramente uma dependência linear do sinal analítico com a concentração do analito presente nas soluções analíticas, conforme a lei de Lambert-Beer. O comportamento linear é confirmado pela análise gráfica dos resíduos deixados pelo modelo e corroborado pela análise de variância (ANOVA), apresentados em seguida.

Figura 20 – Curva analítica de absorvância associada a componente B do vetor RGB versus concentração do analito.

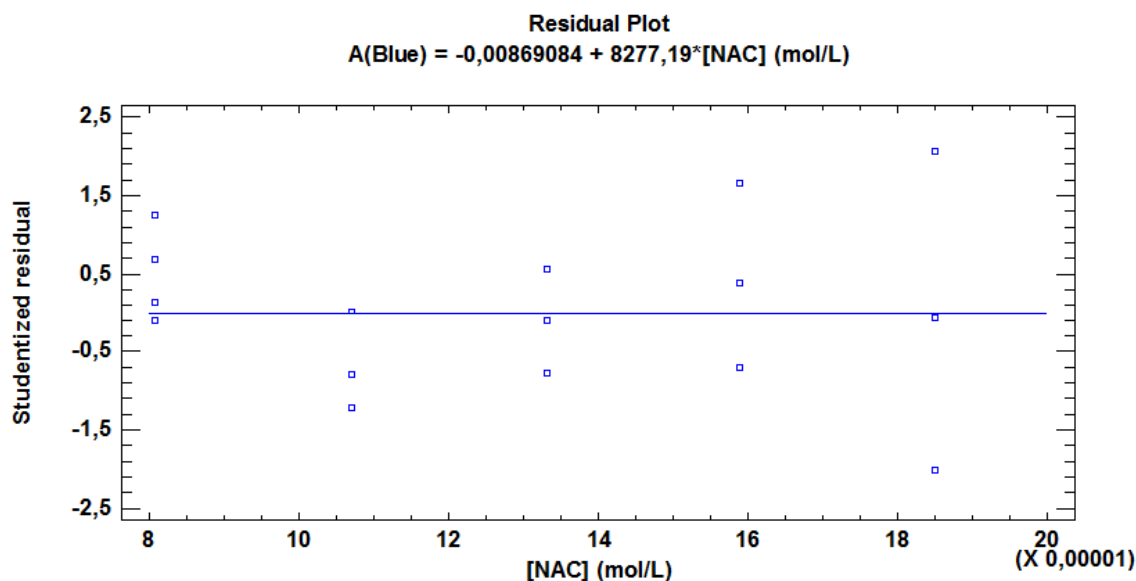


Fonte: Autor.

A equação da regressão linear foi $A = 8246,5 \times [\text{NAC}] - 0,0052$, onde A é a resposta analítica (absorvância) e [NAC] é a concentração da solução de NAC. A curva apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9993 ($n = 5$) com limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) estimados em $2,18 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $7,26 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

No gráfico de resíduos, apresentado na **Figura 21**, a distribuição dos resíduos ao longo da faixa de trabalho estudada se dá de maneira aleatória, não apresentando nenhum perfil sistemático que indique falta de ajuste do modelo.

Figura 21 – Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo de calibração para cinco níveis de concentração em quintuplicata.



Fonte: Autor.

3.3.5 ANOVA

Os resultados obtidos da ANOVA, para a validação do modelo de calibração utilizando o método proposto, são apresentados na **Tabela 9**. Uma vez definidos os graus de liberdade, as médias quadráticas foram calculadas utilizando as equações apresentadas na Seção 2.1.

Tabela 9 – Resultados obtidos da ANOVA para validação do modelo de calibração utilizando o método proposto

FONTE	Soma Quadrática	G.L.	Média Quadrática
Modelo	$SQ_{\text{reg}} = 2,32284$	1	$MQ_{\text{reg}} = 2,32284$
Residual	$SQ_r = 0,0134999$	23	$MQ_r = 0,000586953$
Falta de ajuste	$SQ_{\text{faj}} = 0,00167205$	3	$MQ_{\text{faj}} = 0,00055735$
Erro puro	$SQ_{\text{ep}} = 0,0118279$	20	$MQ_{\text{ep}} = 0,000591393$
Total	$SQ_t = 2,33634$	24	

Os resultados dos testes de falta de ajuste e significância de regressão são mostrados na **Tabela 10**. Podemos notar que o valor da razão MQ_{fa}/MQ_{ep} é menor que o ponto de distribuição F à um nível de confiança estatística de 95%, considerando o mesmo grau de liberdade. Portanto, não há evidência de falta de ajuste para o modelo de calibração. Já o valor da razão MQ_{reg}/MQ_r é muito alto frente ao ponto de distribuição F, considerando o mesmo grau de liberdade e o nível de 95% de confiança estatística.

