

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

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO AUTOMÁTICO  
PARA DETERMINAÇÃO FOTOMÉTRICA DE N-UREÍDOS  
TOTAIS EM LEGUMINOSAS EMPREGANDO  
MULTICOMUTAÇÃO EM FLUXO**

Carla Cripa Crispino Kamogawa\*

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  
2010

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

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO AUTOMÁTICO  
PARA DETERMINAÇÃO FOTOMÉTRICA DE N-UREÍDOS  
TOTAIS EM LEGUMINOSAS EMPREGANDO  
MULTICOMUTAÇÃO EM FLUXO**

Carla Cripa Crispino Kamogawa\*

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  
2010

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

C932dp

Crispino-Kamogawa, Carla Cripa.

Desenvolvimento de procedimento automático para determinação fotométrica de *N*-ureídeos totais em leguminosas empregando multicomutação em fluxo / Carla Cripa Crispino Kamogawa. -- São Carlos : UFSCar, 2010. 89 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Química. 2. Análise em fluxo. 3. Soja. 4. Espectrofotometria. 5. Nitrogênio fixação. I. Título.

CDD: 540 (20ª)

**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 banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata Carla Cripa Crispino Kamogawa, realizada em 28 de julho de 2010:*



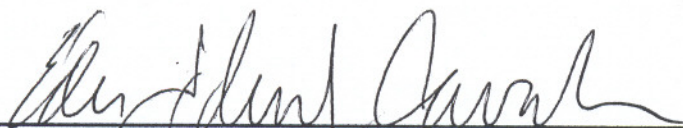
---

Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis



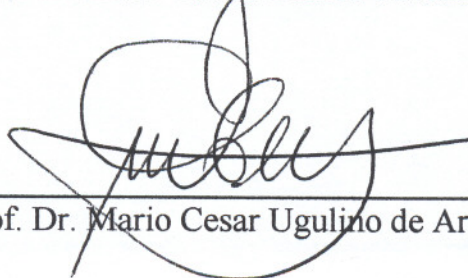
---

Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho



---

Prof. Dr. Eder Tadeu Gomes Cavalheiro



---

Prof. Dr. Mario Cesar Ugulino de Araujo



---

Dr. Gilberto Batista de Souza

*“ Se chorei ou se sorri,  
O importante é que  
Emoções eu vivi”.*

*(Roberto Carlos)*

*“Termine o que você começa.  
Termine bem. É mais importante terminar  
do que começar. Quando você termina,  
é hora de começar novamente.”*

*(autor desconhecido)*

*Dedico este trabalho,*

*Ao meu Amor Marcos,  
meu presente, pela paciência, compreensão e  
companheirismo  
sem você nenhum sonho seria possível ou valeria a pena.*

*A meu filho Lucas e minha filha Alice  
(que ainda não nasceu, mas já é muito amada)  
aos quais dedico minha vida.*

*Aos meus queridos pais Domingos e Aparecida,  
que um dia sonharam e hoje  
compartilham este importante momento  
comigo.*

## *AGRADECIMENTOS*

Ao Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis pela orientação, apoio, incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho e pelos momentos de descontração e amizade regados a calorosas risadas, sempre compartilhando muita sabedoria e experiência de vida, fazendo com que esta jornada fosse muito agradável.

A Dr.<sup>a</sup> Mariângela Hungria, pesquisadora da Embrapa Soja, pelo incentivo e por ceder as amostras utilizadas neste trabalho.

Aos Professores Joaquim de Araújo Nóbrega e Éder Cavalheiro pelas sugestões apresentadas no exame de qualificação.

Às secretárias da Pós-Graduação da UFSCar, Ariane, Cristina e Luciane.

Ao CENA pela concessão de equipamentos e infra-estrutura para a execução de toda parte experimental. Ao João Geraldo pela arte nos desenhos.

À técnica e amiga Sheila Roberta, pelas animadas conversas sobre os mais diversos assuntos e especialmente por toda ajuda proporcionada.

A família do laboratório, Andréia, Alessandra, Tuanne, Jeová, Gláucia, Marcelo, Janete, Milton, Sivan, Rejane, Mário e André, pelos momentos de convivência e alegria e por vários outros de discussões sobre ciência. A vida nos separará geograficamente, mas saibam que cada um de vocês tem um lugar muito especial no meu coração!

Aos queridos amigos Fábio Vieira, Richard, Alexssandra, Milton (japa), Dário, Izabela, Alfredo, Lorena, Fábio Rocha, Tati, Idoia, Wagner Wenzel e Maria Tereza pelos vários churrascos regados com muitas risadas, alegria e descontração. Vocês também têm seu lugar no meu coração!

Aos amigos Nestor (Espanha), Vitória (Bahia), Sofia (Portugal) e Marcelão (Pernambuco) pelo apoio, incentivo, sugestões e principalmente pela agradável convivência durante sua passagem por aqui. Vocês deixaram muita saudade!

Aos pequenos (e não tão pequenos), alegres e divertidos Andrey, Sofia, Felipe, Giovane, João Pedro, Aninha, Marcelo Henrique e Murilo Augusto pelos belos momentos que passamos juntos. Adoro vocês!

Aos meus queridos pais que, com muito sacrifício, lutaram e sempre me incentivaram a estudar e ao meu irmão Luís Henrique que foi sempre meu exemplo!

A minha cunhada e Amiga Célia por toda dedicação e carinho à minha família e às minhas sobrinhas Luísa e Manuela, que com simples sorrisos, tornam a vida mais alegre e renovam, a cada dia, a esperança.

Aos meus sogros Ortência e Ildfonso, por dispor de seu tempo para cuidar do meu filhote em vários momentos de necessidade. Vocês são nossos anjos da guarda!

Aos Professores do laboratório de Química Analítica do CENA Chico, Fer, Zé Santista e Zagatto e aos técnicos Fátima, Tatinha, Otávio e Mi pelos momentos de convivência e descontração.

Aos colegas da Química Analítica do CENA Zé Paulo, Quienly, Gabriel, Marquinhos, Lidiane, Flávio, Paulino, Paula Packer, Vivi, Evandro, Paula Fortes, Néia, Ana Clara, Tatiana, Iracema pelas inúmeras horas de convivência no cafezinho da tarde.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar pela oportunidade da realização deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

Á todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado. ***MUITO OBRIGADA !***



*Lista de Abreviações*

FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
FIA	“Flow Injection Analysis” (Análise por Injeção em Fluxo)
GOGAT	“Glutamine Oxoglutarate Aminotransferase” (Glutamato Sintase)
GS	“Glutamine Synthetase” (Glutamina Sintetase)
LED	“Light Emitting Diode” (Diodo de Emissão de Luz)
SIA	“Sequential Injection Analysis” (Análise por Injeção Seqüencial)

## Lista de Figuras

FIGURA 1	Soja. ....	2
FIGURA 2	Ciclo do nitrogênio. ....	5
FIGURA 3	Nódulos no sistema radicular de uma leguminosa fixadora de Nitrogênio. ....	6
FIGURA 4	Processo da fixação de N <sub>2</sub> pelas bactérias fixadoras. ....	9
FIGURA 5	<i>N</i> -ureídeos - Alantóina e Ácido alantóico. ....	9
FIGURA 6	Reação de Rimini-Schryver. ....	11
FIGURA 7	Paralelo entre procedimentos manuais e automatizados em um ensaio colorimétrico típico. ....	13
FIGURA 8	Representação esquemática do auto-analisador para determinação de <i>N</i> -ureídeos, segundo GLENISTER e LA RUE (1987). ....	14
FIGURA 9	Diagrama de fluxo de um módulo de análise. ....	15
FIGURA 10	Diagrama de fluxo de um sistema de análise por injeção seqüencial. ....	17
FIGURA 11	Válvulas solenóide utilizadas para manipular amostras e soluções de reagentes no processo de multicomutação. ....	19
FIGURA 12	Modelo do processo de multicomutação em fluxo. ....	19
FIGURA 13	Módulo de análise para implementar o processo de multicomutação em fluxo. ....	20
FIGURA 14	Circuito eletrônico da fonte de alimentação. ....	27
FIGURA 15	Diagrama de blocos do sistema de multicomutação em fluxo. ....	28
FIGURA 16	Diagrama de acoplamento do fotômetro à cela de fluxo. ....	29
FIGURA 17	Diagrama do circuito eletrônico para controle do aquecimento do banho térmico. ....	30
FIGURA 18	Procedimento esquemático da extração de <i>N</i> -ureídeos dos pecíolos dos soja. ....	35
FIGURA 19	Diagrama do primeiro módulo de análise. ....	36
FIGURA 20	Diagrama do segundo módulo de análise. ....	38
FIGURA 21	Rotina de execução do programa. ....	41
FIGURA 22	Módulo de análise empregando fluxo monossegmentado e multicomutação. ....	42

FIGURA 23	Fluxograma do estudo da concentração da solução de hipoclorito de sódio. ....	45
FIGURA 24	Fluxograma do estudo da concentração alcalina da solução de hipoclorito. ....	46
FIGURA 25	Fluxograma do estudo da concentração alcalina da solução de fenol. ....	47
FIGURA 26	Fluxograma do estudo da concentração da solução de fenol. ....	48
FIGURA 27	Procedimento esquemático para a determinação de <i>N</i> -ureídeos totais. ....	51
FIGURA 28	Efeito da concentração da solução de hipoclorito de sódio. ....	55
FIGURA 29	Efeito da concentração de hidróxido de sódio na solução de hipoclorito. ....	57
FIGURA 30	Curva analítica obtida com soluções de referência. ....	59
FIGURA 31	Efeito da concentração de hidróxido de sódio na solução de fenol. .	61
FIGURA 32	Efeito da concentração da solução de fenol no sinal analítico. ....	63
FIGURA 33	Efeito da temperatura para o desenvolvimento da reação. ....	65
FIGURA 34	Efeito do comprimento da bobina B <sub>3</sub> . ....	67
FIGURA 35	Efeito do nº de ciclos e do tempo de abertura da válvula do fenol. ..	69
FIGURA 36	Registros referentes ao processamento de soluções referências de alantoína e de 14 amostras de extratos de folhas de soja (n=3). ....	74
FIGURA 37	Curva analítica referente ao processamento de soluções referência de alantoína (n=3) com o procedimento proposto. ....	75
FIGURA 38	Correlação entre os procedimentos proposto e referência (n = 14). ..	78
FIGURA 39	Registros referentes ao processamento de soluções referência de alantoína e a curva analítica correspondente. ....	79
FIGURA 40	Diagrama de Hommel para resíduos de fenol. ....	82

*Lista de Tabelas*

TABELA 1	Seqüência de eventos do procedimento analítico da segunda configuração mostrada na FIGURA 20. ....	40
TABELA 2	Sequencia de eventos para controle do módulo de análise mostrada na FIGURA 22. ....	43
TABELA 3	Valores de absorbância para o estudo concentração da solução de hipoclorito de sódio. ....	56
TABELA 4	Valores de absorbância para o estudo da concentração alcalina da solução de hipoclorito 10%. ....	58
TABELA 5	Valores de absorbância para o estudo da concentração de hidróxido de sódio na solução de fenol. ....	62
TABELA 6	Valores de absorbância para o estudo da concentração de fenol no sinal analítico. ....	64
TABELA 7	Valores de absorbância para o estudo da temperatura no desenvolvimento da reação. ....	66
TABELA 8	Valores de absorbância para o estudo do comprimento da bobina B <sub>3</sub> . ....	68
TABELA 9	Valores de absorbância para o estudo do número de ciclos e do tempo de inserção da solução de fenol. ....	71
TABELA 10	Resultados do tratamento das amostras com a resina de troca catiônica. ....	72
TABELA 11	Características analíticas. ....	75
TABELA 12	Figuras de mérito entre os procedimentos proposto e referência* ....	76
TABELA 13	Comparação de resultados. ....	77
TABELA 14	Figuras de mérito entre os procedimentos proposto e referência* . ....	80

## RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO AUTOMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO FOTOMÉTRICA DE *N*-UREÍDOS TOTAIS EM LEGUMINOSAS EMPREGANDO MULTICOMUTAÇÃO EM FLUXO. Neste trabalho, é proposto o desenvolvimento de um procedimento automático para determinação fotométrica de *N*-ureídos totais em tecidos de soja empregando o conceito de multicomutação em fluxo. A detecção fotométrica foi baseada no método da formação do composto azul de indofenol (reação de Berthelot), a qual envolve a oxidação do nitrogênio amidico (*N*-ureídos) com hipoclorito e reação com fenol em meio alcalino. Foram desenvolvidos módulos de análise para implementar o procedimento analítico, instrumento de detecção fotométrica empregando LED como fonte de radiação eletromagnética e fotodiodo como detector. O controle dos dispositivos foi realizado empregando um computador, programado em QuickBasic 4.5. Os estudos realizados para otimização do procedimento proposto compreenderam experimentos para avaliar os seguintes parâmetros: concentração da solução de hipoclorito e alcalinidade da mesma; concentração da solução de fenol e sua alcalinidade; temperatura para o desenvolvimento da reação; tempo de residência da zona da amostra, volume da solução de fenol; e remoção dos potenciais interferentes empregando resina de troca iônica. Após a otimização das variáveis de controle, o procedimento proposto apresentou curva analítica com resposta linear na faixa de 30 a 260  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , Limite de detecção de 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , desvio padrão relativo menor que 3%, consumo de 6,7 mg de fenol por determinação e frequência de amostragem de 22 determinações por hora. O procedimento desenvolvido foi empregado para a determinação de *N*-ureídos em amostras de extratos de folhas de soja. Os resultados foram comparados com um procedimento de referência (VOGELS e van der DRIFT, 1970) e não apresentaram diferença significativa para o nível de confiança de 95%. Neste sentido, pode-se afirmar que o procedimento desenvolvido é adequado para análise de rotina em laboratórios que desenvolvem pesquisas em microbiologia do solo e Fixação Biológica de Nitrogênio com vantagens em relação à precisão, custos operacionais e geração de efluente.

## ABSTRACT

DEVELOPMENT OF AN AUTOMATIC PROCEDURE FOR PHOTOMETRIC DETERMINATION OF TOTAL *N*-UREIDE IN LEGUME USING MULTICOMMUTATION FLOW. This work aimed the development of an automated procedure for photometric determination of total ureide in soybean tissues using multicommutation in flow analysis. The photometric detection was based on the formation of indophenol blue (the Berthelot reaction), which involving oxidation of the amide nitrogen (*N*-ureide) by hypochlorite and reaction with phenol in alkaline medium. The manifold hardware and the instrument for photometric detection using a LED as radiation source and a photodiode as detector were developed. The system was microcomputer by a software written in QuickBasic 4.5. In the optimization of the proposed procedure the following parameters were considered: the hypochlorite concentration and its alkalinity, the phenol concentration and its alkalinity, the reaction temperature, the sample residence time, the volume of the phenol solution and the removal of interferences by ion exchange resin column. After optimization, the analytical curve was linear in the 30 to 260  $\mu\text{mol L}^{-1}$  concentration range with a limit of detection of 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , a relative standard deviation lower than 3%, consumption of 6.7 mg phenol per determination and sample throughput of 22 determinations per hour. The developed procedure was used for *N*-ureide determination in soybean leaves extracts. With results was agreement with the reference method at the 95% confidence level. The developed procedure is suitable for routine analysis in laboratories conducting research in Soil Microbiology and Biological Nitrogen Fixation with advantages in relation to precision, operational costs and waste generation.

## Sumário

1 - APRESENTAÇÃO.....	1
2 – SÍNTESE DA LITERATURA .....	2
2.1 - Leguminosas – A Soja .....	2
2.2 - Ciclo do Nitrogênio .....	3
2.3 - Processo de Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) .....	6
2.3.1 - Processo de Nodulação Radicular .....	6
2.3.2 - Assimilação e transporte do N <sub>2</sub> fixado para as folhas da planta .....	7
2.3.3 - N-Ureídos – Alantoína e Ácido Alantóico .....	8
2.3.4 - Assimilação do nitrogênio mineral pela leguminosa .....	10
2.4 - Técnicas analíticas para quantificação de N-ureídos .....	10
2.5 - Sistemas de Análise em Fluxo .....	12
2.5.1 - Multicomutação em Fluxo .....	18
OBJETIVOS .....	24
3 - EXPERIMENTAL .....	25
3.1 - Método .....	25
3.2 - Material .....	25
3.2.1 - Equipamentos e Acessórios .....	25
3.2.2 - Construção do módulo de análise .....	26
3.2.3 - Sistema de Detecção .....	29
3.2.4 - Sistema de Controle do Aquecimento do Banho Térmico.....	30
3.3 - Reagentes e Soluções .....	32
3.4 - Preparo da Resina de Troca Catiônica .....	33
3.5 - Preparo das Amostras .....	33
3.6 - Procedimentos em Fluxo .....	35
3.6.1 - Módulo de Análise em Batelada - Primeira Configuração .....	35
3.6.2 - Módulo de Análise por Multicomutação em Fluxo - Segunda Configuração .....	37
3.6.3 - Módulo de Análise por Multicomutação em Fluxo - Terceira Configuração .....	41
3.7 - Otimização das Variáveis .....	45
3.7.1 - Estudo do efeito da Concentração da Solução de Hipoclorito de Sódio. ....	45

3.7.2 - Estudo do efeito da Concentração de Hidróxido de Sódio na Solução de Hipoclorito.....	46
3.7.3 - Estudo do efeito da Concentração de Hidróxido de Sódio na Solução de Fenol.....	47
3.7.4 - Estudo do efeito da Concentração da Solução de Fenol .....	48
3.7.5 - Estudo do efeito da Temperatura no Desenvolvimento da Reação.....	49
3.7.6 - Estudo do efeito do Comprimento da Bobinas de reação, B <sub>3</sub> .....	49
3.7.7 - Estudo do efeito do número de Ciclos e Tempo de Inserção do Fenol..	49
3.8 - Método Comparativo .....	50
3.8.1 - Materiais .....	50
3.8.1.1 - Equipamentos e Acessórios .....	50
3.8.2 - Reagentes e Soluções .....	50
3.8.3 - Procedimento Experimental para a Determinação de N-Ureídos Totais.....	51
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
4.1 - Módulo de Análise em Batelada - Primeira Configuração .....	53
4.2 - Módulo de Análise por Multicomutação em Fluxo - Segunda Configuração .	54
4.2.1 - Estudo do Efeito da Concentração da Solução de Hipoclorito de Sódio.....	54
4.2.2 - Estudo do Efeito da Concentração de Hidróxido de Sódio na Solução de Hipoclorito.....	56
4.2.3 - Estudo do Efeito da Concentração de Hidróxido de Sódio na Solução de Fenol .....	60
4.2.4 - Estudo do Efeito da Concentração da Solução de Fenol.....	62
4.2.5 – Estudo Do Efeito da Temperatura no Desenvolvimento da Reação.....	64
4.2.6 - Estudo do Efeito do Comprimento da Bobina B <sub>3</sub> .....	66
4.2.7 - Estudo do Efeito do Número de Ciclos e do Tempo de Inserção do Fenol.....	68
4.2.8 - Remoção dos Interferentes .....	71
4.3 - Método Comparativo .....	72
4.4 - Desempenho Analítico .....	73
4.4.1 - Módulo de Análise por Multicomutação em Fluxo – Segunda configuração .....	73
4.4.2 - Módulo de Análise por Multicomutação em Fluxo – Terceira configuração .....	78



5 - CONCLUSÕES .....	81
6 - TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS .....	82
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83

## 1 - Apresentação

A demanda de alimentos de origem vegetal ricos em fibras e proteínas tem crescido acentuadamente nos últimos anos. Os cereais e as leguminosas são as principais fontes para a alimentação humana, e dentre as leguminosas destaca-se a soja. O interesse mundial pela soja, em grande parte, deve-se ao teor elevado de proteína de seus grãos (40 %), constituindo uma fonte importante para a alimentação humana e animal.

O nitrogênio (N) é um componente essencial das proteínas, portanto a cultura de soja necessita grandes quantidades desse nutriente. Neste sentido, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) pela planta é de suma importância, pois afeta a produtividade, o custo da produção, tendo também um impacto ambiental favorável em comparação ao uso de fertilizantes nitrogenados, razão pela qual a eficiência desse processo biológico deve ser sempre monitorada.

Uma forma de monitorar a eficiência da FBN é a análise e a determinação dos produtos nitrogenados da seiva do xilema ou das folhas. Os *N*-ureídeos são sintetizados na planta através deste processo, e estão entre os principais produtos da fixação biológica do  $N_2$ .

Os procedimentos manuais, apesar de apresentarem boa exatidão, têm como limitações a precisão das medidas, que depende muito do analista; o tempo gasto por análise; o volume de reagente empregado; o volume de resíduos gerado e também a quantidade de vidraria a serem descontaminadas.

Considerando esses aspectos, a idéia central deste trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de multicomutação em fluxo para determinação de *N*-ureídeos totais em tecido vegetal de leguminosas.

## 2 – Síntese da Literatura

### 2.1 – Leguminosas – A Soja

As leguminosas constituem uma família da classe das dicotiledôneas, que apresentam como principal característica o fruto em forma de vagem ou fava. Vegetais de porte bastante variável, compreendem pequenas plantas herbáceas, trepadeiras, arbustos e até gigantescas árvores das florestas tropicais (VIEIRA, R., 2001).

As leguminosas desempenham papel ecológico importante, dada a capacidade de muitas de suas espécies de fixar o nitrogênio atmosférico no solo, enriquecendo-o com esse elemento fundamental para a agricultura.

Das leguminosas se obtêm múltiplos produtos de uso industrial, mas é sobretudo como alimento básico, e pela importância na culinária de diversos países, que as leguminosas são mais lembradas. Feijões, favas, ervilha, lentilha, grão-de-bico, soja, tremoço e amendoim são algumas leguminosas cultivadas pelas propriedades alimentícias de suas sementes, ricas em proteínas, ferro e carboidratos, ou em óleo, como a soja (*Glycine max* (L.) Merr.), foto da FIGURA 1.



FIGURA 1 - Soja.

