

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS AUTOMÁTICOS EMPREGANDO *FLOW-BATCH* E MULTICOMUTAÇÃO PARA ANÁLISE FOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE INTERESSE FARMACEUTICO E AGRONÔMICO

Alessandra Félix da Costa Pereira*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM QUÍMICA (Área de concentração: Química Analítica)

Orientador: Dr. Boaventura Freire dos Reis

*Bolsista CNPq

São Carlos – SP

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS AUTOMÁTICOS EMPREGANDO
FLOW-BATCH E MULTICOMUTAÇÃO PARA ANÁLISE FOTOMÉTRICA DE
AMOSTRAS DE INTERESSE FARMACEUTICO E AGRONÔMICO**

Alessandra Félix da Costa Pereira*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
QUÍMICA (Área de concentração: Química
Analítica)

Orientador: Dr. Boaventura Freire dos Reis

*Bolsista CNPq

São Carlos - SP

2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

P436ds

Pereira, Alessandra Félix da Costa.

Desenvolvimento de sistemas automáticos empregando *flow-batch* e multicomutação para análise fotométrica de amostras de interesse farmacêutico e agrônomo / Alessandra Félix da Costa Pereira. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

86 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Química. 2. Análise em fluxo. 3. Espectrofotometria. 4. Hemodiálise. 5. Plantas medicinais. I. Título.

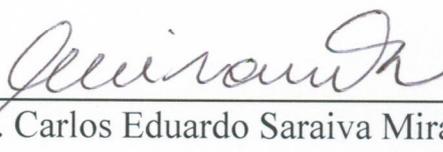
CDD: 540 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado da candidata **Alessandra Felix da Costa Pereira**, realizada em 30 de setembro de 2013:*



Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis



Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda



Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira



Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria



Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Junior

O que é almejado pode ser atingido e o resultado é produto da autoconfiança, persistência e determinação. Existirão percalços durante a trajetória, mas eles nos servirão de aprendizado para fazer valer a pena a nossa pequena história num livro chamado vida.

Alessandra

Dedico esta tese:

Ó Deus, a quem agradeço nos momentos que mais precisei. Colo em que muitas vezes deitei e até repousei. Presença constante nos momentos de alegria, dissabores e conquistas. Por me permitir adentrar em Sua morada para desfrutar sensações dantes desconhecidas, jamais vivenciadas.

*“Minha vida, minha história, só fez sentido quando Te conheci.
...se às vezes me escondo, em Você me acho”*

Sem Você - Rosa de Saron

Aos meus amados pais **Paulo Roberto e Valdevina Felix**, que pelo amor incondicional me apoiaram a mergulhar rumo a essa conquista. Hoje, desfrutam comigo esse momento único. Sem vocês, nada teria o mesmo sabor. Amo-os profundamente! Obrigada por tudo, meus tesouros, meus amores!

Aos meus queridos irmãos **Ana Paula, Leonardo e Ludmilla**. Acredito no seguinte ditado: “ter irmãos equivale a ter amigos duas vezes”. Muito obrigada por todo apoio e compreensão nos momentos importantes aos quais estive ausente, meu irmãos e amigos. Amo muito vocês!

Ao meu amado noivo **Roberto Nascimento**, por todo carinho, amor e incentivo. Pela demonstração de otimismo e companheirismo no exato momento que precisei. Além de tudo, a sua amizade é muito preciosa em minha vida!

AGRADECIMENTOS

Eis que chegou o momento de expressar, neste espaço destinado à emoção, a minha gratidão àqueles que participaram de um momento tão especial de minha vida durante essa trajetória. Ora o coração deixa-nos atropelar algumas palavras, ora permite-nos ser atropelados por elas. A emoção é precursora desse feito e justificável é a sua invasão, principalmente a quem se permite ser tocado por ela. Como me permito embarcar neste universo, deixarei registrado os meus sinceros agradecimentos.

Aos meus preciosos e amados pais, Paulo Roberto e Valdevina, que sempre estiveram presentes em minha formação pessoal e acadêmica, me apoiando em todas as decisões, sobretudo nessa trajetória, que inevitavelmente me induziu priorizar a distância de casa e lamentar os muitos momentos aos quais estive ausente. Senti muitas saudades. Sem a ajuda de vocês certamente não teria percorrido até aqui (...) Eternamente grata. Amo vocês!

Aos meus queridos irmãos e grandes amigos, Ana Paula, Leonardo e Ludmilla, que sempre apoiaram minhas escolhas, sobretudo, nesse caminho. Obrigada pelo carinho, amor e companheirismo!

Ao meu amado Roberto. Por alguma razão a vida nos aponta muitos caminhos. O nosso se cruzou e nele estamos a percorrer uma história enlaçada a muitos sentimentos positivos, somada a uma forte amizade. Obrigada por toda a ajuda, principalmente por me mostrar que muitas coisas podem se tornar possíveis e por me incentivar sempre, meu amor.

Aos cunhados e amigos Débora, Denillo e Rafael. Agradeço imensamente toda força e apoio, pois sei que torceram muito por mim!

A toda a minha família, pela torcida e apoio, especialmente meus tios Apolinária, Lenine, Isabel, Israelita, Inaldo, Eduardo, Tiago, Dália, Penha e Isaías (*in memoriam*) e os primos Marise, Isabele, Aline, Heloíne, Kyara, Karoline, Marisa, Isaac, Janiele, Fábio, Dmitri, Tiago e Ana Paula.

Aos meus futuros sogros e amigos, Maria da Guia e Abmar Lucas, aos quais muito estimo e agradeço por todo apoio, carinho e amizade, assim como aos futuros cunhados Mary, Hélder, Max e Isa. Família maravilhosa e amiga a qual propago todo meu apreço!

Ao meu sobrinho Mateus e aos fofinhos Gabriel e Ian, pela linda presença em minha vida!

Ao amigo e orientador Boaventura Reis, pela orientação deste trabalho, confiança, oportunidade e os diversos momentos compartilhados e enriquecedores, sejam eles no

trabalho, em confraternizações ou nos muitos cafezinhos regados a ciência, história, política, literatura (também de cordel), etc.

As estimadas amigas Andréia Cardoso e Tuanne Dias. A nossa amizade é um fruto maravilhoso brotado em nossos corações. Algumas coisas acontecem por acaso e o acaso permitiu que nos conhecêssemos em São Carlos e fôssemos estudar e morar em Piracicaba. Se não tivesse ido, teria perdido a oportunidade de conhecê-las e ter conquistado valiosas amizades. Ah, para alguns, o ‘acaso’ pode ser chamado de ‘coincidência’, mas para mim ele é chamado de Deus! Obrigada por tudo, amigas!

Ao quarteto Tuanne Dias, Andréia Cardoso, Felisberto Santos e Jeová Miranda, pelos momentos maravilhosos compartilhados. Obrigada pela força e amizade maranhense!

A todos do Laboratório de Química Analítica “Dr. Henrique Bergamin Filho”, do CENA-USP. Em especial: Milton Sasaki, Tuanne Dias, Andréia Cardoso, Jeová Miranda, Carla Cripa, Gláucia Pessin, Felisberto Santos, Mário Feres, Rejane Frizarin, Lidiane Nunes, Ticiane Magalhães e Tatiana Senra. Obrigada pela convivência, pelas experiências compartilhadas e inúmeras reuniões aos quais me fizeram se sentir em casa.

Um abraço especial ao Milton Sasaki e a Tuanne Dias, pelas muitas discussões científicas, assim como pela companhia e atenção dedicadas em muitos momentos que precisei. Obrigada!

À técnica Sheila Perdigão, pela ajuda no laboratório e pelos momentos alegres, inclusive nas diversas comemorações de aniversários compartilhados. Agradeço também a Fátima, Tatinha e Milão, pela ajuda em muitos momentos que precisei.

Ao meu orientador do mestrado, Mário C. Ugulino Araújo, pela oportunidade que me foi concedida ao ingressar à pesquisa na área da Química Analítica e o incentivo para o doutorado longe de casa.

Obrigada também aos amigos de João Pessoa e aos que conquistei no decorrer desses anos que, apesar de estarmos geograficamente distantes, sei que torceram muito por esse meu momento: Edilene e Pablo Nogueira, Ilanna Campelo, Glauciene Marcone, Sayonara Eliziário, Zeine Viana, Melissa Luciano, Lorena Adriana, Daniele Muniz, Heronides Dantas, Herbert Luckwu, Sérgio Bezerra, Janainy Leite, Kelly Freitas, Patrícia Oliveira, Wellington Lyra, Ricardo Lima, Luciano Almeida, Márcio Coelho, Sueny Freitas, Simone Simões, Osmundo Neto, Amália Gama (a vocês, Amália e Osmundo, um obrigada especial pela força e acolhida nos meses iniciais da minha moradia em São Carlos) e Quésia Guedes, a quem também sou muito grata pela acolhida em sua casa quando precisei.

A dona Lu, pela solidariedade e amizade... pela ajuda incalculável. Obrigada por tudo, minha querida!

A todos os amigos do grupo de oração Sentinelas da Manhã da Paróquia Santa Cruz e São Dimas em Piracicaba. Sentirei muitas saudades!

Ao CENA-USP, pela infraestrutura concedida para realização deste projeto. Um agradecimento especial aos funcionários sempre prestativos e competentes: Alzira, João Geraldo, Renata e Marília.

Ao departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Ao CNPq, pelo financiamento prestado para este projeto.

Finalmente, meus sinceros agradecimentos a todos que porventura não tenha mencionado.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser... mas, graças a Deus, não somos o que éramos”.

Martin L. King

Obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DMG	Dimetilglioxima
CAS	Cromoazurol S
CFA	Continuous Flow Analysis (Análises em fluxo contínuo)
ECR	Eriocromo Cianina R
EPA	Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental Norte Americana)
ETAAS	Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica)
FAAS	Flame Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometria de absorção atômica com atomização por chama)
FIA	Flow Injection Analysis (Análises por injeção em fluxo)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado)
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado)
LED	Light Emitting Diode (Diodo emissor de luz)
MCFA	Multicommutation in Flow Analysis (Multicomutação em Análises em fluxo)

MPFA	Multi-pumping Flow Analysis (Análises em fluxo com minibombas solenoide)
MSFIA	Multisyringe Flow Injection Analysis (Análises por injeção em fluxo com multiseringa)
PER	Persulfato de Potássio
SIA	Sequential Injection Analysis (Análises por injeção sequencial)
SFA	Segmented Flow Analysis (Análises em fluxo segmentado)
TEA	Trietanolamina

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Resultados obtidos após variação da concentração da solução do reagente CAS.....	34
Tabela 2.2. Resultados obtidos a partir da variação do volume da solução do CAS.....	35
Tabela 2.3. Resultados obtidos a partir da variação do volume da solução do hexamina.....	36
Tabela 2.4. Características analíticas do método proposto.....	39
Tabela 2.5. Características analíticas do método proposto com o emprego de soluções de referência com glicose na composição.	40
Tabela 2.6. Características analíticas do desempenho global do sistema proposto (FIGURA 2.5)	42
Tabela 2.7. Validação do método proposto	44
Tabela 3.1. Resultado obtido com o tempo de inserção da amostra mostrado na FIGURA 3.8.....	62
Tabela 3.2. Resultado obtido com a otimização do tempo de inserção dos reagentes TEA, PER e DMG, representados pelas FIGURAS 3.9, 3.10 e 3.11, respectivamente.	66
Tabela 3.3. Características analíticas do primeiro procedimento empregado para determinação de Ni (IV) em digeridos de plantas medicinais.....	68
Tabela 3.4. Resultado obtido com a variação da concentração de DMG mostrado na FIGURA 3.16.....	72
Tabela 3.5. Resultado obtido com a variação da concentração de PER mostrado na FIGURA 3.17.....	73
Tabela 3.6. Características analíticas do procedimento proposto para determinação de Ni (IV) em digeridos de plantas medicinais com o novo sistema.....	75

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Ilustração de um sistema FIA básico.....	7
FIGURA 2.1. Ilustração do procedimento proposto pelo Método das Variações Contínuas.....	15
FIGURA 2.2. Diagrama da interface de controle do motor.....	18
FIGURA 2.3. Diagrama da interface de controle digital.....	20
FIGURA 2.4. Diagrama do primeiro módulo de análises.....	21
FIGURA 2.5. Diagrama do segundo módulo de análises.....	23
FIGURA 2.6. Diagrama do fotômetro.....	26
FIGURA 2.7. Diagrama do fotômetro.....	28
FIGURA 2.8. Efeito dos agentes complexantes do procedimento analítico.....	31
FIGURA 2.9. Espectros de absorção do complexo Al(III)-CAS (pH = 5,0) obtidos pelo Método das Variações Contínuas.....	32
FIGURA 2.10. Efeito da concentração da solução CAS.....	33
FIGURA 2.11. Efeito do volume da solução CAS.....	35
FIGURA 2.12. Efeito do volume da solução de hexamina.....	36
FIGURA 2.13. Curva analítica do complexo Al ³⁺ - CAS (FIGURA 2.4).....	38
FIGURA 2.14. Curva analítica do complexo Al ³⁺ - CAS (FIGURA 2.4) com a presença de glicose nas soluções.....	38
FIGURA 2.15. Curva analítica referente a resposta global do sistema proposto (FIGURA 2.5) com a presença de glicose nas soluções.....	41
FIGURA 2.16. Registro dos sinais transientes relativo à repetibilidade do sistema empregado.....	43

FIGURA 3.1. Reação de formação do complexo Ni(II) – DMG.....	49
FIGURA 3.2. Diagrama da cela de fluxo acoplada ao fotômetro.....	53
FIGURA 3.3. Diagrama do módulo de análises.....	54
FIGURA 3.4. Diagrama do módulo de análises.....	56
FIGURA 3.5. Espectros de absorção do complexo Ni(IV)-DMG (pH = 9,0) obtidos pelo Método das Variações Contínuas.....	59
FIGURA 3.6. Comparativo da mudança de cor em relação a variação da proporção Ni (IV)-DMG.....	60
FIGURA 3.7. Estudo da cinética da reação para a formação do complexo Ni (DMG) ₂	61
FIGURA 3.8. Estudo do tempo de inserção da amostra.....	62
FIGURA 3.9. Efeito da variação do tempo de inserção de TEA.....	63
FIGURA 3.10. Efeito da variação do tempo de inserção de PER.....	64
FIGURA 3.11. Efeito da variação do tempo de inserção de DMG.....	65
FIGURA 3.12. Curva analítica obtida após otimização do sistema representado pela FIGURA 3.3.....	66
FIGURA 3.13. Registro referentes ao teste de estabilidade.....	67
FIGURA 3.14. Efeito da variação do número de ciclo de amostra.....	69

FIGURA 3.15. Efeito da variação do número de ciclos de amostragem.....	70
FIGURA 3.16. Efeito da variação da concentração de DMG.....	72
FIGURA 3.17. Efeito da variação da concentração de PER.....	73
FIGURA 3.18. Curva analítica do complexo Ni ²⁺ - DMG.....	74

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS AUTOMÁTICOS EMPREGANDO *FLOW-BATCH* E MULTICOMUTAÇÃO PARA ANÁLISE FOTOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE INTERESSE FARMACEUTICO E AGRONÔMICO

No presente trabalho, é proposto o desenvolvimento de um procedimento automático com sensibilidade suficiente para determinação fotométrica de Al (III) em água para hemodiálise e Ni (IV) em digerido de plantas para fins medicinais. A ANVISA estabeleceu que a concentração máxima permitida é $10 \mu \text{g L}^{-1}$ Al (III) em solução para hemodiálise. A matriz possui alta concentração de sais de Ca, Mg, K e aproximadamente 30% m/v de NaCl, o que torna difícil a determinação do metal. Neste trabalho, este inconveniente foi superado com o emprego de um sistema *flow-batch* multicomutado e um fotômetro de LED equipado com uma cela de fluxo com caminho óptico de 200 mm de comprimento. Não houve preparação prévia da amostra e o método foi baseado na reação de Al (III) com cromoazurol S, que produzia um composto de cor rosa, o qual absorvia radiação electromagnética com máximo em torno de 530 nm. Após a otimização dos parâmetros, o procedimento proposto apresentou resposta linear na faixa de 5,0 e $125 \mu \text{g L}^{-1}$; limite de detecção de $0,6 \mu \text{g L}^{-1}$; consumo de 12 mg de cromoazurol S e 85 mg hexamina, por determinação, respectivamente; frequência de amostragem de 70 determinações por hora e geração de resíduos de 1,6 mL, por determinação. Para a avaliação da exatidão foi empregada a metodologia de adição de padrão e os resultados mostraram recuperação na faixa de 90 a 113%. O módulo de análises para a determinação de Ni (IV) foi desenvolvido para implementar o processo de multicomutação em fluxo com o emprego de minibombas solenoide como unidade de propulsão de fluido. O procedimento desenvolvido foi baseado na reação de níquel com dimetilglioxima em meio alcalino, que produzia um composto com máximo de absorção em 490 nm. Após a otimização dos parâmetros de controle, o procedimento proposto apresentou resposta linear na faixa de 0,13 a $2,0 \text{ mg L}^{-1}$; limite de detecção de $0,04 \text{ mg L}^{-1}$; consumo de 2,40 mg de trietanolamina; 2,00 mg de persulfato de potássio e 0,40 mg de dimetilglioxima, todos por determinação.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF AUTOMATIC SYSTEMS EMPLOYING FLOW-BATCH AND MULTICOMMUTATION FOR PHOTOMETRIC ANALYSIS OF SAMPLES OF PHARMACEUTICAL AND AGRONOMIC INTEREST

In this work, is proposed the development of automated procedures with sufficient sensitivity for photometric determination of Al (III) in water used for hemodialysis treatment and Ni (IV) in digested plants used for medicinal purposes. ANVISA established that the maximum allowable concentration is $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Al (III) in solution for hemodialysis. The matrix has a high concentration of salts such as Ca, Mg, K and about 30% (w/v) NaCl, thus causing difficult to determine the metal. This drawback was overcome in this work by employing a multicommutated flow-batch system and a LED photometer equipped with a flow cell with optical path length of 200 mm. There was no prior preparation of the sample and the method was based on the reaction of Al (III) with chromeazurol S, producing a pink compound, which absorbed electromagnetic radiation with maximum at 530 nm. After optimization of the parameters, the proposed procedure showed a linear response range between 5.0 and $125 \mu\text{g L}^{-1}$; a detection limit of $0.6 \mu\text{g L}^{-1}$; consumption of 12 mg and 85 mg chromeazurol S and hexamine per determination, respectively; a sampling frequency of 70 determination per hour and a waste generation of 1.6 mL per determination. To evaluate the accuracy of the methodology, it was employed standard addition and the results showed a recovery in the 90-113 % range. The analytical module for the determination of Ni (IV) was developed to implement the multicommutation process with the use of solenoid mini-pump as fluid propelling device. The procedure was developed based on the reaction of nickel with dimethylglyoxime in alkaline medium, producing a compound which showed maximum absorption at 490 nm. After optimization of the control parameters, the proposed procedure showed a linear response in the range from 0.13 to 2.0 mg L^{-1} ; detection limit of 0.04 mg L^{-1} ; consumption of 2.40 mg trietanolamine; potassium persulfate of 2.00 mg and dimethylglyoxime of 0.40 mg, per determination.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Sistema de análises em fluxo	4
1.1.1. Histórico	4
1.2. Análises por injeção em fluxo	5
1.3. Multicomutação em análises em fluxo	7
1.3.1. O processo Flow-Batch	8
1.3.2. Análises em fluxo com multiseringa e minibombas solenoide	8
2. DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA AUTOMATIZADO PARA DETERMINAÇÃO DE ALUMÍNIO EM SOLUÇÕES PARA HEMODIÁLISE	11
2.1. Parte Experimental	14
2.1.1. Método	14
2.1.2. Descontaminação dos materiais	15
2.1.3. Preparo de reagentes e soluções	15
2.1.4. Equipamentos e Acessórios	17
2.1.5. Descrição da interface de controle do motor	18
2.1.6. Descrição da interface de controle digital	19
2.1.7. Descrição dos módulos de análises	21
2.1.8. Descrição dos fotômetros	25
2.1.9. Otimização dos sistemas em fluxo	29
2.2. Resultados e discussão	30
2.2.1. Estudo dos agentes complexantes CAS e ECR	30
2.2.2. Avaliação da estequiometria da reação – Método das Variações Contínuas	32
2.2.3. Efeito da concentração e do volume do reagente CAS	33
2.2.4. Efeito do volume da solução de hexamina	36
2.2.5. Desempenho do sistema proposto	37

2.2.6. Validação do método proposto.....	44
2.3. Conclusão	44
3. DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA AUTOMATIZADO PARA DETERMINAÇÃO DE NÍQUEL EM AMOSTRAS DE INTERESSE AGRONÔMICO	47
3.1. Parte Experimental	49
3.1.1. Método	49
3.1.2. Preparo de reagentes e soluções	50
3.1.3. Preparo das amostras.....	51
3.1.4. Equipamentos e Acessórios.....	52
3.1.5. Descrição dos módulos de análises.....	52
3.1.6. Otimização dos sistemas em fluxo	57
3.2. Resultados e discussão	58
3.2.1. Avaliação da estequiometria da reação – Método das Variações Contínuas	58
3.2.2. Estudo da cinética da reação.....	59
3.2.3. Sistema em fluxo – Primeira configuração.....	61
3.2.3.1. Efeito do tempo para inserção da amostra.....	61
3.2.3.2. Efeito da variação dos tempos de inserção dos reagentes TEA, PER e DMG.....	63
3.2.4. Sistema em fluxo – Segunda configuração.....	68
3.2.4.1. Influência do número de ciclos para inserção da amostra	68
3.2.4.2. Influência do número de ciclos de amostragem	70
3.2.4.3. Influência da concentração dos reagentes DMG e PER	71
3.2.5. Desempenho do sistema proposto	74
3.3. Conclusão	75
4. CONCLUSÃO	77
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

CAPÍTULO 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A busca pela normatização e controle de qualidade de produtos agrícolas, alimentícios, farmacêuticos, de análises clínicas, entre outros, conduziu o conhecimento para o desenvolvimento de diferentes métodos ou meios para obtenção de um padrão de produção.

Devido ao contínuo crescimento das indústrias e, conseqüentemente, da degradação das reservas ambientais, tornou-se inevitável a necessidade de métodos que facilitem a redução dos resíduos gerados, principalmente àqueles considerados nocivos ao ambiente e ao homem. A Indústria tem sido alvo de discussões como um dos principais geradores de agentes contaminantes de efluentes, de forma que, em 1991, a Agência de Proteção Ambiental norte americana (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*) desenvolveu um programa com a finalidade de financiar projetos de pesquisa para prevenir a poluição. A partir de então, surgiu o conceito de Química Limpa, também denominada Química Verde, Benigna ou Autossustentável ^{1,2}.

A Química Limpa pode ser definida como “a invenção, desenvolvimento e aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas” ³. Esse tipo particular de prevenção de poluição se baseia em doze princípios e está sendo incorporada, gradativamente, às indústrias e instituições de ensino e/ou pesquisa ¹.

Nesse cenário, a Química Analítica tem um papel fundamental no tocante ao desenvolvimento de métodos analíticos limpos, pois pode contribuir de forma valiosa para o aprimoramento dos objetivos propostos pela Química Limpa ^{2,4,5}. Entretanto, apesar dos avanços quanto ao desenvolvimento de procedimentos analíticos que visam minimizar o emprego de substâncias tóxicas, ainda há lacunas que os impedem de serem considerados limpos.

Os procedimentos analíticos limpos podem ser incorporados tomando algumas medidas, como na ordem que segue: (i) os resíduos não devem ser produzidos; (ii) os resíduos produzidos não devem ser tóxicos; (iii) a quantidade de resíduos deve ser minimizada; (iv) os resíduos tóxicos devem ser reciclados e, se possível, reutilizados e (v) o procedimento analítico deve incluir um método adequado para o tratamento dos resíduos ⁶.

A partir das informações descritas anteriormente, observa-se a importância de se empregar procedimentos capazes de eliminar ou reduzir o uso de reagentes tóxicos com a finalidade de minimizar a geração de resíduos. Além desse foco, a escolha de uma metodologia ou técnica para a execução de um dado estudo analítico envolve outros parâmetros que delinham o planejamento para a adoção da técnica que se pretende empregar, como por exemplo, a matriz de interesse, a espécie química ou a substância a ser quantificada, a especificidade dos reagentes, aplicabilidade, sensibilidade, custo e disponibilidade da técnica, dentre outros.

A espectrofotometria nas regiões ultravioleta e visível do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais difundidas em instituições de ensino/pesquisa e indústrias que engloba as características anteriormente mencionadas. Os métodos espectrofotométricos são baseados na relação entre a absorvância ou transmitância com a concentração de uma espécie absorvente. Essa relação é conhecida como Lei de Lambert - Beer ou comumente denominada Lei de Beer ⁷, a qual é expressa matematicamente conforme a EQUAÇÃO 1.

$$A = \log (1/T) = - \log (T) = abc \quad (\text{EQUAÇÃO 1})$$

Onde: **a** é uma constante denominada de absorvância; **b** representa o comprimento do caminho percorrido (ou caminho óptico) pela radiação eletromagnética no interior do recipiente que contém o composto a ser monitorado e **c** expressa a concentração da espécie química (em gramas por litro). Quando a concentração **c** é expressa em moles por litro, a absorvância é denominada de absorvância molar (ϵ) e a lei de Beer é descrita conforme a EQUAÇÃO 2:

$$A = \epsilon bc \quad (\text{EQUAÇÃO 2})$$

O comprimento do caminho óptico é um parâmetro do sistema de detecção que pode ser variado. Esse recurso tem sido empregado em detecção

fotométrica para melhorar a sensibilidade dos procedimentos, incluindo equipamentos comerciais como os *Ocean Optics*⁸, protótipos de laboratório empregando LED como fonte de radiação eletromagnética^{9,10} e módulos de análises baseados em multicomutação em fluxo⁹⁻¹¹.

1.1. Sistema de análises em fluxo

Os sistemas de análises em fluxo tem recebido grande notoriedade em diversos segmentos, como nas análises Química, Clínica, Farmacêutica, Agrícola, Alimentícia, Ambiental, etc. O emprego desses sistemas possibilita desenvolver métodos que se baseiam no processamento de soluções em fluxo com vasto desempenho e aplicabilidade, demonstrando características notáveis relacionados à uma boa frequência de amostragem, automação, simplicidade, versatilidade e, principalmente, mínima geração de efluentes^{12,13}, que os tornam excelentes contribuidores da filosofia proposta pela Química Limpa.