Tabela 10 – Resultados dos testes de falta de ajuste e significância de regressão.

		Sistema proposto
	MQ_{fa}/MQ_{ep}	0,942
	MQ_{reg}/MQ_r	$3,96 \times 10^3$
Grau de liberdade	Falta de ajuste	3
	Significância de regressão	1
F tabelado a 95% de confiança	Falta de ajuste	9,28
	Significância de regressão	161,4

3.4 Aplicação do método proposto nas amostras

A curva analítica obtida foi utilizada para determinação do analito NAC em formulações farmacêuticas adquiridas no comércio local da cidade de João Pessoa – PB (**Tabela 11**).

Tabela 11 – Determinação de NAC em amostras comerciais adquiridas em comércio local da cidade de João Pessoa-PB.

Amostra	Concentração no rótulo (mg mL ⁻¹)	Concentração de NAC encontrada				
		Método proposto		Método de referência		
		(mg mL ⁻¹)	DPR (%)	(mg mL ⁻¹)	DPR (%)	E _R (%)
A1*	40	38,3	0,7	39,0	1,2	1,8
A2*	40	37,0	1,2	37,4	2,4	1,1
A3*	20	18,2	2,4	18,9	2,0	3,7
A4**	200	170,3	1,4	173,6	0,1	1,9
A5**	200	188,2	1,8	189,4	0,8	0,6

* - amostra líquida; ** - amostra sólida.

O procedimento proposto e o método de referência apresentam um desempenho similar em termos de precisão. De fato, os valores de DPR (%) foram em geral menores que 2,4 %. Além disso, a aplicação do teste *t*-pareado revelou não haver diferença estatisticamente significativa à um nível de confiança de 95%. Em relação a exatidão, o sistema proposto permitiu quantificar o analito com um erro relativo médio de 1,8 %. Este valor confirma que há uma boa concordância entre os valores dos dois procedimentos.

A avaliação do desempenho analítico do analisador proposto demonstra a viabilidade prática e a confiabilidade das medidas de determinação do analito NAC nas amostras. Além disso, o sistema apresenta uma frequência analítica de 30 h⁻¹, diminuindo consideravelmente o tempo de análise, os volumes de reagentes e padrão/amostra gastos e o custo por análise em relação aos procedimentos convencionais de análise deste fármaco.

Capítulo 4

Conclusões



4 Conclusões

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia automática baseada em imagens digitais para determinação de NAC em formulações farmacêuticas. Para isso, foi construído um analisador fluxo-batelada com uma webcam de alta resolução acoplada a CM, como sistema de detecção.

Todos os resultados das análises mostraram-se estatisticamente satisfatórios e o método proposto foi devidamente validado. Para isso, o modelo de calibração obtido por regressão linear foi submetido a análises de variância para falta de ajuste e significância de regressão, realizadas após análise gráfica dos resíduos gerados. Através desses testes, verificou-se a inexistência de estruturas que evidenciem a presença de erros sistemáticos e que o modelo é linear dentro do intervalo de concentração investigado. Os resultados obtidos através do analisador proposto e do método de referência não diferiram estatisticamente quando submetidos ao teste t-pareado, a um nível de 95% de confiança. Confirma-se assim, a confiabilidade dos resultados do analisador proposto tendo como base o método de referência.

O analisador proposto requer uma instrumentação simples, tendo como vantagens: o baixo custo (relativo); baixo consumo de reagentes e amostras; baixa geração de resíduos; reprodutibilidade; versatilidade e robustez. O sistema também possibilita a realização de um grande número análises em um curto intervalo de tempo, apresentando uma frequência analítica de 30 análises por hora para a determinação de NAC em amostras comerciais.

A metodologia proposta pode ser utilizada em outras aplicações analíticas que envolvem reações colorimétricas, sem a necessidade de grandes modificações em sua estrutura física e/ou substituição de seus componentes, sendo necessárias modificações apenas no programa de controle e aquisição de dados.