A soja chegou ao Brasil via Estados Unidos, em 1882. Mas foi a partir da década de 1960, que a soja se estabeleceu como cultura

economicamente importante para o Brasil, sendo cultivada em todo o país. Sua produção tem recebido incentivos fiscais, propiciando o estabelecimento de um importante parque industrial de processamento de soja (incluindo máquinas e insumos agrícolas), surgimento de um sistema cooperativista, estabelecimento de uma bem articulada rede de pesquisa de soja.

Segundo dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA URL, 2010), o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja. Na safra 2006/07, a cultura ocupou uma área de 20,687 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 58,4 milhões de toneladas de grãos. Os Estados Unidos, maior produtor mundial do grão, responderam pela produção de 86,77 milhões de toneladas de soja. Para a safra 2009/10, a expectativa inicial aponta para um recorde de produção. A produtividade média brasileira é de 2.823 kg por hectares, chegando a alcançar cerca de 3000 kg/ha no estado de Mato Grosso, que é o maior produtor brasileiro de soja.

Dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB - URL, 2010) mostram que a soja tem uma importante participação nas exportações brasileiras. Em 2006, foram US\$ 9,3 bilhões, o que representou 6,77% do total exportado.

## **2.2 - Ciclo do Nitrogênio**

O nitrogênio (N) é um componente essencial das proteínas, aminoácidos, DNA, RNA e de outras estruturas celulares. Apesar de ser o mais abundante dos elementos do ar atmosférico - aproximadamente 80% do ar é composto por nitrogênio - os animais e as plantas não são capazes de metabolizá-lo na forma gasosa e retirá-lo diretamente do ar.

Os grãos de soja apresentam um teor médio de 6,5% N (g/g), desse modo, para produzir 1.000 kg de grãos são necessários 65 kg de N. Acrescentando a isso, pelo menos mais 15 kg de N para as folhas, caule e raízes, conclui-se que são necessários, aproximadamente, 80 kg de N.

Conseqüentemente, para a obtenção de rendimentos de 3.000 kg de grãos/ha são necessários 240 kg de N, dos quais 195 kg são retirados da lavoura através da exportação para os grãos (CRISPINO *et al.*, 2001).

As fontes de N necessário à cultura da soja, segundo o ciclo do nitrogênio mostrado na FIGURA 2 são: solo, principalmente pela decomposição da matéria orgânica; fixação não-biológica, resultante de descargas elétricas, combustão e vulcanismo; fertilizantes nitrogenados; e processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>).

O reservatório de N presente na matéria orgânica do solo é limitado, podendo ser esgotado rapidamente. Do mesmo modo, a fixação não-biológica contribui apenas com pequenas quantidades de N. Os fertilizantes nitrogenados representam a forma assimilada com maior rapidez pelas plantas, mas a um custo elevado. Em média, são gastos 6 barris de petróleo para a síntese de 1 tonelada de amônia (SIQUEIRA e MOREIRA, 2002). A utilização dos fertilizantes nitrogenados apresenta diversas limitações e dentre elas baixa taxa de aproveitamento pelas plantas, em média 50% (CRISPINO *et al.*, 2001). Contribui para isso as perdas causadas pela lixiviação para o lençol freático e por volatilização em virtude das transformações químicas que podem ocorrer no solo (CRISPINO *et al.*, 2001).

Neste sentido, a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) pela planta é de suma importância, pois afeta a produtividade e o custo da produção. Tendo também um impacto ambiental favorável em comparação com o uso de fertilizantes nitrogenados. Atualmente, no Brasil, não são mais recomendados fertilizantes nitrogenados para a cultura da soja, uma vez que a FBN é capaz de suprir totalmente as necessidades de nitrogênio (N) da planta (HUNGRIA *et al.*, 1994, 1997). A FBN ocorre graças a uma enzima, denominada nitrogenase, presente apenas em alguns organismos procariontes. Do ponto de vista energético, ela também é dispendiosa para o organismo que a realiza. No entanto, devido à presença de um sistema enzimático, a reação pode ocorrer à temperatura ambiente e pressão atmosférica, conforme a EQUAÇÃO 1:

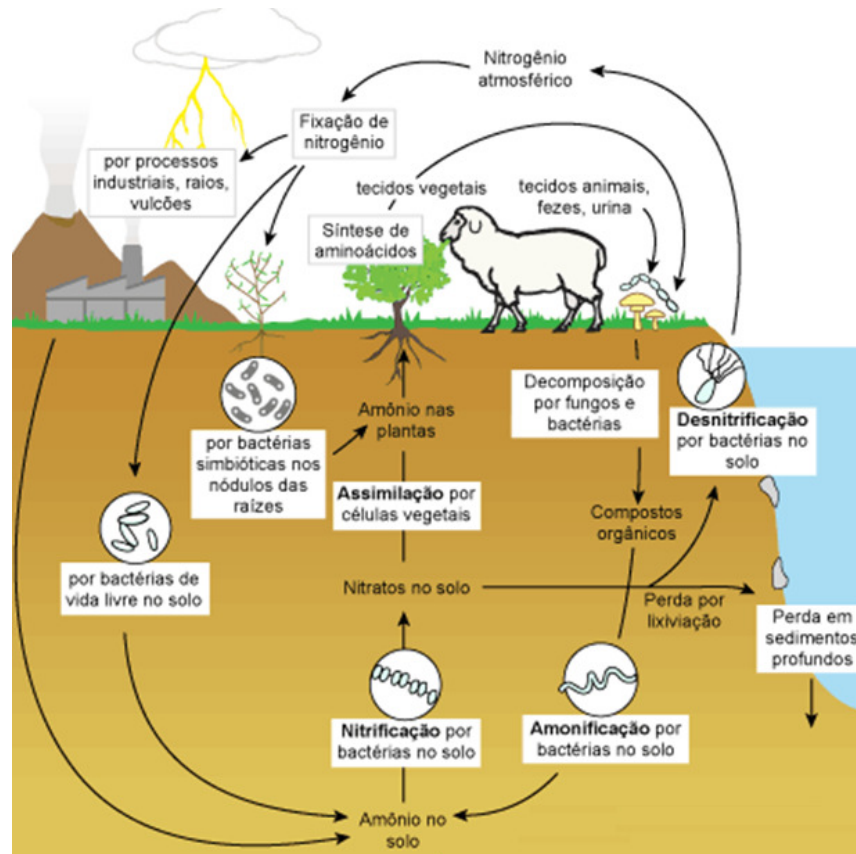
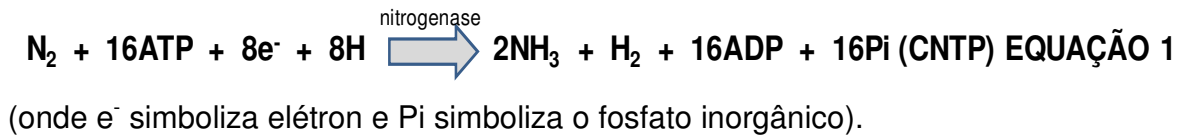


FIGURA 2 - Ciclo do Nitrogênio (adaptado de [www.brasilecola.com](http://www.brasilecola.com)).

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) ocorre por meio de uma associação simbiótica entre plantas leguminosas e bactérias fixadoras (MULLER, 1981). Nesta simbiose, a leguminosa fornece carboidratos, fonte de energia para a vida das bactérias e estas fornecem à leguminosa os produtos da fixação – aminoácidos, amidas como glutamina e asparagina (PEOPLES *et al.*, 1987), e *N*-ureídios (SINCLAIR e SERRAJ, 1995), sendo transportados para a parte aérea da planta via xilema.

O N<sub>2</sub> atmosférico é incorporado às plantas após ser transformado em amônia, pela ação de uma enzima bacteriana dinitrogenase, dentro dos nódulos

formados nas raízes das plantas. Um exemplo do estabelecimento de nódulos no sistema radicular de uma leguminosa fixadora de nitrogênio é mostrado na FIGURA 3.

Essas bactérias realizam o processo de fixação biológica gratuitamente para o agricultor, em troca de alguns produtos da fotossíntese das plantas (VARGAS e HUNGRIA, 1997).



FIGURA 3 - Nódulos no sistema radicular de uma leguminosa fixadora de Nitrogênio.

## **2.3 - Processo de Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN)**

### **2.3.1 - Processo de Nodulação Radicular**

A soja é uma planta nodulífera, isto é, capaz de desenvolver e estabelecer nódulos em seu sistema radicular. O nódulo pode ser considerado como sendo a “casa das bactérias”, onde ocorre a fixação de  $N_2$ .

As bactérias fixadoras do nitrogênio gasoso, pertencem ao grupo dos rizóbios de crescimento populacional lento, recebendo em função disso, o nome de bradirrizóbios. Atualmente, duas são as espécies de bactérias capazes de nodular as raízes de soja e fixar o  $N_2$ : *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* (SIQUEIRA e FRANCO, 1988; HUNGRIA *et al.*, 1994; VARGAS e HUNGRIA, 1997).

No solo, estimuladas por substâncias orgânicas exsudadas pela raiz da soja, as bactérias multiplicam-se na rizosfera da planta, entrando em contato com diversos pêlos radiculares. Simultaneamente, ocorre à adesão das bactérias à epiderme dos pêlos absorventes, quando então, sinais moleculares (polissacarídeos) são estabelecidos entre planta e bactéria hospedeira. Esses sinais moleculares estão relacionados às substâncias químicas exsudadas pela raiz de soja que ativam o gene da nodulação da bactéria, determinando a infecção das raízes e a conseqüente formação dos nódulos (HALVERSON e STACEY, 1986).

### **2.3.2 - Assimilação e transporte do $N_2$ fixado para as folhas da planta**

A nutrição básica desses microrganismos constitui-se na fosforilação oxidativa dos produtos elaborados nas folhas pelo processo da fotossíntese (sacarose, glicose e ácidos orgânicos), liberando energia para as bactérias (ALCANTARA, 2008). Estas, por sua vez, fixam o  $N_2$ , o qual, por meio da ação da enzima nitrogenase, é reduzido a  $NH_3$ , sendo rapidamente convertida em íon amônio ( $NH_4^+$ ), esquema na FIGURA 4.

No entanto, o  $NH_4^+$  inibe a fixação do nitrogênio (BERGENSEN, 1982), prejudicando a formação de ATP na respiração e fotossíntese. Assim, ainda no nódulo (HOPKINS, 1995; MYLONA *et al.*, 1995), o  $NH_4^+$  é incorporado em esqueletos carbônicos e convertido em aminoácidos através da ação das enzimas glutamina sintetase (GS), glutamato sintase (GOGAT). Os principais produtos que



exportados dos nódulos radiculares para a parte aérea das plantas são as amidas (principalmente asparagina e, em menor porcentagem, a glutamina) e os *N*-ureídeos (alantoína e ácido alantóico) (SPRENT, 1980; ATKINS, 1991)

Leguminosas de origem temperada (ex. ervilha) produzem asparagina e leguminosas de origem tropical (ex. soja) produzem *N*-ureídeos para a exportação do nitrogênio para o restante da planta (SIQUEIRA e FRANCO, 1988).

Os *N*-ureídeos, alantoína e ácido alantóico, atuam como principais produtos de fixação de  $N_2$  em leguminosas tropicais (MATSUMOTO *et al.*, 1977) e representam 70-90% do nitrogênio total solúvel em água, ou seja, presente na seiva do xilema da soja transportado dos nódulos da raiz às folhas de soja (STREETER, 1979), entrando no metabolismo nitrogenado global da espécie (MÜLLER, 1981; VARGAS e HUNGRIA, 1997).

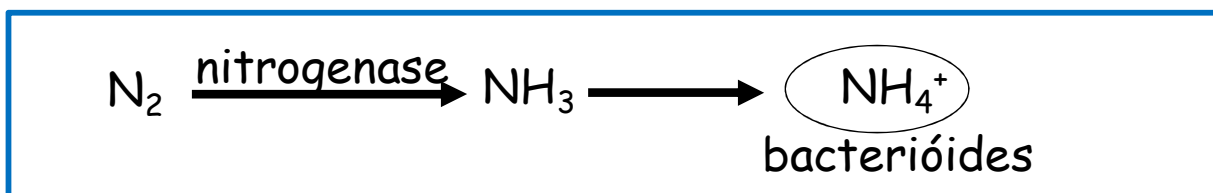


FIGURA 4 - Processo da fixação de  $N_2$  pelas bactérias fixadoras.

### 2.3.3 - *N*-Ureídeos – Alantoína e Ácido Alantóico

No metabolismo das purinas (compostos orgânicos heterociclícos) são encontrados três produtos intermediários alantoína, ácido alantóico e ureidoglicolato (VOGELS e van der DRIFT, 1970). O nitrogênio contido nesses compostos é aumentado predominantemente pela FBN (SIQUEIRA e FRANCO, 1988). Em leguminosas tropicais (REINBOTHE e MOTHES, 1962), cerca de 90% do nitrogênio total presente na seiva do xilema é translocado na forma de alantoína e ácido alantóico à parte aérea da planta. Na FIGURA 5 são mostradas as formas estruturais das moléculas da alantoína e ácido alantóico.

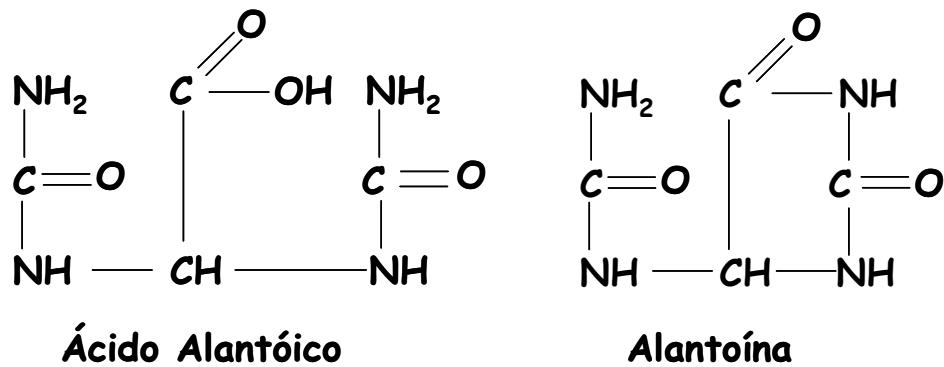


FIGURA 5 - *N*-ureídeos - Alantoína e Ácido alantóico

Estes produtos nitrogenados, sintetizados nos nódulos, são exportados rapidamente para a parte aérea do hospedeiro, via xilema, pelo fluxo da transpiração (SIQUEIRA e FRANCO, 1988). As leguminosas mais representativas para o Brasil, a soja e o feijão quando noduladas, transportam o N proveniente da FBN principalmente na forma de *N*-ureídeos (SIQUEIRA e FRANCO 1988; HUNGRIA, 1994). A determinação destes compostos nitrogenados na seiva do xilema é importante em estudos fisiológicos, mostrando as variações metabólicas que ocorrem devido ao microssimbionte e ao hospedeiro, alterações metabólicas por estresse ambiental, além de indicar a eficiência do processo da fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA, 1994).

Herridge e colaboradores (1990) demonstraram que a análise dos compostos nitrogenados da seiva do xilema, tanto em condições de campo como em casa de vegetação, pode ser utilizada para a quantificação da fixação biológica do N<sub>2</sub>. Isso foi proposto para as leguminosas que transportam *N*-ureídeos, pois em diversos experimentos foi encontrada uma correlação positiva e significativa entre a concentração de *N*-ureídeos na seiva do xilema e as estimativas do N<sub>2</sub> proveniente da fixação. Isto indica que os sistemas simbióticos mais eficientes transportam uma porcentagem mais elevada de *N*-ureídeos que, inclusive, parece ser mais facilmente translocado para os grãos, ou seja, se a concentração de *N*-ureídeos no xilema é alta a fixação do nitrogênio atmosférico também é alta (GLENISTER e LARUE, 1987 ;NEVES *et al.*, 1985).

### 2.3.4 - Assimilação do nitrogênio mineral pela leguminosa

As plantas que não se encontram associadas às bactérias fixadoras de nitrogênio, precisam absorvê-lo a partir do solo. O uso de fertilizantes nitrogenados minerais na adubação da soja libera amônia que acaba sendo reduzida a nitrato. Tanto a forma amoniacal como a nítrica são prontamente absorvidas e assimiláveis pela planta de soja. Porém é principalmente sob a forma de glutamina que o nitrogênio é exportado para os órgãos vegetais (MULLER, 1981), a fim de ser incorporado nas moléculas nitrogenadas.

Quando leguminosas são cultivadas na presença de nitrogênio mineral, a concentração de *N*-ureídos na seiva pode ser inferior, uma vez que o  $\text{NH}_4^+$  inibe a FBN (BERGENSEN, 1982). Assim, logo que é absorvido pelas raízes, esse íon é assimilado pelas enzimas GS e GOGAT, e os compostos dominantes formados neste caso são os aminoácidos glutamina, asparagina (BERGENSEN, 1982) e nitrato.

## 2.4 - Técnicas analíticas para quantificação de *N*-ureídos

A aparente correlação positiva entre a concentração de *N*-ureídos na seiva do xilema e as estimativas do  $\text{N}_2$  provenientes da fixação biológica de nitrogênio foi encontrada por Hardy e colaboradores em 1968, utilizando a técnica de redução do acetileno (HARDY, *et al.*, 1968). Porém, esta técnica apesar de simples, rápida e de baixo custo, possui desvantagens (LEDGARD e STEELE, 1992) como: determinação em curto período de tempo pois, normalmente são necessárias determinações em um espaço maior de tempo para cobrir possíveis variações noturnas, diurnas e de época de crescimento; necessidade de calibração da produção de etileno com a fixação biológica de  $\text{N}_2$  e influência do ensaio sobre a atividade da nitrogenase.

Em 1970, VOGELS e van der DRIFT propuseram um método espectrofotométrico altamente sensível e seletivo para a quantificação dos *N*-

ureídos. Nesta metodologia, baseada na reação de Rimini-Schryver (YOUNG e CONWAY, 1942), os *N*-ureídos são estimados empregando hidrólise seletiva (ácida ou alcalina) a glioxilato (VOGELS e van der DRIFT, 1970), segundo o mecanismo reacional mostrado na FIGURA 6.

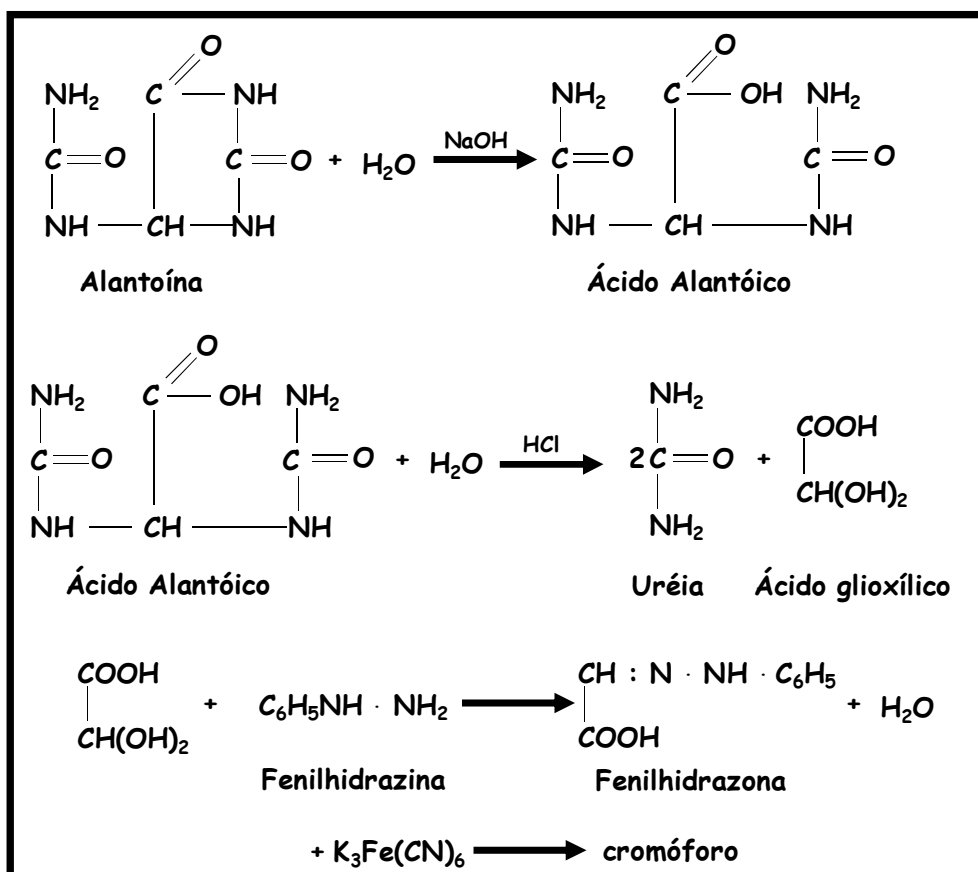


FIGURA 6 - Reação de Rimini-Schryver. (Adaptado de VOGELS e van der DRIFT, 1970).

Na década de 90, Herridge e colaboradores confirmaram através da técnica da diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  (HERRIDGE e PEOPLES 1990), a teoria de que quanto maior e mais eficiente a fixação biológica de nitrogênio, maior o teor *N*-ureídos nos tecidos de plantas leguminosas.

Das três principais técnicas para determinação de *N*-ureídos, a mais difundida e usada ainda hoje para quantificação de *N*-ureídos nos laboratórios de

Microbiologia do Solo, é a de VOGELS e van der DRIFT (1970), podendo ser conduzida com equipamentos básicos de um laboratório de Microbiologia.

## 2.5 - Sistemas de Análise em Fluxo

A idéia de automação em química analítica tem como paradigma o aumento da produtividade através da mecanização dos processos manuais realizados pelos analistas. Segundo esse conceito, cada amostra é individualmente tomada, devidamente isolada e processada (concentrada, diluída, etc.), recebe os reagentes necessários, é deixada um tempo reagindo e então, tem seu produto monitorado, como pode ser visto na FIGURA 7 (b e c), constituindo-se num processo completamente discreto de análise.

Entretanto, o processamento das amostras desde sua extração até a obtenção do composto final, é um procedimento que envolve numerosas etapas, e assim pode apresentar vários problemas ao analista, uma vez que há o envolvimento de grande quantidade de partes móveis como recipientes para amostras, cubetas, entre outros, resultando em frequentes problemas de precisão tornando-se demorado principalmente quando há grandes quantidades de amostras a serem processadas.