1.1.1. Histórico

O primeiro protótipo de um sistema de análises em fluxo foi proposto pelo bioquímico americano Leonard T. Skeggs Jr. Após alguns trabalhos de análise de sangue realizados em um laboratório de Química Clínica no fim da década de 40, Skeggs verificou que os resultados de suas análises eram pouco confiáveis e pensou em construir um equipamento que permitisse realizar as medidas sem intervenção manual. Construiu, então, um equipamento automático que se caracterizava por aspirar, sequencialmente, as amostras para um percurso analítico em direção a um detector e entre elas eram introduzidos segmentos de bolhas de ar, que possibilitava minimizar a dispersão na zona da amostra. Em 1950, tentou, sem sucesso, comercializar o protótipo, porém em 1954 a companhia Technicon Corporation se interessou pelo instrumento e nos idos de 1957 comercializou o Autoanalisador (*AutoAnalyser*®), ou seja, o modelo que viria a ser uma ruptura

radical com os procedimentos manuais de análises. Hoje, o Autoanalisador é conhecido como Análises em Fluxo Segmentado (SFA, do inglês *Segmented Flow Analysis*)¹⁴⁻¹⁶.

O trabalho de Skeggs, sem dúvida, contribuiu ricamente para a Química, sobretudo, a Química Analítica. O seu trabalho pode ser considerado o princípio da comutação em Sistemas de Análises em Fluxo^{13,17}. Também, o ponto de partida para o desenvolvimento de outros métodos analíticos baseados no conceito de análises em fluxo contínuo.

Desde a proposta inicial, diversas modalidades dos sistemas de análises em fluxo foram desenvolvidas para diferentes aplicações, como por exemplo, MCFA¹⁸, SIA¹⁹, *Flow Batch*²⁰, MSFIA²¹, Multi-pumping²², etc, e o número de publicações tem crescido consideravelmente. Essa suposição foi validada após pesquisa realizada em maio do ano corrente no banco de dados *Analytical Abstracts*, o qual no campo de busca foi digitado “*Flow Analysis*” e encontrados ca. 7900 trabalhos publicados.

1.2. Análises por injeção em fluxo

Uma alternativa aos sistemas em fluxo segmentado por ar surgiu na década de 70 sob a denominação de Análise por Injeção em Fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*)²³. Nesta vertente, uma amostra é injetada em um fluxo carregador não segmentado, ou seja, desprovido de bolhas de ar. Posteriormente, uma ou mais soluções de reagentes são inseridas continuamente nesse percurso e a mistura das soluções, incluindo a amostra injetada, é transportada em direção a um sistema de detecção, onde um sinal é gerado. O valor máximo do sinal é relacionado à concentração da espécie química de interesse. Devido à dispersão da amostra na mistura das soluções dos reagentes e do fluido transportador, a concentração da amostra no percurso analítico varia ponto a ponto, gerando um gradiente de concentração, o qual pode diminuir a magnitude do sinal gerado. Esse efeito pode ser minimizado com a otimização de alguns parâmetros, como o volume da amostra injetado, as vazões do fluido carregador e dos reagentes, o comprimento do reator e o diâmetro interno da tubulação^{24,25}.

No decorrer dos anos, os sistemas FIA tem sido amplamente empregados em laboratórios de rotina e centros de pesquisa por agregarem algumas vantagens, tais como: simplicidade de instrumentação, emprego de pequenos volumes de soluções, menor risco de contaminações (permite o gerenciamento de soluções em um sistema fechado) e versatilidade. Esta última é uma característica consequente dos sistemas em fluxo não-segmentado (ou contínuo), ou seja, lhes confere a possibilidade de desenvolver procedimentos analíticos com diversas configurações ²⁶.

Atualmente, um sistema FIA pode ser constituído pelas seguintes partes: um dispositivo para propulsão de fluidos (bomba peristáltica, minibombas solenoide, seringa motorizada); um sistema de detecção para monitoramento da espécie de interesse e um módulo de análises, o qual pode ser constituído por um injetor proporcional ou válvulas solenoide; reatores e linhas de fluxo ^{27,28}. Quando é empregada minibomba solenoide para a propulsão de fluido, a mesma compõe o módulo de análises, pois esse dispositivo incorpora a propulsão de fluido e a comutação na mesma unidade ²².

A FIGURA 1.1 mostra o diagrama de um sistema FIA básico, onde a amostra é inserida em um fluido transportador e recebe a solução do reagente na confluência. A reação se desenvolve durante o transporte para o detector, onde o sinal gerado é monitorado continuamente. Observa-se que o registro do sinal tem a forma de uma gaussiana assimétrica, a qual é uma característica dos sistemas de análises em fluxo e é obtida pela dispersão da amostra no fluido transportador. A altura máxima do registro reflete a concentração da espécie monitorada, que pode ser alterada mediante variação do volume da solução da amostra inserido no percurso analítico ou da variação do comprimento do percurso analítico, confluência, etc ^{23,25}.

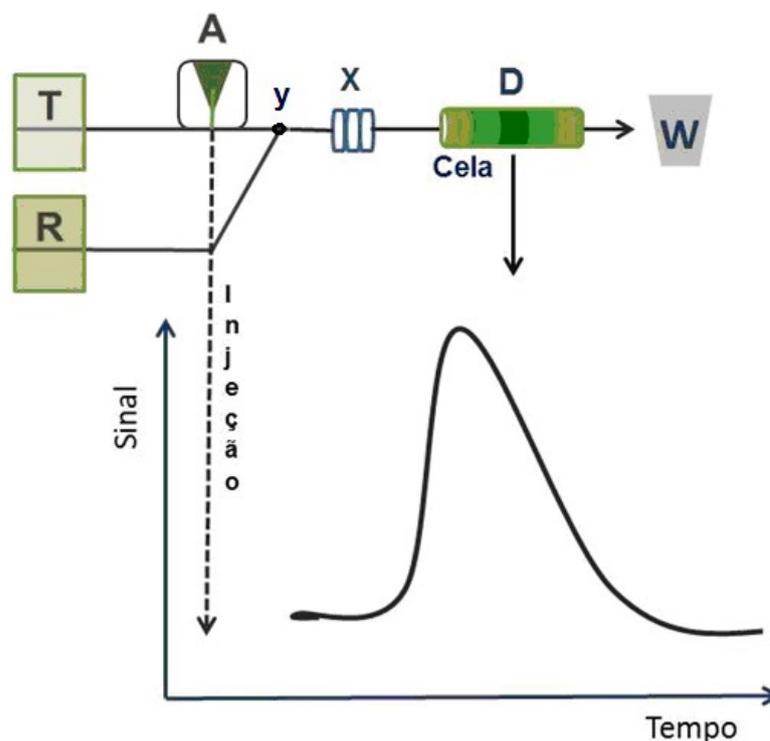


FIGURA 1.1 - Ilustração de um sistema FIA básico. A = amostra; T = solução transportadora; R = reagente; x = reator; y = confluência; D = detector; W = descarte.

1.3. Multicomutação em análises em fluxo

Um novo conceito de inserção e gerenciamento de soluções em sistemas de análises em fluxo foi proposto em 1994 com a denominação de Multicomutação em Análises em Fluxo (MCFA, do inglês *Multicommutation in Flow Analysis*) ou resumidamente, Multicomutação em Fluxo ¹⁸. Com os recursos de eletrônica e da informática, a inserção das alíquotas da amostra e dos reagentes é realizada de forma automática. O módulo de análises, constituído por um conjunto de válvulas solenoide, seleciona o volume de cada solução e controla, via computador, o tempo de permanência da válvula ligada. O controle individual de cada válvula permite selecionar a ordem de adição das soluções, oferecendo uma versatilidade superior aos sistemas FIA usuais que empregam injetor proporcional.

As características dessa nova modalidade se assemelham aos genuínos sistemas, porém, a automatização agregou outras características que se tornaram intrínsecas aos sistemas MCFA, tais como: menor intervenção do analista;

melhor desempenho quanto ao gerenciamento de pequenas alíquotas de soluções, maior versatilidade, reconfiguração do funcionamento do módulo de análises por *software* e menor consumo de reagentes e de geração de efluentes.

Com tais características, não tardou a aceitação dos sistemas MCFA em laboratórios de pesquisa no Brasil e também em outros países, cujo resultado pode ser visualizado nos diversos trabalhos publicados no decorrer dos anos desde seu nascimento ²⁹⁻³⁴.

1.3.1. O processo *Flow-Batch*

O processo *Flow-Batch* foi introduzido em 1999 ³⁵ e caracteriza-se por implementar procedimentos analíticos associados ao processo de multicomutação em análises em fluxo com o emprego de uma câmara de mistura. Este processo mimetiza de forma automática um procedimento manual. O processamento da amostra ocorre no interior da câmara com um mínimo de diluição, com pequenas alíquotas de reagentes e o volume completado com solução da amostra ^{20,34}. Essencialmente, o processo *Flow-Batch* tem sido empregado em procedimentos baseados em detecção fotométrica, incluindo equipamentos comerciais e protótipos de laboratório empregando LED como fonte de radiação e fototransistor ³³ ou fotodiodo ³⁴ como transdutor de sinal.

1.3.2. Análises em fluxo com multiseringa e minibombas solenoide

O dispositivo de maior uso para propulsão de fluídos em sistemas de análises em fluxo é a bomba peristáltica, entretanto, em menor escala tem sido empregado bombas de seringas motorizadas ²¹ e minibombas solenoide ²². No caso do uso de bombas de seringas motorizadas como propulsor de fluído, geralmente o equipamento é constituído por quatro seringas com movimento realizado por motor de passo, o que dá uma grande maleabilidade para controlar os volumes das soluções liberadas. Em virtude de possuir quatro seringas, permite bombear quatro

soluções ao mesmo tempo. As quatro seringas são movidas de forma solidária e um conjunto de válvulas solenoide permite direcionar o fluxo de cada solução para o módulo de análises ou para o respectivo reservatório.

A minibomba solenoide empregada como unidade de propulsão de fluídos em sistemas de análises em fluxo é um dispositivo eletromecânico selado, que quando se aplica uma diferença de potencial através de um diafragma interno, aspira uma alíquota da solução. Quando o fornecimento de energia elétrica é interrompido, o diafragma se contrai e libera no orifício de saída a alíquota de solução aspirada. Desse modo, ligando e desligando o dispositivo sequencialmente, é liberado um volume de solução que é um múltiplo do volume da alíquota multiplicado pelo número de vezes em que a minibomba foi acionada. Este recurso tem sido utilizado para desenvolver procedimentos analíticos nos quais se destaca a versatilidade e o baixo consumo de reagentes ^{22,36}.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de um sistema automatizado para determinação de alumínio em soluções para hemodiálise

2. DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA AUTOMATIZADO PARA DETERMINAÇÃO DE ALUMÍNIO EM SOLUÇÕES PARA HEMODIÁLISE

A ingestão do alumínio por via oral através da água, alimentos ou medicamentos não causa grandes riscos à saúde humana, entretanto, por não ser considerado um elemento essencial ao corpo humano o seu efeito cumulativo é potencializado no organismo, via corrente sanguínea, de pessoas que sofrem de insuficiência renal e que carecem de sessões de hemodiálise, pois os rins não conseguem eliminar o metal absorvido ^{37,38}.

A hemodiálise é uma terapia alternativa que mimetiza a função renal realizada em pacientes portadores de insuficiência renal crônica ou aguda, cuja função é remover as substâncias tóxicas acumuladas no sangue e tecidos do corpo em consequência da falência dos mecanismos excretores renais ^{37,39}. A literatura relata casos em que pessoas que sofrem de insuficiência renal crônica ou aguda e que são submetidas periodicamente ao tratamento hemodialítico apresentaram concentrações elevadas de alumínio na corrente sanguínea. Os estudos apontam que a contaminação do metal na solução destinada para o tratamento de hemodiálise pode causar danos irreversíveis ^{39,40}. A contaminação pode ser advinda da pele do paciente, das agulhas e seringas ou, principalmente, da água para abastecimento público, pois o sulfato de alumínio é empregado como agente floculante em estações de tratamento de água e os traços de alumínio existentes não são totalmente eliminados pelos processos convencionais de purificação. Dessa forma, é necessário que o tratamento da água destinada para o preparo de soluções para hemodiálise seja extremamente criterioso ⁴¹.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu que a concentração máxima de alumínio em soluções para hemodiálise é de $10 \mu \text{g L}^{-1}$ ⁴². Como esta concentração é muito baixa, é necessário dispor de procedimentos analíticos associados a técnicas de detecção bastante sensíveis para atender essa demanda, pois a matriz apresenta alta concentração salina, superior a 25 % (m/v) de NaCl, além de outros sais, o que pode dificultar a quantificação de alumínio em concentração da ordem de $\mu \text{g L}^{-1}$ ^{43,44}.

A espectrofotometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) é uma das técnicas analíticas que pode ser empregada para

determinação do alumínio, pois apresenta sensibilidade que permite alcançar o limite de concentração tolerado ⁴⁴⁻⁴⁸. Outras técnicas de detecção, tais como ativação com nêutrons ⁴⁹, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) ⁵⁰, voltametria ⁵¹, fluorimetria ^{52,53} e espectrofotometria ^{43,44, 54-56} também tem sido empregadas.

Processos de separação empregando extração com solvente orgânico ⁴⁷, resina de troca iônica ^{43,52} e extração em fase sólida ⁵⁵ tem sido empregados e agregam como vantagens a separação do analito da matriz salina e a pré-concentração. Tais abordagens possibilitaram atingir baixos limites de detecção com equipamentos bastante sensíveis.

A extração empregando-se solvente orgânico metilisobutilcetona, bombeado continuamente, foi precedida da reação de Al (III) com o agente quelante 8-hidroxiquinolina. A detecção foi realizada empregando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) ⁴⁷.

A resina de troca catiônica AG50W-X8 foi empregada para pré-concentrar a reação entre Al (III) e o agente complexante eriocromo cianina R, com cloreto de cálcio como eluente, empregando um sistema automatizado em fluxo e detecção espectrofotométrica ⁴³.

Em outro estudo, o reagente cromogênico chromotrope 2B foi imobilizado em uma coluna de resina aniônica AG1-X8 e o complexo formado com os íons Al (III) permaneceu retido na resina, o qual era eluído usando uma solução de HCl para posterior detecção fluorimétrica empregando um sistema FIA ⁵².

A extração em fase sólida foi desenvolvida com o emprego do polietileno em pó como suporte sólido e cromoazurol S como reagente cromogênico para determinar alumínio em concentrados salinos empregando um sistema de análises em fluxo. O composto formado foi imobilizado no suporte sólido, eluído com HNO₃ em meio alcoólico e detectado por espectrofotometria UV-VIS ⁵⁵.

Trabalhos realizados com o processo *Flow-Batch*, aliado aos sistemas em fluxo, demonstraram a possibilidade de mimetizar de forma automática um procedimento manual de titulação, pois no interior da câmara de mistura eram inseridas pequenas alíquotas dos reagentes e o volume completado com solução da amostra. Após o desenvolvimento da reação, o produto era deslocado para o espectrofotômetro, onde o sinal referente à concentração do analito era monitorado ^{35,58}. Em trabalhos posteriores, a detecção fotométrica passou a ser realizada

diretamente na câmara de mistura ^{33,34,57,58}. O emprego de LED como fonte de radiação e fototransistor ⁵⁷ ou fotodiodo ⁵⁸ como detector, permitiu o acoplamento desses dispositivos à câmara de mistura, formando uma unidade compacta e de dimensão reduzida.

Nos trabalhos baseados no processo *flow-batch*, geralmente a propulsão dos fluídos tem sido realizada por bomba peristáltica e inserção das soluções da amostra e dos reagentes na câmara de mistura por válvulas solenoide ⁵⁷⁻⁵⁸. Entretanto, em recentes trabalhos baseados nesse processo, foram empregadas minibombas solenoide para a propulsão de fluídos, permitindo a redução das dimensões de módulo de análises ^{33,60}. Não foi necessário o uso de válvulas solenoide, já que a minibomba realizava a inserção da solução e a propulsão de fluído como uma unidade de comutação ^{22,34}.

Seringas controladas por um pequeno motor acoplado ao módulo de análises também tem sido empregadas como propulsão de fluído, principalmente em sistemas de análises por injeção sequencial (SIA, do inglês *Sequential Injection Analysis*) ⁶¹⁻⁶³. Entretanto, foi encontrado apenas um trabalho que empregava esses dispositivos de propulsão associados ao processo *flow-batch* ⁶⁴.

Visando ampliar o emprego de seringas como unidade de propulsão, foi feito um estudo no qual um módulo de propulsão de fluidos era realizado com quatro seringas, as quais tinham movimento solidário, executado por um motor de passo controlado por um *software* ⁶⁵⁻⁶⁸. Um arranjo de válvulas solenoide permitia seleccionar sequencialmente a inserção das alíquotas da amostra e dos reagentes.

Considerando-se os relatos dos manuscritos citados, observa-se que há demanda por procedimento analítico para a determinação de alumínio em soluções para hemodiálise. Na maioria dos trabalhos que abordam sistemas com multicomutação em análises em fluxo tem sido empregados bombas peristálticas ^{18,69} e minibombas solenoide como propulsores de fluído ^{22,36,70}. Entretanto, bomba de seringa tem grande potencial para ser empregada como propulsor de fluído em módulos de análises baseados no processo de multicomutação, mas tem sido pouco explorada para essa finalidade⁷¹. Como visto anteriormente, a pré-concentração associada aos sistemas em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de alumínio em concentrados salinos demonstrou a exploração por diferentes métodos e técnicas analíticas que necessitam de considerável diluição da amostra devido à alta concentração salina das soluções.

Desta forma, a quantificação do alumínio sem o emprego da etapa de pré-concentração e separação de matriz e sem grandes diluições da amostra é bastante desafiador, pois isto implica em determiná-lo quase que diretamente na amostra *in natura*. Neste sentido, esta parte do projeto objetiva desenvolver um módulo de análises baseado nos processos multicomutação em fluxo e *Flow-Batch* para quantificar Al(III) em concentrados salinos. Bombas de seringa e minibombas solenoide serão empregadas como propulsores de fluídos e uma câmara de mistura para homogeneizar as soluções e produzir o composto a ser detectado, com diluição reduzida.

2.1. Parte Experimental

2.1.1. Método

O método espectrofotométrico foi baseado na reação entre Al (III) e o agente complexante cromoazurol S (CAS), cujo complexo produzido foi monitorado com máximo de absorção em aproximadamente 535 nm.

A estrutura da reação entre o Al (III) e o CAS não foi encontrada na literatura, portanto, neste estudo foi empregado o Método das Variações Contínuas (Método de Job), que é um método simples para determinar a estequiometria de uma reação. No caso deste trabalho, o método foi empregado para estimar a estequiometria do complexo formado entre o metal e o ligante ^{72,73}.

O procedimento foi realizado tomando diferentes proporções do metal Al (III) e do ligante CAS, mantendo a soma das concentrações constante, conforme ilustrado na FIGURA 2.1. Observa-se que o tubo cinco é único ponto em que a proporção metal-ligante é constante.

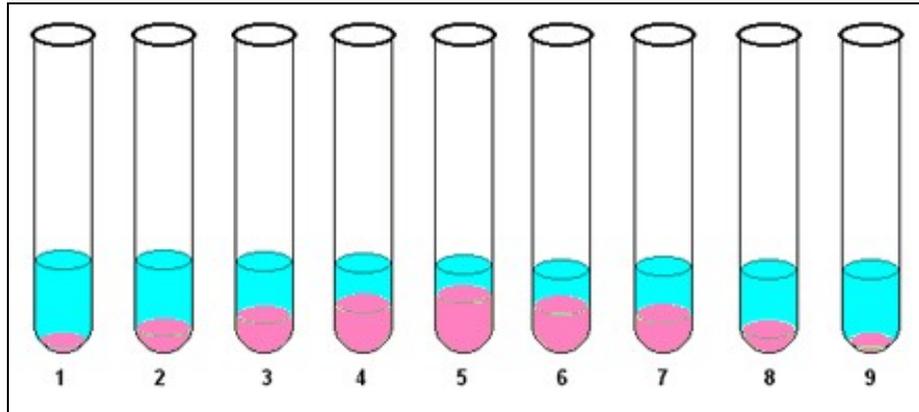


FIGURA 2.1 - Ilustração do procedimento proposto pelo Método das Variações Contínuas. A solução azul representa o metal e a rosa o ligante.

2.1.2. Descontaminação dos materiais

Todos os materiais empregados para estocar as soluções foram de plástico polietileno e o procedimento adotado para evitar a contaminação dos mesmos consistiu em deixá-los em um banho com HNO_3 10% (v/v) em solução alcoólica por 48 horas. Após esse tempo, todo o material foi lavado cinco vezes com água destilada e mais duas com água purificada. Recipientes de vidro foram evitados porque possuem óxido de alumínio como um dos constituintes presentes em sua composição, que por lixiviação poderia contaminar as soluções ³⁸.

2.1.3. Preparo de reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e estocadas em frascos de polietileno previamente descontaminados, conforme descrito no item 2.1.2. Água purificada em sistema Millipore Milli-Q (condutividade $\leq 18 \Omega \text{ cm}^{-1}$) foi utilizada para o preparo das soluções e limpeza dos materiais. Amostras de hemodiálise foram doadas pela Santa Casa de Misericórdia da cidade de Piracicaba, São Paulo e da cidade de Imperatriz, no Maranhão. As amostras apresentam a seguinte composição, para 100 mL de solução: cloreto de sódio (NaCl) $\approx 30 \%$ (m/v); cloreto de potássio (KCl) 0,67g; cloreto de cálcio, sol. 50%,

(CaCl₂) 1,98 g; cloreto de magnésio (MgCl₂.6H₂O) 0,46 g e ácido acético (C₂H₄O₂) 1,08 g. Uma das soluções possui, acrescido à composição descrita anteriormente, 4,50 g de glicose anidra (C₆H₁₂O₆).

As soluções foram preparadas como segue abaixo:

- Uma solução salina de 1000 mL foi preparada com as mesmas concentrações dos sais descritos no rótulo das amostras de hemodiálise, como mencionado anteriormente.
- Uma solução estoque 1000 mg L⁻¹ de Al (III) foi preparada a partir da diluição de uma ampola de solução de titrisol (100 mL de AlCl₃) em 1000 mL de água purificada.
- As soluções padrão de trabalho foram preparadas diariamente pela diluição apropriada da solução salina.
- Uma solução estoque 0,1% (m/v) do reagente cromogênico cromoazurol S (C₂₃H₁₃ClO₉SN₃) (CAS) foi preparada a partir da dissolução de 0,1 g do reagente em 100 mL de água purificada.
- Foram preparadas soluções reagentes CAS com concentrações de 0,01; 0,02 e 0,03 % (m/v), no dia de uso, diluindo em água purificada;
- Foi preparada uma solução 0,1 % do reagente cromogênico eriocromo cianina R (C₂₃H₁₅Na₃O₉S) (ECR) em 100 mL de água purificada e a partir desta, uma solução de 0,02%.
- Uma solução estoque de hexamina ((CH₂)₆ N₄) 3,0 mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 21,03 g em 50 mL de água purificada e soluções com concentrações 1,0 e 2,0 mol L⁻¹ foram preparadas por diluição com água purificada.
- Outro conjunto de solução salina foi preparado com o mesmo procedimento, porém com a adição de 4,05 mL da glicose (para 100 mL), já que uma das amostras continha essa substância na composição.

2.1.4. Equipamentos e Acessórios

Os equipamentos e acessórios empregados para execução desta parte do projeto estão descritos a seguir.

- Um microcomputador equipado com uma interface eletrônica PCL-711S (Advantech Corp, OH, USA) para controle e aquisição de dados, o qual opera com um programa escrito em linguagem de programação Quick BASIC 4.6;
- Um motor de corrente contínua com tensão de 12 V e 0,4 A (Modelo SF 105-SA, Microred) com rotação de 17 RPM e torque de 15 Ncm⁻¹;
- Interface de quatro relés e três transistores TIP 31 para controlar o movimento do motor;
- Uma câmara de mistura *Flow-Batch* confeccionada em acrílico com volume interno de 4,0 mL e um agitador com barra magnética;
- Tubos de polietileno para acoplamento à câmara de mistura;
- Duas válvulas solenoide de estrangulamento P/N 225P091-21 (NResearch); uma válvula seletora de seis portas P/N 225T091 (NResearch) e quatro válvulas solenoide de três vias NResearch empregadas para inserir as soluções à câmara de mistura;
- Quatro seringas automáticas de 10 mL e duas minibombas solenoide P/N 120SP1210-5TP (BioChem Valve) para propulsionar os fluídos;
- Duas celas de fluxo com caminho óptico de 100 e 200 mm de comprimento e 1,2 mm de diâmetro interno;
- Um fotodiodo OPT301 (Burr Brown) como detector;
- Capacitores eletrolíticos e resistores de diferentes valores;
- LED de alto brilho e ângulo de emissão estreito < 20° com $\lambda = 535$ nm.

- Fonte de alimentação estabilizada em 12,0 V e capacidade de corrente para 3,0 A, usada para alimentar o motor das bombas de seringa, as válvulas solenoide e as minibombas solenoide.
- Fonte de alimentação estabilizada em +12,0 V e -12,0 V e com capacidade para fornecer corrente de 1,0 A, usada para alimentar o fotômetro.

2.1.5. Descrição da interface de controle do motor

Na FIGURA 2.3 é mostrado o diagrama da interface de relés usada para controlar o funcionamento do motor da bomba de seringa.