4.1 Perspectivas

O presente trabalho tem como perspectivas a aplicação do analisador automático baseado em imagens digitais para determinação de outros analitos, não necessariamente fármacos, mas que apresentem características químicas estruturais similares ao NAC, como por exemplo, o captopril.

Planeja-se ainda, para os próximos estudos, um aperfeiçoamento do método de calibração utilizando filmagens para realizar calibração por gradiente de concentração e/ou titulações, utilizando uma webcam *Full HD*, com a finalidade de realizar um estudo comparativo entre estas vertentes e a metodologia proposta. O objetivo secundário das perspectivas de estudos futuros consiste na simplificação e diminuição do custeamento da estrutura deste sistema de análise, através do desenho e desenvolvimento de protótipos de bombas-seringa e válvulas solenoides prototipados em impressora 3D.

Capítulo 5

Referências



5 Referências

ALBUQUERQUE, M. P.; ALBUQUERQUE, M. P. Processamento de imagens: métodos e aplicações. Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – CBPF/MCT, p. 2–7, 2006.

ALMEIDA, P. L. et al A rapid, sensitive and green analytical method for the determination of sulfite in vinegars using pararosaniline reaction with image detection. *Analytical Methods*, v. 10, n. 4, p. 448–458, 2018.

ALMEIDA, J. B. S. Um método quimiluminescente baseado em imagens digitais para determinação de Cr(IV) em águas usando um sistema fluxo batelada. [s.l.] UFPB, 2012.

ALMEIDA, L. F. et al. An automatic flow-batch standard-addition method for sodium determination in alcohol fuel by flame photometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 14, n. 2, p. 249–253, 2003.

ANDRADE, R. A. N. Um Luminômetro Fluxo-Batelada para Determinação Quimiluminescente de Vitamina B12 em Medicamentos. [s.l.] UFPB, 2011.

ANDRADE, S. I. E. Um analisador fluxo-batelada baseado em imagens digitais para determinação de Al(III) e Cr(VI) em águas. [s.l.] UFPB, 2012.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Acetilcisteína. Blau Farmacêutica, p. 7, 2017.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira - Vol. 2. [s.l: s.n.]. v. 1, 2010.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, p. 56–59, 2003.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. *Diário Oficial da União*, p. 61, 2010a.

AZEVEDO, E.; CONCI, A. Computação Gráfica: Teoria e Prática. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

BENEDETTI, L. Determinação in situ de analitos de interesse alimentício empregando tratamento de imagens digitais de spot tests. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2013.

BERNS, R. Principles of colour technology. 3rd Ed ed. New York: Wiley, 2000.

BRITO, N. M. et al. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, v. 13, p. 129–146, 2003.

BYRNE, L. et al. Digital imaging as a detector for generic analytical measurements. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 19, n. 8, p. 517–522, 2000.

CARNEIRO, J. M. T. et al. Spectrophotometric catalytic determination of Fe(III) in estuarine waters using a flow-batch system. *Analytica Chimica Acta*, v. 455, n. 2, p. 327–333, 2002.

CARNEIRO, J. M. T.; HONORATO, R. S.; ZAGATTO, E. A. G. Individual sample conditioning in flow analysis. Determination of N-total in plant materials. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v. 368, n. 5, p. 496–500, 2000.

CARVALHO, P. O perigo dos remédios falsos. Disponível em: <<https://istoe.com.br/o-perigo-dos-remedios-falsos/>>. Acesso em: 4 fev. 2018.

CHAGAS, M. P. et al. Exploiting iminoquinone free radical production for thiol based drugs determination in pharmaceutical formulations. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 9, p. 1646–1652, 2009.

CORREA, A. L. et al. Fast and reliable BIA/amperometric quantification of acetylcysteine using a nanostructured double hydroxide sensor. *Talanta*, v. 186, p. 354–361, 2018.

DINIZ, P. H. D. et al. Flow-batch analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 35, p. 39–49, 2012.

EURACHEM. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. *CITAC*, v. 2nd, n. 3, p. 126, 2012.

FORNAZARI, A. L. T. et al. Flow Injection Spectrophotometric System for N -Acetyl-L- Cysteine Determination in Pharmaceuticals. *Acta Chimica Slovenica*, v. 52, n. 2, p. 164–167, 2005.

GATTI, R.; MORIGI, R. 1,4-Anthraquinone: A new useful pre-column reagent for the determination of N-acetylcysteine and captopril in pharmaceuticals by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 143, p. 299–304, 2017.