Dessa idéia, Leonard Skeggs, nos anos 50 desenvolveu um sistema de análise que permitia implementar procedimentos analíticos, inserindo uma alíquota da solução da amostra em um fluxo contínuo da solução de reagente.

O princípio básico dos sistemas propostos por Leonard Skeggs era adicionar seqüencialmente amostra e reagente e uma seqüência de bolhas de ar que ajudavam na homogeneização e evitava a dispersão, FIGURA 7 (c), sendo que essas eram removidas antes da detecção (SKEGGS, 1957). Desta idéia, surgiu o equipamento conhecido como Autoanalyzer, o qual foi comercializado pela Technicon e desde então, o principal foco desses equipamentos era análise clínica.

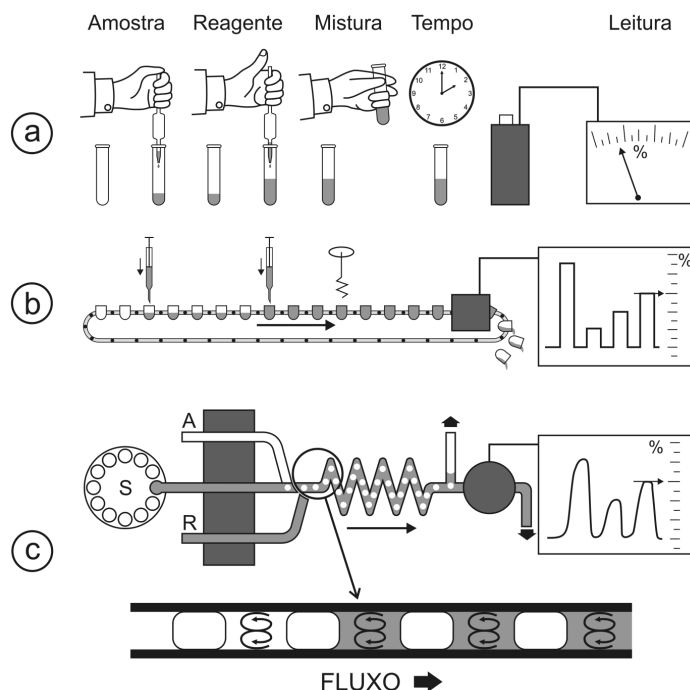


FIGURA 7 - Paralelo entre procedimentos manuais e automatizados em um ensaio colorimétrico típico: **(a)** operação manual; **(b)** um tipo de analisador discreto; **(c)** analisador em fluxo com segmentação de ar. Notar que em todas as análises, as detecções são realizadas na condição de equilíbrio da reação (à direita). (Adaptado de RUZICKA e HANSEN, 1988).

Em 1982, PATTERSON e colaboradores fizeram uso de um Autoanalyzer para quantificação espectrofotométrica de *N*-ureídeos (PATTERSON *et al.*, 1982). O princípio desta metodologia, baseava-se na determinação dos compostos amídicos, os quais reagem com hipoclorito e fenol resultando no indofenol (reação de Berthelot) (DOMNAS, 1961). Os extratos dos tecidos de soja eram tratados com uma resina de troca catiônica para remover aminoácidos e  $\text{NH}_4^+$ .

GLENISTER e LA RUE (1987), também fizeram uso de um Autoanalyzer para implementar a determinação semi-automática de *N*-ureídeos. Neste procedimento, os autores automatizaram as três últimas etapas da reação de Rimini-Schryver para o método espectrofotométrico proposto por VOGELS e van der DRIFT (1970), mostrado na FIGURA 6 e esquematizado na FIGURA 8, no qual o glioxilato é convertido a fenilhidrazona, a qual é oxidada em meio

fortemente ácido com ferricianeto, resultando em um produto com absorção em 540 nm.

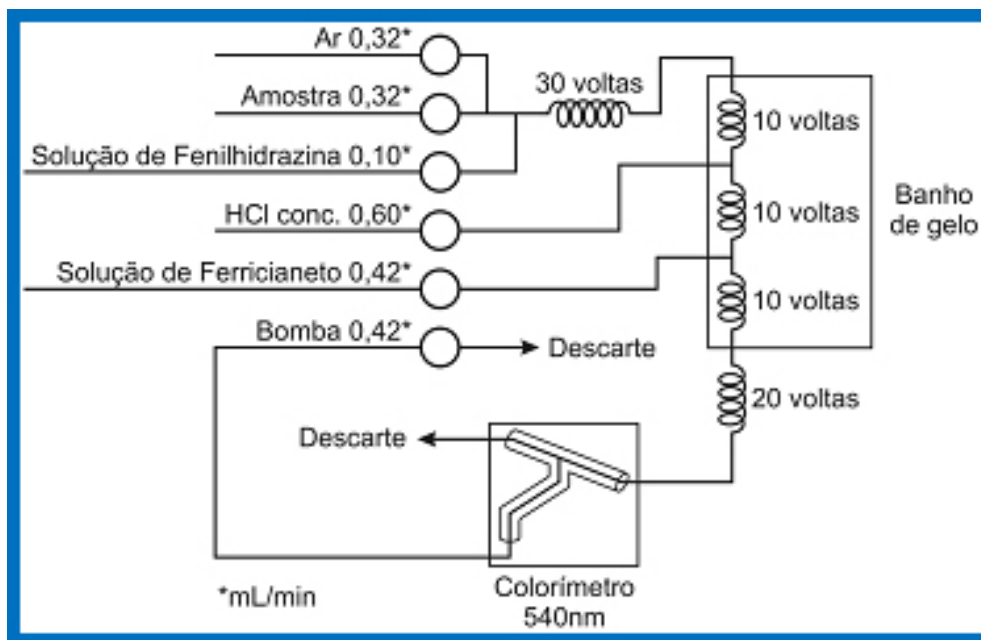


FIGURA 8 - Representação esquemática do auto-analisador para determinação de *N*-ureídios, segundo GLENISTER e LA RUE (1987).

Com o intuito de se buscar a automação desejada foi proposto em 1975, o processo de análise por injeção em fluxo pelos pesquisadores RUZICKA e HANSEN (1975). Inicialmente, o processo foi denominado análises por injeção em fluxo e identificado pela sigla FIA, sendo esta utilizada no título dos primeiros trabalhos escritos em Inglês "Flow Injection Analysis".

A análise química por injeção em fluxo tem como principais vantagens menor envolvimento do analista, menor consumo de reagentes, menores tempo de análise com maior precisão e exatidão (RUZICKA e HANSEN, 1975), quando comparada a sistemas de análise em batelada.

A análise química por injeção em fluxo tem como princípio básico à injeção reprodutível de um certo volume de amostra num fluxo transportador, o qual a desloca para a cela de fluxo onde ocorre a detecção. Ao longo do percurso analítico recebe os reagentes e pode passar por diversas etapas de processamento, sofrendo dispersão controlada e reprodutível, a qual assegura

que os processos que ocorrem entre a injeção e a detecção não necessitem que a reação se complete, ou atinja o estado de equilíbrio, garantindo a obtenção de um sinal identificável (REIS, 1996), como ilustrado na FIGURA 9.

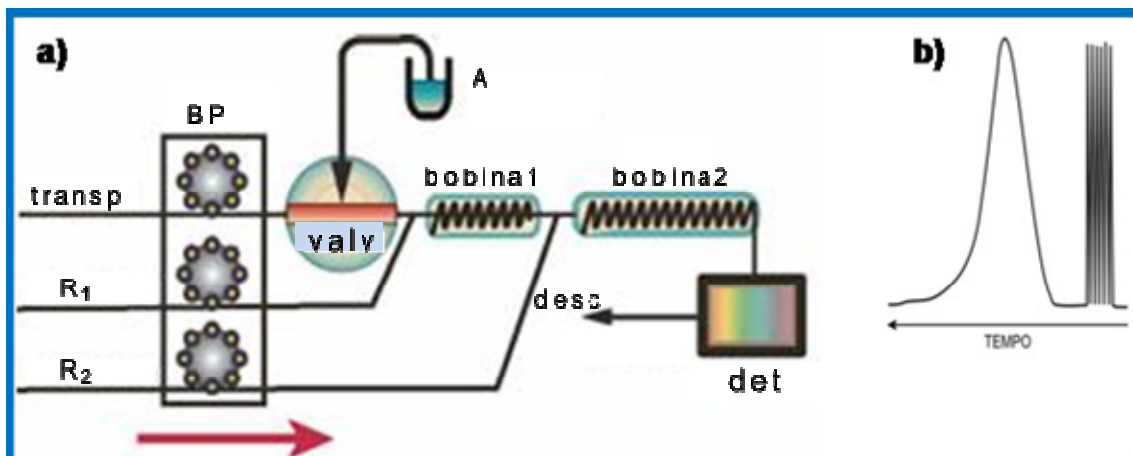


FIGURA 9 - Diagrama de fluxo de um módulo de análise. **a)** módulo de análise; **b)** registro do sinal analítico traçado em função do tempo. O registro da direita em **b** mostra o perfil de distribuição do analito ao passar pelo detector. A = amostra; transp. = transportador; desc. = descarte; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = reagentes; det. = detector; valv. = válvula solenóide e BP = bomba peristáltica. (Adaptado de [www.flowinjection.com](http://www.flowinjection.com)<sup>1</sup>).

Os sistemas em fluxo permitem que uma infinidade de operações tais como diluição, pré-concentração, mistura, etc., sejam realizadas com maior flexibilidade do que nos sistemas “batch”.

Diversos procedimentos manuais foram adaptados à técnica FIA, por exemplo: extração por solvente orgânico (BERGAMIN *et al.*, 1978a); pré-concentração com resina de troca iônica (BERGAMIN *et al.*, 1980); separação por geração de fase gasosa (ZAGATTO *et al.*, 1979); adição de padrões (GINÉ *et al.*, 1983); extração líquido-líquido em fase única (FACCHIN *et al.*, 1994), etc. Foram desenvolvidos sistemas de reamostragem para efetuar diluição em linha (REIS *et al.*, 1994), sistema monossegmentado por bolhas de ar para minimizar a dispersão (PASQUINI e OLIVEIRA, 1985); sistema com zonas coalescentes para minimizar

<sup>1</sup> Disponível em: < <http://www.flowinjection.com/method2.aspx>>. Acessado em 08/07/2010.



o consumo de reagentes (BERGAMIN *et al.*, 1978b), dissolução eletrolítica, possibilitando a análise de amostras sólidas (metálicas) sem dissolução prévia (SOUZA *et al.*, 1991) e re-localização da cela de fluxo para a determinação seqüencial de dois analitos (NOGUEIRA *et al.*, 1996).

A versatilidade dos sistemas de análise por injeção em fluxo possibilitou seu emprego acoplada a outras técnicas analíticas como: absorção atômica com chama (ZAGATTO *et al.*, 1979a) fluorescência atômica (MOREDA-PINEIRO *et al.*, 1997) quimiluminescência (ZAITSU *et al.* 1987), amperometria (ZHENG & ZHAN, 1999), biamperometria (MICHALOWSHI *et al.*, 1993), potenciometria com eletrodos íons seletivos (VIEIRA *et al.*, 2003), etc.

Os sistemas FIA típicos fazem uso de bombas peristálticas para a propulsão dos fluidos, tubos de propulsão do tipo Tygon, conexões e confluências para promover o encontro da amostra com o reagente, o percurso é normalmente composto por tubulação de polietileno com diâmetro de 0,8 mm e finalmente um detector dotado com cela de fluxo acoplado a um registrador potenciométrico.

Inicialmente, era utilizada uma seringa hipodérmica para selecionar e inserir a alíquota da solução da amostra no percurso analítico, o que deu origem ao nome do processo "Flow Injection Analysis". Inovações com o intuito de diminuir as flutuações causadas pelo processo de injeção e tornar os sistemas mais versáteis surgiram com o injetor proporcional (REIS e BERGAMIN, 1993).

Continuando na linha de evolução dos sistemas de análise em fluxo e sempre na busca da automação, RUZICKA e MARSHALL (1990) apresentaram um novo conceito de análise em fluxo, denominado análise por injeção seqüencial e identificado pela sigla SIA, sendo esta utilizada no título dos trabalhos publicados em Inglês "Sequential Injection Analysis".

A análise por injeção seqüencial pode ser definida como processo mecanizado, no qual as soluções são inseridas no percurso analítico de forma seqüencial e, em seguida, podem ser transportadas em direção ao detector. A FIGURA 10 mostra um diagrama de fluxo de um sistema de análise por injeção seqüencial.

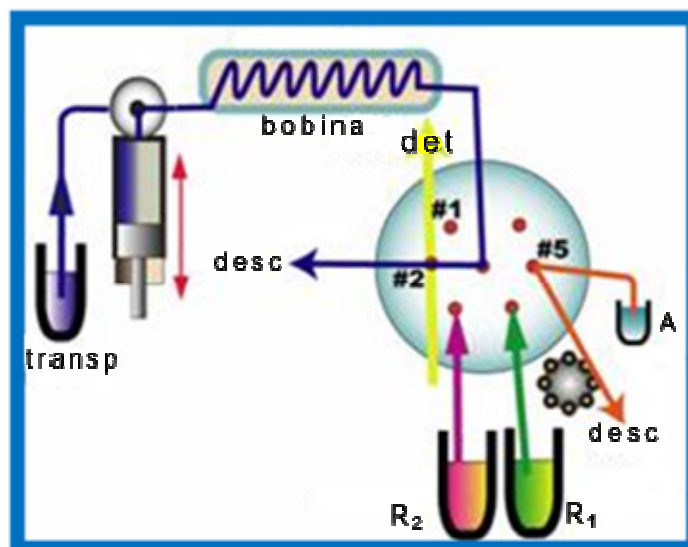


FIGURA 10 - Diagrama de fluxo de um sistema de análise por injeção seqüencial. A = amostra; transp. = transportador; desc. = descarte; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = reagentes e det. = detector uv-vis. (Adaptado de [www.flowinjection.com](http://www.flowinjection.com)<sup>1</sup>)

Enquanto o FIA clássico emprega um canal de bombeamento para cada solução, o SIA é monocanal. Os sistemas de análise por injeção sequencial são implementados com válvula eletro-mecânica de multiposição. Esta válvula, tem uma porta central que se comunica sequencialmente com 8 portas laterais, as quais podem ser designadas para a inserção das soluções dos reagentes e da amostra no percurso analítico. A comunicação da porta central da válvula com as laterais para inserção das alíquotas da amostra e reagentes é controlada por um microcomputador, em seqüência previamente estabelecida. O emprego desses recursos de eletrônica e informática dá ao SIA um grande potencial para desenvolver procedimentos automáticos, permitindo modificações nas variáveis operacionais, sem que seja necessário se modificar a configuração do módulo de análise.

A baixa freqüência de amostragem e dificuldades de se implementar procedimentos analíticos que empregam varias soluções de reagentes são, em princípio, desvantagem do sistema de injeção sequencial em relação ao sistema por injeção em fluxo (Vieira, J., 2001), mas esse fato não tem limitado suas aplicações.

Os sistemas de SIA tem tido muitas aplicações, principalmente em análises de processos industriais e ambientais (VANSTADEN e TALJAARD, 1996), como monitoramento de bioprocessos, de processos farmacêuticos, de biorremediações (BARNETT, *et al.*,1999), reações cinéticas e catalíticas (RUZICKA, 1992), entre outras.

A versatilidade dos sistemas SIA permite a adaptação de câmaras de difusão (DECNOPWEEVER e KRAAK, 1997), membranas de diálises (SILVA *et al.*, 1999), câmara de pervaporação (KAMOGAWA e NOGUEIRA, 2003 ), etc.

Depois de inovações como o injetor proporcional e a válvula multiposição surgem às válvulas solenóide de três vias (MALCOLMELAWES e PASQUINI, 1988), as quais impulsionaram a criação de um novo conceito na escala evolutiva dos sistemas de análise em fluxo, o qual será abordado no próximo segmento.

### **2.5.1 - Multicomutação em Fluxo**

Em 1994, Reis e colaboradores empregando válvulas solenóide de 3 vias, desenvolveram o processo denominado Multicomutação em fluxo (REIS *et al.*, 1994). Na FIGURA 11 são mostrados alguns modelos de válvulas solenóide de 3 vias e válvulas solenóide de estrangulamento utilizadas no processo multicomutação.

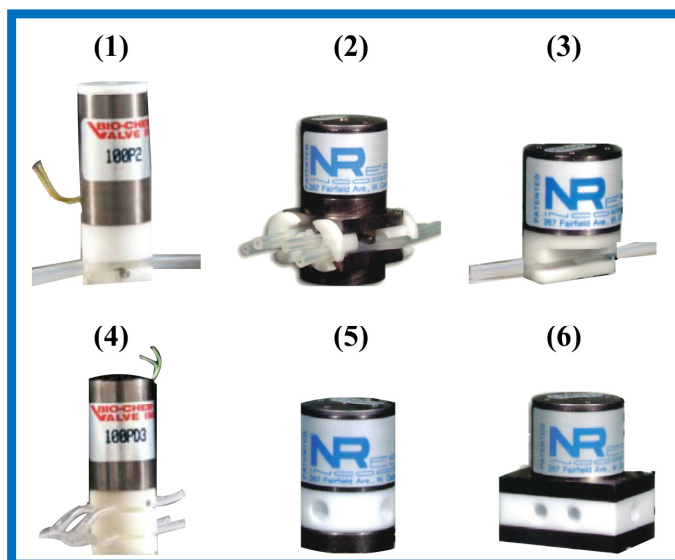


FIGURA 11 - Válvulas solenóide utilizadas para manipular amostras e soluções de reagentes no processo de multicomutação. Onde de (1) até (4) são válvulas de estrangulamento do tipo: única via; multivias; única via; multivias, respectivamente; e (5) e (6) válvulas de 3 vias e de isolamento, respectivamente.

De acordo com o modelo da FIGURA 12, o princípio da multicomutação baseia-se na introdução alternada de pequenas alíquotas de amostra e reagente no percurso analítico, produzindo múltiplas interfaces entre as soluções, formando a partir do ponto de junção (x) (FIGURA 13) uma seqüência binária a qual é transportada por uma solução transportadora até o detector

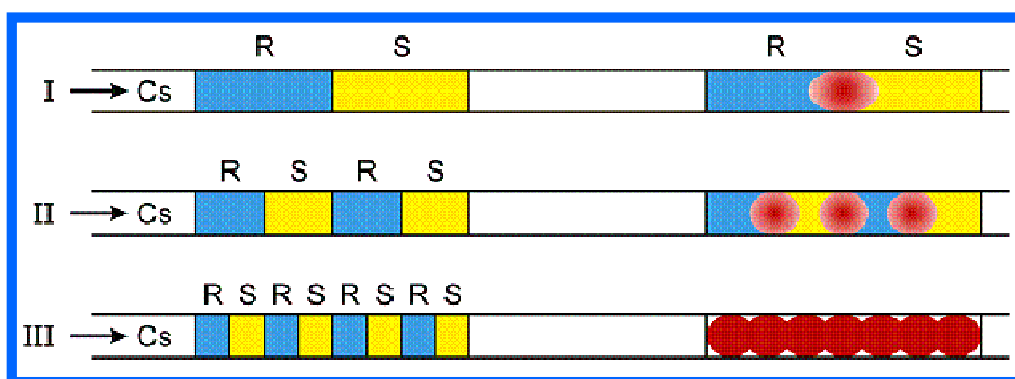


FIGURA 12 - Modelo do processo de multicomutação em fluxo. Cs = transportador; R = Reagente; S = Amostra e ● = produto da reação.

Segundo o diagrama do processo de multicomutação, ilustrado na FIGURA 13, o módulo de análise para implementar um procedimento analítico, é constituído por um conjunto de válvulas solenóide, sendo uma para cada solução a ser processada. Várias soluções podem ser inseridas no percurso analítico empregando apenas um canal de bombeamento.

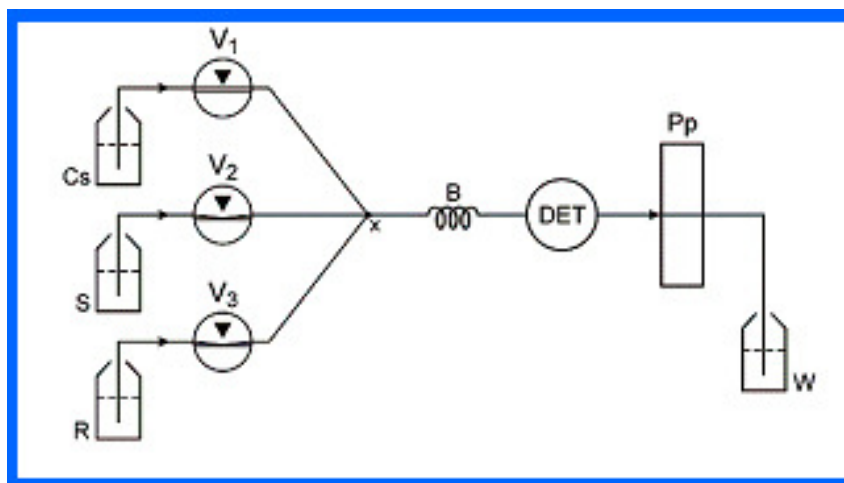


FIGURA 13 - Módulo de análise para implemetar o processo de multicomutação em fluxo. **Cs** – solução transportadora; **S** – amostra; **R** – reagente; **V<sub>1</sub>**, **V<sub>2</sub>** e **V<sub>3</sub>** – válvulas solenóide de estrangulamento do tipo via única; **x**- confluência; **B** – bobina de mistura; **DET** – detector; **Pp** – bomba peristáltica, modo aspiração; **W** – descarte.

O processo de multicomutação permite, além das mesmas vantagens do sistema FIA, que as válvulas solenóide sejam acionadas somente quando o reagente é requerido, trazendo como grande vantagem economia de amostra e reagentes e, consequentemente, menor geração resíduo (ICARDO *et al.*, 2002), contribuindo para o conceito de Química Limpa.