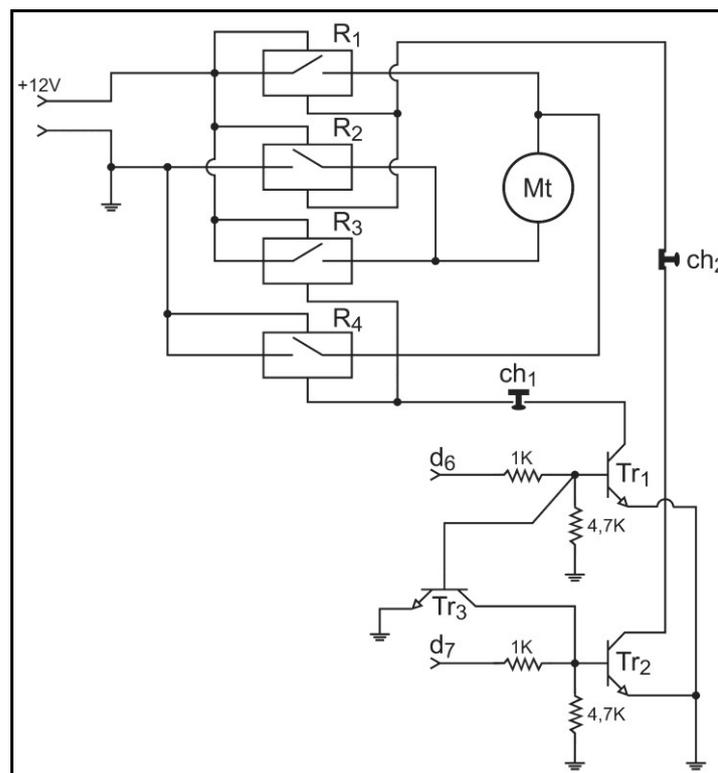


FIGURA 2.2 - Diagrama da interface de controle do motor. R₁-R₄ = relés eletromecânicos de 12 V, corrente de contato 10 A; Mt = motor de corrente contínua, tensão 12 volts, corrente 400 mA, rotação 17 RPM e torque 16 Ncm; Tr₁-Tr₃ = transistores Tip 31; d₆ e d₇ = bits de controle da interface digital.

Na configuração apresentada na FIGURA 2.2, os relés estão desligados e, conseqüentemente, o motor encontra-se parado. Quando o computador envia um sinal de controle através da interface e ativa o bit d_6 , o transistor Tr_1 entra em operação e fecha o circuito elétrico dos relés R_1 e R_2 , permitindo a circulação de corrente através do motor, o qual gira no sentido anti-horário. Quando o bit d_7 é ativado, o transistor Tr_2 fecha o circuito dos relés R_3 e R_4 . Nesta condição, a corrente circula através do motor em sentido horário. Então, o deslocamento dos êmbolos das seringas ocorre em função do sentido de rotação do motor. O transistor Tr_3 funciona como protetor anticoincidência, pois se os bits d_6 e d_7 forem ativados ao mesmo tempo, esse transistor entra em operação e coloca o transistor Tr_1 em corte, impedindo a circulação de corrente através dos relés R_3 e R_4 . As chaves Ch_1 e Ch_2 são posicionadas para delimitar o deslocamento máximo permitido dos êmbolos. Assim, se um comando for transmitido erroneamente, o motor é desligado quando os êmbolos das seringas alcançam a posição estabelecida por estas chaves.

2.1.6. Descrição da interface de controle digital

Os relés utilizados para acionar o motor drenam uma corrente elétrica em torno 100 mA e necessitam de uma diferença de potencial de 12,0 V. As minibombas e as válvulas solenoide também requerem uma diferença de potencial de 12,0 V e corrente elétrica da ordem de 300 mA. Portanto, é necessário dispor de uma interface para compatibilizar as condições de trabalho destes dispositivos. Na FIGURA 2.3 é mostrado o diagrama elétrico da interface usada para essa atividade, a qual foi montada em placa de circuito impresso em fibra de vidro.

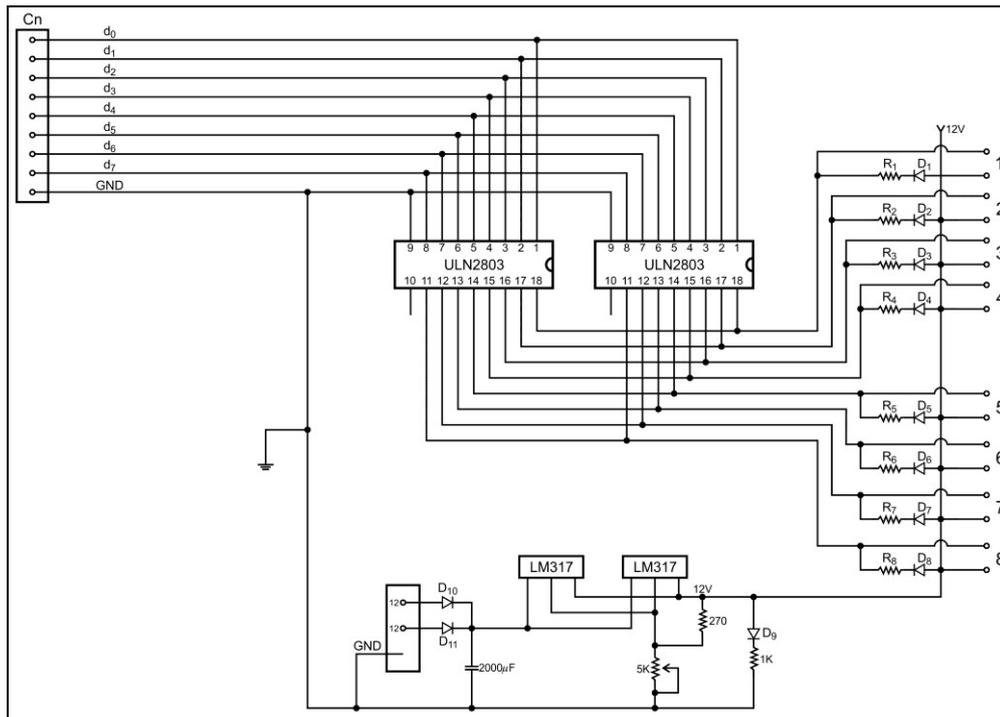


FIGURA 2.3 - Diagrama da interface de controle digital. Cn = conector da interface de controle PCL-711S; d_0 - d_7 = bits de controle; D_1 - D_9 = LEDs de sinalização; R_1 - R_8 = resistores de 2200 Ω . Os números de 1 a 8 indicam os bornes para conexão das válvulas e das minibombas solenoide.

Os diodos retificadores D_{10} e D_{11} , o capacitor de 2000 μF , os reguladores de voltagem LM317 e os resistores de 270, 1000 e 5000 Ω formam a fonte de alimentação. Os dois reguladores de voltagem estão ligados em paralelo para aumentar a potência da fonte. A diferença de potencial desejada é ajustada por meio do resistor variável de 5,0 k Ω . Os sinais de controle gerados pelo computador e enviados através do conector Cn tem diferença de potencial entre 2,5 e 5,0 V e corrente da ordem de poucos miliamperes. O circuito integrado ULN2803 recebe esse sinal na entrada e na saída pode chavear um dispositivo com alimentação de 12,0 V e corrente até 0,4 A. Nesta interface, os dois circuitos integrados estão ligados em paralelo visando fornecer corrente mais elevada. Então, tem-se o total de oito linhas de controle na saída destes componentes, cada uma com capacidade para drenar até 0,8 A de corrente.

2.1.7. Descrição dos módulos de análises

A FIGURA 2.4 mostra o diagrama do primeiro módulo de análises, o qual associa os processos de multicomutação em fluxo e *Flow-Batch*. Este sistema engloba uma câmara de mistura semiaberta, onde as soluções são homogeneizadas e onde é formado o complexo de interesse; um agitador magnético, que serve como suporte para a câmara de mistura; duas válvulas de estrangulamento; uma válvula seletora de seis vias e uma seringa de plástico com volume de 10 mL que está em comunicação direta com a válvula de seis vias.

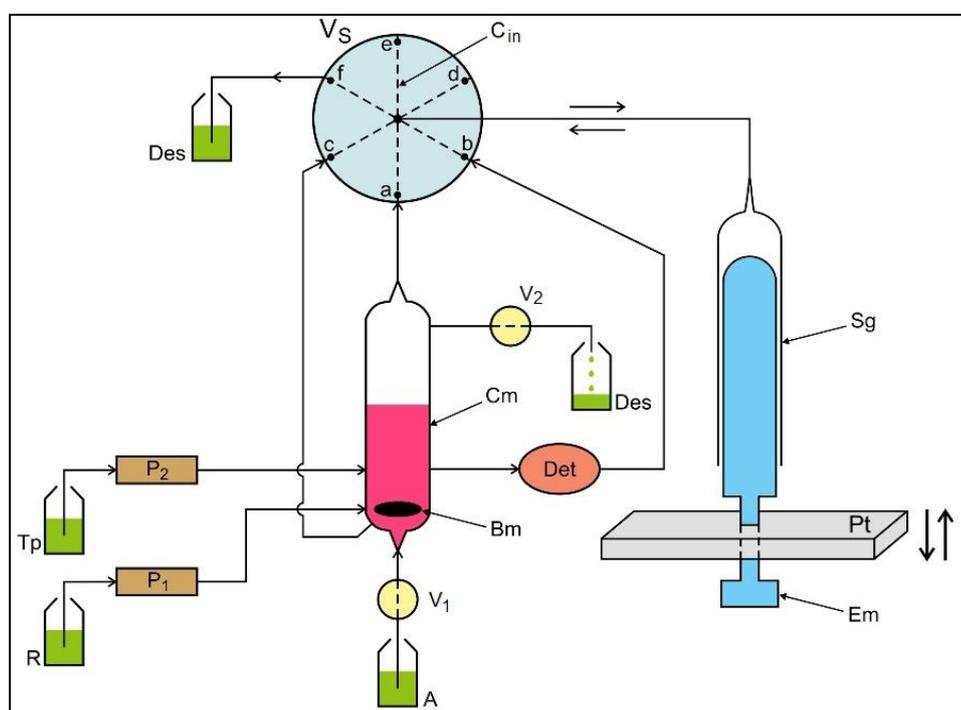


FIGURA 2.4 - Diagrama do primeiro módulo de análises. V_1 e V_2 = válvulas solenoide de estrangulamento; P_1 e P_2 = minibombas solenoide; R = reagente cromogênico CAS; Tp = solução de hexamina; Vs = válvula seletora de 6 vias; Cin = canais internos da válvula seletora Vs; a - f = válvulas solenoide das portas da válvula seletora; A = amostra; Cm = câmara de mistura; Bm = barra magnética; Sg = seringa; Em = êmbolo da seringa; Det = fotômetro de LED, $\lambda = 535$ nm; Des = descarte de soluções; Pt = plataforma de deslocamento do êmbolo da seringa.

O êmbolo da seringa está fixado em uma plataforma móvel (Pt), a qual foi acoplada ao motor, podendo ser deslocada para cima e para baixo, em função do sentido de rotação do motor. Este recurso foi utilizado para encher e esvaziar a

seringa. O funcionamento desse módulo de análises envolve as etapas descritas a seguir.

1) Na configuração mostrada na FIGURA 2.4, a seringa está na posição para iniciar a amostragem, que é o fim do curso do êmbolo no estado de compressão. Quando a válvula V_2 e a válvula a da válvula seletora V_s são acionadas, o êmbolo da seringa é deslocado para baixo e a solução da amostra é aspirada para a câmara através da válvula V_1 .

2) Após um intervalo de tempo estabelecido para aspirar a alíquota da amostra (20 s), o motor é desligado. As minibombas P_1 e P_2 são acionadas o número de vezes programado para inserir na câmara de mistura as alíquotas das soluções do reagente cromogênico e da solução de hexamina, respectivamente. O funcionamento dessas minibombas solenoide requer a aplicação de um pulso elétrico de 12 V, durante um intervalo de tempo entre 0,1 e 0,15 s. Quando desligadas, elas ejetam uma alíquota da solução, sendo que o volume ejetado depende do modelo de minibomba empregada. Para acionamento sequencial é necessário esperar um intervalo de tempo da ordem de 0,1 s para acioná-la novamente.

3) Após um intervalo de tempo de 10 s para equilibrar a pressão interna, a válvulas V_1 e a da válvula V_s são desligadas.

4) Nessa etapa, o motor efetua a rotação no sentido horário para deslocar o êmbolo da seringa para cima e ao mesmo tempo a válvula f também é acionada. Nessa condição, a seringa é esvaziada e o efluente é direcionado para o descarte.

5) O motor é ativado com rotação no sentido anti-horário para deslocar o êmbolo da seringa para baixo. Ao mesmo tempo, a mistura de soluções é deslocada da câmara de mistura para a cela de fluxo através das válvulas V_2 e b . Após um intervalo de 7 s, suficiente para encher a cela com a solução do composto formado, o movimento da seringa é interrompido e a absorção da radiação emitida pelo LED é monitorada. O sinal é gerado pelo fotodetector e convertido para sinal digital pela interface PCL-771S, que salva como arquivo ASCII para permitir posterior processamento. O

mesmo procedimento foi repetido duas vezes com intervalos de tempo de 4,0 s para obter o total de três replicatas para cada etapa de amostragem.

6) Nesta etapa, o motor é ligado com rotação no sentido horário e simultaneamente as válvulas V_2 e f executam o esvaziamento da câmara de mistura. A válvula V_2 é do tipo 'normalmente fechada', então durante as etapas de amostragem e leitura do sinal, ela mantém fechada a entrada de ar na câmara. Na etapa de esvaziamento da câmara ela é acionada, permitindo a entrada de ar enquanto a solução é aspirada para o descarte.

O segundo módulo de análises empregado nesta etapa do projeto está descrito na FIGURA 2.5. Este sistema se diferencia do anterior por empregar um número maior de seringas e inserção da amostra efetuada pelo reator e não empregar a válvula seletora de seis portas. Além disso, a câmara de mistura é aberta, ou seja, opera em equilíbrio com a pressão atmosférica.

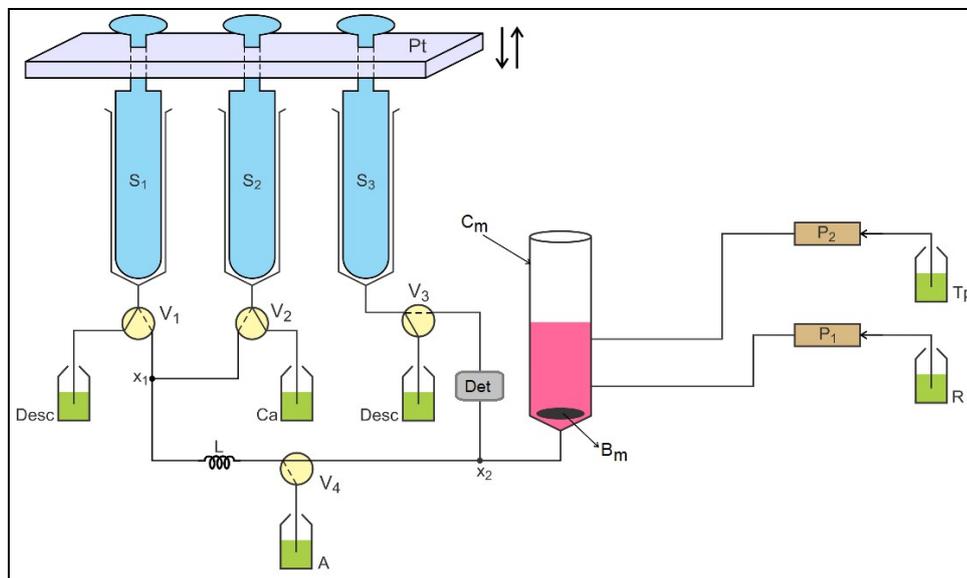


FIGURA 2.5 - Diagrama do segundo módulo de análises. $S_1 - S_3$ = seringas; $V_1 - V_4$ = válvulas solenoide de três vias; P_1 e P_2 = minibombas solenoide; C_m = câmara de mistura; Det = fotômetro; L = reator, com volume = 3,0 mL; Bm = barra magnética; X_1 e X_2 = conectores de 3 vias; Ca = solução transportadora, água; Desc = descarte de efluente; A = amostra; Tp e R = solução tampão e reagente cromogênico, respectivamente.

O funcionamento deste módulo de análises envolve as etapas descritas a seguir.

1) Na configuração mostrada nesta FIGURA 2.5, os êmbolos das seringas estão deslocados para extremidade de acesso ao interior das seringas. Os êmbolos das seringas são fixados a uma barra metálica (Pt), a qual está acoplada mecanicamente ao eixo do motor, que a desloca para frente ou para trás.

2) Quando é iniciado o processo de amostragem, um sinal de controle é enviado pelo microcomputador através da interface digital para acionar as válvulas V_1 e V_4 e o motor com rotação no sentido anti-horário. Ao mesmo tempo, a solução da amostra é aspirada pela seringa S_1 através das válvulas V_1 e V_4 para o reator (L) e também, a solução transportadora (Ca) é aspirada para o interior da seringa S_2 através da válvula V_2 , que permanece desligada.

3) Quando o intervalo de tempo ($t = 18$ s) programado para encher o reator é finalizado, o motor é desligado. Em seguida, ele é novamente ligado, mas com rotação no sentido horário e os êmbolos são deslocados para a extremidade externa das seringas. Nesta etapa, a válvula V_2 é acionada e as válvulas V_1 e V_4 são mantidas desligadas.

4) Nesta condição, a solução da amostra é deslocada do reator pela solução transportadora e é inserida na câmara de mistura (C_m). Nesta etapa, os êmbolos das seringas chegam à posição de repouso, como mostrada na FIGURA 2.5.

5) Em seguida, as minibombas P_1 e P_2 são acionadas e inserem as alíquotas das soluções do tampão e do reagente cromogênico no interior da câmara. Após o intervalo de tempo definido para o desenvolvimento da reação, o motor é acionado com rotação no sentido anti-horário e os êmbolos das seringas são novamente deslocados para extremidade interna das mesmas.

6) Ao mesmo tempo, a válvula V_3 é acionada e em função desta ação a solução do composto formado é aspirada para o fotodetector (Det). Após o intervalo de tempo programado para encher a cela de fluxo ($t = 7,0$ s), o motor é desligado e o sinal gerado pelo fotômetro é lido pelo computador através da entrada analógica da interface PCL711S. O sinal gerado em mV é convertido para digital e salvo no formato ASCII para posterior processamento dos dados.

7) Em seguida, são executadas duas etapas de deslocamento dos êmbulos: uma para acionar o motor e a válvula solenoide V_3 por 4,0 s e outra para realizar a leitura do sinal gerado. Este recurso foi incorporado ao *software* de controle e aquisição de dados para permitir a execução de três replicatas para cada etapa de amostragem.

8) Após a leitura do sinal, a câmara e a cela de fluxo são esvaziadas, através da seringa S_3 e da válvula V_3 . A válvula V_3 é mantida acionada e o motor é direcionado para sentido anti-horário. Quando termina esta etapa, os êmbolos das seringas retornam para o início do curso de deslocamento e a seringa S_2 é preenchida com a solução transportadora.

9) Quando o sentido de rotação do motor é invertido, no mesmo momento que válvula V_2 é acionada, a solução transportadora é deslocada para a câmara de mistura através do reator. Após um intervalo de tempo de 10 s, a câmara é esvaziada através da cela de fluxo. Esta etapa é executada quando o motor é acionado com rotação no sentido anti-horário e a válvula V_3 é também acionada. Esta sequência é realizada automaticamente após cada etapa de amostragem programada.

2.1.8. Descrição dos fotômetros

O fotômetro de LED de ambos os sistemas foi acoplada uma cela de fluxo de caminho óptico de 200 mm, de forma que eles formavam uma unidade compacta. A FIGURA 2.6 mostra o diagrama do fotômetro empregado para o primeiro sistema de fluxo mostrado na FIGURA 2.4.

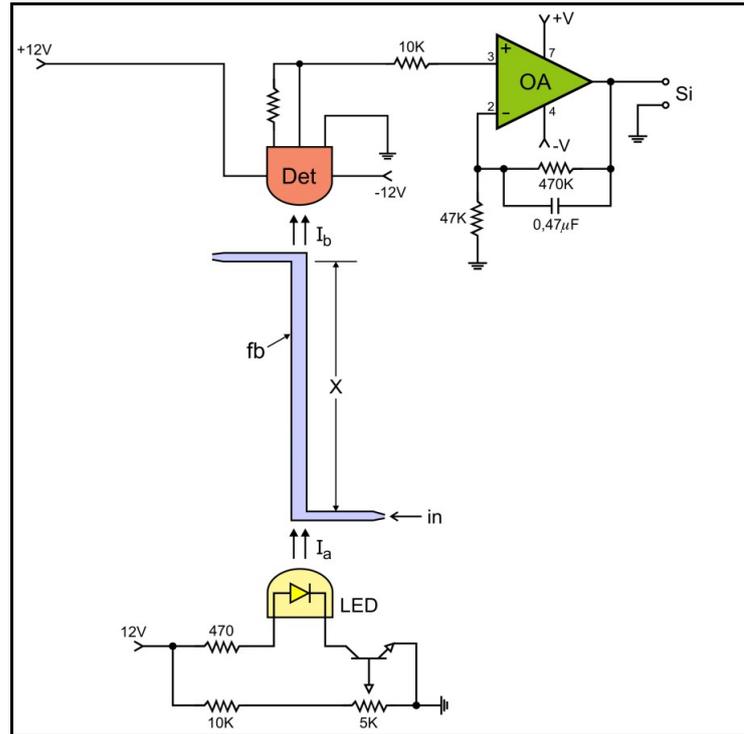


FIGURA 2.6 - Diagrama do fotômetro. LED = diodo emissor de luz, $\lambda_{\max} = 535 \text{ nm}$; AO = amplificador operacional OP07; fb = corpo da cela de fluxo; x = comprimento da cela de fluxo, 200 mm; I_a e I_b = feixes de radiação incidente e emergente, respectivamente; in e out = entrada e saída de solução; Si = sinal gerado, mV; Det = fotodiodo OPT301 (Burr-Brown).

Quando era iniciada a operação do *software* de controle e aquisição dos dados, era perguntado ao operador se desejava fazer a calibração do fotômetro. Se a resposta fosse afirmativa, eram executadas as etapas 1, 3, 4 e 5 descritas para o módulo de análises da FIGURA 2.4 e a calibração era efetuada com água ao invés da amostra. O programa solicitava que o LED fosse apagado, o que era feito por meio do resistor variável acoplado à base do transistor, então o computador lia o sinal gerado no escuro (V_0) e, em seguida, solicitava que a emissão do LED fosse restabelecida e ajustada. O ajuste era realizado para obter um sinal de 2000 mV na saída do fotodetector, que é o valor máximo aceitável pela interface de conversão analógica/digital empregada.

Na etapa de calibração, a cela encontrava-se preenchida com o fluido transportador, o qual, a princípio, não absorvia a radiação eletromagnética emitida pelo LED, portanto, $I_a = I_b$.

A diferença de potencial de 2000 mV (V_f) apresenta uma função linear com a intensidade do feixe de radiação I_a , então, após calibração do fotômetro, era

iniciado o processo de amostragem e quando o composto produzido era introduzido no interior da cela de fluxo, parte da radiação emitida pelo LED era absorvida pelo composto. Dessa forma, a intensidade do feixe de radiação I_b que chegava ao fotodetector era menor que I_a e a diferença de potencial gerada pelo fotodetector era menor que 2000 mV, estabelecido na etapa de calibração. Os valores de V_0 e V_f foram arquivados como referência para calcular a absorbância da espécie química de interesse.

A variação entre as diferenças de potenciais tem relação com a concentração do analito, a qual é dada pela lei de Lambert-Beer, que obedece a EQUAÇÃO 1 mostrada no primeiro capítulo deste manuscrito. Para melhor compreender o emprego da lei de Beer neste trabalho, a EQUAÇÃO 3 mostra uma adaptação da equação geral, descrita na EQUAÇÃO 1.

Então, de acordo com a Lei de Beer, a seguinte equação deve ser obedecida:

$$\text{Log}(V_f - V_0) / (V_i - V_0) = abc \quad (\text{EQUAÇÃO 3})$$

Para a qual:

V_0 = diferença de potencial lida no escuro;

V_f = diferença de potencial de fundo de escala (2000 mv);

V_i = diferença de potencial gerada com a solução do composto na cela de fluxo;

a = constante característica do composto;

c = concentração do analito;

b = caminho óptico da cela de fluxo.

O fotômetro empregado para o segundo sistema de fluxo foi constituído com os mesmos dispositivos presentes no primeiro fotômetro, porém, a cela de fluxo possui uma geometria diferente. No primeiro fotômetro, foi empregada uma cela de fluxo d e formato Z e a do segundo fotômetro, um tubo de vidro reto onde nas extremidades foram fundidos cilindros de vidro e a entrada e saída do fluido são feitas através de pequenas aberturas laterais. A FIGURA 2.7 mostra o segundo fotômetro.

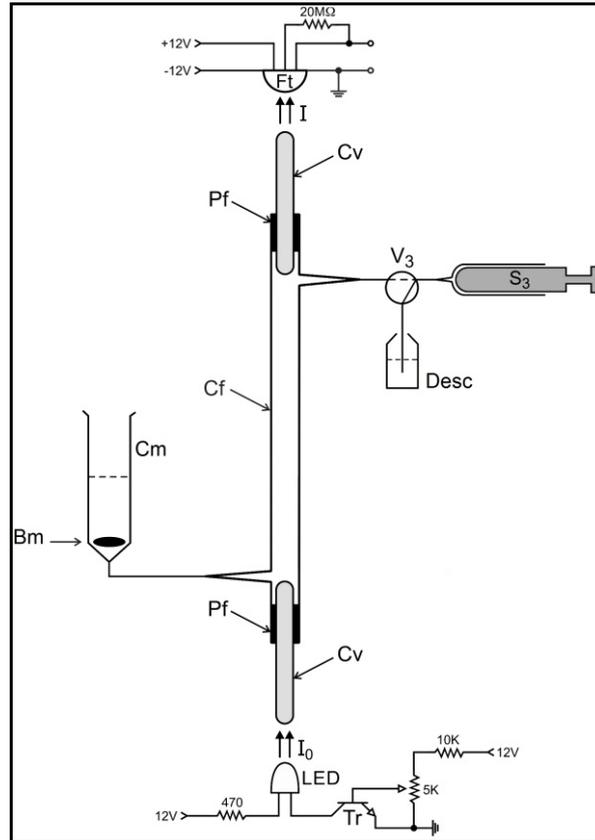


FIGURA 2.7 - Diagrama do fotômetro. Cf = corpo da cela de fluxo, tubo de vidro de 200 mm de comprimento e 1,2 mm de diâmetro interno; LED = diodo emissor de luz com máximo de emissão em 535 nm, intensidade de emissão 10000 milicandelas e ângulo de abertura do feixe de radiação de 15°; Tr = transistor BC547; Cv = cilindros de vidro, diâmetro de 1,2 mm e comprimento de 20 mm; pf = ponto de fusão do tubo de vidro com os cilindros; V₃ = válvula solenoide de 3 vias; S₃ = seringa; Cm = câmara de mistura; Bm = barra magnética; Desc = descarte de efluente; I₀ = feixe de radiação emitida pelo LED; I = feixe de radiação que atinge o detector após percorrido o caminho óptico da cela de fluxo, Ft = fotodiodo 0PT301 (*Burr-Brown*).