GILJANOVIC, J.; BRKLJACA, M.; PRKIC, A. Flow injection spectrophotometric determination of N-acetyl-L-cysteine as a complex with palladium (II). *Molecules*, v. 16, n. 9, p. 7224–7236, 2011.

GIMENES, F. R. E. et al. Segurança do paciente na terapêutica medicamentosa e a influência da prescrição médica nos erros de dose. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 18, n. 6, p. 1055–1061, 2010.

HAGGAG, R. S. et al. Spectrophotometric and spectrofluorimetric determination of mesna, acetylcysteine and timonacic acid through the reaction with acetoxymmercuri fluorescein. *Analytical Methods*, v. 8, n. 11, p. 2479–2493, 2016.

HOLLER, F.; SKOOG, D.; CROUCH, S. Princípios de análise instrumental. 6ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HONORATO, R. S. et al. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. *Analytica Chimica Acta*, v. 396, n. 1, p. 91–97, 1999.

HONORATO, R. S.; CARNEIRO, J. M. T.; ZAGATTO, E. A. G. Spectrophotometric flow-batch determination of aluminum in plant tissues exploiting a feedback mechanism. *Analytica Chimica Acta*, v. 441, n. 2, p. 309–315, 2001.

HURTADO, R. L.; LASMAR, M. C. Medicamentos falsificados e contrabandeados no Brasil: panorama geral e perspectivas de combate ao seu consumo. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 30, n. 4, p. 891–895, 2014.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre validação de métodos analíticos. CGCRE, p. 31, 2016.

KARIMI-MALEH, H.; SALEHI, M.; FAGHANI, F. Application of novel Ni(II) complex and ZrO₂ nanoparticle as mediators for electrocatalytic determination of N-acetylcysteine in drug samples. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 25, n. 4, p. 1000–1007, 2017.

KOHL, S. K.; LANDMARK, J. D.; STICKLE, D. F. Demonstration of Absorbance Using Digital Color Image Analysis and Colored Solutions. *Journal of Chemical Education*, v. 83, n. 4, p. 644, 2006.

KUKOC-MODUN, L. et al. Flow injection analysis of N-acetyl-L-cysteine based on the reduction of copper(ii)-neocuproine reagent. *Analytical Letters*, v. 49, n. 5, p. 607–617, 2016.

LEÃO, A. Gerenciamento de cores para imagens digitais. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

LIMA, M. B. Determinação quimiluminescente de ferro em óleos baseado em pontos quânticos de CdTe usando um sistema fluxo-batelada com extração em fase única e imagens digitais. [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 2014.

LIMA, M. B. et al. Using webcam, CdTe quantum dots and flow-batch system for automatic spectrofluorimetric determination of N-Acetyl-L-cysteine in pharmaceutical formulations. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, n. 9, p. 1638–1646, 2014.

LIMA, M. B. Um micro flow-batch para determinação fotométrica e turbidimétrica de taninos em amostras de chás. [s.l.] UFPB, 2010.

LIMA, R. A. C. et al. Hardness screening of water using a flow-batch photometric system. *Analytica Chimica Acta*, v. 518, n. 1–2, p. 25–30, 2004.

LOPEZ-MOLINERO, A. et al. Chemometric interpretation of digital image colorimetry. Application for titanium determination in plastics. *Microchemical Journal*, v. 96, n. 2, p. 380–385, 2010.

LYRA, W. S. et al. Digital image-based flame emission spectrometry. *Talanta*, v. 77, n. 5, p. 1584–1589, 2009.

LYRA, W. S. et al. Indirect determination of sodium diclofenac, sodium dipyrone and calcium gluconate in injection drugs using digital image-based (webcam) flame emission spectrometric method. *Analytical Methods*, v. 3, n. 9, p. 1975–1980, 2011.

MARQUES F.; VIEIRA, N. *Processamento Digital de Imagens*. Rio de Janeiro: Brasport, 1999.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos*. 2ª ed. Campinas - SP: Editora da Unicamp, 2001.

NETO, B. B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. *Recomendações para calibração em Química Analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada)*. v. 25, n. 5, p. 856–865, 1998.

OMS, Organização Mundial da Saúde. *Sistema Mundial de Vigilância e Monitorização da OMS para os produtos médicos de qualidade inferior e falsificados*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/regulation/ssffc/publications/GSMSreport_PO.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2018.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. *Calibração: Uma Revisão Para Químicos Analíticos*. Química Nova. Recife-PE, 1996.