A seqüência de acionamento das válvulas e os tempos de permanência de cada válvula ligada podem ser estabelecidos por software em função das características do procedimento analítico. Em vista disso, o mesmo módulo de análise pode ser empregado para a determinação de diferentes analitos sem alterar sua configuração.

A versatilidade do processo de multicomutação permite o desenvolvimento de diversos módulos de análise com duas, três, quatro ou mais válvulas solenóide. Esta característica tem tido muitas aplicações, principalmente em análises ambientais (SILVA *et al.*, 2009), farmacêuticas (PAIM *et al.*, 2002), agronômicas (TUMANG, *et al.*, 1998), clínicas (LUCA e REIS, 2004), entre outras.

KRONKA e colaboradores desenvolveram um procedimento no qual o sistema de fluxo baseado no processo de multicomutação permitia a determinação espectrofotométrica de amônio e fosfato em digeridos de plantas (KRONKA *et al.*, 1996). A detecção fotométrica foi baseada nos métodos de azul de molibdênio e azul de indofenol para fosfato e amônio, respectivamente. A reação para fosfato ocorria em meio ácido e a de amônio em meio alcalino. Em vista das facilidades do processo de multicomutação, foi possível determinar os dois analitos sem alteração da configuração do módulo de análise, com uma frequência de amostragem de 80 determinações por hora (det/h), RSD em torno de 2,0% e mínimo consumo de reagentes.

O controle dos dispositivos via software facilitou, por exemplo, a inserção sequencial de múltiplas zonas de amostra no percurso analítico, permitindo um aumento do tempo de residência da amostra, melhorando a sensibilidade de procedimentos analíticos baseados em reações de cinéticas relativamente lentas. Essa estratégia foi explorada por TUMANG e colaboradores (1998) no desenvolvimento de um procedimento espectrofotométrico para determinação de boro em digeridos de planta, usando o método da reação com o reagente cromogênico Azometina-H, resultando em 35 det/hora, RSD de 2,5% e baixo consumo de reagente.

Outra vantagem do controle dos componentes do módulo de análise via software é a interrupção do fluxo da zona de amostra durante um determinado período, evitando o uso de bobinas reacionais de comprimento longo, para melhorar a sensibilidade em métodos baseados em reações cinéticas lentas, fator que aumenta a dispersão da zona de amostra. Essa estratégia foi adotada por LAPA e colaboradores (2000) no desenvolvimento de um procedimento fluorimétrico para aumentar o tempo de reação na determinação de amilorida em

preparações farmacêuticas. Neste trabalho, os autores fizeram uso de uma bobina reacional de 50 cm apenas e com tempo de parada de fluxo de 120 s o que resultou em uma freqüência de amostragem de 30 det/hora com RSD de 2,2%.

A diversidade de aplicação do processo de multicomutação permite o desenvolvimento de diversos módulos de análise acoplados a outras técnicas de detecção como ICP OES (MIRANDA *et al.*, 2002), Infravermelho com transformada Fourier (RODENAS-TORRALBA *et al.*, 2004), potenciometria (PAIM *et al.*, 2002), entre outras.

Nesse contexto, MIRANDA e colaboradores (2002) desenvolveram um procedimento, no qual o sistema de fluxo baseado no processo de multicomutação foi acoplado a um espectrômetro de emissão ótica com plasma induzido (ICP OES) para determinação de Cd, Ni e Pb em digeridos de material vegetal e alimentos. Para isso, os autores desenvolveram um módulo de análise no qual os analitos eram pré-concentrados em linha em uma coluna com resina de troca catiônica e obtiveram uma freqüência de amostragem de 90 det/hora com RSD menor que 4%.

Mesmo com a diversidade de técnicas de detecção associadas ao processo de multicomutação em fluxo, a técnica predominante ainda é a espectrofotometria de absorção molecular. Nesse contexto, a associação de módulos de análise acoplados a fotômetros baseados em LEDs (ROCHA, 2000) como fonte de radiação e fotodiodos como transdutor de sinal, tem sido desenvolvidos com a intenção de construir equipamentos integrados e de dimensão reduzida.

Nessa linha, LUCA e REIS (2004) desenvolveu um procedimento de multicomutação em fluxo com detecção espectrofotométrica para determinação simultânea de proteína total e albumina em plasma de sangue animal. Nessa proposta, os métodos fotométricos selecionados foram baseados na reação com Verde de Bromocresol e Biureto e empregou dois detectores fotométricos baseados em LEDs, acoplados a celas de fluxo, com  $\lambda = 546$  nm e  $\lambda = 628$  nm para determinação de albumina e proteína total respectivamente. Os autores

obtiveram uma frequência de amostragem de 45 det/hora para os dois analitos e consumo de 140  $\mu\text{L}$  para amostra e reagentes.

Silva e colaboradores (2009) desenvolveram um procedimento de multicomutação em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de ortofostato em águas naturais empregando o método do azul de molibdênio. O sistema de detecção foi composto por um LED como fonte de radiação acoplado a cela de fluxo de caminho ótico longo e um fotodiodo para a geração do sinal, o qual constituiu-se em um equipamento compacto de bom desempenho, uma vez que apresentou LD de 2,4  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a faixa linear de trabalho de 10 - 800  $\mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{PO}_4^{3-}$ , frequência de amostragem de 20 det/hora e RSD de 2,0%.



## Objetivos

O presente trabalho de Tese teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema de multicomutação em fluxo para determinação de *N*-ureídos totais em tecido vegetal de leguminosas visando a sua adequação para estudos envolvendo a Microbiologia do Solo e a Fixação Biológica de Nitrogênio. Para o cumprimento desse objetivo mais geral, alguns objetivos específicos destacaram-se.

Desenvolver um software para controlar o módulo de análise e efetuar a aquisição de dados, possibilitando que as várias etapas da determinação dos *N*-ureídos fossem executadas de forma automática/mecânica;

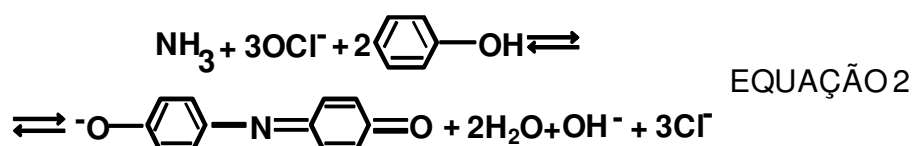
Desenvolver um instrumento para detecção fotométrica para determinação de *N*-ureídos totais empregando LED como fonte de radiação e fotodiodo como detector.

Desenvolver procedimento analítico automático para determinação sequencial de *N*-ureídos totais em tecidos de leguminosas (soja), empregando multicomutação em fluxo e detecção fotométrica.

### 3 - Experimental

#### 3.1 – Método

O método selecionado para a determinação de *N*-ureídos em tecido vegetal de soja baseia-se na formação do composto azul de indofenol (reação de Berthelot). A formação do composto azul de indofenol ocorre através da oxidação do nitrogênio amídico (DOMNAS, 1961) com hipoclorito de sódio e reação com fenol em meio alcalino, como mostrado na EQUAÇÃO 2. A formação do complexo pode ser quantificado por espectrofotometria de uv-vis, monitorando a absorção em 625 nm, a qual é função da concentração de *N*-ureídos na amostra.



#### 3.2 - Material

##### 3.2.1 - Equipamentos e Acessórios

Os equipamentos e acessórios compreenderam um fotômetro construído em laboratório, empregando componentes básicos como fotodiodo, LED (Light Emitting Diode) de alto brilho com máximos de emissão em 660 nm e um fotodiodo com amplificador operacional integrado ao mesmo encapsulamento; um microcomputador Pentium II com uma interface eletrônica PCL-711S (advantech corp, OH, USA); uma bomba peristáltica Ismatec IPC-8 com tubos de bombeamento de Tygon com diâmetro de 1,00 e de 2,0 mm; cinco válvulas

solenóide de três vias e 2 válvulas solenóide de estrangulamento via única (NResearch, New Jersey, NJ, USA); linhas de fluxo de tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno; uma interface para prover a diferença de potencial e intensidade de corrente requeridas para o funcionamento das válvulas (RODENAS-TORRALBA *et al.*, 2006), uma cela de fluxo de vidro, tendo 30 mm de caminho óptico e 3,0 mm de diâmetro interno. O programa de controle do módulo de análise para implementar os três procedimentos analíticos e efetuar a aquisição dos dados foi escrito em linguagem QuickBasic 4.5.

### 3.2.2 - Construção do módulo de análise

O módulo de análise baseado no processo de multicomutação em fluxo, foi constituído por uma bomba peristáltica e 5 válvulas solenóide de 3 vias e 2 válvulas solenóide de estrangulamento via única.

O módulo de análise e o sistema de detecção foram controlados por um microcomputador Pentium 166 MHz equipado com uma interface eletrônica, PCL-711S. Essa interface fornece 2 portas digitais de entrada e 2 de saída, todas de 8 linhas, um conversor analógico/digital (ADC) e um conversor digital para analógico (DAC), ambos com 12 bites de resolução.

As válvulas solenóide foram controladas pelo microcomputador através da interface PCL-711S. As portas de saída digital de 8 bits geram sinais de controle no padrão “transistor-transistor logic” (TTL) (HOROWITZ & HILL, 1980). Os sinais de controle gerados pelo computador e disponibilizados nas portas digitais de saída, são no padrão TTL, portanto a diferença de potencial máxima é de 5 V e a intensidade de corrente é da ordem 2 mA. Para o funcionamento das válvulas solenóide era necessária uma diferença de potencial de 12V e intensidade de corrente em torno de 100 mA. Para tanto, foi necessário a construção de uma interface de potência para compatibilizar as diferenças de potencial e corrente necessárias para o acionamento das válvulas. Na FIGURA 14

é mostrado o diagrama da interface, a qual foi construída em placa de circuito impresso em fibra de vidro.

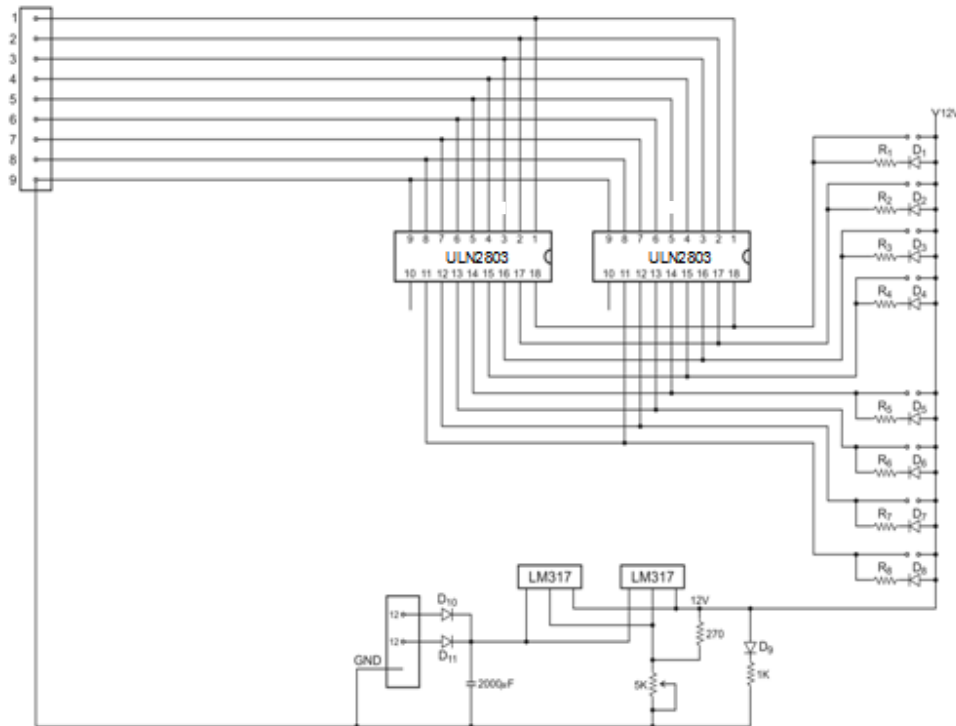


FIGURA 14 – Circuito eletrônico da fonte de alimentação.  $D_{10}$  e  $D_{11}$  = diodos retificadores para 2 A; LM 317 = reguladores de voltagem;  $D_1 - D_9$  = diodos emissores de luz (LED);  $R_1 - R_8$  = resistores de 2,2 k $\Omega$ , 1/4 W.

As linhas numeradas de 1 a 9 em associação nos dois circuitos integrados ULN2803, formam a interface para conexão com as linhas de saída da interface PCL 771S. Os sinais de controle são enviados pelo computador através destas linhas. Cada linha do ULN2803 pode suportar um dreno de corrente de 400 mA, e nesta interface dois circuitos integrados foram associados em paralelo para aumentar a intensidade de corrente fornecida. Na entrada de força desta interface ( $D_{10}$  e  $D_{11}$ ) foram soldados os terminais de 12 V alternados fornecidos pelo transformador. O resistor variável de 5 k $\Omega$  acoplado aos reguladores LM317, permitiu ajustar a diferença de potencial desejada (12V). Convém lembrar que 12 V alternados fornecidos pelo transformador é o valor eficaz, portanto depois de

retificado o valor de carga armazenado no capacitor gerou uma diferença de potencial em torno de  $17 (V_{efz}\sqrt{2})$ . Os pontos -o e o- na interface indicam os terminais de conexão das válvulas solenóide. Observa-se que em cada par de terminais, um está ligado à linha de 12 V e o outro aos ULN2803. Quando computador envia um sinal de controle para uma linha de entrada destes dispositivos, internamente ele fecha o circuito para o terra, permitindo a circulação de corrente através do dispositivo conectado na respectiva linha. Os LEDs acoplados em paralelo com os terminais permitem visualizar qual dispositivo foi acionado naquele instante.

O diagrama de blocos representativo do sistema de análise em fluxo desenvolvido é mostrado na FIGURA 15. O software de controle do módulo de análise foi escrito em linguagem Quick Basic 4.5, o qual comanda cada uma das válvulas solenóide, a bomba peristáltica e o detector.

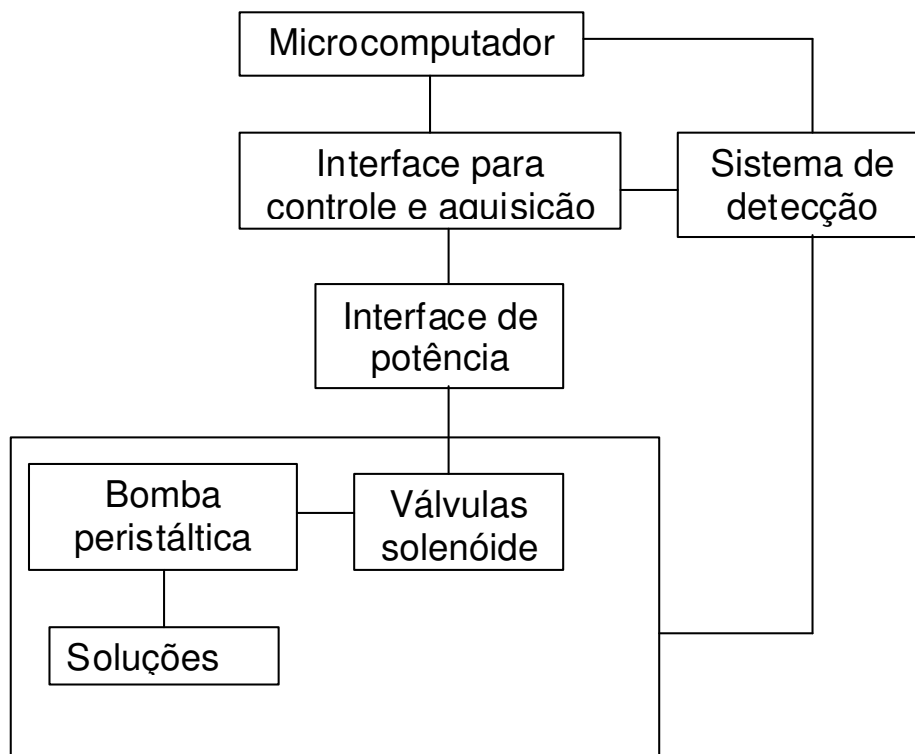


FIGURA 15 – Diagrama de blocos do sistema de muticomutação em fluxo.

### 3.2.3 - Sistema de Detecção

O instrumento de detecção fotométrica para a determinação de *N*-ureídeos foi desenvolvido empregando LED como fonte de radiação e fotodiodo como detector. Nos diagramas dos módulos de análise mostrados nas FIGURAS 18, 19 e 21 está indicado o fotômetro de LED e na FIGURA 16 é mostrado diagrama do fotômetro indicando também o acoplamento à cela de fluxo, a qual é um tubo de vidro em “U” com diâmetro interno de 3,0 mm e comprimento de 30 mm, então o volume interno da cela é de 212  $\mu$ L. O fotômetro emprega um LED com máximo de emissão em 660 nm. O circuito de controle do brilho do LED constituído pelo transistor e pelos resistores possibilitava ajustar a intensidade de emissão do LED.

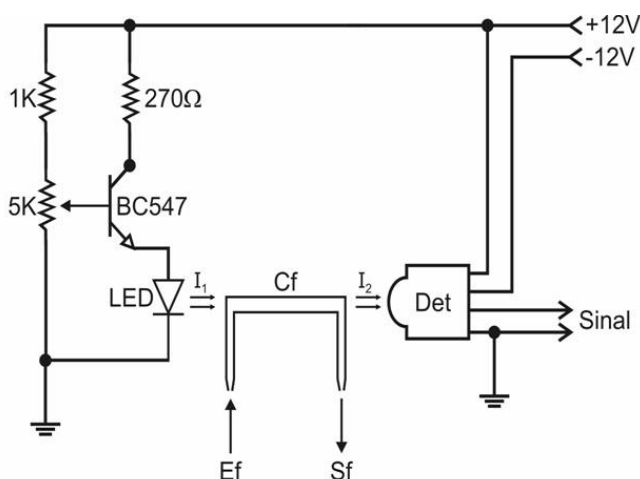


FIGURA 16. Diagrama de acoplamento do fotômetro à cela de fluxo. LED = fonte de radiação eletromagnética;  $\lambda = 625$  nm;  $I_1$  e  $I_2$  = feixe de radiação incidente e emergente na cela de fluxo, respectivamente; Cf = cela de fluxo, 30 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno; Ef e Sf = entrada e saída de fluido; Det = detector fotométrico.

Quando o programa é executado, a calibração do fotômetro é feita em duas etapas. Na primeira, o LED é apagado e o microcomputador lê o sinal de saída do fotômetro no escuro (Se). Na segunda etapa, com a cela de fluxo cheia com água, o brilho do LED é ajustado através do resistor variável (5 k $\Omega$ ) até a

saída do sinal atingir o valor de 2000 mV (Vf). Estes valores (Se, Vf) são salvos e usados como referência no cálculo da absorbância, quando o procedimento analítico é executado.

### 3.2.4 - Sistema de Controle do Aquecimento do Banho Térmico

O sistema de controle do aquecimento do banho térmico foi desenvolvido segundo o diagrama mostrado na FIGURA 17.

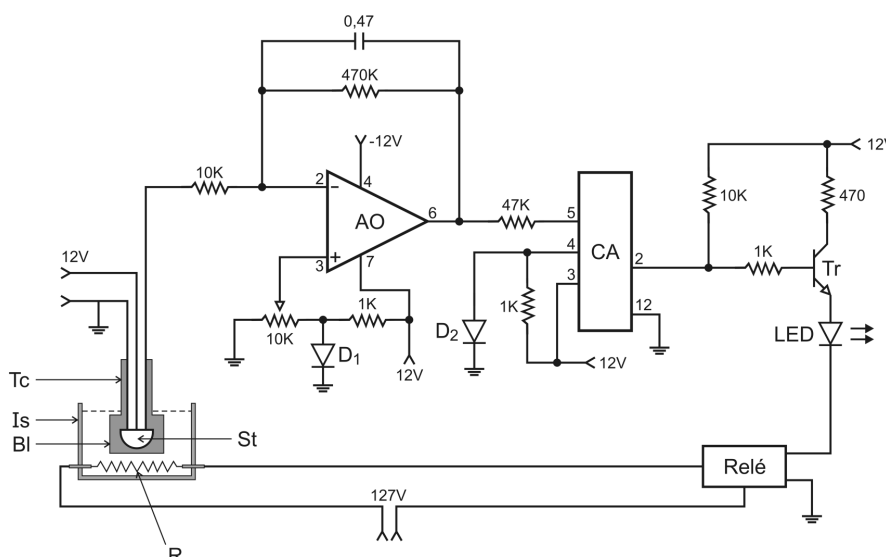


FIGURA 17. Diagrama do circuito eletrônico para controle do aquecimento do banho térmico. St = Sensor de temperatura LM35, R = Resistor (30  $\Omega$ ), fio de níquelcromo; BI = tarugo da latão; Is = caixa de isopor, capacidade de 2L; Tc = tubo de cobre; D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> = diodos retificadores, IN4007 DC; AO = amplificador operacional OP07; CA = comparador analógico, LM339; Tr = transistor BC547; LED, máximo de emissão  $\lambda = 640$  (vermelho).

O LM 35 é um sensor de temperatura de estado sólido que opera da faixa de -55 a 155  $^{\circ}\text{C}$  com resposta linear de 10 mV por  $^{\circ}\text{C}$ . A malha de amplificação formada pelo amplificador operacional (AO) amplificava a diferença de potencial gerada pelo sensor de temperatura em torno de 47 vezes. A saída do amplificador operacional está acoplada a uma das entradas analógicas do

comparador (CA). Na outra entrada do comparador (pino 4) está aplicada a diferença de potencial em torno de 0,7 V fornecida pela malha formada pelo diodo ( $D_2$ ) e pelo resistor de  $1\text{k}\Omega$ . A temperatura de trabalho foi estabelecida em  $40\text{ }^\circ\text{C}$  e a calibração do controlador foi realizada considerando as características do comparador LM339. Foi estabelecido como referência aplicada ao pino 4, a diferença de potencial de 0,7 V. Quando a diferença de potencial aplicada ao pino 5 é igual ou maior que 0,7 V, o dispositivo coloca internamente o pino 2 (saída) em estado de alta impedância, então a corrente drenada pelo resistor de  $10\text{ k}\Omega$  flui através da base do transistor (Tr), o qual funciona como chave. A corrente que flui através do transistor e do LED aciona o relé de estado sólido, o qual fecha o circuito do aquecedor. À medida que a temperatura aumenta a diferença de potencial gerada pelo sensor de temperatura aumenta. O sensor está acoplado à entrada inversora do amplificador operacional, portanto uma variação positiva no sinal de entrada gera uma variação de polaridade negativa na saída (pino 6). Uma diferença de potencial menor que 0,7 V no pino 5 leva a mudança de estado do comparador analógico. Neste caso, é semelhante ao fechamento de uma chave interna para terra, então a corrente que flui através do resistor de  $10\text{ k}\Omega$  é drenada para terra. Em consequência, o transistor entra em corte (para de conduzir), apaga o LED e desliga o relé de estado sólido, parando de fornecer energia para o banho térmico.