Às extremidades da cela de fluxo foram acoplados cilindros de vidro que funcionam como guias de onda. Um cilindro conduz o feixe de radiação emitido pelo LED (I₀) até o interior da cela e o outro, coleta o feixe de radiação emergido do interior da cela de fluxo na outra extremidade e o conduz até o fotodetector. Esta geometria de cela apresenta um melhor aproveitamento do feixe de radiação emitido pelo LED, por isto foi dispensado o emprego de uma etapa de amplificação de sinal na saída do fotodetector como mostrado no primeiro fotômetro (FIGURA 2.6).

O fundamento para o processo de calibração para este fotômetro é semelhante ao anterior, porém, a operação do módulo era iniciada quando o módulo de seringas era acionado para encher a cela de fluxo com solução transportadora. Previamente, era inserido um volume de 2,0 mL da solução transportadora na

câmara de mistura pela seringa S₂ e a válvula V₂. Após esta etapa, o motor era ligado e a válvula solenoide V₃ era acionada ao mesmo tempo. Após um intervalo de tempo estabelecido para encher a cela de fluxo (10 s), o motor e a válvula V₃ eram desligados e o Programa solicitava que a emissão do LED fosse restabelecida e ajustada. A forma de aquisição de dados para este fotômetro era semelhante a do primeiro.

2.1.9. Otimização dos sistemas em fluxo

Alguns parâmetros foram avaliados com o objetivo de estabelecer as condições experimentais dos procedimentos propostos.

Para o primeiro sistema foram investigados: influência da concentração do CAS, sendo estudadas as concentrações de 0,01, 0,02 e 0,03% (m/v); influência do volume do CAS inserido no interior da câmara, sendo estudados os volumes de 40; 50; 60 e 70 µL, que correspondem a 4, 5, 6 e 7 pulsos das bombas correspondentes, já que cada pulso acionado pela bomba equivalia a 10 µL (capacidade máxima do seu volume interno) e efeito do volume da solução de hexamina, de 150, 200, 250 e 300 µL, que correspondem 15, 20, 25 e 30 pulsos. A concentração de hexamina foi fixada em 3,0 mol L⁻¹ para manter o pH da solução em torno de 5,0⁷⁴. O volume de inserção da amostra foi um parâmetro mantido fixo, pois o volume de 3,0 mL da solução foi programado para ser inserido no interior da câmara de mistura.

Antes do estudo de otimização ter sido iniciado, foi realizado um estudo acerca do reagente cromogênico que seria empregado para complexar o alumínio. Os reagentes cromoazurol S e eriocromo cianina R estão entre os mais usados para a determinação de alumínio em diferentes matrizes, incluindo soluções para hemodiálise^{38,54}. Foi realizado, então, um comparativo entre os dois reagentes, com concentração de 0,02% (m/v) para ambos a fim de verificar qual o mais sensível para desenvolver a reação em meio à alta concentração salina.

Analogamente à otimização do primeiro sistema, foi adotado o mesmo procedimento para otimizar o segundo sistema. Foi fixado também o volume de 3,0

mL de amostra para as três replicatas a ser inserido à câmara de mistura de forma a manter as proporções.

2.2. Resultados e discussão

2.2.1. Estudo dos agentes complexantes CAS e ECR

Os experimentos foram realizados separadamente, empregando concentração 0,02 % (m/v) de CAS e ECR e soluções de referência nas concentrações 10, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Al (III). A minibomba solenoide P₁ foi acionada seis vezes, que correspondia a um volume de 60 μL de reagente inserido à câmara de mistura e a minibomba P₂ foi acionada 25 vezes para a inserção da solução de hexamina 3,0 mol L⁻¹, que correspondia a 250 μL de solução inserida à câmara. Foi fixada esta concentração de hexamina porque concentrações inferiores não forneceram resultados esperados, então essa concentração foi mantida para ajustar o pH da solução presente na câmara após a formação do complexo ternário, cujo valor esperado era em torno de 5,0⁷⁴. A FIGURA 2.8 mostra o resultado do estudo.

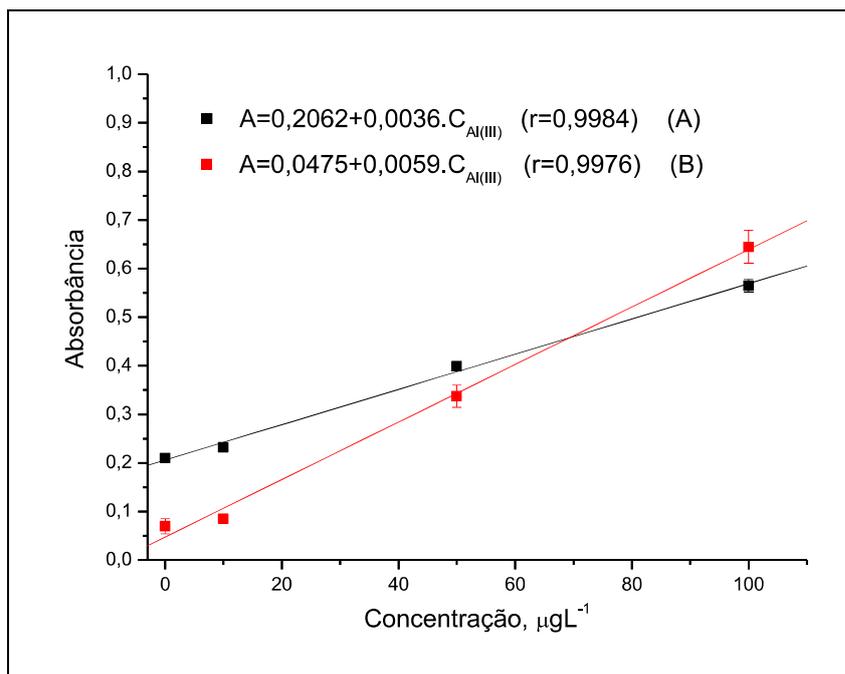


FIGURA 2.8 - Efeito dos agentes complexantes do procedimento analítico. Curvas A e B = reagentes ECR e CAS, respectivamente. Concentrações 0,02 % (m/v) e pH do meio = 5,0.

Considerando-se o coeficiente angular da curva analítica como um parâmetro relacionado à sensibilidade, percebe-se que a melhor sensibilidade foi alcançada com o reagente CAS, a qual é 70% maior que a obtida quando empregado o reagente ECR. Além disso, a absorbância do branco é menor, o que é vantajoso em sistemas de análises em fluxo que empregam adição pulsada. De acordo com este resultado, o reagente CAS foi selecionado para dar sequência ao trabalho.

Segundo a literatura ⁷⁴, a cinética da reação entre CAS e Al (III) é rápida, então não foram realizados ensaios visando uma otimização temporal. Com efeito, como três alíquotas da solução do composto produzido foram aspiradas para a cela de fluxo em tempos distintos, então se o desenvolvimento da reação ainda estivesse em curso, os sinais monitorados teriam magnitude crescente.

2.2.2. Avaliação da estequiometria da reação – Método das Variações Contínuas

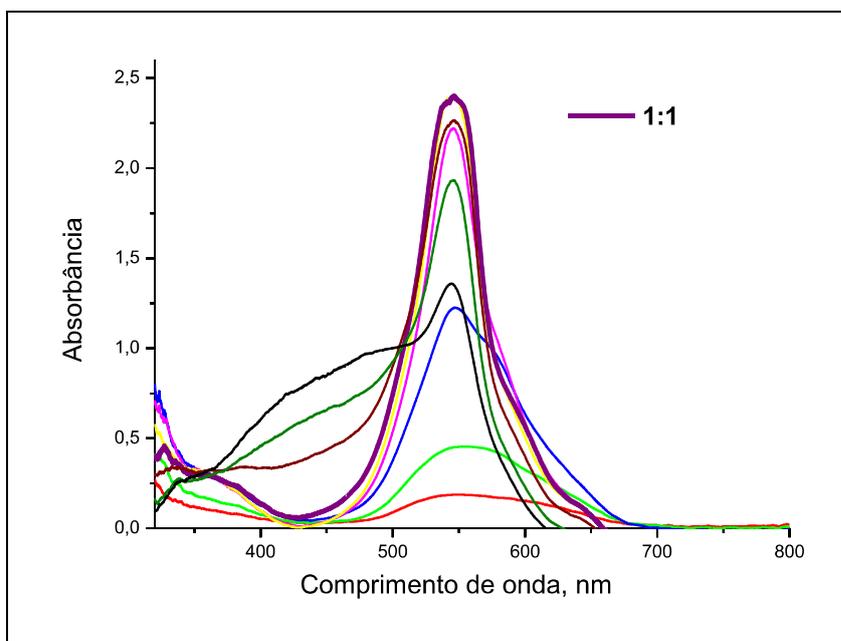


FIGURA 2.9 - Espectros de absorção do complexo Al(III)-CAS (pH = 5,0) obtidos pelo Método das Variações Contínuas.

Como mostra a FIGURA 2.9, observa-se que à medida que a concentração de Al (III) é diminuída (demais espectros coloridos localizados abaixo do espectro de cor roxa), há uma redução do valor de absorbância do complexo. Desta forma, a proporção 1:1 (metal:ligante) (espectro destacado de cor roxa) confirmou a estequiometria da reação do complexo Al(III)-CAS, cuja absorção do espectro ocorreu com maior intensidade.

2.2.3. Efeito da concentração e do volume do reagente CAS

A concentração do reagente pode afetar a sensibilidade de forma desfavorável e também a faixa de resposta linear do procedimento analítico quando a estequiometria da reação não é atendida. Como o reagente é colorido, o seu excesso pode aumentar consideravelmente a leitura do branco. Um valor elevado da leitura do branco pode causar um estreitamento da faixa de resposta linear, devido à saturação do sistema de detecção. Dessa forma, foi feito um estudo para observar a influência da concentração e do volume do reagente CAS, sem que comprometesse a sensibilidade e sem que precisasse utilizar um excesso de volume. O estudo foi realizado usando as concentrações 0,01; 0,02 e 0,03% (m/v) de CAS e, uma vez otimizado esse parâmetro, foi feito o estudo do volume inserido, sendo eles 40; 50; 60 e 70 μL e fixado um volume de 200 μL para a hexamina para evitar variações do meio.

O resultado do estudo relacionado às concentrações dos reagentes está mostrado na FIGURA 2.10 e na TABELA 2.1 e o resultado relacionado aos volumes das soluções está mostrado na FIGURA 2.11 e disposto na TABELA 2.2.

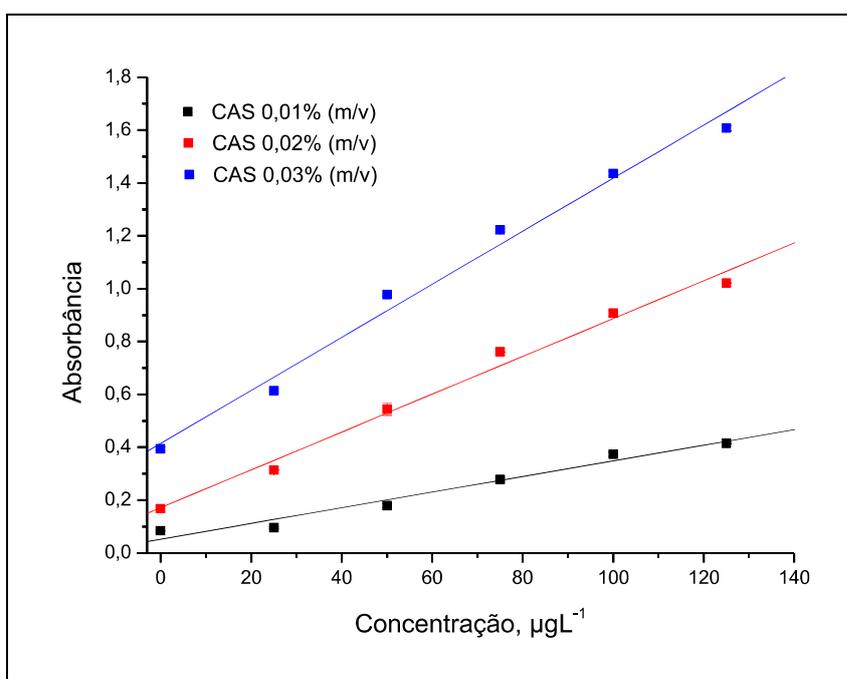


FIGURA 2.10 - Efeito da concentração da solução CAS.

TABELA 2.1 - Resultados obtidos após variação da concentração da solução do reagente CAS.

Concentração de CAS (%)	Coefficiente angular (sensibilidade)	Coefficiente de correlação (r)	Equação da reta
0,01	0,0030	0,9838	$A = 0,0527 + 0,0030 \cdot C_{Al(III)}$
0,02	0,0072	0,9940	$A = 0,1715 + 0,0072 \cdot C_{Al(III)}$
0,03	0,0100	0,9937	$A = 0,4147 + 0,0100 \cdot C_{Al(III)}$

Ao analisar as curvas da FIGURA 2.10, observa-se um aumento da sensibilidade com a concentração do reagente, embora ocorra também, um aumento da leitura do branco, que seria esperado uma vez que o reagente apresenta absorção na mesma faixa do composto formado com o analito. Os dados da TABELA 2.1 mostram que o sinal do branco e o coeficiente angular cresceram linearmente com a concentração do reagente, entretanto, o coeficiente de correlação linear apresentou melhor resultado para as duas concentrações mais altas. Experimentos realizados usando solução de CAS com concentração de 0,04 % apresentou resposta linear semelhante a da concentração de 0,03 %, entretanto, a leitura do sinal do branco era maior, portanto, a concentração de 0,03 % foi selecionada para dar continuidade ao trabalho.

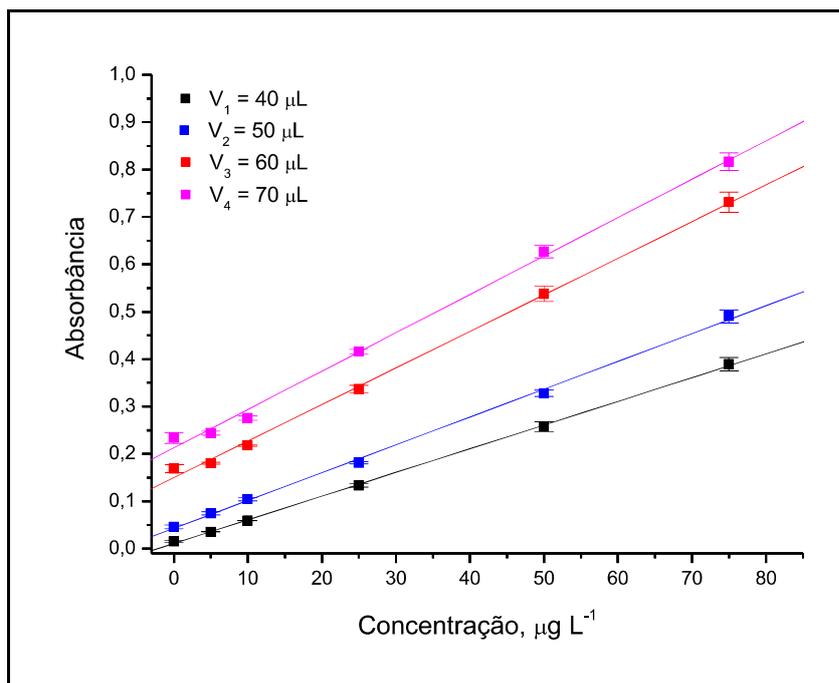


FIGURA 2.11 - Efeito do volume da solução CAS.

Ao analisar as curvas analíticas da FIGURA 2.11, observa-se que há um ganho de sensibilidade quando o volume da solução do reagente variou de 40 para 60 µL. Entretanto, as curvas relacionadas aos volumes de 60 e 70 µL são praticamente paralelas, indicando apenas um aumento da leitura do sinal do branco. Dessa forma, o volume de 60 µL possuía reagente suficiente para atender a estequiometria da reação. Quanto à linearidade, os dados da TABELA 2.2 indicam que os valores obtidos não possuem diferença significativa, então o volume de 60 µL foi selecionado.

TABELA 1.2 - Resultados obtidos a partir da variação do volume da solução do CAS.

Volume de CAS (µL)	Coefficiente angular (sensibilidade)	Coefficiente de correlação (r)	Equação da reta
40	0,0109	0,9998	$A = 0,0109 + 0,0050.C_{Al(III)}$
50	0,0428	0,9993	$A = 0,0428 + 0,0059.C_{Al(III)}$
60	0,1499	0,9989	$A = 0,1499 + 0,0077.C_{Al(III)}$
70	0,2127	0,9983	$A = 0,2127 + 0,0081.C_{Al(III)}$

2.2.4. Efeito do volume da solução de hexamina

A reação entre o reagente CAS e o Al (III) é dependente do pH, então nos experimentos descritos anteriormente foi empregada uma solução de hexamina com concentração de $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ e mantido um volume de $200 \text{ }\mu\text{L}$. O pH recomendado na literatura para essa reação é em torno de $5,0$ ⁷⁴. Nessa etapa do experimento, foi avaliado o efeito do volume da solução de hexamina inserida à câmara de mistura, cujos resultados são mostrados na FIGURA 2.12 e na TABELA 2.3.

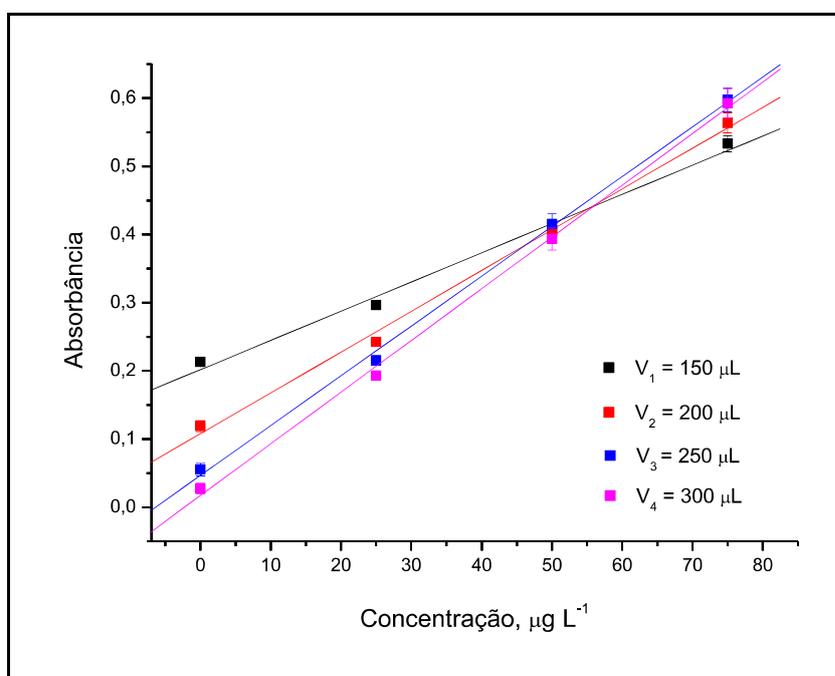


FIGURA 2.12 - Efeito do volume da solução de hexamina.

TABELA 2.3 - Resultados obtidos a partir da variação do volume da solução do hexamina

Volume de Hexamina (μL)	Coefficiente angular (sensibilidade)	Coefficiente de correlação (r)	Equação da reta
150	0,0044	0,9958	$A = 0,1961 + 0,0044.C_{\text{Al(III)}}$
200	0,0061	0,9982	$A = 0,1010 + 0,0061.C_{\text{Al(III)}}$
250	0,0075	0,9985	$A = 0,0061 + 0,0075.C_{\text{Al(III)}}$
300	0,0078	0,9980	$A = 0,0011 + 0,0078.C_{\text{Al(III)}}$

De acordo com os resultados, foram avaliados três parâmetros: o valor da leitura do branco, o coeficiente angular (sensibilidade) e o coeficiente linear (linearidade). Observa-se que a quantidade de hexamina inserida tem efeito significativo na leitura do branco, a qual diminui com aumento do volume. Pode-se inferir que o decréscimo observado seria causado por diluição, entretanto, considerando-se que o volume da amostra na câmara era 3000 μL , uma variação de 100 μL da solução de hexamina não causaria uma variação dessa ordem. Considerando estes resultados, o volume de 250 μL de hexamina foi selecionado, o qual corresponde a 25 pulsos de inserção executados pela minibomba P₂ da FIGURA 2.4.

Após a avaliação dos parâmetros com o emprego do primeiro módulo de análises (FIGURA 2.4), medições da acidez do produto obtido foram realizadas através da coleta da solução. Foi observado que o pH da mistura das soluções foi mantido em torno de 4,9, próximo a 5,0 que é o recomendado pela literatura ⁷⁴.

2.2.5. Desempenho do sistema proposto

Uma vez estabelecidas as condições operacionais, foram processados dois conjuntos de soluções de referência para verificar o desempenho global do sistema proposto (FIGURA 2.4), sendo um deles preparado com glicose na mesma concentração discriminada no rótulo do fabricante. As curvas analíticas correspondentes são mostradas nas FIGURAS 2.13 e 2.14.

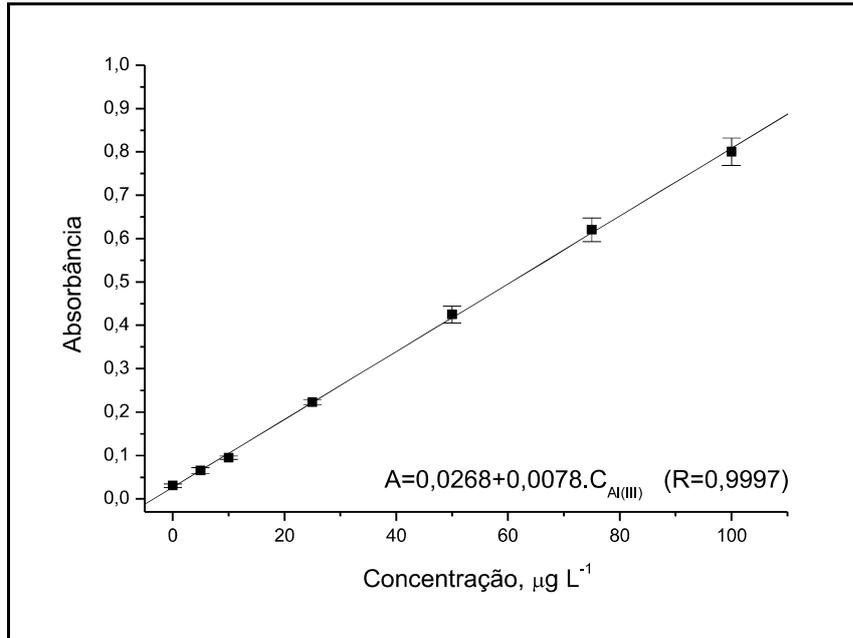


FIGURA 2.13 - Curva analítica do complexo Al^{3+} - CAS (FIGURA 2.4).

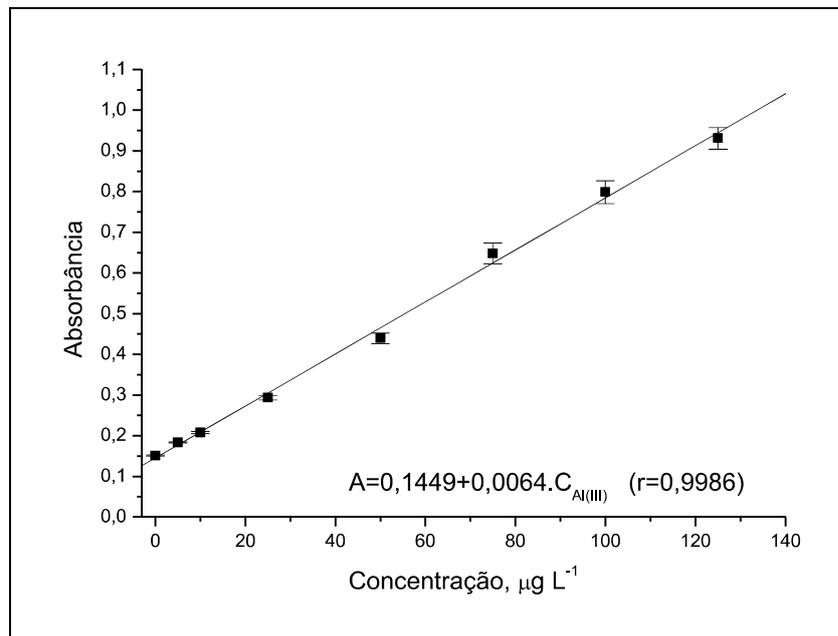


FIGURA 2.14 - Curva analítica do complexo Al^{3+} - CAS (FIGURA 2.4) com a presença de glicose nas soluções.

Ao analisar as curvas das FIGURAS 2.13 e 2.14, pode-se observar uma ótima resposta em termos de linearidade e também de sensibilidade, entretanto, verifica-se na FIGURA 2.14 um sinal mais elevado para o branco e um decréscimo do coeficiente angular, se comparado com a resposta obtida mostrada na FIGURA 2.13. Essa diferença pode ser atribuída à presença da glicose, uma substância orgânica presente em uma matriz ainda mais complexa.

Apesar dessas observações, verifica-se que a solução de referência com concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Al (III) apresentou sinal com magnitude suficiente para ser discriminada em relação à leitura do branco.

Para averiguar se a resolução seria afetada após o processamento desse conjunto de soluções com glicose, a faixa linear foi ampliada como observado na FIGURA 2.14. Portanto, observa-se uma boa resposta com o emprego dessas soluções numa faixa linear de 5 a $125 \mu\text{g L}^{-1}$.

As características analíticas do sistema proposto para os dois conjuntos de soluções estão dispostas nas TABELAS 2.4 e 2.5, respectivamente.

TABELA 2.4. Características analíticas do método proposto (Sistema da FIGURA 2.4).

CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5,0 - 100
Equação da reta	$A = 0,0268 + 0,008 \cdot C_{\text{Al (III)}}$ ($r=0,9997$)
Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$), critério (3σ)	1,58
Limite de quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5,26
Coefficiente de variação (%)	2,68
Consumo de hexamina (mg)	85
Consumo de cromoazurol S (μg)	12
Frequência de amostragem (h^{-1})	21
Geração de efluente (mL) (por determinação)	1,6

TABELA 2.5. Características analíticas do método proposto com o emprego de soluções de referência com glicose na composição.

CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5,0 - 125
Equação da reta	$A = 0,1449 + 0,006.C_{AI(III)}$ ($r=0,9986$)
Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,57
Limite de quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,89
Coefficiente de variação (%)	1,96
Consumo de hexamina (mg)	85
Consumo de cromoazurol S (μg)	12
Frequência de amostragem (h^{-1})	21
Geração de efluente (mL)	1,6

Os resultados apresentados demonstraram que o sistema proposto (FIGURA 2.4) possui bom desempenho em termos de consumo de reagentes e geração de efluentes, conforme pode ser observado nas TABELAS 2.4 e 2.5. O limite de detecção estimado foi de até quinze vezes menor que a concentração de referência estabelecida para soluções de hemodiálise ⁴².

Os objetivos do projeto foram alcançados, porém, apesar do sistema proposto ter apresentado um bom desempenho, a sua configuração foi modificada a fim de obter uma melhor resposta em termos de frequência de amostragem, pois 21 determinações por hora pode ser considerada baixa para um procedimento analítico automático. Dessa forma, o segundo módulo de análises foi proposto (FIGURA 2.5) e embora apresente uma estrutura diferente do primeiro, do ponto de vista conceitual são idênticos.

Dessa forma, os estudos foram repetidos e um novo conjunto de soluções de referência (com glicose) foi preparado por diluição binária para averiguar o desempenho do novo sistema com o objetivo de melhorar a frequência analítica.

As amostras de hemodiálise também foram processadas após firmadas as condições analíticas. A curva analítica obtida está ilustrada na FIGURA 2.15 e as características analíticas estão descritas na TABELA 2.6.

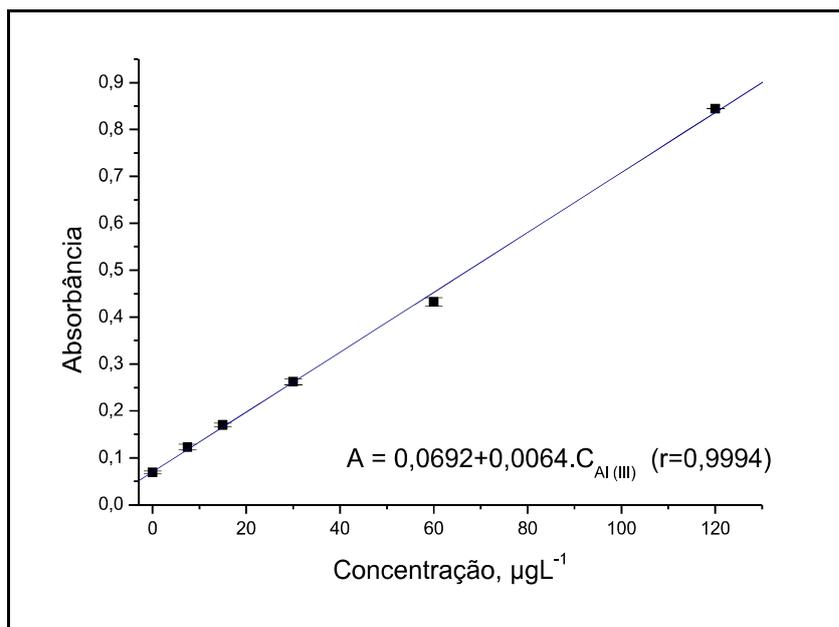


FIGURA 2.15 - Curva analítica referente a resposta global do sistema proposto (FIGURA 2.5) com a presença de glicose nas soluções.

De acordo com a FIGURA 2.15, a curva analítica obtida possui uma tendência semelhante à FIGURA 2.14 e com o mesmo valor de coeficiente angular. Observa-se que o sinal referente a leitura do branco decresceu se comparado ao da FIGURA 2.14, sendo ambas as soluções com glicose na composição. Como as concentrações das soluções são baixas, todo o cuidado foi tomado para o preparo das soluções, então uma fonte de erro possivelmente foi eliminada quando foi empregado o preparo das soluções por diluição binária.

As características analíticas do sistema proposto, mostrado na FIGURA 2.5, estão descritas na TABELA 2.6.

TABELA 2.6 - Características analíticas do desempenho global do sistema proposto (FIGURA 2.5)

CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	7,5 – 120
Equação da reta	$A = 0,0692 + 0,0064.C_{AI(III)}$ ($r=0,9994$)
Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$), critério (3σ)	1,41
Limite de quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4,69
Coefficiente de variação (%)	2,33
Consumo de hexamina (mg)	85
Consumo de cromoazurol S (μg)	12
Frequência de amostragem (h^{-1})	70
Geração de efluente (mL)	1,6

De acordo com a TABELA 2.6, observa-se que os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação e do coeficiente de variação foram superiores aos apresentados com o emprego do sistema anterior, porém, a diferença não foi significativa, uma vez que foram processadas soluções com concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$. A diferença quanto à frequência de amostragem foi de fato a mais significativa se comparada a obtida com o emprego do sistema anterior, pois o segundo módulo de análises permitiu obter 70 determinações por hora, contra 21 determinações obtidas com o primeiro sistema, ou seja, mais que o triplo alcançado.

Em sistemas de análises em fluxo o desempenho do propulsor de fluido é determinante para se obter bons resultados. Quando é empregado o processo de multicomutação sua importância aumenta, pois a inserção da alíquota da amostra e das soluções dos reagentes é função do tempo de permanência das válvulas ligadas e da vazão de bombeamento. Então, tendo estabelecido as condições operacionais, foi realizado um conjunto de experimentos para verificar o desempenho global do sistema como um todo. Nesse caso, estão incluídos a estabilidade do fotômetro e do dispositivo de propulsão de fluido, além do desenvolvimento da reação para formar o composto detectado. Uma variação de qualquer um destes parâmetros afetaria a magnitude dos sinais gerados e a precisão dos resultados.

Para avaliar globalmente o sistema, foram empregadas as mesmas condições de análise comentadas nos itens anteriores e o teste foi realizado três vezes para cada solução e em triplicata. Os registros referentes às medições são mostrados na FIGURA 2.16, onde observa-se que nos três conjuntos os registros apresentam perfis idênticos, indicando que o comportamento global do sistema é constante ao longo do tempo.

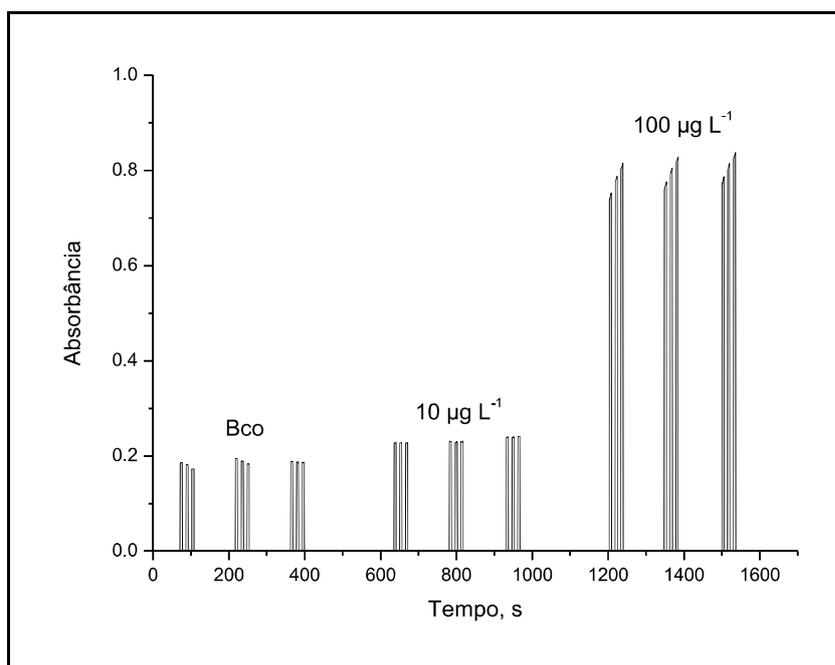


FIGURA 2.16 - Registro dos sinais transientes relativo à repetibilidade do sistema empregado. Bco = branco.

A partir dos registros da FIGURA 2.16 foram encontrados os seguintes valores para os desvios relativos das medições: 3,2; 2,5 e 3,4 % para o branco, para as soluções de 10 µg L⁻¹ Al (III) e de 100 µg L⁻¹ Al (III), respectivamente. Estes dados indicam que o sistema proposto tem ótimo desempenho e sensibilidade suficiente para quantificar alumínio em solução para hemodiálise com concentrações menores que o limite estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (10 µg L⁻¹)⁴².

2.2.6. Validação do método proposto

A validação do método proposto foi realizada por meio de testes de adição de padrão à amostra. A TABELA 2.7 mostra o resultado obtido.

TABELA 2.7 - Validação do método proposto

Amostra Hemodiálise	Concentração adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
1*	45,00	46,88 \pm 0,02	97,0
2*	65,00	76,21 \pm 0,03	112,0
3*	80,00	93,49 \pm 0,03	113,0
4**	45,00	57,30 \pm 0,05	127,0
5**	65,00	73,54 \pm 0,05	113,0
6**	80,00	83,83 \pm 0,04	105,0

*amostras sem glicose; **amostras com glicose.

Como a maioria dos procedimentos analíticos adota a faixa de aceitabilidade entre 70 e 120 % como aceitável e, considerando a complexidade da matriz, cujo analito foi detectado em baixas concentrações, pode concluir que os resultados obtidos mostram, com exceção da amostra quatro, uma boa faixa de recuperação (97 a 113 %).

2.3. Conclusão

Os resultados mostraram que o procedimento desenvolvido para a determinação de alumínio em amostras para tratamento de hemodiálise é exequível e apresenta sensibilidade suficiente para atender as normas estabelecidas pela ANVISA. Além disso, demonstra que a bomba de seringa desenvolvida apresentou desempenho suficiente para encorajar seu emprego no desenvolvimento de outros procedimentos analíticos, tendo como vantagem adicional baixo custo dos componentes e a vida média das seringas em torno de 6 meses. O primeiro conjunto

de seringas instalado funcionou durante o desenvolvimento do procedimento analítico, sem necessidade de manutenção, indicando ótima robustez.

*Desenvolvimento de um sistema automatizado para
determinação de níquel em amostras de interesse agronômico*

3. DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA AUTOMATIZADO PARA DETERMINAÇÃO DE NÍQUEL EM AMOSTRAS DE INTERESSE AGRONÔMICO

O níquel é considerado um micronutriente para plantas devido ao seu efeito significativo no desenvolvimento e na produção das mesmas ⁷⁵⁻⁷⁸. Dentre os efeitos inerentes à sua ação é citada a hidrólise da uréia, que é uma das fontes naturais de nitrogênio utilizada pelas plantas na realização da fotossíntese ^{79,80}.

Pesquisas envolvendo nutrição mineral de plantas relatam que a determinação de níquel é requerida para prevenir deficiência nas mesmas, uma vez que a concentração do metal em diferentes partes da planta é um indicador do seu estado nutricional ⁸¹. Contudo, a presença de níquel em excesso pode afetar desfavoravelmente a absorção de outros micronutrientes essenciais que, conseqüentemente, prejudica o desenvolvimento da planta ⁸².

Apesar dos sintomas de toxidez se desenvolverem quando níveis excessivos são absorvidos, e das plantas variarem quanto à sensibilidade ao excesso ⁸³, o níquel é considerado moderadamente tóxico quando comparado a outros metais pesados, mas ainda assim, há indicação de que ele pode causar sérios danos à saúde humana ^{84,85}.

O uso de plantas para fins terapêuticos é milenar ^{86,87} e mesmo nos dias atuais continua sendo amplamente empregado ⁸⁸⁻⁹⁰ em forma de chás ou infusões devido as suas propriedades de cura. No Brasil, a ANVISA aprovou a Resolução nº 48, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, incluindo o controle de qualidade da droga vegetal, do produto acabado e da importação de produtos fitoterápicos ⁹¹, porém, ainda não há uma legislação que especifique um limite de alguns metais contidos na planta *in natura*, como é o caso do níquel, por exemplo.

A disponibilidade de procedimentos para a determinação dos elementos considerados essenciais e, principalmente, aqueles que também podem ser considerados tóxicos quando em excesso, é primordial para monitorar o controle de qualidade das plantas com fins medicinais.

Os procedimentos comumente empregados para determinação de níquel envolvem espectrometria de absorção atômica com chama FAAS ⁹²,

espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) ⁹³ e espectrofotometria UV-Vis ⁹⁴. A extração em fase sólida tem sido empregada com o objetivo de separação e pré-concentração, sendo que a detecção tem sido efetuada por espectrofotometria UV-Vis ⁹⁴ ou espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) ⁹⁵.

Níquel e outros metais pesados foram quantificados em folhas de *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae), conhecida popularmente como boldo, por espectrofotometria de absorção atômica após digestão nítrica. Os níveis de níquel encontrados variaram de 4,31 mg kg⁻¹ a 0,77 mg kg⁻¹ e, segundo os autores, estes valores não ultrapassam a recomendação diária do metal, mesmo para crianças lactentes, cuja faixa de concentração permitida é de 5 a 15 µg g⁻¹ de Ni por dia no leite ⁹⁷.

Teores de alguns metais pesados foram determinados em amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hill.). As amostras foram decompostas em forno microondas com sistema fechado e processadas em espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado, cujas concentrações de níquel encontradas não ultrapassaram 5µg .g⁻¹ ⁹⁸.

Foi realizado um estudo para quantificar níquel em folhas e saquinhos comercializados para o preparo de chás de menta das espécies *Mentha piperita* e *Mentha pulegium* e uma mistura de ervas contendo a mesma planta. As amostras foram digeridas em HNO₃ 65%, secas em forno de mufla a 450 °C por 48 horas e a cinza obtida foi dissolvida em HNO₃ 1,5 % e diluídas para posterior processamento no espectrômetro com plasma indutivamente acoplado (ICPS). O resultado apresentou concentração de níquel de 1,79 ± 0,25 mg Kg⁻¹ em amostras contidas nos saquinhos comerciais e 1,00 ± 0,083 mg Kg⁻¹ nas amostras de folhas. Maior concentração do metal foi encontrada nas amostras constituídas da mistura da erva, cuja variação foi 0,53 mg Kg⁻¹ (mínima); 4,84 mg Kg⁻¹ (máxima) e 1,72 mg Kg⁻¹ (média) com ± 1,13 de desvio padrão ⁹⁰

Geralmente, a detecção fotométrica emprega equipamento de menor custo de aquisição e de operação ⁹⁹. Isto é um dos objetivos dessa tese e como objetivo específico desta parte do trabalho, visa-se desenvolver um procedimento automático para a determinação fotométrica de níquel em digeridos de plantas medicinais. O procedimento analítico foi desenvolvido empregando um módulo de análises baseado no processo de multicomutação em análises em fluxo (MCFA) ¹⁰⁰,

o qual utilizou minibombas solenoide como unidade de propulsão de fluídos ¹⁰¹. A detecção fotométrica foi realizada com um fotômetro de LED, o qual foi configurado para trabalhar com cela de fluxo de 50 mm de caminho óptico.

3.1. Parte Experimental

3.1.1. Método

O método espectrofotométrico empregado para quantificar o níquel nas amostras de plantas foi baseado na reação entre o metal e o agente complexante dimetilglioxima (DMG) em meio alcalino ^{99,102}. O complexo formado era de coloração levemente rosa correspondente ao dimetilglioximato de níquel (II), que foi monitorado espectrofotometricamente a 490 nm.

A reação entre o Ni (II) e o reagente DMG produz o precipitado Ni(DMG)₂ que é a base do método gravimétrico bastante difundido, como pode ser visualizado na FIGURA 3.1.

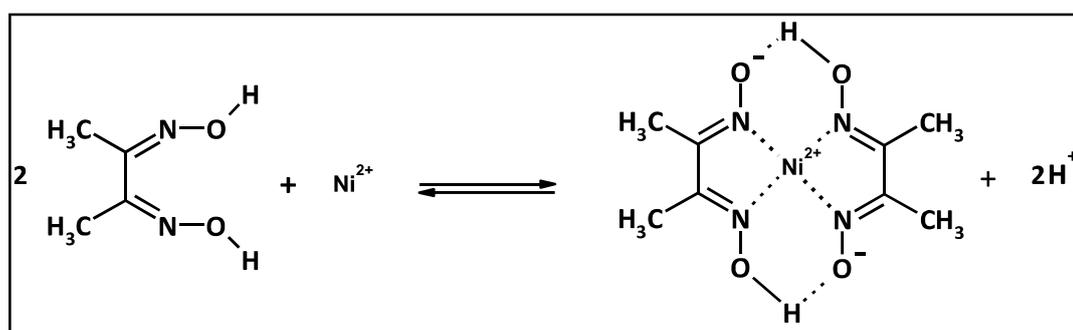


FIGURA 3.1 - Reação de formação do complexo Ni(II)-DMG. (Adaptada de MARCZENKO & BALCERZAK ¹⁰²)

Segundo a literatura, em solução alcalina, o níquel passa do estado II para o estado de oxidação IV e a reação é muito lenta e instável ¹⁰². A estequiometria da reação do Ni (II) com a DMG é 1:2 (metal: ligante), porém, não há

relatos sobre a estequiometria da reação quando o metal é complexado no estado de oxidação IV.

Sabe-se, porém, que a DMG é um ligante bidentado e se o número de coordenação do níquel for IV, duas geometrias são possíveis: tetraédrica e quadrado planar. Entretanto, tanto o Ni (II) quanto o Ni (IV) são íons pequenos (principalmente o Ni (IV)) e o tamanho e geometria dos ligantes impedem a formação do complexo tetraédrico (efeito estérico), formando assim um complexo quadrado planar. Dessa forma, há evidências de que as proporções estequiométricas para os dois estados de oxidação do metal são equivalentes. Como o estado de oxidação IV é instável em solução aquosa por longo tempo, é necessário utilizar um agente oxidante forte tal como persulfato de potássio para acelerar a reação e promover mais rapidamente o estado de oxidação IV ¹⁰³.

Diante do exposto, foi realizado o estudo do Método das Variações Contínuas ^{72,73} para estimar a estequiometria da reação quando o complexo é produzido em meio alcalino. Este estudo foi realizado tomando diferentes quantidades do metal Ni (II) (preparado neste estado de oxidação) e do ligante (DMG), mantendo a soma das quantidades constante, conforme ilustrado na FIGURA 2.1 do capítulo precedente. O método permitiu estimar a estequiometria do complexo formado através de diferentes medidas de absorbância na região do visível, com monitoramento do comprimento de onda em 490 nm.

3.1.2. Preparo de reagentes e soluções

Todas as soluções foram estocadas em frascos adequados e preparadas com reagentes de grau analítico conforme descrito abaixo.

- Água purificada obtida pelo sistema Millipore Milli-Q (condutividade elétrica $\leq 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) foi utilizada para o preparo das soluções e lavagem dos materiais.
- Uma solução estoque de Ni (II) 1000 mg L^{-1} foi preparada pela dissolução de 1,0 g de sulfato de níquel ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em 14 mL de ácido nítrico concentrado (HNO_3) e completado o volume para 1000 mL com água purificada.

- As soluções de trabalho na faixa de 0,25 a 2,0 mg L⁻¹ foram preparadas diariamente pela diluição apropriada da solução estoque com ácido nítrico (HNO₃) 0,65 mol L⁻¹.
- Uma solução de 0,5 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH) foi preparada por diluição apropriada de uma solução estoque previamente padronizada.
- O reagente cromogênico dimetilglioxima, ((CH₃CNOH)₂), 1,0 % (m/v) (DMG) foi preparado dissolvendo o sólido em 100 mL de hidróxido de sódio 0,5 mol L⁻¹.
- A solução de trietanolamina, (C₆H₁₅NO₃) 3,0 % (v/v) (TEA) foi preparada diluindo o reagente em 100 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹.
- A solução de persulfato de potássio (K₂S₂O₈), 5,0 % (m/v) (PER) foi preparada em 100 mL de água purificada.

3.1.3. Preparo das amostras

Onze amostras de plantas medicinais (folhas secas) popularmente utilizadas foram doadas pela Farmácia de Plantas Mediciniais Prof. Accorsi, localizada em Piracicaba-SP. As seguintes amostras, em massa seca, foram adquiridas: abacateiro, alecrim, alfafa, alfazema, arnica montana, camomila, canela, erva doce, eucalipto, hortelã e pata de vaca.

As amostras foram moídas por um moinho de facas, pesadas em torno de 1,0 g (em triplicata) e calcinadas por aproximadamente 6 horas a 550 °C. Após esse período, foram filtradas em 25,0 mL de ácido nítrico 0,5 mol L⁻¹.

3.1.4. Equipamentos e Acessórios

Foram empregados os seguintes equipamentos e acessórios:

- Bomba peristáltica modelo IPS-08 Ismatec, com tubos de Tygon (d.i. 0,8 mm);
- Microcomputador equipado com interface para controle e aquisição de dados PCL 711S (Advantech Cincinnati, OH, USA);
- Válvulas solenoide de três vias (NRResearch, New Jersey, NJ, USA);
- Cella de fluxo de 50 mm de caminho óptico;
- Fonte de alimentação de corrente contínua regulada;
- Interface de potência para acionamento das válvulas solenoide;
- Acrílico para construção de componentes do módulo de análises;
- Tubos de polietileno para construção de bobinas de reação e linhas de fluxo;
- Amplificadores operacionais para montagem de interface de condicionamento de sinais; LED de alto brilho e ângulo de emissão estreito ($< 20^\circ$); resistores e capacitores diversos e placa de circuito impresso em fibra de vidro.

3.1.5. Descrição dos módulos de análises

O sistema de detecção e a cela de fluxo empregados formam uma unidade compacta como pode ser visto na FIGURA 3.2. A cela de fluxo tem caminho óptico de 100 mm de comprimento e 1,2 mm de diâmetro interno. Esse sistema de detecção foi empregado para os dois módulos de análises abordados nesta parte do projeto.

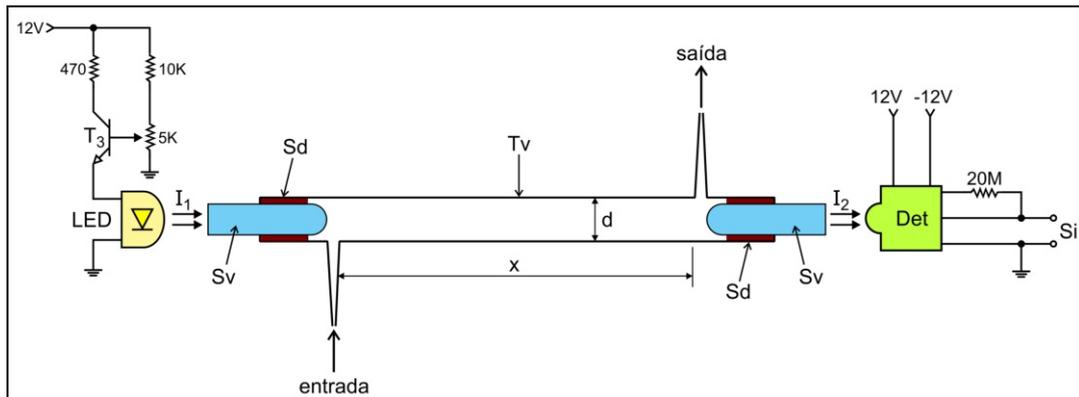


FIGURA 3.2. Diagrama da cela de fluxo acoplada ao fotômetro. Tr = transistor BC547; LED = diodo emissor de luz, $\lambda_{\max} = 490 \text{ nm}$; $x = 100 \text{ mm}$; $d = 1,2 \text{ mm}$; Tv: cela de fluxo; Sv = cilindros de vidro, diâmetro 1,2 mm, comprimento 20 mm; Sd = ponto de fusão do tubo e dos cilindros; I_1 e I_2 = feixes de radiação incidente e emergente na cela de fluxo, respectivamente; Det. = fotodetector; Si = sinal.

O primeiro módulo de análises (FIGURA 3.3) empregado nesta etapa do projeto foi constituído por quatro válvulas solenoide para a inserção das soluções no percurso analítico, uma bomba peristáltica para a propulsão dos fluidos e um sistema de detecção, onde foi empregado LED como fonte de radiação e um fotodiodo como detector. Todo o sistema foi acoplado a um microcomputador por meio de uma interface eletrônica. O programa de controle foi escrito em linguagem de programação Quick Basic 4.5 com recursos para controlar a manipulação das soluções e realizar a aquisição de dados.

O fotômetro e as válvulas solenoide são similares aos usados no procedimento para determinação de alumínio em águas para hemodiálise, então foram empregadas as mesmas interfaces e as fontes de alimentação.

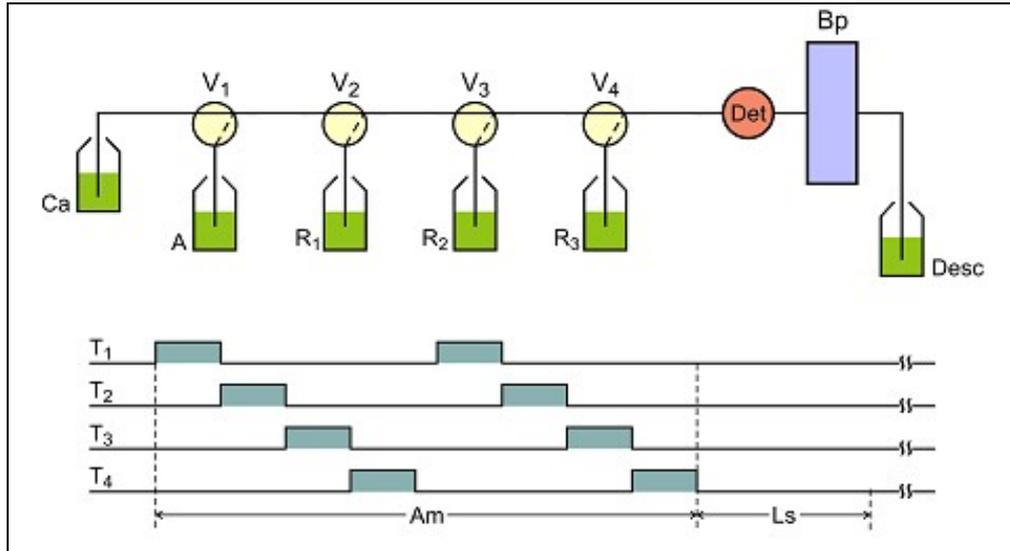


FIGURA 3.3. Diagrama do módulo de análises. V₁ - V₄ = válvulas solenoide de três vias; A = amostra; Ca = solução transportadora, NaOH 0,5 mol L⁻¹ R₁, R₂ e R₃ = reagentes TEA, PER e DMG, respectivamente; Det = fotômetro com detecção UV-VIS; Bp = bomba peristáltica, Desc = descarte de efluente; T₁ - T₄ = diagrama de tempos de acionamento das válvulas solenoide V₁, V₂, V₃ e V₄, respectivamente.