RADIC, N.; KUKOC-MODUN, L.; BIOCIC, M. Kinetic Spectrophotometric Determination of N-acetyl-L-cysteine Based on the Reduction of Copper(II)-neocuproine Reagent. *Croatica Chemica Acta*, v. 86, n. 1, p. 65–71, 2013.

RAVAZZI, C. G. et al. Smartphone application for captopril determination in dosage forms and synthetic urine employing digital imaging. *Talanta*, v. 189, p. 339–344, 2018.

RIBEIRO, A. L. et al. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova*, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

ROCHA, T. G.; GALENDE, S. B. A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. *Uningá Review*, v. 20, p. 97–103, 2014.

RODRIGUES, A. O Brasil na rota dos remédios falsificados. Disponível em: <https://istoe.com.br/437819_O+BRASIL+NA+ROTA+DOS+REMEDIOS+FALSIFICADOS/>. Acesso em: 10 mar. 2018.

SAMADI-MAYBODI, A.; TILEHKAN, A.; SADEGHI-MALEKI, M. Determination of Diclofenac and N-Acetylcysteine by an Optimized Luminescence Method Using CdS Quantum Dots as Sensitizers. *Journal of Fluorescence*, v. 27, n. 3, p. 1025–1034, 2017.

SANTANA, R. S.; GAIÃO, E.; PIMENTEL, M. F.; NASCIMENTO, G.; HONORATO, R. S.; ARAÚJO, M. C. U. Um sistema automático de preparação de misturas de calibração multielementar para análise por ICP-AES. 23a Reunião Anual - Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas - MG, 2000.

SILVA, A. S. Avaliação da secagem do bagaço de cajá usando planejamento fatorial composto central. [s.l.] UFRN, 2008.

SIMA, I. A.; CASONI, D.; SÂRBU, C. High sensitive and selective HPTLC method assisted by digital image processing for simultaneous determination of catecholamines and related drugs. *Talanta*, v. 114, p. 117–123, 2013.

SKOOG et al. *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª ed ed. São Paulo: Thomson, 2006.

TÔRRES, A. R. Determinação da Acidez Total de Vinhos Tintos Empregando Titulações Baseadas em Imagens Digitais. [s.l.] UFPB, 2010.

VAKH, C. et al. Flow Analysis: A Novel Approach For Classification. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 46, n. 5, p. 374–388, 2016.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; J., P. R. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. *Química Nova*, v. 32, n. 5, p. 1278–1287, 2009.

VERDE, R. P. O perigo dos metais pesados no meio ambiente. Disponível em: <<https://www.pensamentoverde.com.br/reciclagem/perigo-metais-pesados-meio-ambiente/>>. Acesso em: 5 dez. 2018.

WEN, X.; TU, C. Indirect Spectrophotometric Determination of Acetylcysteine in Pharmaceutical Sample using Fe (III) -Sulfosalicylic Acid System. *Atlantis Press*, v. 4, n. Bbe, p. 465–470, 2017.

WHO, World Health Organization. Substandard and falsified medical products. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/substandard-and-falsified-medical-products>>. Acesso em: 11 fev. 2018a.

WHO, World Health Organization. Definitions of Substandard and Falsified (SF) Medical Products. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/regulation/ssffc/definitions/en/>>. Acesso em: 11 fev. 2018b.

WONGWILAI, W. et al. Webcam camera as a detector for a simple lab-on-chip time based approach. *Talanta*, v. 81, n. 3, p. 1137–1141, 2010.

ZAGATTO, E. A. G. et al. Information essential for characterizing a flow-based analytical system. *Pure Appl. Chem.*, v. 74, n. 8, p. 1479–1487, 2002.

ZAGATTO, E. A. G. et al. Mixing chambers in flow analysis: A review. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 64, n. 5, p. 524–532, 2009.

ZAPPIELO, C. D.; TEIXEIRA, C. R. Preparação, caracterização do carbon black por 3-mercaptopropil-trimetoxissilano e sua utilização como um adsorvente alternativo para pré-concentração de cádmio em sistema de análise de fluxo. Londrina-PR: [s.n.]. Disponível em: <www.uel.br/eventos/eaic/anais/?content=2015/artigo.php&cod=432>. Acesso em: 21 mar. 2018.