A temperatura de trabalho era monitorada com um termômetro e quando alcançava o valor de  $40\text{ }^\circ\text{C}$  ajustava-se o potenciômetro acoplado à entrada não inversora do amplificador operacional até o LED apagar. O resistor de  $1\text{k}\Omega$  e o diodo  $D_1$  formavam uma fonte de referência estável em torno de 0,7 V e o resistor de  $10\text{ k}\Omega$  (multi-voltas) permitia um ajuste fino.

Ao longo do trabalho verificou-se que a temperatura de  $40\text{ }^\circ\text{C}$  era mantida, dispensando a recalibração do dia. Quanto à resolução de resposta do controlador, não foi possível fazer uma verificação rigorosa pela falta de um termômetro com resolução de  $0,1\text{ }^\circ\text{C}$ , entretanto observou-se que esta variação era no máximo de  $0,5\text{ }^\circ\text{C}$  e para a aplicação em apreço, não causava diferença significativa.



### 3.3 - Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e, estocadas em frascos de polietileno ou vidro, quando necessário. Água destilada e água purificada com condutividade menor que  $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$  foi utilizada na lavagem dos materiais e no preparo das soluções respectivamente.

Uma solução estoque de Alantoína  $1500 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi preparada pela dissolução de  $0,0593 \text{ g}$  de alantoína em  $250 \text{ mL}$  de água. Essa solução foi armazenada em frasco de vidro e mantida em refrigerador.

As soluções padrão de trabalho de alantoína, na faixa de  $30$  a  $260 \mu\text{mol L}^{-1}$  foram preparadas diariamente pela diluição apropriada da solução estoque.

Uma solução de hidróxido de sódio  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada dissolvendo-se  $6,0 \text{ g}$  do sólido em  $100 \text{ mL}$  de água.

Uma solução de ftalato ácido de potássio  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 4,0$ ) foi preparada dissolvendo-se  $10,21 \text{ g}$  do sólido em  $250 \text{ mL}$  de água.

Uma solução de hipoclorito  $10\% \text{ v/v}$  em meio alcalino foi preparada diariamente diluindo-se  $5,0 \text{ mL}$  de hipoclorito de sódio comercial (padronizado) em  $45 \text{ mL}$  de  $\text{NaOH } 0,15 \text{ mol L}^{-1}$ .

Uma solução saturada de fenol  $1,6 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pela diluição de  $15 \text{ g}$  fenol em  $100 \text{ mL}$  de maneira que houvesse a formação de um “corpo de fundo” (precipitado) no fundo do frasco. Essa solução foi armazenada em frasco âmbar, guardada em geladeira e denominada Solução A.

Uma solução saturada de fenol em meio alcoólico  $1:1 \text{ v/v}$  foi preparada diluindo-se  $50,0 \text{ mL}$  da solução A em  $50,0 \text{ mL}$  de etanol resultando em um volume final de  $100 \text{ mL}$ . Essa solução, cuja concentração é de  $0,80 \text{ mol L}^{-1}$ , foi armazenada em frasco âmbar, guardada em geladeira e denominada Solução B.

A solução de trabalho de fenol alcoólico em meio básico  $3:1:1 \text{ v/v/v}$  foi preparada diluindo-se  $12,0 \text{ mL}$  da solução B em  $4,0 \text{ mL}$  de água e  $4,0 \text{ mL}$  de  $\text{NaOH } 1,5 \text{ mol L}^{-1}$ , resultando em uma solução de concentração  $0,48 \text{ mol L}^{-1}$  de fenol. Essa solução foi armazenada em frasco âmbar Solução C.

### 3.4 - Preparo da Resina de Troca Catiônica

Para preparar a coluna de troca iônica, foi utilizado um tubo de acrílico cilíndrico de 3 mm de diâmetro interno e 20 mm de comprimento.

O condicionamento (PATTERSON *et al.*, 1982) da resina de troca catiônica (Dowex Maraton C), foi feito adicionando 100 mL de água sobre a resina em um Becker, em seguida foi mantida sob agitação por 5 min e deixada em repouso por 1 minuto. Feito isso, a água foi drenada e adicionou-se 50 mL de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> sobre a resina. Novamente, a suspensão foi agitada por 5 min e deixada em repouso por 1 minuto. Em seguida descartou-se o hidróxido. Após o descarte, a resina foi lavada 5 vezes com água afim de se retirar o hidróxido remanescente.

A ativação da resina foi feita adicionando-se 50 mL de HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> sendo a suspensão agitada por 5 min e deixada em repouso por 1 minuto. Feito isso, descartou-se o ácido. Em seguida, a resina foi lavada 5 vezes com água afim de se retirar o ácido remanescente. Após o descarte, foi filtrada a vácuo para se retirar o excesso de água. A resina foi então suspensa em etanol 50% e em seguida filtrada a vácuo e guardada em um frasco selado.

Para o preenchimento da coluna, as extremidades da mesma foram protegidas com lã de vidro para evitar perdas de resina para o percurso analítico, o que provocaria a obstrução das linhas de transmissão. Para a remoção dos interferentes presentes nos extratos de folhas de soja, foi usado aproximadamente 1,0 g de resina ativada.

### 3.5 - Preparo das Amostras

As amostras de tecido vegetal de soja foram cedidas pela Dra. Mariângela Hungria da EMBRAPA Soja de Londrina – PR e foram coletadas de dois conjuntos de ensaios realizados em duas safras (2002/2003 e 2004/2005) e

distribuídos nas principais regiões produtoras de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] segundo SOUZA (2006).

Segundo SOUZA (2006), os ensaios conduzidos na safra 2002/2003 foram instalados no delineamento experimental em blocos ao acaso, com três repetições. As coletas para a avaliação da fixação biológica do nitrogênio em soja foram realizadas no estágio R2 (florescimento pleno: 50% das plantas de cada parcela no estágio de florescimento pleno) do desenvolvimento da soja. Os experimentos foram instalados, conduzidos, as coletas foram efetuadas e as amostras enviadas para o Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja. Todas as áreas haviam sido cultivadas com soja por vários anos, recebido inoculantes e apresentavam populações estabelecidas de *Bradyrhizobium*, entretanto, não foram disponibilizadas informações sobre a inoculação na safra 2002/2003, bem como sobre as cultivares utilizadas e o sistema de cultivo adotado. Nenhuma das áreas recebeu fertilizante nitrogenado.

Os ensaios conduzidos na safra 2004/2005 foram no sistema de plantio convencional. As parcelas dos experimentos foram constituídas de quatro fileiras de 5 m de comprimento espaçadas por 0,5 m. Os ensaios foram conduzidos com o delineamento experimental em blocos ao acaso, com quatro repetições. As coletas para a avaliação da fixação biológica do nitrogênio em soja foram realizadas também no estágio R2. A inoculação foi feita com estirpes de *Bradyrhizobium* e foi utilizado o inoculante comercial Cell-Tech da Nitragin, aplicado na dose de 600.000 células semente<sup>-1</sup>.

No estágio R2, dez plantas de soja foram coletadas ao acaso de cada parcela, segundo sorteio realizado previamente à coleta, excluindo-se as duas fileiras externas e as duas fileiras centrais, para a avaliação da nodulação e crescimento das plantas. No laboratório, a parte aérea foi separada das raízes, lavada em água destilada e acondicionada em saco de papel.

A extração de *N*-ureídeos dos pecíolos de soja foi feita empregando o procedimento descrito por HUNGRIA (1994) e esquematizado na FIGURA 18, onde a amostra de tecido vegetal foi seca a 60° até atingir massa constante e moída em micro-moinho. O tamanho das partículas foi selecionado em 20 mesh.

Em seguida uma massa de 0,5 g do material seco foi colocada em tubo de vidro, onde foram adicionados 5 mL de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) e 2,5 mL de etanol (relação aproximada de 2:1 v/v, tampão:etanol). A mistura foi aquecida em banho-maria a  $80^\circ\text{C}$  durante 15 min, não deixando ferver. Em seguida, a mistura foi mantida em repouso durante 1h. Após essa etapa, a suspensão foi filtrada utilizando lã de vidro e centrifugada durante 5 min a 6600 rpm. O extrato (sobrenadante) resultante foi de 4,0 mL e 2,0 mL deste extrato foram diluídos para 30 mL. Os extratos bruto e diluído foram guardados em geladeira para as análises posteriores.

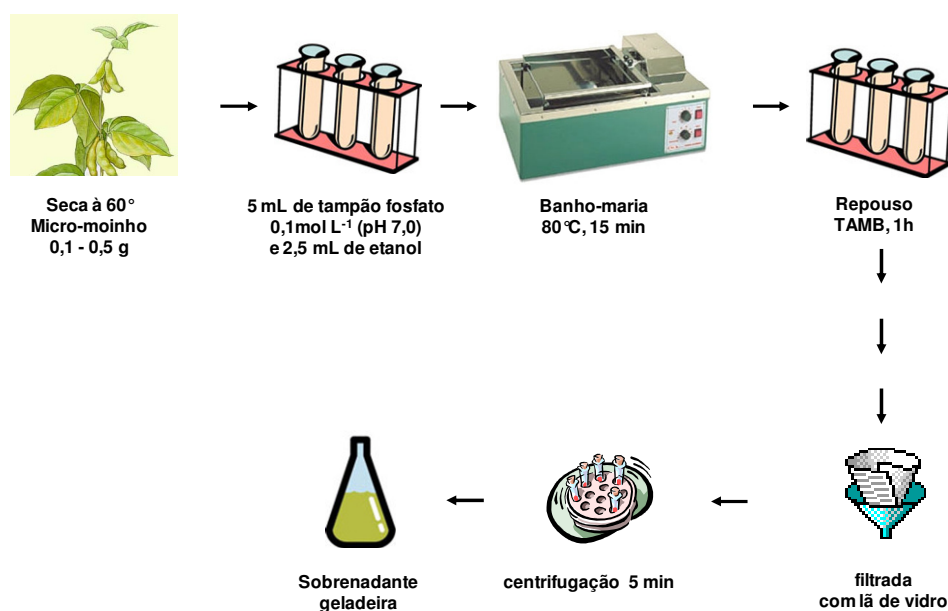


FIGURA 18 – Procedimento esquemático da extração de *N*-ureídos dos pecíolos de soja.

### 3.6 – Procedimentos em Fluxo

#### 3.6.1 – Módulo de Análise em Batelada - Primeira Configuração

No primeiro módulo, FIGURA 19, a válvula  $V_3$  (amostra), a válvula  $V_2$  (solução ftalato), a válvula  $V_1$  (solução hipoclorito) e a válvula  $V_4$  (solução C) foram

acionadas sequencialmente com tempos de abertura de 15; 15; 7,5 e 30 s respectivamente. O tempo de 7,5 s equivale a um volume de 250  $\mu\text{L}$ , o que corresponde à adição de 500; 500; 250 e 1000  $\mu\text{L}$ , respectivamente para amostra, solução ftalato, solução de hipoclorito e solução C, totalizando 2,25 mL. Na câmara de mistura, essas amostras permaneciam em repouso durante 10 s para o desenvolvimento da reação. Em seguida, a válvula  $V_5$  era acionada para aspirar a solução de amostra para o detector, onde o sinal do analito era gerado.

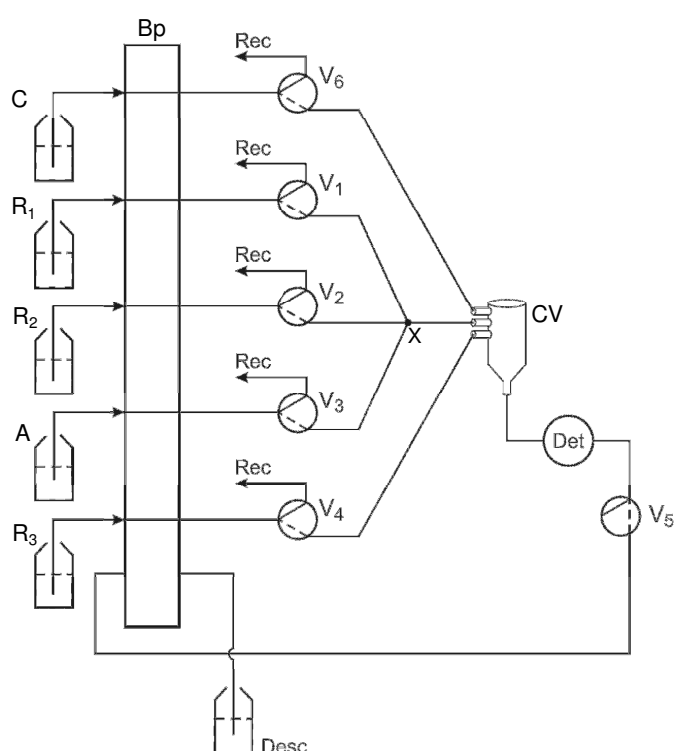


FIGURA 19 - Diagrama do primeiro módulo de análise.  $V_1$  a  $V_6$  = válvulas solenóide de três vias; C = transportador (água); A = amostra;  $R_1$  = solução de hipoclorito de sódio 30%;  $R_2$  = solução ftalato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,0;  $R_3$  = solução de fenol/metanol (1:1); X= confluência feita em acrílico; CV = câmara de vidro; Bp = bomba peristáltica; det = fotômetro de LED,  $\lambda = 660 \text{ nm}$ ; Desc = descarte de soluções. Todas as soluções eram bombeadas com vazão de  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ . As linhas tracejadas nos símbolos das válvulas indicam que estão fechadas, ou seja, as soluções estão reciclando.

### **3.6.2 – Módulo de Análise por Multicomutação em Fluxo - Segunda Configuração**

Na configuração mostrada na FIGURA 20, inicialmente todas as válvulas estão desligadas, ou seja, estão em posição de reciclagem com o objetivo de preencher os tubos de polietileno. Quando o programa era iniciado, todas as válvulas eram acionadas sequencialmente durante 30 s para preencher as respectivas linhas de fluxo do percurso analítico. Posteriormente, a válvula  $V_2$  permanecia acionada por 90 s para lavar o percurso analítico com o fluido transportador (C).

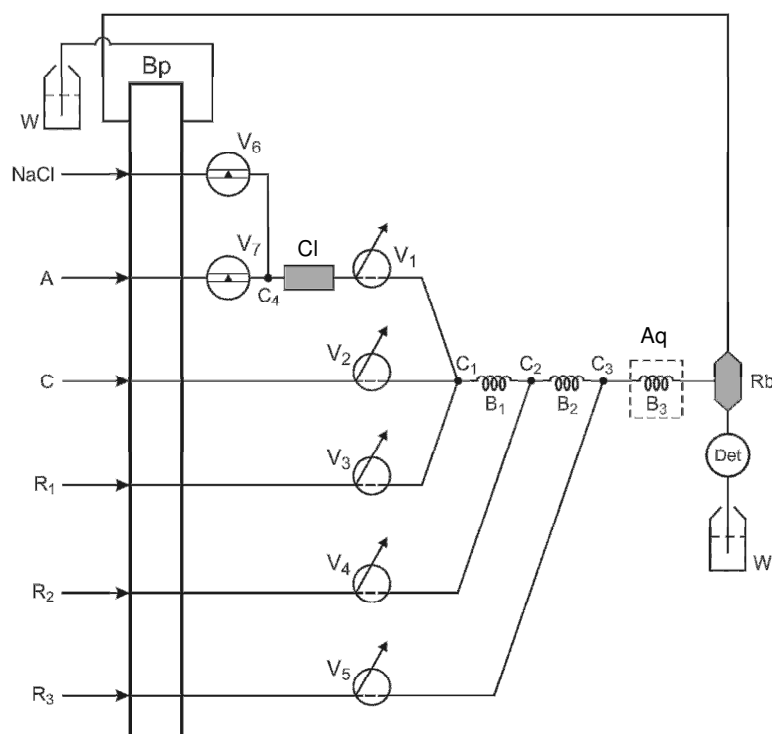


FIGURA 20 - Diagrama do segundo módulo de análise.  $V_1$  a  $V_5$  = válvulas solenóide de três vias e  $V_6$  e  $V_7$  = válvulas solenóide de estrangulamento; A = amostra; C = transportador (água);  $R_1$  = solução ftalato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,0;  $R_2$  = solução de hipoclorito de sódio 10% em meio alcalino;  $R_3$  = solução de fenol alcoólico em meio alcalino (3:1:1);  $C_1$  a  $C_4$  = confluências feitas em acrílico;  $B_1$ ,  $B_2$  e  $B_3$  = bobinas de reação de 50, 100 e 250 cm, respectivamente; Cl = coluna preenchida com resina de troca catiônica; Bp = bomba peristáltica; Det = fotômetro de LED,  $\lambda = 660 \text{ nm}$ ; Aq = aquecedor com temperatura controlada em  $40^\circ \text{ C}$ ; Rb = removedor de bolhas com vazão constante de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ . As linhas tracejadas nos símbolos das válvulas indicam que estão fechadas, ou seja, as soluções estão reciclando. Todas as soluções eram bombeadas com vazão de  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

Finalizada a etapa de lavagem do percurso analítico, o programa solicitava a calibração do fotômetro, a qual era feita em duas etapas. Na primeira, o LED era apagado fornecendo o valor do sinal de saída do fotômetro no escuro ( $Se$ ). Na segunda etapa, o brilho do LED era ajustado através do resistor variável ( $5 \text{ k}\Omega$ ) acoplado à base do transistor (FIGURA 16, pág. 29) para obter na saída do fotodetector um sinal de aproximadamente  $2000 \text{ mV}$  ( $Vf$ ). Estes valores ( $Se$ ,  $Vf$ )

eram usados como referência no cálculo da absorvância durante o procedimento analítico.

Após a etapa de calibração, o computador iniciava a rotina de análise e executava a sequência de operações conforme mostrado na TABELA 1. Na primeira etapa a válvula  $V_7$  era acionada para que a amostra fluísse através da coluna. Na segunda e na terceira etapas eram acionadas alternadamente as válvulas  $V_1$  e  $V_3$ , preenchendo a bobina  $B_1$  através da confluência  $C_1$ . Esta seqüência de acionamento das duas válvulas é chamada de ciclo de amostragem, e era repetido várias vezes, conforme está indicado na TABELA 1. O volume de cada alíquota de solução inserida no percurso analítico era função da vazão de bombeamento e do intervalo de tempo de acionamento de cada válvula ( $\Delta t_1, \Delta t_2, \Delta t_3, \Delta t_4, \Delta t_5, \Delta t_6, \Delta t_7$ ) previamente estabelecido como variável de entrada (TABELA 1). Após completar o número de ciclos de amostragem, a etapa 4 era executada para que NaCl fluísse através da coluna para troca dos cátions retidos pelo sódio, regenerando os sítios catiônicos. Esta etapa era mantida até o final de cada determinação. Nas etapas 5 e 6 era realizada a mistura binária da alíquota contida na bobina  $B_1$  com o reagente  $R_2$  preenchendo a bobina  $B_2$ . Nas etapas 7 e 8 era realizada a mistura binária da alíquota contida na bobina  $B_2$  com o reagente  $R_3$ , preenchendo a bobina  $B_3$ . Nesta última etapa ocorria também o aquecimento da zona da amostra (40 °C). Na etapa 9 a zona de amostra era deslocada até o detector. Durante esta etapa, o computador efetuava a aquisição de dados, lendo o sinal gerado pelo fotômetro através da entrada analógica/digital da interface PCL 711S. Após a leitura do sinal, o computador calculava a absorvância usando a EQUAÇÃO 3.

$$A = -\log[(\text{sinal} - Se)/(\text{Vf} - Se)]; \quad \text{EQUAÇÃO 3}$$

Onde:

$A$  = absorvância

sinal = leitura em mV

Vf = leitura de fundo de escala em mV

Se = leitura tomada no escuro em mV



A absorvância era salva no padrão ASCII para permitir posterior processamento. Enquanto o processo analítico estava em curso, um gráfico do sinal gerado pelo detector em função do tempo era mostrado na tela do computador, para permitir sua visualização em tempo real.

TABELA 1. Seqüência de eventos do procedimento analítico da segunda configuração mostrada na FIGURA 20.

Etapa	Evento	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>	V <sub>5</sub>	V <sub>6</sub>	V <sub>7</sub>	Tempo (s)	Ciclos
1	Inserir Amostra	0	0	0	0	0	0	1	1	-
2	Inserir Amostra	1	0	0	0	0	0	1	0,4	16*
3	Inserir Reagente R <sub>1</sub>	0	0	1	0	0	0	0	0,4	16*
4	Regenera coluna	0	0	0	0	0	1	0	145	-
5	Inserir Reagente R <sub>2</sub>	0	0	0	1	0	1	0	0,4	16**
6	Desloca amostra	0	1	0	0	0	1	0	1,0	16**
7	Inserir Reagente R <sub>3</sub>	0	0	0	0	1	1	0	0,3	16***
8	Desloca amostra	0	1	0	0	0	1	0	1,0	16***
9	Leitura de sinal	0	1	0	0	0	1	0	100	

Os símbolos \*, \*\*, \*\*\* indicam que estes pares de eventos foram executados o número de vezes indicado, antes de passar à etapa seguinte.