As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam o caminho de passagem de fluido com as válvulas desligadas e ligadas, respectivamente. As superfícies sombreadas em blocos azuis representam o diagrama de tempos e indicam quando a respectiva válvula está acionada.

De acordo com a configuração do módulo de análises mostrado FIGURA 3.3, todas as válvulas estão desligadas e o sistema preparado para dar início ao processo de amostragem. As alíquotas das soluções da amostra e dos reagentes são inseridas no percurso analítico sequencialmente como indicado no diagrama de tempos. Nessa ordem, são inseridas sequencialmente uma alíquota da amostra, uma de TEA, uma de PER e uma de DMG. Esta sequência constitui um ciclo de amostragem. O diagrama de tempos da FIGURA 3.3 mostra a rotina de análise para esta configuração e que foram realizados dois ciclos de amostragem, mas esse número pode ser variado para atender os requisitos do procedimento analítico.

O volume da alíquota de cada solução depende da vazão e do intervalo de tempo em que a válvula correspondente foi mantida acionada. A vazão foi mantida constante, então o intervalo de tempo de acionamento da válvula foi a variável estudada para otimizar as condições de funcionamento do processo

analítico. O volume de cada solução inserido no percurso analítico é diretamente proporcional ao tempo de acionamento da respectiva válvula.

Todas as soluções foram bombeadas mantendo a bomba peristáltica com vazão de 1 mL min⁻¹. Antes de ser iniciado o processo de amostragem, todos os canais eram preenchidos previamente com água purificada para limpeza dos mesmos e posteriormente com as soluções. Nessa etapa, as válvulas eram acionadas sequencialmente por intervalo de tempo de 30 s. Logo após a etapa de limpeza, era iniciado o procedimento de calibração do fotômetro.

A calibração era iniciada com o LED apagado e fornecia o valor do sinal de saída gerado com o fotômetro no escuro (V_0). Em seguida, era ajustado através do resistor variável para obter um sinal de aproximadamente 2000 mV (V_f) na saída do fotodetector.

Após a etapa de limpeza e de calibração do fotômetro, a sequência de operações era processada pelo microcomputador para ser iniciado o processo de amostragem e posteriormente era efetuada a aquisição de dados, cujo sinal era gerado pelo fotômetro e convertido de analógica para digital pela interface PCL 711S. Após a leitura do sinal, o microcomputador calculava a absorvância usando a EQUAÇÃO 4 indicada a seguir, a qual foi incorporada à rotina de aquisição de dados.

$$\text{Abs} = \log [(V_i - V_0) / (V_f - V_0)] \quad (\text{EQUAÇÃO 4})$$

Onde:

Abs = absorvância
 V_i = leitura em mV
 V_f = leitura de fundo de escala (2000 mV)
 V_0 = leitura tomada no escuro em mV.

Os dados gerados eram salvos em código ASCII para permitir posterior processamento. Enquanto o processo de análise estava em curso, um gráfico do sinal analítico em função do tempo era mostrado em tempo real.

O segundo módulo de análises empregado nesta etapa do projeto está descrito na FIGURA 3.4. Este sistema contempla uma estratégia mais simples que o sistema anterior. Foram empregadas minibombas solenoide que desempenham as mesmas funções das válvulas solenoide para a inserção das soluções e da bomba

peristáltica para propulsão das mesmas. Os demais dispositivos foram mantidos para esta configuração.

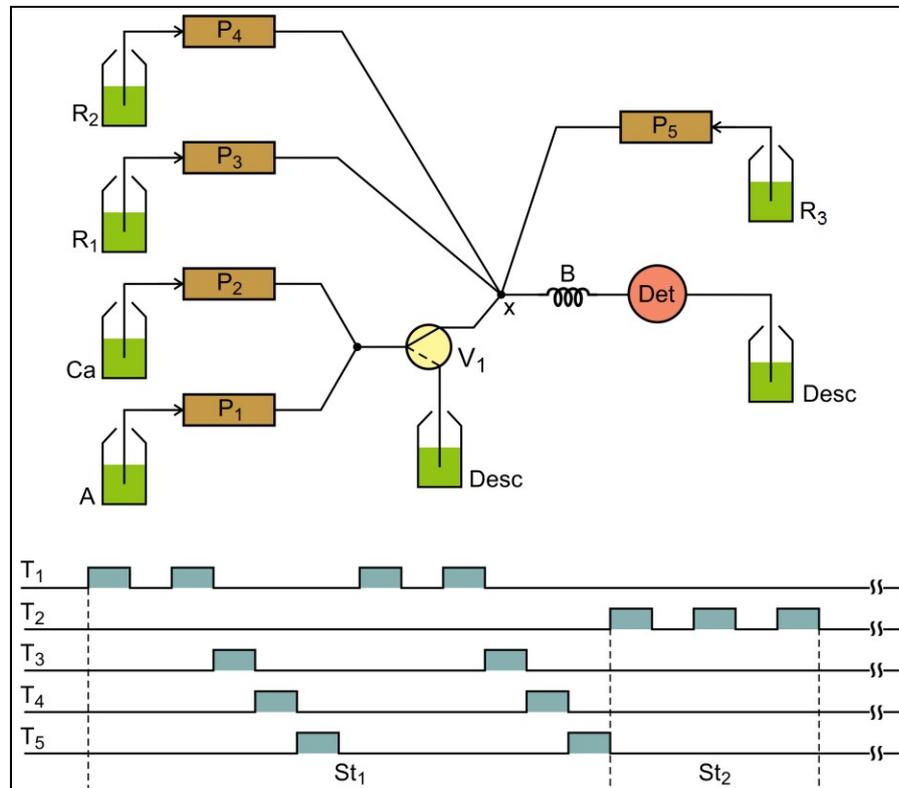


FIGURA 3.4. Diagrama do módulo de análises. P₁-P₅ = bombas solenoide; V₁ = válvula solenoide de três vias; X = confluência; A = amostra; Ca = carregador água; R₁, R₂ e R₃ = reagentes TEA, PER e DMG, respectivamente; B = reator de 100 cm (d.i. 0,8 mm); DET = fotômetro de LED, $\lambda = 490$ nm; Desc = descarte de efluente; St₁ e St₂ = etapas de amostragem e de leitura de sinal, respectivamente; T₁ – T₅ = diagrama de tempos de acionamento das bombas solenoide.

Segundo o diagrama de tempos mostrado na FIGURA 3.4, o processo de amostragem tem início quando as minibombas P₁, P₃, P₄ e P₅ são acionadas sequencialmente para inserir alíquotas da amostra e dos reagentes R₁, R₂ e R₃ no percurso analítico. No diagrama de tempos estão indicados duas sequências de acionamentos, portanto foram executados dois ciclos de amostragem. Este número pode ser variado para atender os requisitos do procedimento analítico. A válvula V₁ é mantida desligada. Finalizando a etapa de amostragem, a minibomba P₂ é acionada para inserir a solução transportadora para deslocar a zona da amostra através do reator B para o detector. A mistura entre as soluções e o

desenvolvimento da reação para formação do complexo Ni(IV)-DMG ocorre durante o transporte através do reator.

Quando é adicionada uma nova amostra, é necessário lavar os tubos que levam a solução da amostra até a minibomba e desta até o ponto de confluência X. Nesta etapa, é aplicado à minibomba P₁ 10 ciclos de acionamento (liga/desliga) e a válvula V₁ é mantida ligada, então o fluido bombeado é desviado para o descarte. Em seguida, é aplicado 5 ciclos de acionamento na minibomba P₂ para lavar e percurso entre a confluência e as válvulas solenoide. A rotina de análise para esta configuração é mostrada no diagrama de tempos da FIGURA 3.4.

3.1.6. Otimização dos sistemas em fluxo

Com o objetivo de estabelecer as condições experimentais dos procedimentos propostos, foram avaliados alguns parâmetros.

Para o primeiro sistema (FIGURA 3.3) foram investigados o tempo de inserção da amostra no percurso analítico, programados em 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 s e variação do tempo de inserção dos reagentes TEA, DMG e PER com tempos de 0,5; 1,0 e 1,5 s cada. Enquanto era otimizado a variação do tempo de inserção de um reagente, o tempo para os demais fora fixado em 1,0 s. Estes intervalos de tempo se referem a inserção de cada solução em um ciclo de amostragem. Os experimentos foram realizados estabelecendo 5, 10 e 15 ciclos de amostragem.

Para o segundo sistema (FIGURA 3.4), os seguintes parâmetros foram avaliados: influência do número de ciclos de amostra (de 1 a 5) por amostragem; influência do número de ciclos de amostragem (5, 10, 15 e 20); influência do comprimento do reator (50, 100, 150 e 200 cm); influência da concentração do reagente dimetilglioxima (0,5; 1,0 e 1,5 % (m/v)) e influência da concentração do reagente persulfato de potássio (4,0; 5,0 e 6,0% (m/v)). Foi utilizada a concentração máxima de 3% (m/v) do agente mascarante TEA para este estudo, sendo suficiente para evitar o efeito dos potenciais interferentes, como o ferro, por exemplo. Ainda assim, o número de ciclos de inserção da solução de TEA sempre foi igual ao da amostra.

Com o primeiro módulo de análises mostrado na FIGURA 3.3, foi avaliado o tempo de inserção dos reagentes DMG, PER e TEA no percurso analítico via acionamento das válvulas solenoide correspondentes. Com o intuito de minimizar o volume de efluente gerado, foi avaliada a variação da concentração desses reagentes empregando o segundo sistema.

3.2. Resultados e discussão

3.2.1. Avaliação da estequiometria da reação – Método das Variações Contínuas

O Método das Variações Contínuas foi realizado para estimar a estequiometria da reação. O ensaio foi realizado da mesma forma como descrito na FIGURA 2.1 do item 2.2.1 do capítulo 2. O resultado mostrou que o complexo Ni(IV)-DMG produzido apresentou a proporção 1:2 (metal:ligante), que corresponde ao máximo de absorção mostrado na FIGURA 3.5. Os espectros representados pelas cores preta, vermelha e azul, correspondem as proporções 1:9; 2:8 e 3:7 (M:L), respectivamente, e apresentaram menor absorção, indicando que estas proporções não atendiam a estequiometria de formação do complexo. Os registros dos demais resultados coincidem com a linha de base, indicando que a concentração do composto formado não era suficiente para ser detectado.

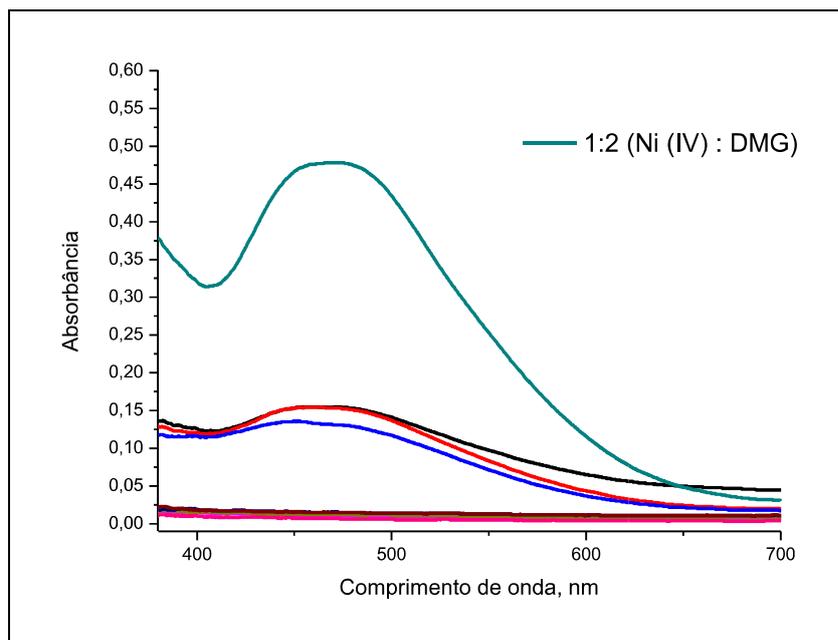


FIGURA 3.5. Espectros de absorção do complexo Ni(IV)-DMG (pH = 9,0) obtidos pelo Método das Variações Contínuas.

3.2.2. Estudo da cinética da reação

O reagente persulfato de potássio (PER) é um agente oxidante forte que foi empregado para acelerar o desenvolvimento da reação. Desta forma, foi feito um teste na bancada para averiguar esse processo. O resultado mostrou que quando foi adicionado o reagente PER, rapidamente a solução ficou colorida (FIGURA 3.6 A). Entretanto, quando o teste foi realizado na ausência deste reagente, a coloração da solução foi observada após um intervalo de tempo de doze minutos. Isto evidenciou o quanto a cinética da reação é lenta, quando não foi empregado agente oxidante. Segundo a literatura, o uso do oxidante não tem efeito sobre a cor do composto formado ¹⁰², portando não deve afetar a faixa de absorção de radiação eletromagnética do composto.

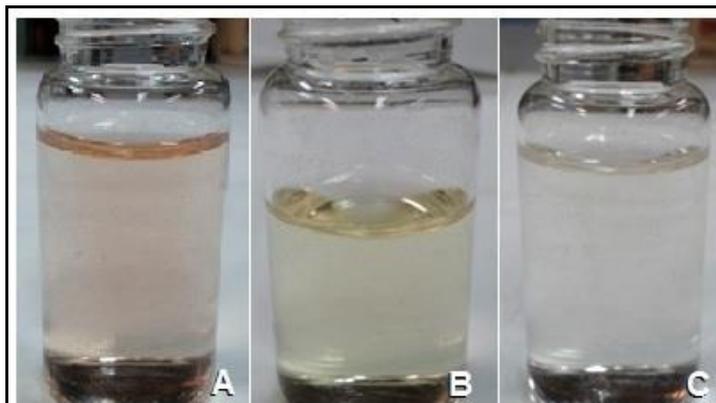


FIGURA 3.6. Mudança de cor em relação a proporção Ni(IV)-DMG com o emprego do Método das Variações Contínuas (FIGURA 3.5). **A**: proporção 1:2 – cor obtida após formação do complexo Ni(IV)-DMG (pH=9,11); **B**: cor obtida pelas proporções representadas pelos espectros de absorção de cores preta, azul e vermelha mostrados na FIGURA 3.5 (pH=6,82); **C**: ausência de cor representada pelas demais proporções que não apresentaram absorção (pH=3,94).

A cinética da reação também foi avaliada quando foi empregada a estratégia de parada de fluxo. A FIGURA 3.7 mostra o registro de sinal obtido com a bomba peristáltica em funcionamento, vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, e quando o fluxo foi interrompido com a parada da bomba peristáltica. Observa-se que o máximo do registro obtido com a bomba peristáltica em movimento ocorreu em um intervalo de tempo em torno de 60 s. Com a parada de fluxo, pode-se estimar que o máximo de sinal foi alcançado em um intervalo de tempo de 100 s.

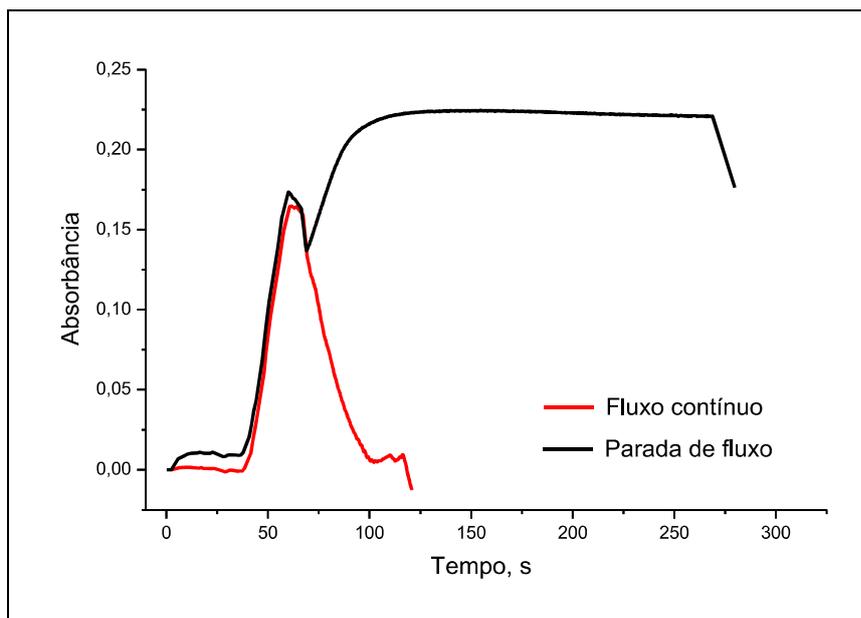


FIGURA 3.7. Estudo da cinética da reação para a formação do complexo Ni (IV)-DMG

3.2.3. Sistema em fluxo – Primeira configuração

3.2.3.1. Efeito do tempo para inserção da amostra

O tempo de acionamento da válvula solenoide para inserir o volume da amostra no percurso analítico foi avaliado em 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 s. O estudo foi realizado com duas soluções padrão de níquel com concentrações de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ e os resultados estão dispostos na FIGURA 3.8. Enquanto o tempo de inserção da amostra era otimizado, os demais tempos de acionamento das válvulas para inserir os demais reagentes foram fixados em 1,0 s.

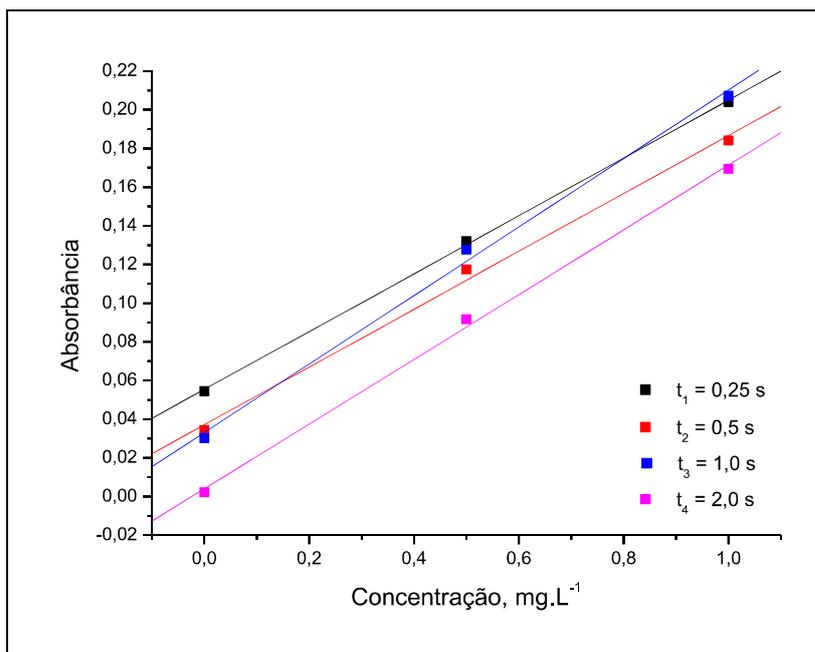


FIGURA 3.8. Estudo do tempo de inserção da amostra.

Uma análise qualitativa das curvas mostradas na FIGURA 3.8 percebe-se que as curvas referentes aos intervalos de tempo de 1,0 e 2,0 s são paralelas, portanto, as duas condições fornecem a mesma sensibilidade. Observa-se que o diferencial entre estas curvas é sinal do branco, que é maior para o tempo de 1,0 s. Os experimentos foram realizados mantendo a vazão da bomba constante ($17 \mu\text{L s}^{-1}$), portanto, o volume de cada alíquota da amostra inserido passou de 17 para $34 \mu\text{L}$, causando diluição do reagente, o que resultou no decréscimo do sinal do branco. Os resultados mostrados na TABELA 3.1 corroboram com esta argumentação. Então, tomando-se a sensibilidade como critério de avaliação, o tempo de 1,0 s foi selecionado.

TABELA 3.1. Resultado obtido com o tempo de inserção da amostra mostrado na FIGURA 3.8.

Tempo de inserção da amostra (s)	Coefficiente angular (sensibilidade)	Coefficiente de correlação (r)	Equação da reta
0,25	0,1346	0,9989	$A = 0,0617 + 0,1346.C_{\text{Ni(IV)}}$
0,5	0,1212	0,9950	$A = 0,0489 + 0,1212.C_{\text{Ni(IV)}}$
1,0	0,1498	0,9969	$A = 0,0446 + 0,1498.C_{\text{Ni(IV)}}$
2,0	0,1453	0,9979	$A = 0,0132 + 0,1453.C_{\text{Ni(IV)}}$

*Absorbância

3.2.3.2. Efeito da variação dos tempos de inserção dos reagentes TEA, PER e DMG

Os tempos de acionamento das válvulas solenoide para inserir os reagentes TEA, PER e DMG foram estabelecidos em 0,5; 1,0 e 1,5 s. Foi adotado o mesmo procedimento do estudo do tempo de inserção da amostra, ou seja, variando para uma solução de reagente de cada vez, mantendo os demais em 1,0 s. Os resultados obtidos são mostrados nas FIGURAS 3.9, 3.10 e 3.11.

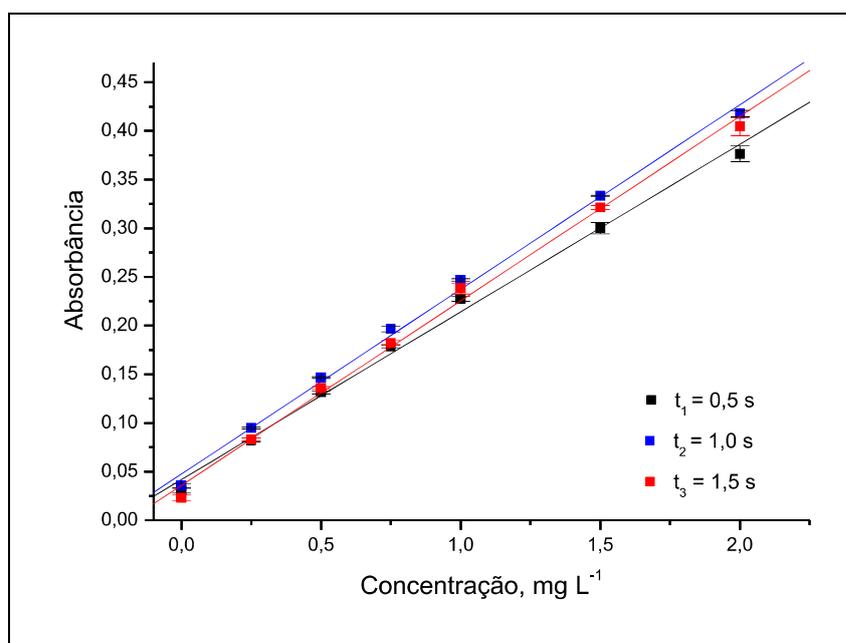


FIGURA 3.9. Efeito da variação do tempo de inserção de TEA.

As curvas da FIGURA 3.9 mostram uma boa linearidade e indicam que o volume da solução de TEA não tem efeito significativo na magnitude do sinal gerado. Entretanto, há um fato a ser considerado: o volume das alíquotas da solução de TEA variou de 8,5 a 25,5 μ L, entretanto, a curva relacionada ao volume de alíquota de 8,5 μ L apresentou menor inclinação. Considerando o efeito de diluição esperado, ela deveria estar em posição superior. Outro dado importante é que a

curva relacionada às alíquotas com volume de 25,5 μL apresenta uma inclinação intermediária, quando seria esperado uma menor inclinação devido ao efeito de diluição. Entretanto, do ponto vista prático, o efeito não é significativo. Portanto foi selecionado para os experimentos seguintes o intervalo de tempo de 1,0 s (17 μL) para inserção do volume da solução mascarante inserido em cada ciclo de amostragem.

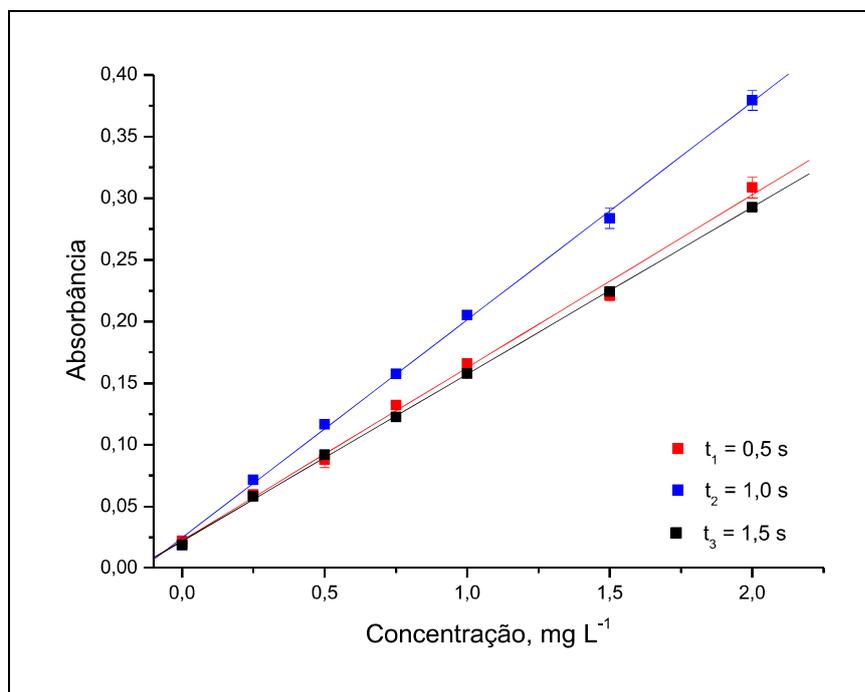


FIGURA 3.10. Efeito da variação do tempo de inserção de PER.