O programa para efetuar o controle do módulo de análise e a aquisição dos dados foi escrito em linguagem QuickBasic 4.5. O fluxograma do programa é constituído por um conjunto de sub-rotinas conforme demonstrado na FIGURA 20. A seqüência de acionamento das válvulas executada pelo microcomputador é mostrada na TABELA 1. As variáveis solicitadas pelo microcomputador quando o programa é iniciado são: tempo de inserção da solução de amostra, tampão, hipoclorito, fenol, carregador, deslocamento da zona de amostra, leitura do sinal, número de ciclos de amostragem e número de replicatas. Uma vez fornecidas as informações, o microcomputador efetua todas as etapas descritas no programa de controle, sem intervenção do operador.

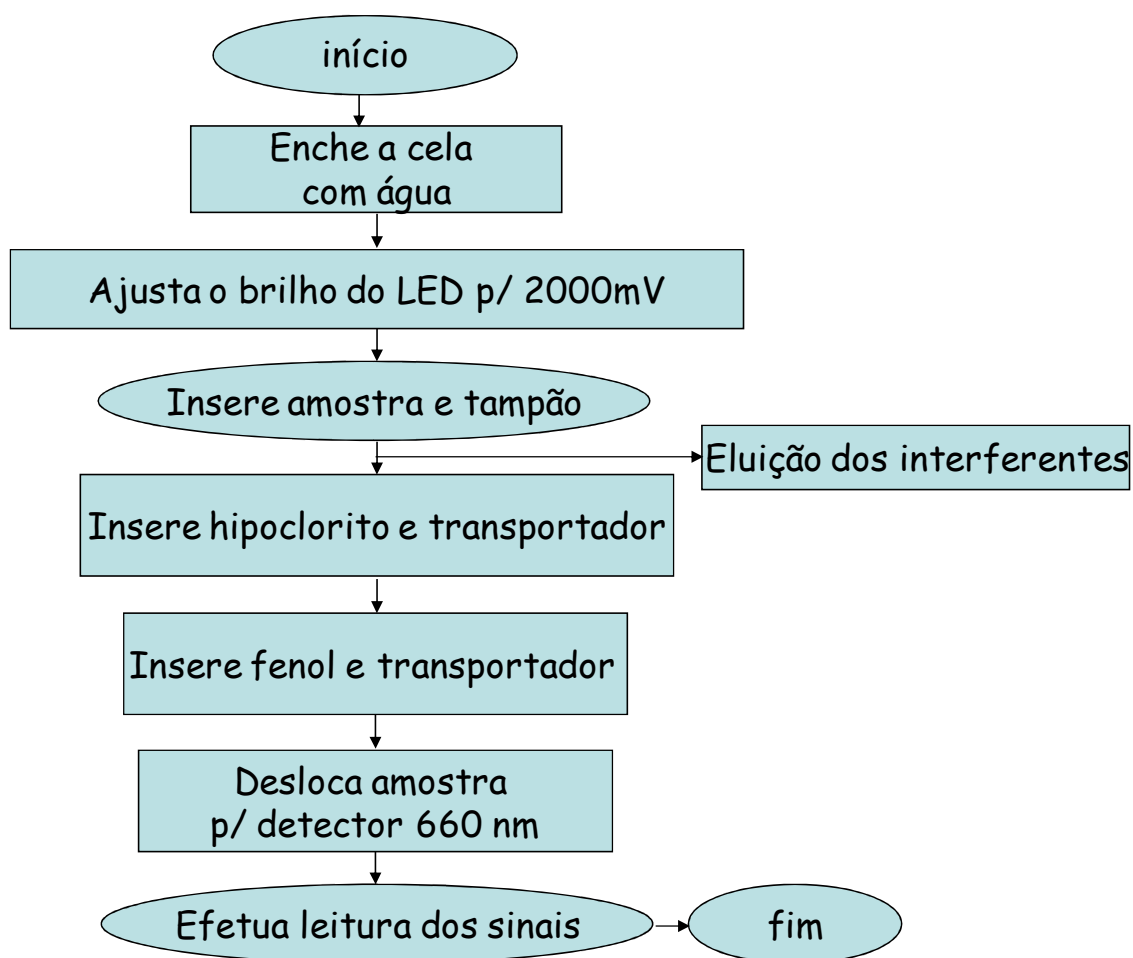


FIGURA 21. Rotina de execução do programa.

### 3.6.3 – Módulo de Análise por Multicomutação em Fluxo – Terceira Configuração

Na FIGURA 22 é mostrado o diagrama de fluxo do módulo de análise projetado para implementar o processo de fluxo monossegmentado por ar, empregando o conceito de multicomutação em fluxo.

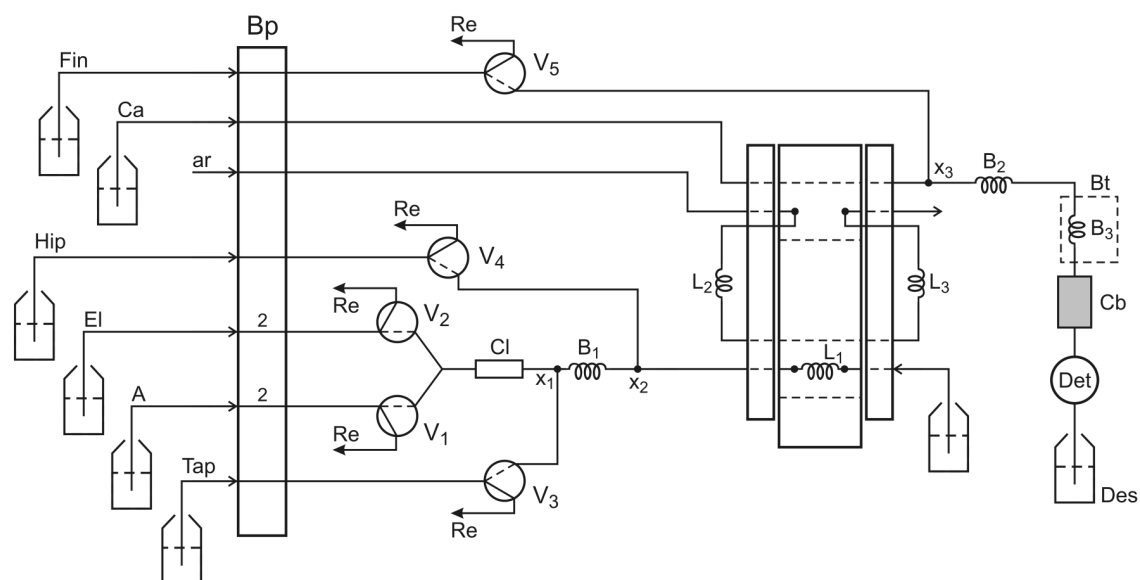


FIGURA 22. Módulo de análise empregando fluxo monossegmentado e multicomutação. As 3 superfícies retangulares representam o injetor automático visto de cima, e as linhas tracejadas indicam furos internos para passagem de fluídos.  $V_1$  a  $V_5$  = válvulas solenóide de três vias; A = amostra; Ca = transportador (água); Tap = solução ftalato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,0; Hip = solução de hipoclorito de sódio 10% em meio alcalino; Fin = solução de fenol alcoólico em meio alcalino; El = solução eluente, NaCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , vazão  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $X_1$  a  $X_3$  = confluências feitas em acrílico;  $B_1$  e  $B_2$  = bobinas de reação, tubos de polietileno de 100 e 50 cm, respectivamente, diâmetro 0,8 mm;  $B_3$  = bobina de reação, tubo de Teflon de 200 cm comprimento, diâmetro interno 1,6 mm; Cl = coluna preenchida com resina de troca catiônica; Bp = bomba peristáltica; Det = fotômetro de LED,  $\lambda = 660 \text{ nm}$ ; Bt = banho térmico com temperatura controlada em  $40^\circ \text{ C}$ ; Cb = câmara remoção de bolhas de ar; Re = retorno das soluções para os respectivos recipientes;  $L_1$  = alça de amostragem, tubo de polietileno de 50 cm de comprimento, diâmetro interno 0,8 mm;  $L_2$  e  $L_3$  = alças para inserção de bolhas de ar, tubo de polietileno de 30 cm de comprimento, diâmetro interno 0,8 mm; Des = descarte de efluente. As linhas tracejadas nos símbolos das válvulas indicam que estão fechadas, ou seja, as soluções estão reciclando.

Nesta configuração todas as válvulas estão desligadas e todas as soluções, exceto o fluído transportador são bombeadas de volta para os seus recipientes (Re). As válvulas solenóide e o injetor automático eram controlados pelo computador empregando a mesma interface de controle descrita na FIGURA 14 (pág. 27).

Quando ao programa de controle e aquisição de dados era colocado em funcionamento, o microcomputador executava todas as etapas envolvidas no procedimento analítico segundo descrito na TABELA 2. O fotômetro empregado foi o mesmo descrito antes, a etapa de calibração era igual, portanto não foi descrita novamente.

TABELA 2. Sequência de eventos para controle do módulo de análise mostrada na FIGURA 22

Etapa	Evento	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>	V <sub>5</sub>	IA*	IB*	Tempo (s)
1	Injetor/Amostragem	0	0	0	0	0	1	0	1
2	Inserir Amostra e Tampão	1	0	1	0	0	0	0	20
3	Inserir Hipoclorito e Eluente	0	1	0	1	0	0	0	10
4	Injetor/Injeção	0	0	0	0	0	0	1	1
5	Desloca bolha (L <sub>3</sub> )	0	0	0	0	0	0	0	8
6	Inserir Fenol	0	0	0	0	1	0	0	15
7	Completa deslocamento	0	0	0	0	0	0	0	20

\*IA e IB = injetor nas posições de amostragem e injeção respectivamente.

Após a calibração do fotômetro o computador executava a sequência de eventos descrita na TABELA 2. Observa-se que na etapa **1** o injetor era deslocado para posição de amostragem (FIGURA 22). O deslocamento do injetor de uma posição de repouso para outra era feita empregando um par de solenóide, os quais eram alimentados com 220 V de rede elétrica através de relés de estado sólido. O sinal gerado pela interface de controle (FIGURA 14, linhas 7 e 8, pág. 27) ativava os relés nas etapas **1** e **4**. Na etapa **2**, a válvula V<sub>1</sub> era acionada para direcionar o fluxo da amostra através da coluna de resina de troca iônica, onde ficariam retidos os potenciais interferentes, e a amostra tratada fluía da coluna na

confluência ( $X_1$ ). Ao mesmo tempo, a  $V_3$  era acionada para inserir a solução tampão à amostra. O intervalo de tempo programado para estas válvulas ( $V_1$  e  $V_3$ ), era suficiente para encher a bobina  $B_1$  com a solução da amostra tamponada. Na etapa **3**, ocorria o acionamento das válvulas  $V_2$  e  $V_4$ . Nesta condição, a solução do eluente fluía através da coluna de resina e da bobina de reação ( $B_1$ ). A solução de hipoclorito era adicionada à zona da amostra na confluência  $X_2$ , e fluía através da alça de amostragem ( $L_1$ ). Durante estas etapas um fluxo de ar era bombeado através das alças  $L_2$  e  $L_3$ . Na etapa **4**, o injetor era deslocado para a posição de injeção da zona de amostragem, e para isso o microcomputador enviava o sinal de controle para o relê (IB) através do bit  $D_8$  da interface controle (FIGURA 14, pág. 27). Nesta posição, a alça de amostragem ( $L_1$ ) era inserida no percurso analítico entre as alças  $L_2$  e  $L_3$ . Na etapa **5**, todas as válvulas eram desligadas e o fluído transportador (Ca) era bombeado através das alças  $L_2$ ,  $L_1$  e  $L_3$ , deslocando a zona da amostra da alça  $L_1$  para o reator  $B_2$ . Na etapa **6**, a válvula  $V_5$  era acionada para inserir a solução de fenol na zona da amostra através da confluência  $X_3$ . Conforme mostra a TABELA 2, na etapa **7** todas as válvulas estão desligadas, e somente a solução transportadora é bombeada para deslocar a zona da amostra através do reator ( $B_3$ ), onde ocorria o aquecimento e o desenvolvimento da reação para formar o composto a ser detectado. Finalizada esta etapa, a execução do programa retornava à etapa **1** e iniciava outro ciclo de amostragem.

Durante todas estas etapas, o microcomputador efetuava a aquisição de dados em intervalos de tempo de 0,2 s. Convém lembrar que cada leitura apresentada como resultado era a média de 500 aquisições consecutivas. A absorbância era calculadas pelo computador segundo a EQUAÇÃO 3 (pág. 39).

### 3.7- Otimização das Variáveis

#### 3.7.1 – Estudo do efeito da Concentração da Solução de Hipoclorito de Sódio

Para a determinação de *N*-ureídeos totais, na etapa de oxidação, as soluções de concentrações de 5; 10; 15 e 30% (v/v) de hipoclorito de sódio foram investigadas, conforme mostrado no fluxograma da FIGURA 23. Para as quatro soluções de hipoclorito, a concentração de 0,15 mol L<sup>-1</sup> de NaOH do meio foi mantida fixa e foram inseridos 212,48 µL. Na etapa de oxidação, foram utilizadas como soluções de trabalho, o branco e 160 µmol L<sup>-1</sup> e algumas condições foram mantidas fixas, como: solução ftalato 0,2 mol L<sup>-1</sup>, solução de fenol em meio alcalino 0,30 mol L<sup>-1</sup> e bobinas de mistura B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, de 50 e 100 cm (d.i. 0,8 mm) respectivamente e bobina de reação, B<sub>3</sub>, de 400 cm.

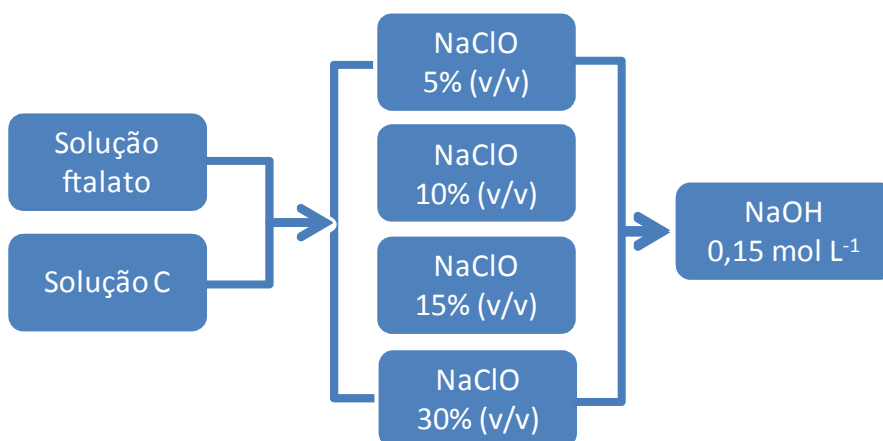


FIGURA 23 - Fluxograma do estudo da concentração da solução de hipoclorito de sódio.

### 3.7.2 - Estudo do efeito da Concentração de Hidróxido de Sódio na Solução de Hipoclorito

Para a determinação de *N*-ureídeos, na etapa de oxidação, as soluções de concentrações de 0; 0,05; 0,075; 0,15 e 0,30 mol L<sup>-1</sup> de NaOH na solução de hipoclorito de sódio foram investigadas, conforme mostrado no fluxograma da FIGURA 24. Para as cinco concentrações de NaOH avaliadas, a concentração de hipoclorito foi de 10% (m/v) e foram inseridos 212,48 µL da mistura. Na etapa de oxidação, foram utilizadas como soluções de trabalho, o branco e 160 µmol L<sup>-1</sup> de alantoína e algumas condições foram mantidas fixas, como: solução ftalato 0,2 mol L<sup>-1</sup>; solução C em meio alcalino 0,30 mol L<sup>-1</sup> e bobinas de mistura B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, de 50 e 100 cm (d.i. 0,8 mm) respectivamente e bobina de reação, B<sub>3</sub>, de 400 cm (d.i. 0,8 mm).

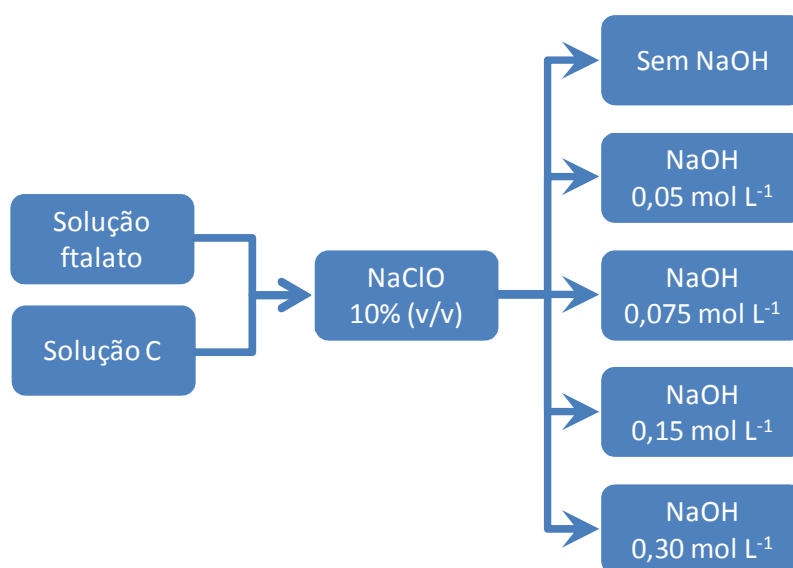


FIGURA 24. Fluxograma do estudo da concentração alcalina da solução de hipoclorito.

### 3.7.3 - Estudo do efeito da Concentração de Hidróxido de Sódio na Solução de Fenol

Para a determinação de alantoína, na etapa de formação do composto azul de indofenol, a concentração do meio alcalino na solução de fenol alcoólico foi investigada, conforme mostrado no fluxograma da FIGURA 25. Para isso, as soluções de NaOH nas concentrações de 0,05; 0,075; 0,15; 0,30 e 1,0 mol L<sup>-1</sup> foram avaliadas. Para os cinco meios avaliados, a solução C possuía concentração de 0,64 mol L<sup>-1</sup> e foram inseridos 212,48 µL. Neste estudo, foram utilizadas como soluções de trabalho, o branco e 160 µmol L<sup>-1</sup> de alantoína e algumas condições foram mantidas fixas, como: solução ftalato 0,2 mol L<sup>-1</sup>; solução de hipoclorito 10% em meio alcalino 0,15 mol L<sup>-1</sup> e bobinas de mistura B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, de 50 e 100 cm (d.i. 0,8 mm) respectivamente e bobina de reação, B<sub>3</sub>, de 400 cm (d.i. 0,8 mm).

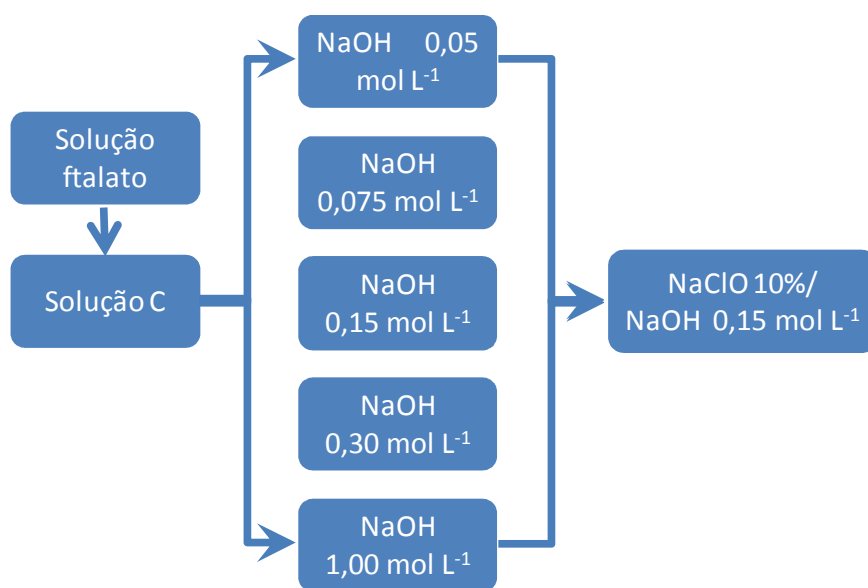


FIGURA 25 – Fluxograma do estudo da concentração alcalina da solução de fenol.



### 3.7.4 - Estudo do efeito da Concentração da Solução de Fenol

Para a determinação de *N*-ureídos, na etapa de formação do composto azul de indofenol, as soluções de concentrações 0,16; 0,32; 0,40; 0,48; 0,56 e 0,64 mol L<sup>-1</sup> de fenol alcoólico em meio alcalino foram investigadas, conforme mostrado no fluxograma da FIGURA 26. Esses valores de concentrações são devidos ao compromisso de se manter a concentração de fenol e NaOH na razão de 4:1 respectivamente. Para as seis soluções de fenol alcoólico em meio alcalino avaliadas, a concentração de 0,30 mol L<sup>-1</sup> de NaOH do meio foi mantida constante e foram inseridos 212,48 µL. Na etapa de formação do composto azul de indofenol, foram utilizadas como soluções de trabalho, o branco e 200 µmol L<sup>-1</sup> de alantoína e algumas condições foram mantidas fixas, como: solução ftalato 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 4,0; solução C em meio alcalino 0,30 mol L<sup>-1</sup> e bobinas de mistura B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, de 50 e 100 cm (d.i. 0,8 mm) respectivamente e bobina de reação, B<sub>3</sub>, de 400 cm (d.i. 0,8 mm).