Conforme escrito na FIGURA 3.10, foram estabelecidos os intervalos de tempo de 0,5 1,0 e 1,5 s para inserção da solução de persulfato de potássio, portanto, analogamente, os volumes da solução inseridos por ciclo de amostragem foram 8,5, 17 e 25,5 μL . Considerando a inclinação das curvas analíticas como parâmetro, verifica-se que a melhor resposta foi obtida quando alíquota inserida foi 17 μL . A presença do oxidante no meio reacional afeta a cinética da reação, então possivelmente o emprego do volume de 8,5 μL prejudicou o desenvolvimento da

reação, enquanto que para o volume de 25,5 μL pode ter ocorrido efeito de diluição. Considerando estes resultados, o intervalo de tempo de 1,0 s foi selecionado.

Experimentos similares foram realizados programando intervalos de tempo de 0,5; 1,0 e 1,5 s para inserção da solução de DMG, e os resultados são mostrados na FIGURA 3.11.

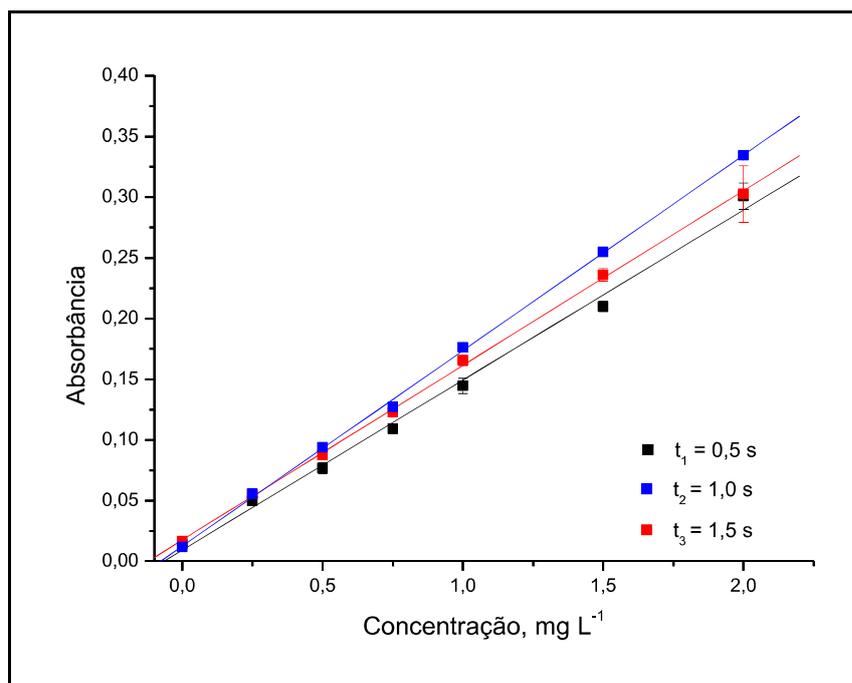


FIGURA 3.11. Efeito da variação do tempo de inserção de DMG.

Ao analisar a FIGURA 3.11, observa-se um comportamento semelhante ao observado na FIGURA 3.10. Tomando a inclinação da curva analítica como parâmetro, o melhor resultado foi obtido com tempo de 1,0 s, o qual corresponde a inserção de um volume de 17 μL . Isto mostra que se fossem empregados tempos maiores, o reagente DMG seria adicionado em excesso, e não resultaria em ganho de sinal. Os valores numéricos relacionados com as curvas analíticas das FIGURAS 3.9, 3.10 e 3.11 são mostrados na TABELA 3.2, onde se observa que em todos os casos a melhor resposta foi obtida quando o intervalo de tempo para inserir a alíquota da solução foi de 1,0 s.

TABELA 3.2. Resultado obtido com a otimização do tempo de inserção dos reagentes TEA, PER e DMG, representados pelas FIGURAS 3.9, 3.10 e 3.11, respectivamente.

Tempo inserção (s)	Coeficiente angular			Coeficiente de correlação (r)		
	TEA	PER	DMG	TEA	PER	DMG
0,5	0,1722	0,1402	0,1401	0,9973	0,9981	0,9972
1,0	0,1895	0,1768	0,1610	0,9982	0,9994	0,9997
1,5	0,1893	0,1354	0,1439	0,9978	0,9998	0,9996

Estabelecidas estas condições operacionais, um novo conjunto de soluções e padrões com concentração na faixa de 0,25 a 2,0 mg L⁻¹ Ni (II) foram preparados e processados, visando avaliar a resposta do sistema como um todo. O resultado obtido é mostrado na FIGURA 3.12.

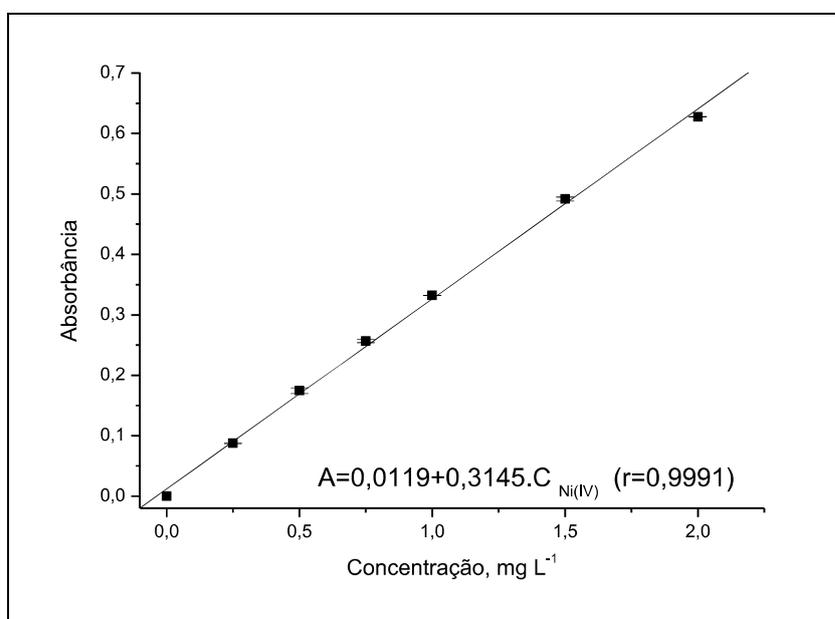


FIGURA 3.12. Curva analítica obtida após otimização do sistema representado pela FIGURA 3.3.

Como pode ser visto na FIGURA 3.12, a curva analítica obtida mostrou uma boa sensibilidade e uma boa linearidade na faixa de 0,25 a 2,0 mg L⁻¹ Ni (II). Para averiguar a precisão e a estabilidade do sistema, onde se inclui o módulo de análises, o fotômetro e o desenvolvimento da reação, foi feito teste de repetibilidade com as soluções do branco e a solução padrão de 0,75 mg L⁻¹ Ni (II), com dez repetições para ambos, cujo resultado é mostrado na FIGURA 3.13.

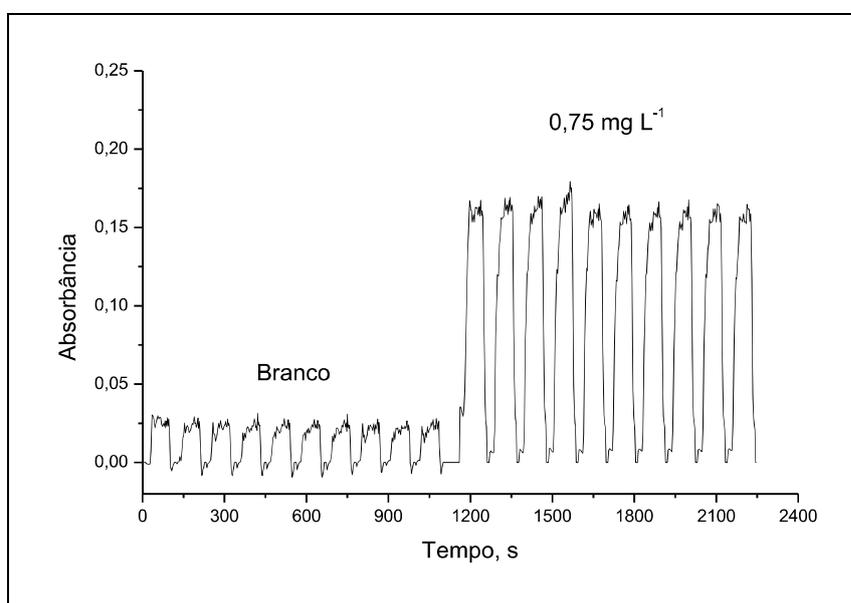


FIGURA 3.13. Registro dos sinais transientes do teste de estabilidade. Primeiro conjunto de registros à esquerda corresponde aos sinais gerados com o branco e outro conjunto corresponde aos sinais gerados com solução padrão 0,75 mg L⁻¹ Ni (II).

A partir dos resultados discutidos até o presente, foram obtidas as características analíticas do sistema proposto, apresentadas na TABELA 3.3.

Tabela 3.3. Características analíticas do primeiro procedimento empregado para determinação de Ni (II) em digeridos de plantas medicinais.

CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	
Faixa linear (mg L ⁻¹ Ni (II))	0,25 - 2,0
Equação da reta	$A=0,0119 + 0,3145.C_{Ni(IV)}$ (r =0,9991)
Limite de detecção (mg L ⁻¹ Ni (II)), critério (3σ)	0,012
Limite de quantificação (mg L ⁻¹ Ni (II))	0,038
Coefficiente de variação (%)	3,5 (n = 10)
Consumo dos reagentes (mg)*	0,02; 0,03 e 0,91
Frequência de amostragem (h ⁻¹)	28

*TEA, PER e DMG, respectivamente.

3.2.4. Sistema em fluxo – Segunda configuração

Apesar do sistema descrito na FIGURA 3.3 ter apresentado um bom desempenho, a sua configuração foi modificada a fim de obter uma melhor resposta em termos de frequência de amostragem. Dessa forma, para o segundo módulo de análises (FIGURA 3.4) foram mantidas as mesmas condições de trabalho.

3.2.4.1. Influência do número de ciclos para inserção da amostra

Nesta abordagem, cada ciclo corresponde a um pulso de tensão aplicado à minibomba solenoide. O estudo foi realizado programando o computador para variar de 1 a 5 o número de ciclos de inserção de uma solução com

concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Ni (II), mantendo um ciclo de inserção para as outras soluções.

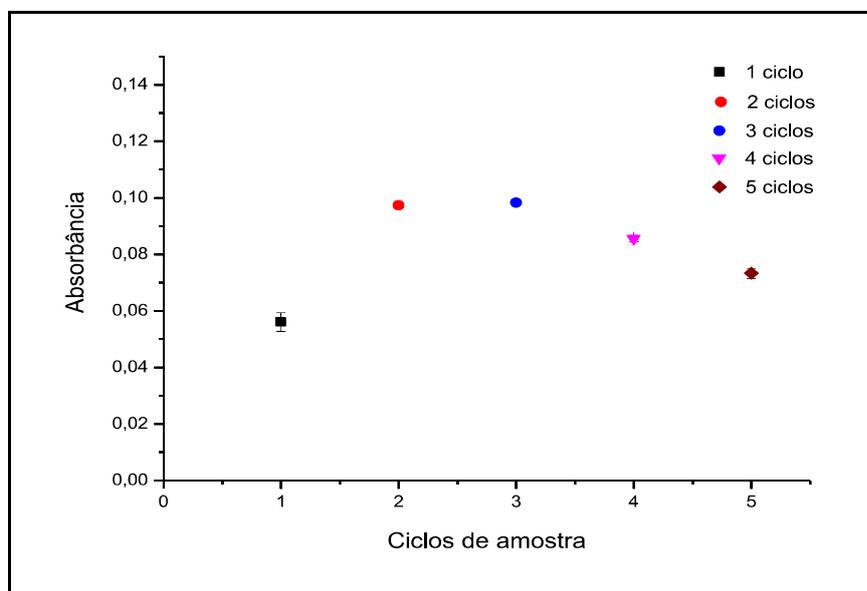


FIGURA 3.14. Efeito da variação do número de ciclo de amostra.

O resultado mostrado na FIGURA 3.14 indica valor máximo para 2 e 3 ciclos de inserção da amostra, que corresponde aos volumes de 80 e 120 μL , visto que a minibomba solenoide usada liberava 40 μL por ciclo de inserção. Podemos atribuir o decréscimo de sinal para volumes maiores a dois possíveis efeitos: falta de reagente e/ou mistura incompleta. Quando era aplicado 4 ciclos de inserção da solução da amostra, o volume inserido era de 160 μL . O reator empregado possuía diâmetro interno de 0,8 mm, portanto, a alíquota da solução ocupava um espaço do reator de 326 mm, que era praticamente um terço do mesmo. No processo de multicomutação a mistura entre as alíquotas das soluções da amostra e do reagente ocorre por difusão a partir da interface de contato, portanto, quando a alíquota da solução ocupa um espaço muito longo, o reagente pode não se distribuir em toda extensão da amostra, causando decréscimo do sinal monitorado. Baseando-se nestes argumentos, foram selecionados três ciclos de inserção da amostra (e do reagente TEA) por ciclo de amostragem, mantendo para as soluções dos demais reagentes um ciclo de inserção por ciclo de amostragem.

3.2.4.2. Influência do número de ciclos de amostragem

O ciclo de amostragem foi definido como uma sequência de eventos em que é inserida uma alíquota da amostra e uma alíquota de cada uma das soluções de reagentes. A partir dos experimentos descritos no item anterior, foi estabelecido que um ciclo de amostragem compreendia três ciclos de inserção da amostra e um ciclo de inserção de cada uma das soluções de reagentes. Em sistemas de análises em fluxo o volume da zona da amostra afeta a magnitude do sinal gerado, portanto este é um parâmetro que deve ser investigado. No módulo de análises proposto, o volume da zona da amostra pode ser aumentado com o aumento o número de ciclos de amostragem. Visando estabelecer a condição de trabalho mais apropriada, experimentos foram realizados com 5, 10, 15 e 20 números de ciclos de amostragem, mas mantendo fixos três ciclos de inserção da amostra e do reagente TEA e um ciclo de inserção para cada solução de reagentes PER e DMG. O resultado é mostrado na FIGURA 3.15.

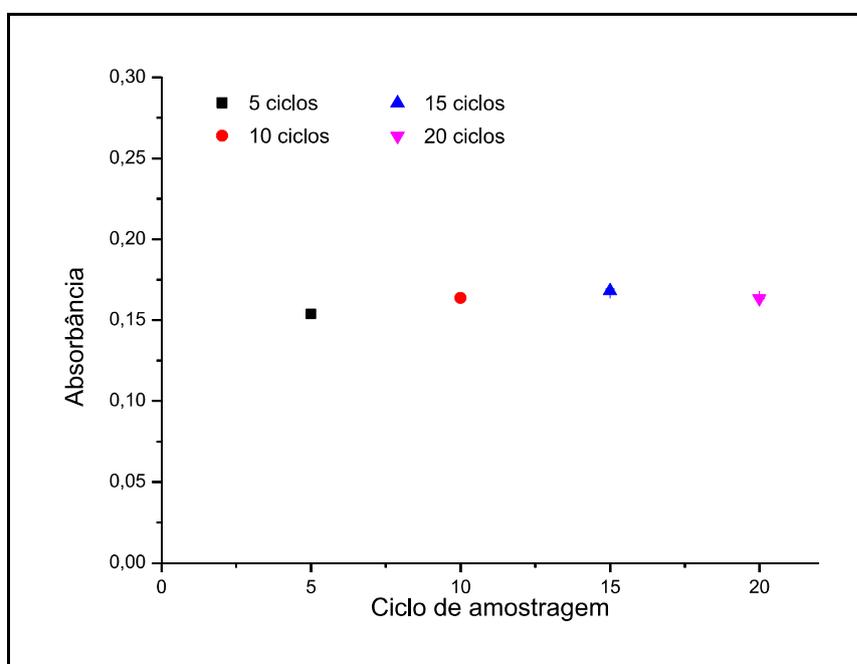


FIGURA 3.15. Efeito da variação do número de ciclos de amostragem.

De acordo com a FIGURA 3.15, observa-se que entre 5 a 10 ciclos de amostragem ocorreu um pequeno ganho de sinal, o qual foi mantido praticamente constante para os demais. A bobina de reação tem um volume interno de 500 μL , o caminho óptico da cela de fluxo tem um volume de 115 μL , então a soma dos volumes das conexões daria um volume de aproximadamente 100 μL , portanto, o volume estimado do percurso analítico seria de 715 μL . Em cada ciclo de amostragem era inserido um volume 240 μL , portanto, quando era aplicado cinco ciclos de amostragem, era inserido um volume de 1200 μL . Este fenômeno é conhecido em sistemas de análises em fluxo, pois quando o volume da zona da amostra supera o volume do percurso analítico, a dispersão não tem efeito significativo, então o aumento da zona da amostra não resulta em aumento do sinal gerado. Neste caso, consideramos o volume da cela de fluxo, pois ele é grande suficiente para atuar na dispersão, o que em geral é desprezível quando o volume da cela de fluxo é muito menor que o do percurso analítico.

Adicionalmente, o coeficiente angular variou de 0,2989 para 0,3305 quando foram empregados 5 e 10 ciclos, respectivamente, mas uma diferença não significativa foi observada quando o número de ciclos foi variado de 10 para 15 (de 0,3305 para 0,3404). Quando mais 5 ciclos foram adicionados, totalizando em 20, o coeficiente decresceu para 0,3301. Estes resultados demonstram um comportamento semelhante ao esperado na condição de volume infinito, em que o aumento do volume da zona da amostra não causa aumento do percurso analítico. Desta forma, dez ciclos foram suficientes para obter o resultado esperado com sensibilidade suficiente para dar prosseguimento ao estudo.

3.2.4.3. Influência da concentração dos reagentes DMG e PER

Nos estudos anteriores obtidos com o primeiro sistema para determinação do níquel, os reagentes foram otimizados por tempo de inserção no percurso analítico. Nesta nova configuração, as minibombas solenoide inseriam as alíquotas das soluções no percurso analítico controlando o número de pulsos elétricos aplicados às mesmas. Então, foram avaliados a variação de concentração de 0,5; 1,0 e 1,5 % de DMG e 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 % de PER. Para inserção da

amostra e do reagente TEA, foram fixados 3 pulsos e para as soluções dos reagentes DMG e PER, foi programado 1 pulso (ciclo de inserção) para as minibombas usadas para manipular a inserção destas soluções. Os resultados são mostrados nas FIGURAS 3.16 e 3.17 e nas TABELAS 3.4 e 3.5.

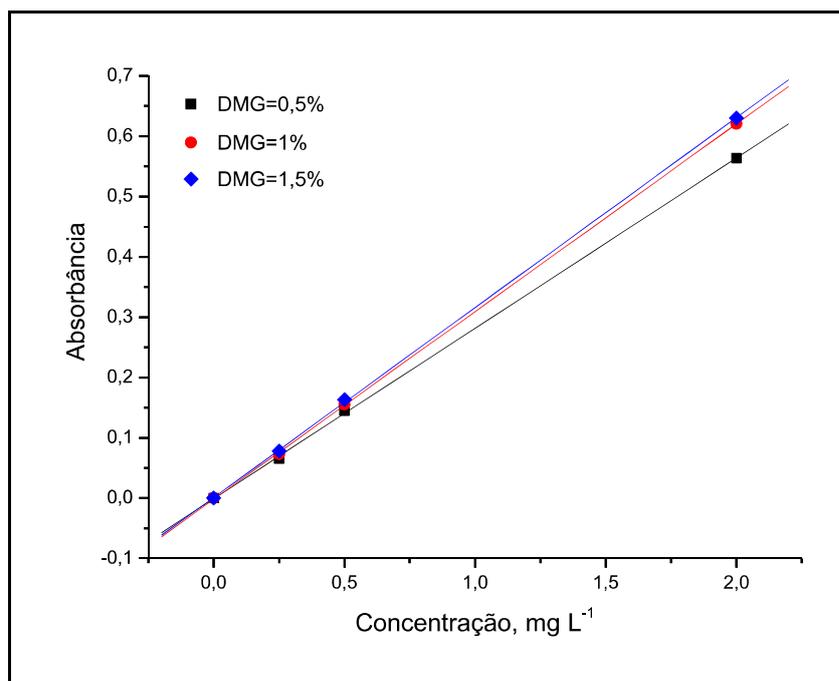


FIGURA 3.16. Efeito da variação da concentração de DMG.

TABELA 3.4 - Resultado obtido com a variação da concentração de DMG mostrado na FIGURA 3.16.

Concentração de DMG (%)	Coefficiente angular (sensibilidade)	Coefficiente de correlação (r)	Equação da reta
0,5	0,2823	0,9999	$A = -0,0008 + 0,2823 \cdot C_{Ni(IV)}$
1,0	0,3101	0,9999	$A = -0,0017 + 0,3101 \cdot C_{Ni(IV)}$
1,5	0,3147	0,9999	$A = 0,0014 + 0,3147 \cdot C_{Ni(IV)}$

As curvas obtidas na FIGURA 3.16 e os resultados dispostos na TABELA 3.4 mostram que não há diferença significativa da sensibilidade quando empregadas as concentrações de 1,0 e 1,5%. Entretanto, há um leve acréscimo

entre as concentrações de 0,5 e 1,0%. Dessa forma, foi estabelecida a concentração de 1,0 % de DMG, sendo suficiente para complexar o metal.

Ao analisar as curvas referentes às concentrações de PER, verifica-se que não há diferença significativa entre as curvas relacionadas às concentrações 5,0 e 6,0 %, como pode ser observado na FIGURA 3.17. Experimentos iniciais demonstraram que o persulfato de potássio melhora a cinética da reação de formação do complexo, então é possível que uma menor concentração deste reagente não contribuiu com a cinética necessária para o desenvolvimento da reação no tempo de residência da amostra no percurso analítico do módulo de análises. Baseado neste resultado a concentração de 5 % foi selecionada.

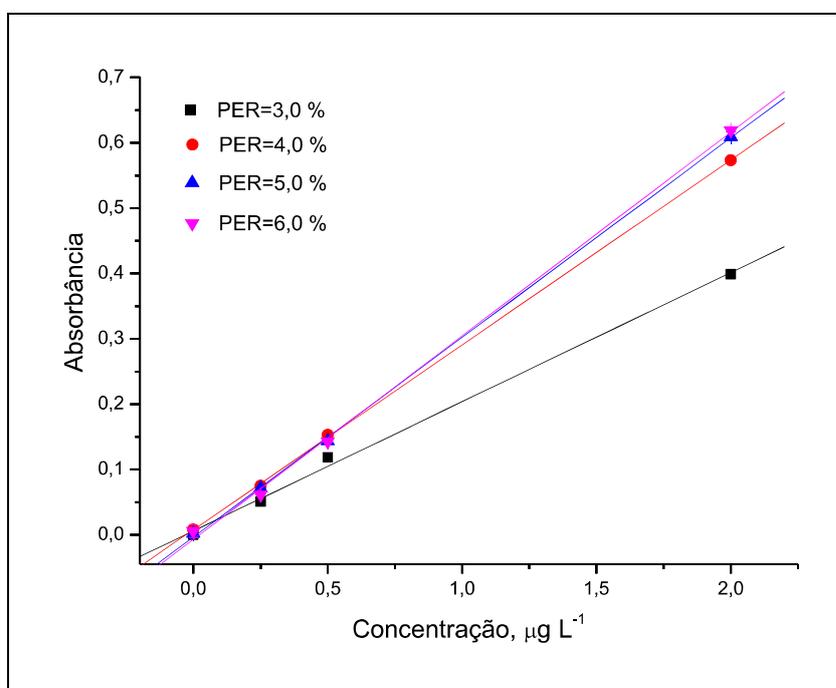


FIGURA 3.17. Efeito da variação da concentração de PER.

TABELA 3.5 - Resultado obtido com a variação da concentração de PER mostrado na FIGURA 3.17.

Concentração de PER (%)	Coefficiente angular (sensibilidade)	Coefficiente de correlação (r)	Equação da reta
3,0	0,1977	0,9987	$A = 0,0061 + 0,1977.C_{Ni(IV)}$
4,0	0,2829	0,9999	$A = 0,0079 + 0,2829.C_{Ni(IV)}$
5,0	0,3054	0,9999	$A = -0,0033 + 0,3054.C_{Ni(IV)}$
6,0	0,3116	0,9994	$A = -0,0071 + 0,3116.C_{Ni(IV)}$

3.2.5. Desempenho do sistema proposto

Uma vez definido os parâmetros experimentais discutidos nos itens precedentes, foi verificado o desempenho global do sistema proposto. Para isto, um conjunto de soluções de referências foi processado e o resultado é mostrado na FIGURA 3.18.

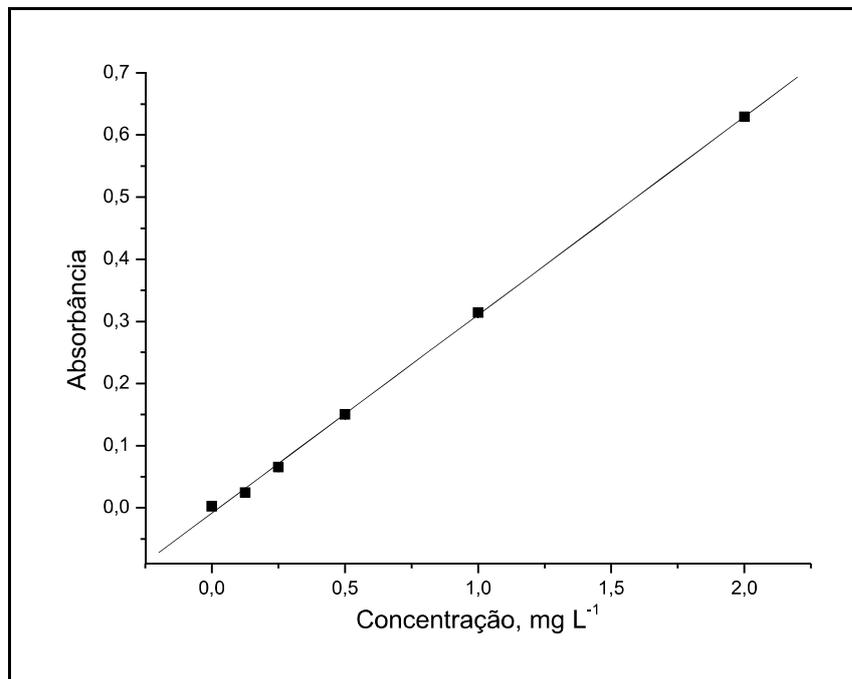


FIGURA 3.18. Curva analítica do complexo Ni²⁺ - DMG

O desempenho global do sistema proposto é função da resposta do fotômetro, do módulo de análises, do *software* de controle e aquisição e do procedimento analítico. Individualmente, todos responderam de forma adequada. A curva mostrada na FIGURA 3.18 é o coroamento dessa etapa do trabalho, pois apresentou ótima correlação linear e sensibilidade para determinar níquel em digeridos de material vegetal. As características analíticas do sistema estão descritas na TABELA 3.5.