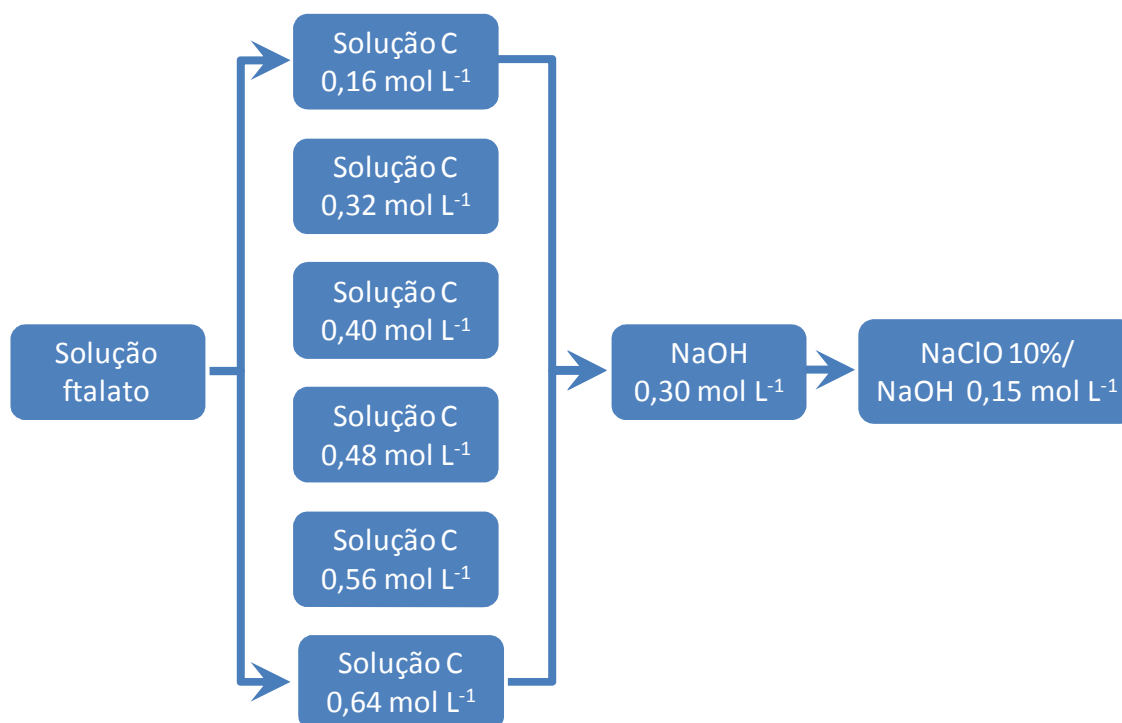


FIGURA 26 – Fluxograma do estudo da concentração da solução de fenol.

### **3.7.5 - Estudo do efeito da Temperatura no Desenvolvimento da Reação**

A influência da temperatura para a formação do composto azul de indofenol foi avaliada mantendo a bobina de reação ( $B_3$ ) enrolada em um ferro de solda com temperatura controlada. Assim, as temperaturas de 26 (temperatura ambiente), 32 e 40 °C foram estabelecidas para o estudo. Para esta investigação foram utilizadas como soluções de trabalho, o branco e 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de alantoína e bobina de reação de 400 cm (d.i. 0,8 mm).

### **3.7.6 - Estudo do efeito do Comprimento da Bobinas de reação, $B_3$**

A influência do comprimento da bobina de reação ( $B_3$ ) para a formação do composto azul de indofenol foi avaliada, estabelecendo para este estudo bobinas de 400, 350, 250, 150, 100 e 50 cm (d.i. 0,8 mm) enroladas em um ferro de solda com temperatura controlada (40°C). Para esta investigação, foram utilizadas como soluções de trabalho, o branco e 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de alantoína.

### **3.7.7 - Estudo do efeito do Número de Ciclos e Tempo de Inserção do Fenol.**

O número de ciclos e tempo de abertura da válvula para inserção da solução de fenol alcoólico em meio alcalino foi avaliada para a determinação de alantoína. Este estudo foi realizado mantendo-se fixos os volumes das alíquotas da amostra ( $\mu\text{L}$ ), tampão ( $\mu\text{L}$ ) e hipoclorito ( $\mu\text{L}$ ) e variando-se o número de ciclos e tempo de abertura da válvula do fenol em 15 ciclos de 0,3 s; 22 ciclos de 0,2 s e 11 ciclos de 0,4 s. Para esta investigação, foram utilizadas como soluções de trabalho, o branco e 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de alantoína.

## 3.8 - Método Comparativo

### 3.8.1 - Material

#### 3.8.1.1 - Equipamentos e Acessórios

Os equipamentos e acessórios compreenderam um banho-maria termostatzado (MARCONI, TE-159) uma mini-microcentrífuga (Benchmark, BSC1006 - B), um agitador do tipo vórtex (TECNAL, AP-56), um medidor de pH (TECNAL, TEC 2mp), um agitador eletromagnético (TE-085) e um espectrofotômetro (FEMTO, 700PLUS).

#### 3.8.2 - Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e estocadas em frascos de polietileno. Água destilada e água purificada com condutividade menor que  $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$  foi utilizada na lavagem das vidrarias e no preparo das soluções respectivamente.

Uma solução estoque de Alantoína  $1500 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi preparada pela dissolução de 0,0593 g de alantoína em 250 mL de água. Essa solução foi armazenada em frasco de vidro e mantida em geladeira.

As soluções padrão de trabalho, na faixa de 30 a  $260 \mu\text{mol L}^{-1}$  foram preparadas diariamente pela diluição apropriada da solução estoque.

Uma solução de hidróxido de sódio  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada dissolvendo-se 1,0 g do sólido em 50 mL de água.

Uma solução de HCl  $0,65 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada diariamente diluindo-se 2,7 mL de ácido clorídrico concentrado em 50mL de água.

Uma solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada dissolvendo-se 10,88 g do sólido em 200 mL de água.

Uma solução de  $K_2HPO_4$   $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada dissolvendo-se 13,92 g do sólido em 200 mL de água.

Uma solução de tampão fosfato ( $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ )  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0, foi preparada adicionando-se aos 200 mL da solução de  $HPO_4^{2-}$  quantidades da solução  $H_2PO_4^-$  até que o pH 7,0 fosse atingido.

Uma solução de fenilhidrazina  $0,23 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada dissolvendo-se 0,1663 g do sólido em 50 mL de água.

Ácido clorídrico concentrado.

Uma solução de ferricianeto de potássio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , foi preparada dissolvendo-se 0,8396 g do sólido em 50 mL de água e também foi pré-resfriado.

### 3.8.3 - Procedimento Experimental para a Determinação de *N*-Ureídos Totais

Posteriormente a extração dos *N*-ureídos, procedeu-se a hidrólise alcalina da alantoína seguida pela hidrólise ácida do ácido alantóico segundo procedimento descrito por VOGELS e van der DRIFT (1970) e esquematizado na FIGURA 27.

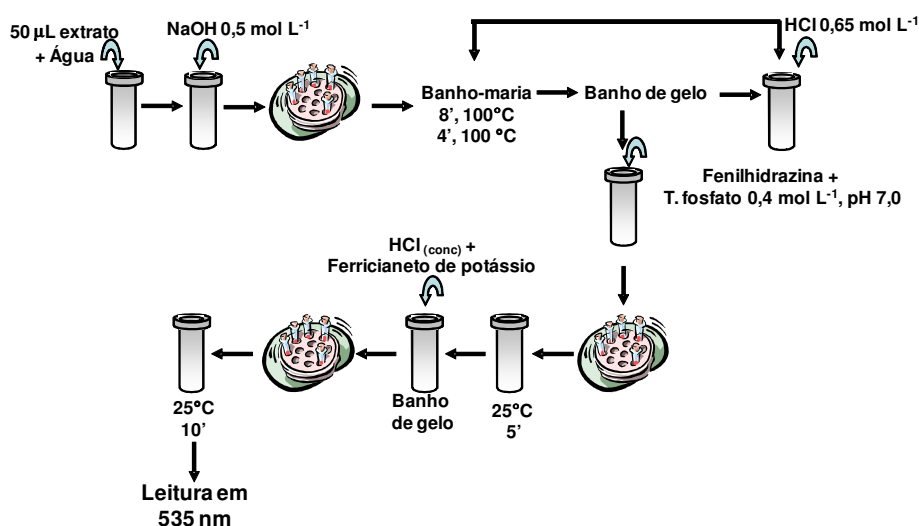


FIGURA 27 – Procedimento esquemático para a determinação de *N*-ureídos totais.

A uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do extrato adicionou-se água destilada para completar um volume de 750  $\mu\text{L}$  em seguida, acrescentou-se 250  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ . A mistura foi homogeneizada empregando um agitador do tipo vórtex, em seguida foi aquecida em banho-maria a 100°C por 8 min. Após resfriar em banho de gelo, acrescentou-se 250  $\mu\text{L}$  de HCl 0,65 mol  $\text{L}^{-1}$  e novamente aqueceu-se por 4 min. a 100°C. Resfriou-se novamente e manteve-se os tubos em gelo, adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,4 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 7,0, 250  $\mu\text{L}$  de fenilhidrazina e misturou-se em um vórtex, deixando os tubos à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, colocaram-se os tubos no banho de gelo e adicionou-se 1,25 mL de HCl concentrado e pré-resfriado e 250  $\mu\text{L}$  de ferricianeto de potássio, também pré-resfriado e misturou-se. Removeram-se os tubos do gelo e fez-se a leitura das absorvâncias em 535 nm após 10 min de descanso a temperatura ambiente.

## 4 - Resultados e Discussão

### 4.1 - Módulo de Análise em Batelada - Primeira Configuração

Inicialmente, empregando o módulo de análise mostrado na FIGURA 19 (pág. 36), tentou-se manter a relação entre as soluções das amostras e dos reagentes descritos por PATTERSON e colaboradores (1982). Porém, não foram obtidos resultados mensuráveis, independente das concentrações das soluções de referência usadas.

Em outro estudo, realizado com a mesma configuração, ar foi borbulhado dentro da câmara para promover a mistura da solução da amostra e dos reagentes, visando melhorar o desenvolvimento da reação. Para isso, usou-se uma bomba de aquário acoplada a um dispositivo microcontrolado, construído no laboratório. Este dispositivo permitia que o controle da vazão fosse feito via modulação de largura de pulso da rede elétrica (PWM). Entretanto, os sinais gerados não foram adequados para fins analíticos. Uma hipótese para explicar esse problema pode ser a oxidação do fenol, uma vez que quando a válvula V<sub>4</sub> (FIGURA 19) era acionada para a inserção do fenol, a solução dentro da câmara de mistura desenvolvia uma cor amarela, entretanto seria esperado o desenvolvimento de uma coloração azul. Outra hipótese, pode ser atribuída a volatilização do cloro, impedindo a formação de cloramina, e conseqüentemente impossibilitando a formação do composto azul de indofenol. Em vista disso, imaginou-se que as condições operacionais do módulo de análise, e talvez, o próprio módulo não eram apropriados para mimitizar o procedimento proposto por PATTERSON e colaboradores (1982).

## 4.2 - Módulo de Análise por Multicomutação em Fluxo - Segunda Configuração

No procedimento de PATTERSON e colaboradores (1982), a solução de hipoclorito de sódio era preparada por diluição com água. Nos testes realizados com o primeiro sistema, verificou-se que havia uma forte dependência da alcalinidade do meio no desenvolvimento da reação, então, este parâmetro foi a primeira variável investigada com o novo módulo de análise mostrado na FIGURA 20 (pág. 38). As vazões das soluções transportadora (C), da amostra (A) e dos reagentes ( $R_1 - R_3$ ) foram previamente estabelecidas em  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ , visando manter as proporções 1:1 entre as soluções. Os intervalos de tempo ( $\Delta t_1 - \Delta t_5$ ) de acionamento das válvulas  $V_1$  a  $V_5$  foram fixados em 0,4 s. Dessa maneira, os volumes inseridos tinham valores próximos aos descritos por PATTERSON e colaboradores (1982). As bobinas de mistura  $B_1$  e  $B_2$  foram estabelecidas em 50 e 100 cm.

Normalmente, em sistemas de análise em fluxo, a solução transportadora é preparada no mesmo meio da solução da amostra, a fim de evitar a geração de gradientes de concentrações, tendo como consequência o efeito Schlieren (ZAGATTO, *et al.*, 1990). No entanto, no sistema proposto foi utilizada água como fluido transportador e não foi observada perturbação da linha de base, o que pode ser considerada como uma vantagem em comparação ao procedimento anterior (ZAGATTO, *et al.*, 1990).

### 4.2.1 - Estudo do Efeito da Concentração da Solução de Hipoclorito de Sódio

Como pode ser observado, na FIGURA 23 (pág. 45), foram realizados experimentos usando soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 5, 10, 15 e 30 % (v/v) em meio alcalino ( $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ ). Nestes experimentos foram empregados solução ftalato ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) e uma solução de

fenol em meio alcalino ( $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ ), e os resultados obtidos são mostrados na FIGURA 28.

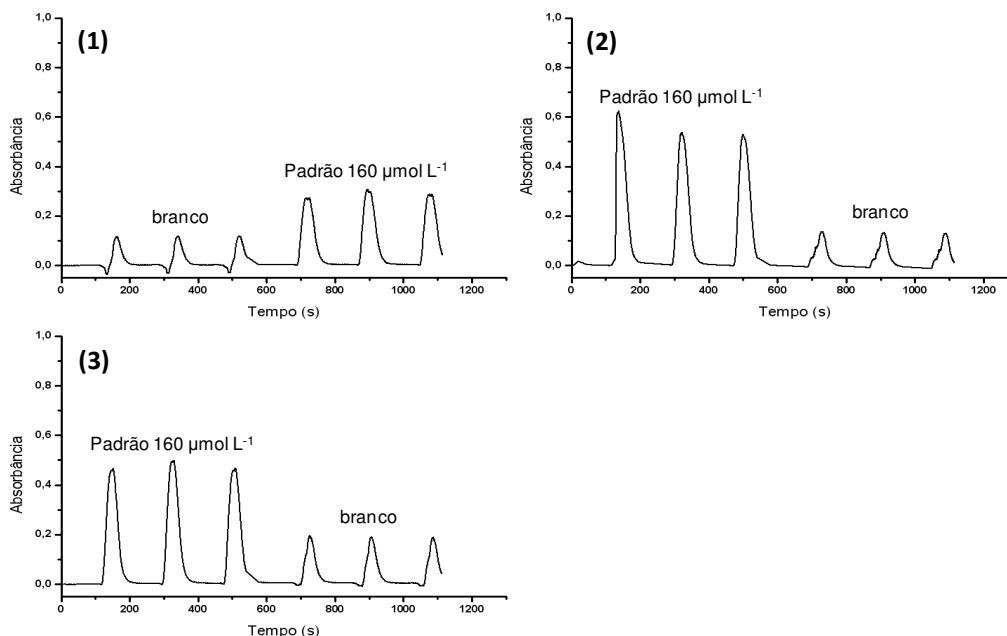


FIGURA 28 – Efeito da concentração da solução de hipoclorito de sódio. (1) 5%; (2) 10%; (3) 15%. Condições do estudo: soluções de trabalho, o branco e referência  $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; solução ftalato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , solução de fenol em meio alcalino  $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ ; bobinas de mistura  $B_1$ ,  $B_2$ , de 50 e 100 cm (d.i. 0,8 mm) respectivamente e bobina de reação,  $B_3$ , de 400 cm (d.i. 0,8 mm).

A FIGURA 28 mostra os perfis dos registros dos sinais gerados, entretanto quando foi usada a solução de hipoclorito de sódio com concentração de 30% (v/v), não foi gerado resultado que permitisse alguma avaliação, indicando que a reação não ocorrera, provavelmente devido ao excesso de hipoclorito que teria promovido a oxidação do fenol. Nos demais experimentos, considerando-se a discriminação entre os registros dos sinais do branco e da solução de alantóina como parâmetro analítico, observa-se que o melhor resultado foi obtido com a concentração de hipoclorito de sódio 10%. Na TABELA 3, são mostrados os valores de absorbância, onde se observa que as leituras do branco e da solução de referência de alantóina aumentaram com a concentração da solução de hipoclorito. Entretanto, a maior diferença é observada para os resultados



referentes à concentração de 10 %. Portanto esta solução foi selecionada para dar continuidade ao trabalho.

TABELA 3. Valores de absorvância para o estudo concentração da solução de hipoclorito de sódio.

Concentração de hipoclorito (%)	Absorvância média		Razão Sol.ref./ Branco
	Branco	Solução de referência	
5	0,118 ± 0,002	0,29 ± 0,02	2,45
10	0,133 ± 0,004	0,56 ± 0,05	4,24
15	0,192 ± 0,003	0,48 ± 0,02	2,48

Solução de referência, alantoína 160  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

#### 4.2.2 - Estudo do Efeito da Concentração de Hidróxido de Sódio na Solução de Hipoclorito

Como pode ser observado, na FIGURA 24 (pág. 46), foram realizadas 5 experimentos, variando a concentração de hidróxido de sódio na solução de hipoclorito 10%. Nestes experimentos as concentrações das soluções de ftalato ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) e fenol em NaOH ( $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ ) foram as mesmas usadas no item anterior. Os resultados obtidos nestes experimentos são mostrados na FIGURA 27.

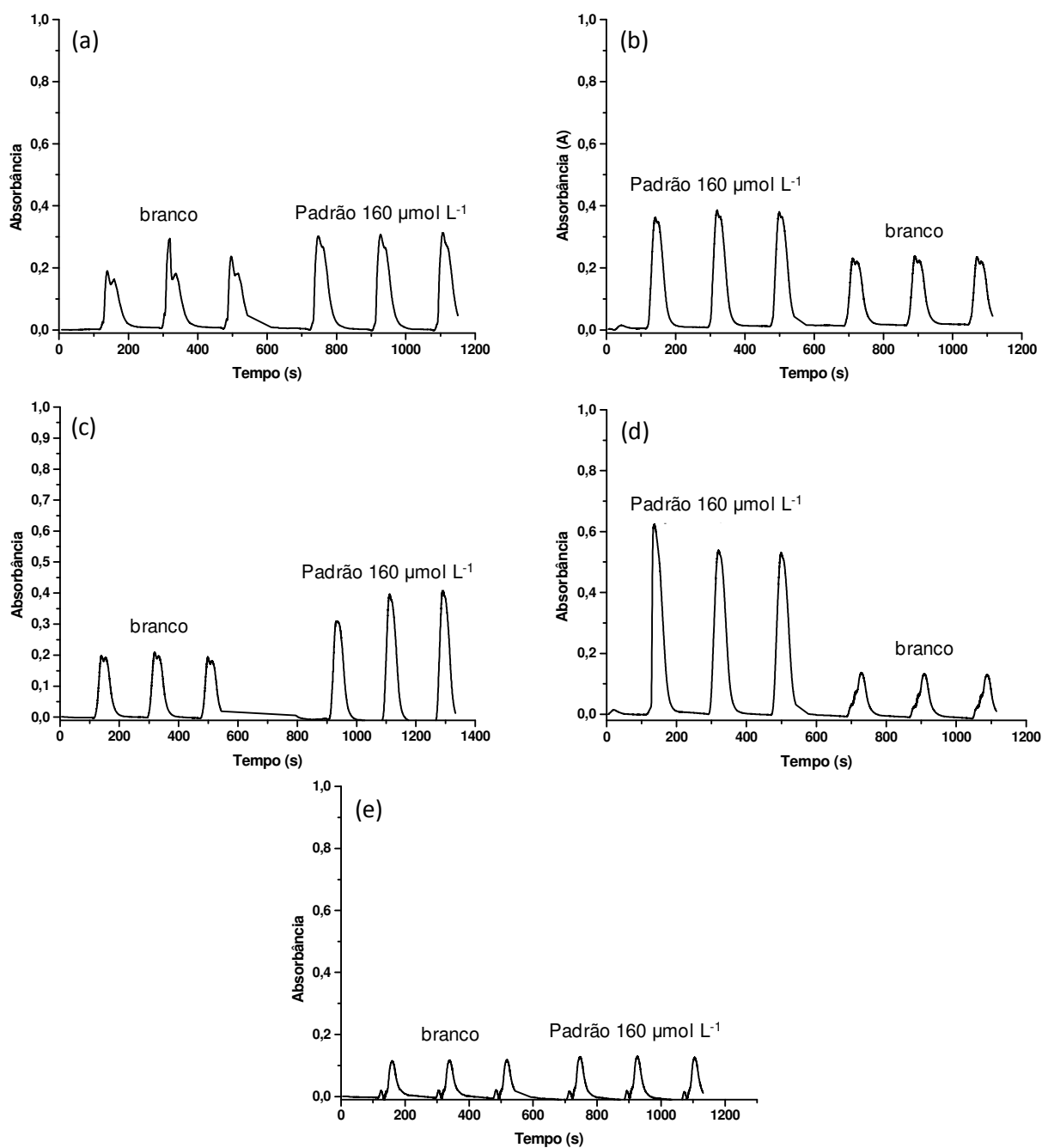


FIGURA 29 - Efeito da concentração de hidróxido de sódio na solução de hipoclorito. Os conjuntos de registros **a**, **b**, **c**, **d**, e **e** correspondem aos experimentos realizados usando soluções de hipoclorito com concentrações de hidróxido de sódio de 0,0; 0,05; 0,075; 0,15 e 0,30 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os demais parâmetros foram os mesmos do item anterior.

Analisando os 5 conjuntos de registros e tomando-se a diferença entre as leituras do branco e da solução de alantoína como parâmetro de interesse, observa-se que o melhor resultado é o representado pelo conjunto **d**. Observa-se, também, que essa diferença é crescente a partir do conjunto de registros **a**, entretanto o último caso, onde a concentração de NaOH era 0,30 mol L<sup>-1</sup> apresentou o pior resultado. Este efeito indica que em meio com alcalinidade mais alta, a reação não se desenvolveu. Os dados da TABELA 4 mostram que o ganho de sinal com a concentração de NaOH de 0,15 mol L<sup>-1</sup> é o dobro do segundo melhor caso. Estes dados mostram que o desenvolvimento da reação é muito dependente da alcalinidade do meio.

TABELA 4. Valores de absorvância para o estudo da concentração alcalina da solução de hipoclorito 10%.

Concentração (mol L <sup>-1</sup> )	Absorbância média		Razão Sol ref. / branco
	Branco	Solução de referência	
0	0,152 ± 0,109	0,309 ± 0,006	2,02
0,05	0,235 ± 0,004	0,377 ± 0,122	1,60
0,075	0,196 ± 0,002	0,372 ± 0,055	1,89
0,15	0,133 ± 0,000	0,565 ± 0,052	4,24
0,30	0,117 ± 0,002	0,129 ± 0,002	1,09

Solução de referência, alantoína 160 µmol L<sup>-1</sup>.