Tabela 3.62. Características analíticas do procedimento proposto para determinação de Ni(IV) em digeridos de plantas medicinais com o novo sistema.

CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	
Faixa linear (mg L ⁻¹ Ni (IV))	0,13 - 2,0
Equação da reta	A= -0,0085 + 0,3190.C _{Ni(IV)} (r=0,9996)
Limite de detecção (mg L ⁻¹ Ni (IV)), critério (3σ)	0,04
Limite de quantificação (mg L ⁻¹ Ni (IV))	0,14
Coeficiente de variação (%)	1,9257 (n=10)
Consumo dos três reagentes (mg)*	2,40; 2,00 e 0,40
Frequência de amostragem (h ⁻¹)	42

*TEA, PER e DMG, respectivamente. Todos por determinação.

3.3. Conclusão

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que os dois procedimentos analíticos desenvolvidos neste estudo são apropriados para a determinação de níquel em digeridos de material vegetal. Além disso, atenderam aos conceitos preconizados pela Química Limpa, consumindo reduzida quantidade de reagentes, diminuindo também o volume de efluente gerado. Quanto ao segundo módulo de análises, observa-se que o mesmo apresentou uma frequência de amostragem 1,5 vezes maior que o primeiro. Além disso, emprega dispositivos para propulsão de fluido de menor custo.

CAPÍTULO 4

Conclusão

4. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que os métodos empregados para determinação de Al (III) em soluções destinadas para tratamento de hemodiálise e Ni (II) em digeridos de plantas são eficazes e com sensibilidade suficiente. Além disto, houve uma mínima geração do volume de efluentes, ou seja, atenderam aos conceitos preconizados pela Química Limpa.

Os sistemas desenvolvidos apresentaram excelente desempenho, como estabilidade, baixo ruído, pouco consumo de soluções e um bom gerenciamento das mesmas.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F. & SILVEIRA, C. C. "“Green Chemistry” - os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa". *Química Nova*, 26(1):123, 2003.
2. KOEL, M. & KALJURAND, M. "Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry". *Pure Appl. Chem.*, 78(11):1993, 2006.
3. TUNDO, P.; ANASTAS, P.; StC. BLACK, D.; BREEN, J.; COLLINS, T.; MEMOLI, S.; MIYAMOTO, J.; POLYAKOFF, M. & TUMAS, W. "Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview". *Pure Appl. Chem.*, 72(7):1207, 2000.
4. ARMENTA, S.; GARRIGUES, S. & De La GUARDIA, M. "Green Analytical Chemistry". *Trends in Analytical Chemistry*, 27(6):427, 2008.
5. MELCHERT, W. R.; REIS, B. F. & ROCHA, F. R. P. "Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review". *Analytica Chimica Acta*, 714:8, 2012.
6. ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A. & FATIBELLO FILHO, O. "Flow analysis strategies to greener analytical chemistry. An overview". *Green Chemistry*, 3: 216, 2001.
7. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. & NIEMAN, T. A. "Princípios de análise instrumental". 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.
8. MELCHERT, W. R.; ROCHA, F. R. P.; RAIMUNDO Jr, I. M. & REIS, B. F. "Construção de uma cela de fluxo de longo caminho óptico para medidas espectrofotométricas". *Química Nova*, 31(2):427, 2008.
9. PIRES, C. K.; REIS, B. F.; MORALES-RUBIO, A & de La GUARDIA, M. "Speciation of chromium in natural waters by micropumping multicommutated light emitting diode photometry". *Talanta (Oxford)*, 72:1370, 2007.
10. DIAS, T. R. & REIS, B. F. "A LED based photometer for solid phase photometry: zinc determination in pharmaceutical preparation employing a multicommutated flow analysis approach". *J. Braz. Chem. Soc.*, 23(8): 1515, 2012.
11. VIEIRA, G. P.; CRISPINO, C. C.; PERDIGÃO, S. R. W. & REIS, B. F. "An environmentally friendly photometric procedure for ammonium determination in rainwater employing a multicommutation approach". *Analytical methods*, 5(2):489, 2013.
12. VALCÁRCEL, M. & LUQUE de CASTRO, M. D. "Techniques and instrumentation in analytical chemistry. Automatic methods of analysis", vol. 9, Amsterdam: Elsevier, 1988, 560p.

13. ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; TOWNSHEND, A. & WORSFOLD, P. J. "Flow analysis with spectrophotometric and luminometric detection". Amsterdam: Elsevier, 2012. 471p.
14. SKEGGS, L. T. "An automatic method for colorimetric analysis". *Am. J. Clin. Pathol.*, 28(3): 311, 1957.
15. SKEGGS, L. T. Jr; "Persistence . . . and prayer: From the artificial kidney to the AutoAnalyzer". *Clinical Chemistry*, 46(9):1425, 2000.
16. ROSENFELD, L. "A Golden age of clinical chemistry: 1948-1960". *Clinical Chemistry*, 46(10):1705, 2000.
17. ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S. & SANTOS, J. L. M. "Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends". *Analytica Chimica Acta*, **468**:119, 2002.
18. REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C. & LAPA, R. A. "Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests". *Analytica Chimica Acta*, **293**:129, 1994.
19. RUZICKA, J. & MARSHALL, G. D. "Sequential injection - a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays". *Analytica Chimica Acta*, 237(2):329, 1990.
20. DINIZ, P. H. G. D.; ALMEIDA, L. F.; HARDING, D. P. & ARAÚJO, M. C. U. "Flow-batch analysis". *Trends in Analytical Chemistry*, **35**:39, 2012.
21. MAYA, F.; ESTELA, J. M. & CERDÀ, V. "Multisyringe flow injection technique for development of green spectroscopic analytical methodologies". *Spectroscopy Letters*, **42**:312, 2009.
22. LAPA, R. A. S.; LIMA, J. L. F.; REIS, B. F.; SANTOS, J. L. M. & ZAGATTO, E. A. G. "Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities". *Analytica Chimica Acta*, 466(1):125, 2002.
23. RUZICKA, J. & HANSEN, E. H. "Flow injection analyses: Part 1. New concept of fast continuous flow analysis". *Analytica Chimica Acta*, 78(1):145, 1975.
24. CERDÀ, A. & CERDÀ, V. "An introduction to flow analysis". Flow Analysis XI, Palma de Mallorca, Spain, 2009, 218p.
25. ARRUDA, M. A. Z. & COLLINS, C. H.; "Informações essenciais para a caracterização de um sistema de análise em fluxo". *Química Nova*, 28(4):739, 2005.
26. REIS, B. F.; GINÉ, M. F. & KRONKA E. A. M. "A análise química por injeção em fluxo contínuo". *Química Nova*, 12(1):82, 1989.
27. ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B. & REIS, B. F. "Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo". *Química Nova*, 23(1):119, 2000.

28. LAPA, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, B. F. & SANTOS, J. L. M. "Continuous sample recirculation in an opened-loop multicommutated flow system". *Analytica Chimica Acta*, **377**:103, 1998.
29. KRONKA E. A. M.; REIS, B. F.; VIEIRA, J. A.; BLANCO, T. & GERVASIO, A. P. G. "Multicomutação e amostragem binária em análise química em fluxo. Determinação espectrofotométrica de ortofosfato em águas naturais". *Química Nova*, **20**(4):372, 1997.
30. ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B. & REIS, B. F. "A multicommutation-based flow system for multi-element analysis in pharmaceutical preparations". *Talanta*, **55**:861, 2001.
31. CERDÀ, V. & PONS, C. "Multicommutated flow techniques for developing analytical methods". *Trends in Analytical Chemistry*, **25**(3):236, 2006.
32. FERES, M. A.; FORTES, P. R.; ZAGATTO, E. A.; SANTOS, J. L. & LIMA, J. L. "Multi-commutation in flow analysis: recent developments and applications". *Analytica Chimica Acta*, **618**(1):1, 2008.
33. LIMA, M. B.; BARRETO, I. S.; ANDRADE, S. I. E.; NETA, M. S. S.; ALMEIDA, L. F. & ARAÚJO, M. C. U. "Photometric determination of phosphorus in mineralized biodiesel using a micro-flow-batch analyzer with solenoid micro-pumps". *Talanta*, **98**:118, 2012.
34. ANDRADE, R. A. N.; ANDRADE, S. I. E.; MARTINS, V. L.; MOREIRA, P. N. T.; COSTA, D. J. E.; LYRA, W. S. & ARAÚJO, M. C. U. "A flow-batch luminometer". *Microchemical Journal*, **108**:151, 2013.
35. HONORATO, R. S.; ARAÚJO, M. C. U.; LIMA, R. A. C.; ZAGATTO, E. A. G.; LAPA, R. A. S. & LIMA, J. L. F. C. "A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimization algorithm for end point search". *Analytica Chimica Acta*, **396**:91, 1999.
36. BORGES, S. S. & REIS, B. F. "An Environmental friendly procedure for photometric determination of hypochlorite in tap water employing a miniaturized multicommutated flow analysis setup". *Journal of automated methods and management in chemistry*, **2011**:1, 2011.
37. NAYAK, P. "Aluminum: impacts and disease (REVIEW)". *Environmental Research Section A*, **89**:101, 2002.
38. GARCIA, S. C.; GIODA, A. & NASCIMENTO, D. B. "O problema da contaminação na determinação de traços de alumínio". *Química Nova*, **20**(4): 407, 1997.
39. SAVORY, J.; BERTHOLF, R. L. & WILLS, M. R. "Aluminium toxicity in chronic renal insufficiency". *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, **14**(3): 681, 1985.

40. AZHARI, S. J. & AMIM, A. S. "Spectrophotometry: high sensitive and selective spectrophotometric determination of aluminium after collection on a membrane filter using 2,3-dichloro-6-(3-carboxy-2-hydroxy-1-naphthylazo) and z ephiramine". *Analytical Letters*, **40**:2959, 2007.
41. BOHRER, D. "Alumínio em diálise: Uma visão analítica". *J. Bras. Nefrol.*, 19(3):264, 1997.
42. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC número 154 de 15 de junho de 2004. Disponível em: http://www.saude.mg.gov.br/atos_normativos/legislação-sanitaria/estabelecimentos-de-saude/hemosialise/res_154.pdf.
43. PEREIRA, M. S. S. & REIS, B. F. "Determinação espectrofotométrica de alumínio em concentrados salinos utilizados em hemodiálise empregando pré-concentração em fluxo". *Química Nova*, 25(6):931, 2002.
44. NASCIMENTO, P. C.; JOST, C. L.; GUTERRES, M. V.; DEL' FABRO, L. D.; CARVALHO, L. M. & BOHRER, D. "Simultaneous determination of Al(III) and Fe(III) in post-hemodialysis fluids by spectrophotometry and multivariate calibration". *Talanta*, **70**:540, 2006.
45. KRUGER, P. C. & PARSONS, P. J. "Determination of serum aluminum by electrothermal atomic absorption spectrometry: A comparison between Zeeman and continuum background correction system". *Spectrochimica Acta Part B*, **62**, 288, 2007.
46. LUCCAS P. O.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. & KRUG, F. J. "Atomization of Al in a tungsten coil electrothermal atomic absorption spectrophotometer". *Talanta*, **48**:695, 1999.
47. KOMÁREK, J.; CERVENKA, R.; RUZICKA, T. & KUBAN, V. "ET-AAS determination of aluminium in dialysis concentrates after continuous flow solvent extraction". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **45**:504, 2007.
48. SCANCAR, J.; MILACIC, R., BENEDIK, M. & KRIZAJ, I. "Total metal concentrations in serum of dialysis patients and fractionation of Cu, Rb, Al, Fe and Zn in spent continuous ambulatory peritoneal dialysis fluids". *Talanta*, **59**:355, 2003.
49. STAMATELATOS, I. E.; KATOPODIS, K.; BERSOS, Y.; KALEF-EZRA, J. A.; LEFKOPOULOS, G. & SIAMOPOULOS, K. "Serum aluminum determination by instrumental neutron activation analysis in long-term haemodialysis patients". *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 241(3), 483, 1999.
50. CHEN, B.; ZENG, Y. & HU, B. "Study on speciation of aluminum in human serum using zwitterionic bile acid derivative dynamically coated C18 column HPLC separation with UV and on-line ICP-MS detection". *Talanta*, **81**:180, 2010.

51. CARVALHO, L. M.; NASCIMENTO, P. C.; BOHRER, D.; STEFANELLO, R. & BERTAGNOLLI, D. "Determination of aluminum as contaminant in dialysis concentrates by adsorptive cathodic stripping voltammetry". *Analytica Chimica Acta*, **546**:79, 2005.
52. FERNÁNDEZ, P.; CONDE, C. P.; GUTIÉRREZ, A. & CÁMARA, C. "On-line aluminium preconcentration on chelating resin and its FIA-spectrofluorimetric determination in foods and dialysis concentrates". *Talanta*, 38(12):1387, 1991.
53. GUNDUZ, S. B.; KUÇUKKOLBASY, S.; ATAKOL, O. & KÝLYC, E. "Spectrofluorimetric determination of trace aluminum in diluted hemodialysis solutions". *Spectrochimica Acta Part A*, **61**:913, 2005.
54. RODRIGUES, J. L.; MAGALHÃES, C. S. & LUCCAS, P. O. "Flow injection spectrophotometric determination of Al in hemodialysis solutions". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **36**:1119, 2005.
55. BOHRER, D.; GIODA, A.; BINOTTO, R. & NASCIMENTO, P. C. "On-line separation and spectrophotometric determination of low levels of aluminum in high-salt content samples: application to analysis of hemodialysis fluids". *Analytica Chimica Acta*, **362**:163, 1998.
56. PISTON, M.; DOL, I. & KNOCHEN, M. "Multiparametric flow system for the automated determination of sodium, potassium, calcium and magnesium in large-volume parenteral solutions and concentrated hemodialysis solutions". *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, **2006**:1, 2006.
57. HONORATO, R. S.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, R. A. C. & ARAÚJO, M. C. U. "Prior assay as an approach to flow titrations. Spectrophotometric determination of iron in alloys and ores". *Analytica Chimica Acta*, **416**:231, 2000.
58. LIMA, M. B.; ANDRADE, S. I. E.; HARDING, D. P.; PISTONESI, M. F.; BAND, B. S. F. & ARAÚJO M. C. U. "Turbidimetric and photometric determination of total tannins in tea using a micro-flow-batch analyzer". *Talanta*, **88**:717, 2012.
59. FREITAS, S. K. B.; SILVA, V. L.; ARAÚJO, A. N.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; REIS, B. F. & PAIM, A. P. S. "A Multicommutated flow analysis method for the photometric determination of amoxicillin in pharmaceutical formulations using a diazo coupling reaction". *J. Braz. Chem. Soc.*, **22**: 2, **2011**.
60. LIMA M. B.; BARRETO, I. S.; ANDRADE, S. I. E.; ALMEIDA, L. F. & ARAÚJO, M. C. U. "A micro-flow-batch analyzer with solenoid micro-pumps for the photometric determination of iodate in table salt". *Talanta*, **100**:308, 2012.
61. CLADERA, A.; TOMB, C.; GOMEZ, E.; ESTELA, J. M. & CERDÁ, V.; "A new instrumental implementation of sequential injection Analysis". *Analytica Chimica Acta*, **302**:297, 1995.
62. KHANHUATHON, Y.; SIRIANGKHAWUT, W.; CHANTIRATIKUL, P. & GRUDPAN, K. "Flow-Batch method with a sequential injection system for

spectrophotometric determination of selenium(IV) in selenium-enriched yeast using o-phenylenediamine". *Analytical Letters*, **46**:1779, 2013.

63. INFANTE, C. M. C.; MASINI, J. C. & SANTOS, A. C. V. "Development of a spectrophotometric Sequential Injection Analysis (SIA) procedure for determination of ammonium: A Response Surface Methodology (RSM) approach". *Microchemical Journal*, 98:1, 2011.

64. SILVA, M. J.; ANJOS, E. V.; HONORATO, R. S.; PIMENTEL, M. F. & PAIM, A. P. S. "Spectrophotometric cocaine determination in a biphasic medium employing flow-batch sequential injection analysis". *Analytica Chimica Acta*, **629**:98, 2008.

65. CASTILLEJA-RIVERA, W. L.; HINOJOSA-REYES, L.; GUZMÁN-MAR, J. L.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, A.; RUÍZ-RUÍZ, E. & CERDÀ, V. "Sensitive determination of chromium (VI) in paint samples using a membrane optode coupled to a multisyringe flow injection system". *Talanta*, **99**:730, 2012.

66. CERDÀ, V.; ESTELA, J. M.; FORTEZA, R.; CLADERA, A.; BECERRA, E.; ALTIMIRA, P. & SITJAR, P. "Flow techniques in water analysis". *Talanta*, **50**:695, 1999.

67. SERRA, A. M.; ESTELA, J. M. & CERDÀ, V. "MSFIA system for mercury determination by cold vapour technique with atomic fluorescence detection". *Talanta* **77**:556, 2008.

68. ARMAS, G.; MIRÓ, M.; CLADERA, A.; ESTELA, J. M. & CERDÀ, V. "Time-based multisyringe flow injection system for the spectrofluorimetric determination of aluminium". *Analytica Chimica Acta*, **455**:149, 2002.

69. CRISPINO, C. C. & REIS, B. F. "Development of a multicommutated flow analysis procedure for photometric determination of total N-ureide in soybean tissues". *J. Braz. Chem. Soc.*, 24(4):541, 2013.

70. CARNEIRO, J. M. T.; ZAGATTO, E. A. G.; SANTOS, J. L. M. & LIMA, J. L. F. C. "Spectrophotometric determination of phytic acid in plant extracts using a multi-pumping flow system". *Analytica Chimica Acta*, **474**:161, 2002.

71. VIEIRA, G. P.; PERDIGÃO, S. R. W.; FIORE, M. F. & REIS, B. F. "Development of a high sensitive automatic setup for screening of microcystins in surface waters by employing a LED-based photometric detector". *Sensors and Actuators B*, **161**:422, 2012.

72. LOUKAS, Y. L. "Multiple complex formation of unstable compounds with cyclodextrins: Efficient determination and evaluation of the binding constant with improved kinetic studies". *Analyst*, **122**:377, 1997.

73. PEREIRA, C. F.; FERNANDES, E. N.; MARQUES, E. P. & MARQUES, A. L. B. "Potencialidades analíticas do sistema Cu (II) - amarelo de alizarina R: um novo procedimento espectralítico para determinação de Cu(II) no nível de micromolar e estudos de equilíbrios em solução". *Revista Analytica*, **4**:53, 2003.

74. MARCZENKO, Z. "Spectrophotometric determination of elements". John, Wiley & Sons, 1976. 620p.
75. LAVADO, R. S. "Effects of sewage-sludge application on soils and sunflower yield: quality and toxic element accumulation". *Journal of Plant Nutrition*, 29(6):975, 2006.
76. GERENDAS, J.; POLACCO, J. C.; FREYERMUTH, S. K. & SATTELMACHER, B. "Co does not replace Ni with respect to urease activity in zucchini (*Cucurbita pepo* convar. *giromontiina*) and soybean (*Glycine max*)". *Plant and Soil*, **203**:127, 1998.
77. DOUCHKOV, D.; GRYCZKA, C.; STEPHAN, U. W.; HELL R. & BAUMLEIN, H. "Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco". *Plant Cell and Environment*, **28**:365, 2005.
78. PAKDAMAN, N.; GHADERIAN, S. M.; GHASEMI, R. & ASEMANEH, T. "Effects of calcium/magnesium quotients and nickel in the growth medium on growth and nickel Accumulation in pistacia atlantica". *Journal of Plant Nutrition*, **36**:1708, 2013.
79. GERENDAS, J.; POLACCO, J. C.; FREYERMUTH, S. K. & SATTELMACHER, B. "Significance of nickel for plant growth and metabolism". *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde*, **162**:241, 1999.
80. KUTMAN, B. Y.; KUTMAN, U. B. & CAKMAK, I. "Nickel-enriched seed and externally supplied nickel improve growth and alleviate foliar urea damage in soybean". *Plant Soil*, **363**:61, 2013.
81. PAGE, V. & FELLER, U. "Selective transport of zinc, manganese, nickel, cobalt and cadmium in the root System and transfer to the leaves in young wheat plants". *Annals of Botany*, **96**:425, 2005.
82. ZORNOZA, P.; ROBLES, S. & MARTIN, N. "Alleviation of nickel toxicity by ammonium supply to sunflower plants". *Plant and Soil*, **208**:221, 1999.
83. MALAVOLTA, E. & MORAES, M. F. "Níquel – de tóxico a essencial". IPNI – International plant nutrition institute (Informações agronômicas), 118:1, 2007.
84. ALIZADEH, K.; NEMATI, H.; ZOHREVAND, S.; HASHEMI, P.; KAKANEJADIFARD, A.; SHAMSIPUR, M.; GANJALI, M. R. & FARIDBOD, F. "Selective dispersive liquid–liquid microextraction and reconcentration of Ni(II) into a micro droplet followed by ETAAS determination using a yellow Schiff's base bisazanyl derivative". *Materials Science and Engineering C*, **33**:916, 2013.
85. GRIMSRUD, T. K.; BERGE, S. R.; HALDORSEN, T. & ANDERSEN, A. "Exposure to different forms of nickel and risk of lung cancer". *American Journal of Epidemiology*, 156(12):1123, 2002.

86. De La CALLE, I.; COSTAS, M.; CABALEIRO, N.; LAVILLA, I. & BENDICHO, C. "Fast method for multielemental analysis of plants and discrimination according to the anatomical part by total reflection X-ray fluorescence spectrometry". *Food Chemistry*, **138**:234, 2013.
87. SATTAR, S. A.; REDDY, B. S.; RAO, V. K.; PRADEEP, A. S.; RAJU, G. J. N.; RAMANARAYANA, K.; RAO, P. V. M. & REDDY, S. B. "Estimation of trace elements in some anti-epileptic medicinal plants by PIXE". *J. Radioanal Nucl. Chem.*, **294**:337, 2012.
88. MARRERO, J.; REBAGLIATI, R. J.; LEIVA, E.; LONDONIO, A. & SMICHOWSKI, P. "Inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination of fifteen elements in dietary supplements: are the concentrations declared in the labels accurate". *Microchemical Journal*, **108**:81, 2013.
89. CINDRIĆ, I. J.; ZEINER, M.; GLAMUZINA, E.; & STINGEDER, G. "Elemental characterisation of the medical herbs *Salvia officinalis* L. and *Teucrium montanum* L. grown in Croatia". *Microchemical Journal*, **107**:185, 2013.
90. RUBIO, C.; LUCAS, J. R. D.; GUTIÉRREZ, A. J.; GLEZ-WELLER, D.; MARRERO, B. P.; CABALLERO, J. M.; REVERT, C. & HARDISSON, A. "Evaluation of metal concentrations in mentha herbal teas (*Mentha piperita*, *Mentha pulegium* and *Mentha* species) by inductively coupled plasma spectrometry". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **71**:11, 2012.
91. SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N. & PIETRO, R. C. L. R. "O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais". *Revista Brasileira de Farmacognosia - Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(3): 435, 2010.
92. DONATI, G. I.; NASCENTES, C. C.; NOGUEIRA, A. R. A.; ARRUDA, M. A. Z. & NÓBREGA, J. A. "Acid extraction and cloud point preconcentration as sample preparation strategies for cobalt determination in biological materials by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry". *Microch. Journal.*, 82(2):189, 2006.
93. OUERDANE, L.; MARI, S.; CZERNIC, P.; LEBRUN, M. & LOBINSKI, R. "Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOFMS/MS after their isolation by 2D size exclusion hydrophilic interaction LC (SEC-HILIC) monitored by ICP-MS". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **21**:676, 2006.
94. VICENTE, S.; MANIASSO, N.; QUEIROZ, Z. F. & ZAGATTO, E. A. G. "Spectrophotometric flow-injection determination of nickel in biological materials". *Talanta*, **57**:475, 2002.
95. CHANDRA, G. P.; SESHIAH, K.; RAO, Y. K. & WANG, M. C. "Solid phase extraction of Cd, Cu and Ni from leafy vegetables and plant leaves using amberlite XAD-2 functionalized with 2-hydroxy-acetophenone-thiosemicarbazone (HAPTSC) and determination by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy". *J. Agricult. and Food Chem.*, 54(8):2868, 2006.

96. JIANG, N.; CHANG, X. J.; ZHENG, H.; HE, Q. & HU, Z. "Selective solid-phase extraction of nickel(II) using a surface-imprinted silica gel sorbent". *Anal. Chim. Acta*, 577(2):225, 2006.
97. SCHWANZ, M.; FERREIRA, J. J.; FRÖEHLICH, P.; ZUANAZZI, J. A. S. & HENRIQUES, A. T. "Análise de metais pesados em amostras de *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae)". *Revista Brasileira de Farmacognosia - Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(1):98, 2008.
98. SAIDELLES, A. P. F.; KIRCHNER, R. M.; SANTOS, N. R. Z.; FLORES, É. M. M. & BARTZ, F. R. "Análise de metais em amostras comerciais de erva-mate do sul do Brasil". *Alim. Nutr.*, 21(2):259, 2010.
99. MARTELLI, P. B.; REIS, B. F.; KRONKA, E. A. M.; BERGAMIN, H.; KORN, M.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C. & ARAUJO, A. N. "Multicommutation in flow analysis. Part 2. Binary sampling for spectrophotometric determination of nickel, iron and chromium in steel alloys". *Analytica Chimica Acta*, 308:397, 1995.
100. BORGES, S. S.; PEIXOTO, J. S.; FERES, M. A. & REIS, B. F. "Downscaling a multicommutated flow injection analysis system for the photometric determination of iodate in table salt". *Analytica Chimica Acta*, 668:3, 2010.
101. FERNANDES, R. N.; REIS, B. F.; MORALES-RUBIO, A. & De La GUARDIA, M. "Multi-Pumping mechanised determination of selenium in natural waters by Light Emitting Diode (LED) spectrometry". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(7):1242, 2009.
102. MARCZENKO, Z.; BALCERZAK, M. "Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganica analysis". *Analytical Spectroscopy Library*, vol. 10, Elsevier: Amsterdam, 2000. 528p.
103. LEE, J. D. "Química Inorgânica não tão concisa". 5ª ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1999. 527p.