Os resultados obtidos nesses dois estudos prévios mostraram que se encontrou uma condição operacional que permitiria obter uma curva analítica. Então mantendo estas condições, foi processado um conjunto de soluções de referência. Empregando os valores máximos da absorvância como parâmetro, traçou-se a curva analítica da FIGURA 30, a qual apresentou resposta linear caracterizada pela equação  $Y = 0,0027X - 0,0091$  ( $R^2 = 0,996$ ). O limite de detecção estimado considerando-se LD igual  $3\sigma/s$ , foi 4 µmol L<sup>-1</sup> alantoína. Esta

faixa de concentração já permite efetuar a determinação de *N*-ureídeos totais em folhas de soja.

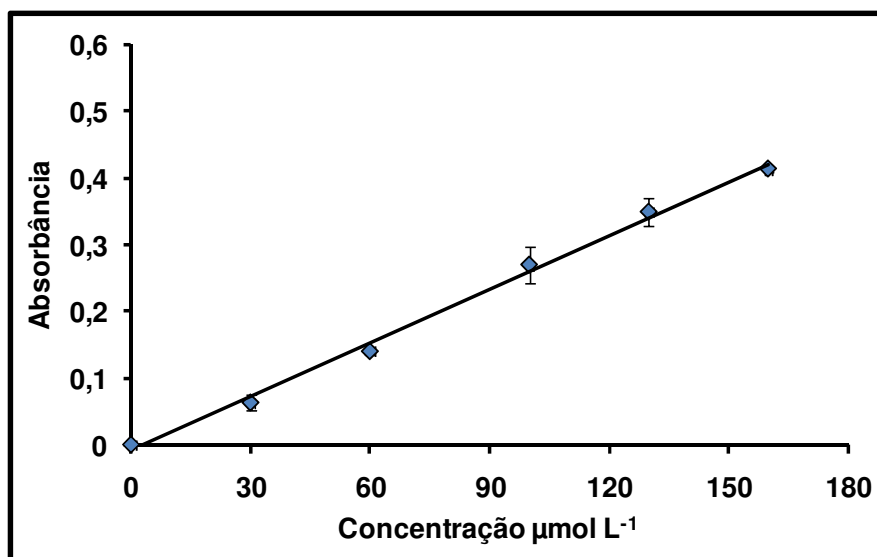


FIGURA 30 - Curva analítica obtida com soluções de referência. Concentrações usadas: 0, 30; 60; 100; 130 e 160  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de alantoína. Solução de hipoclorito 10% em meio alcalino 0,15  $\text{mol L}^{-1}$ ; solução ftalato 0,2  $\text{mol L}^{-1}$  pH 4,0; solução de fenol em NaOH 0,30  $\text{mol L}^{-1}$ ; bobinas de mistura B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, de 50 e 100 cm (d.i. 0,8 mm) respectivamente e bobina de reação, B<sub>3</sub>, de 400 cm (d.i. 0,8 mm).

A precisão dos resultados é da ordem de 5 %, o que para um sistema automático pode ser considerado que deve ser melhorado. Foi observado também que o intervalo de tempo necessário para realizar 18 determinações foi de 3500 s, isto é, aproximadamente uma hora, portanto o sistema proposto pode prover frequência analítica de 18 determinações por hora. Como as vazões de bombeamento, o número de ciclos de inserção e o tempo de acionamento das válvulas solenóide foram os mesmos para amostra e reagentes, o volume gasto de amostra e de cada solução reagente foi de 212,48  $\mu\text{L}$ .

### 4.2.3 - Estudo do Efeito da Concentração de Hidróxido de Sódio na Solução de Fenol

Nos experimentos discutidos nos itens precedentes, a solução de fenol foi mantida em meio alcalino  $0,30 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH. Visando verificar o efeito da alcalinidade desta solução, 5 experimentos foram realizados conforme indicado na FIGURA 25 (pág. 47), mantendo as condições estabelecidas nos itens anteriores. Os registros dos sinais gerados são mostrados na FIGURA 31.

Analisando estes registros, observa-se que a melhor resposta foi obtida com o experimento representado pelo conjunto de registros (**d**), pois além da maior diferença entre os sinais do branco e da solução de alantoína, apresentou registros com perfis sem picos duplos, o que pode ser interpretado como uma boa homogeneidade. A ocorrência de picos duplos nos registros dos sinais do branco e da solução de referência relacionados aos experimentos (**a**), (**b**) e (**e**) podem ser explicadas através das condições extremas de alcalinidade nas soluções do fenol, as quais dificultavam a mistura do reagente com a zona da amostra.

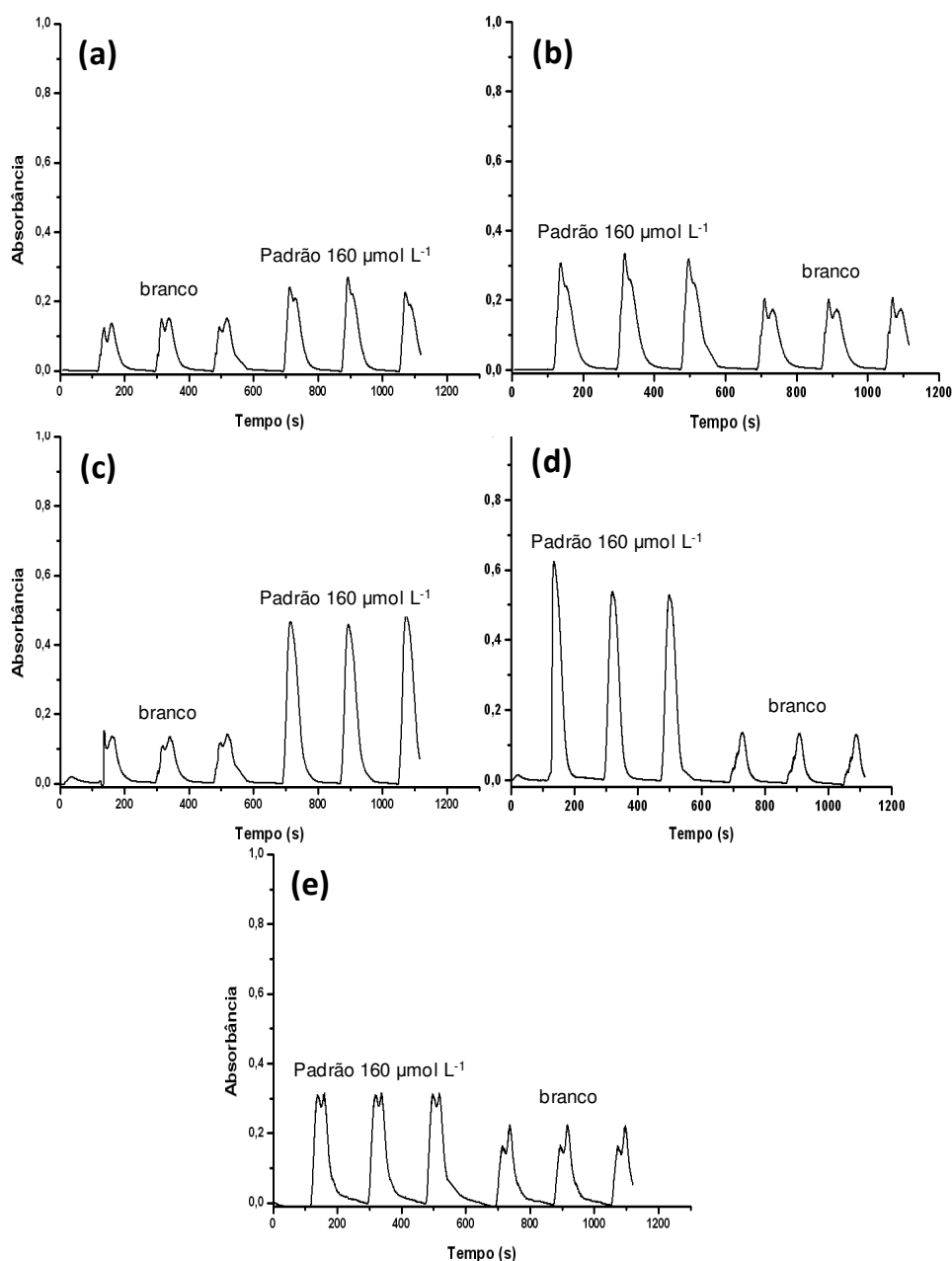


FIGURA 31 - Efeito da concentração de hidróxido de sódio na solução de fenol. **a**, **b**, **c**, **d** e **e** correspondem as concentrações de: 0,05; 0,075; 0,15; 0,30; e 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Condições do estudo: soluções de trabalho, branco e referência 160  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de alantoína; solução ftalato 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 4,0; solução de hipoclorito 10% em meio alcalino 0,15 mol L<sup>-1</sup>; bobinas de mistura B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, de 50 e 100 cm (d.i. 0,8 mm) respectivamente e bobina de reação, B<sub>3</sub>, de 400 cm (d.i. 0,8 mm).

Os dados da TABELA 5 mostram um ganho crescente no sinal com o aumento concentração de NaOH na solução de fenol, sendo que a maior diferença entre os sinais do branco e da solução de referência foi obtido com a concentração de NaOH de  $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ . Em vista disso, para dar continuidade ao trabalho, a solução de fenol foi preparada em solução hidróxido de sódio  $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ .

TABELA 5. Valores de absorvância para o estudo da concentração de hidróxido de sódio na solução de fenol

Concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ )	Absorbância média		Razão Sol ref. / branco
	branco	Solução de referência	
<b>0,05</b>	$0,147 \pm 0,009$	$0,247 \pm 0,022$	1,68
<b>0,075</b>	$0,205 \pm 0,003$	$0,321 \pm 0,014$	1,56
<b>0,15</b>	$0,139 \pm 0,004$	$0,470 \pm 0,013$	3,38
<b>0,30</b>	$0,131 \pm 0,001$	$0,565 \pm 0,052$	4,30
<b>1,0</b>	$0,224 \pm 0,001$	$0,312 \pm 0,002$	1,39

Solução de referência, alantoina  $160 \mu\text{mol L}^{-1}$

#### 4.2.4 - Estudo do Efeito da Concentração da Solução de Fenol

Os experimentos referentes ao efeito da concentração de fenol foram realizados seguindo a estratégia mostrada na FIGURA 26 (pág. 48). Foram realizadas 6 experimentos, variando a concentração da solução de fenol e mantendo a concentração NaOH em  $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ . As concentrações das soluções de ftalato e hipoclorito foram mantidas em  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  e 10% (v/v), respectivamente. A concentração de NaOH na solução de hipoclorito foi mantida em  $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ , tendo os resultados discutidos sido em item anterior.

Na FIGURA 32 são mostrados os registros obtidos nestes experimentos e na TABELA 6 os valores de absorbâncias para as soluções do branco e referência  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  de alantoína.

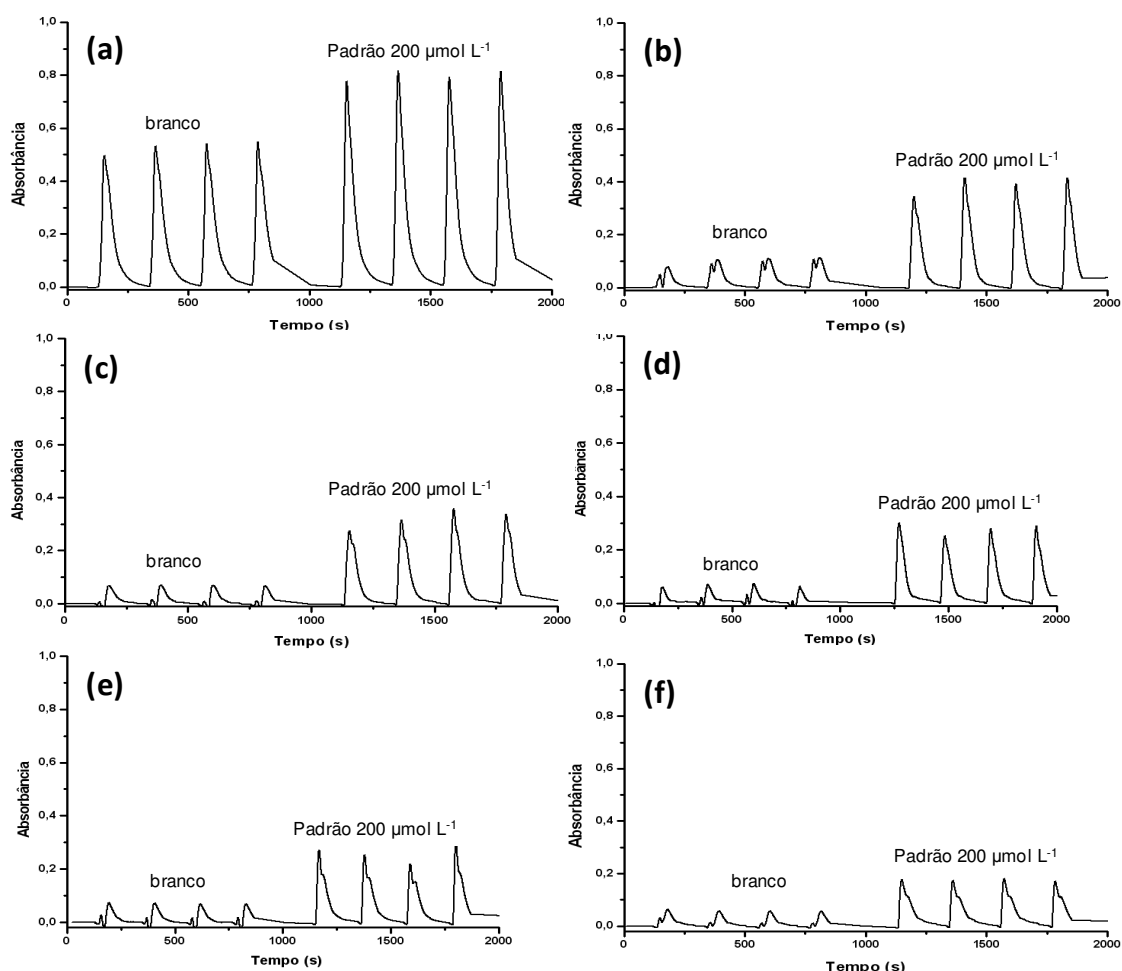


FIGURA 32 - Efeito da concentração da solução de fenol no sinal analítico. **a, b, c, d, e e f** correspondem as concentrações de 0,64; 0,56; 0,48; 0,40; 0,32; e 0,16 mol  $\text{L}^{-1}$ ; de fenol. Condições de trabalho: solução de hipoclorito 10% em meio alcalino  $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ ; solução ftalato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,0; soluções de fenol em NaOH  $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ .

Considerando-se como parâmetro de interesse a diferença entre os sinais do branco e da solução de referência de alantoína, verifica-se que a absorbância é crescente com a concentração de fenol, apresentando maior diferença para a concentração  $0,56 \text{ mol L}^{-1}$ . O segundo melhor resultado



corresponde à concentração de 0,64 mol L<sup>-1</sup>. Entretanto, o sinal do branco é aproximadamente 5 vezes maior para a esta concentração. Este efeito inviabiliza sua escolha, pois um sinal de branco alto poderia diminuir a faixa de resposta linear do método. O terceiro melhor resultado corresponde à concentração de 0,48 mol L<sup>-1</sup>. Esta condição foi selecionada para dar prosseguimento ao trabalho com o objetivo de diminuir a concentração de fenol no resíduo gerado.

TABELA 6. Valores de absorvância para o estudo da concentração de fenol no sinal analítico

Concentração (mol L <sup>-1</sup> )	Absorbância média		Razão Sol ref. / branco
	Branco	Solução de referência	
0,64	0,516 ± 0,045	0,801 ± 0,019	1,55
0,56	0,103 ± 0,016	0,396 ± 0,038	3,83
0,48	0,069 ± 0,001	0,341 ± 0,037	4,97
0,40	0,069 ± 0,006	0,282 ± 0,021	4,07
0,32	0,071 ± 0,002	0,259 ± 0,031	3,64
0,16	0,059 ± 0,003	0,176 ± 0,004	2,97

Solução de referência, alantoina 200 µmol L<sup>-1</sup>

No sexto experimento (Registros *f*), a diferença entre os sinais do branco e da solução de referência diminuiu significativamente, alcançando o menor valor (0,1168). Supõe que, nesta condição, a concentração do reagente não era suficiente para atender a estequiometria da reação.

#### 4.2.5 – Estudo do Efeito da Temperatura no Desenvolvimento da Reação

A temperatura pode afetar favoravelmente o desenvolvimento da reação para produzir a espécie química a ser monitorada, então alguns

experimentos foram realizados para avaliar esse efeito, estabelecendo temperaturas de 26, 32 e 40 °C. Os registros dos sinais obtidos nestes experimentos são mostrados na FIGURA 33 e na TABELA 7, os valores de absorbâncias para as soluções do branco e referência de 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de alantoína.

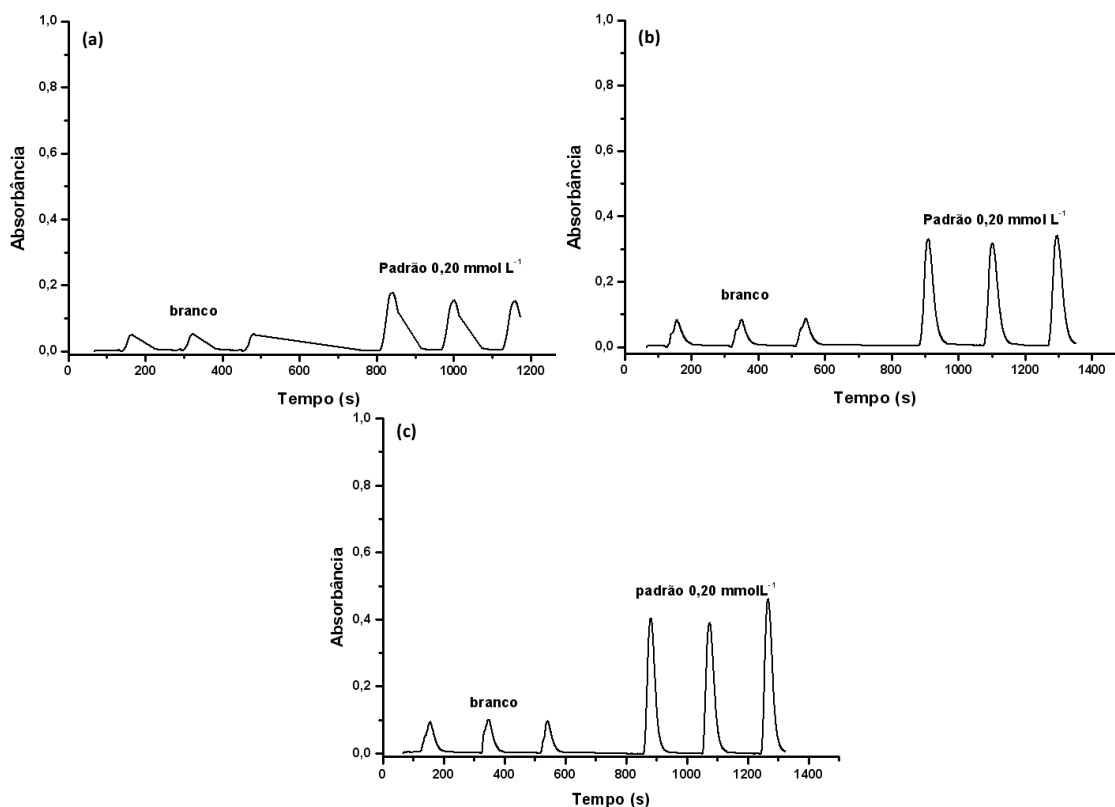


FIGURA 33 - Efeito da temperatura para o desenvolvimento da reação. **a**, **b** e **c** correspondem as temperaturas de 26; 32 e 40 °C. Condições de trabalho: solução de hipoclorito 10% em meio alcalino 0,15 mol L<sup>-1</sup>; solução ftalato 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 4,0, solução de fenol 0,48 mol L<sup>-1</sup> em meio alcalino 0,30 mol L<sup>-1</sup>; bobinas de mistura B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, de 50 e 100 cm (d.i. 0,8 mm) respectivamente e bobina de reação, B<sub>3</sub>, de 400 cm (d.i. 0,8 mm).

Os resultados indicam um aumento significativo do sinal com a temperatura da zona da amostra. A partir dos dados da TABELA 7, deduz-se que houve um aumento de 50% na magnitude do sinal quando a temperatura passou de 26 para 32 °C, sendo que de 32 para 40 °C, o aumento foi de 20 %. Em temperaturas maiores que 40 °C ocorria intensa liberação de bolhas de gás,

segmentando a solução dentro do reator, provocando um sistema bifásico (gás/líquido). A câmara de remoção de bolhas (FIGURA 20, pág. 38) não conseguia efetuar uma remoção completa, causando instabilidade na leitura dos sinais e consequentemente problemas de repetibilidade nos picos. Em vista disso, a temperatura de 40 °C foi selecionada.

TABELA 7. Valores de absorvância para o estudo da temperatura no desenvolvimento da reação.

Temperatura (°C)	Absorvância média		Razão Sol ref. / branco
	branco	Solução de referência	
26	0,052 ± 0,001	0,162 ± 0,014	3,11
32	0,085 ± 0,022	0,330 ± 0,011	3,86
40	0,098 ± 0,003	0,417 ± 0,035	4,27

Solução de referência, alantoína 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$

#### 4.2.6 - Estudo do Efeito do Comprimento da Bobina B<sub>3</sub>

Em sistemas de análise em fluxo, a conversão do analito à espécie de interesse pode ser melhorada aumentando o tempo de residência da zona de amostra. O procedimento desenvolvido para determinação de alantoína, é baseado na reação de Berthelot, a qual tem cinética lenta, portanto necessita de longo intervalo de tempo para seu desenvolvimento.

O tempo de residência da zona da amostra necessário para o desenvolvimento da reação química foi avaliado, efetuando leituras em triplicata do branco e de uma solução de referência 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de alantoína. Nestes experimentos a temperatura na bobina de reação foi mantida em 40°C. O comprimento da bobina B<sub>3</sub> foi variado de 50 a 400 cm, usando tubo de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm. A FIGURA 34 mostra os registros dos sinais

obtidos nestes experimentos e a TABELA 8, os valores de absorbâncias para as soluções do branco e referência  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  de alantoína.

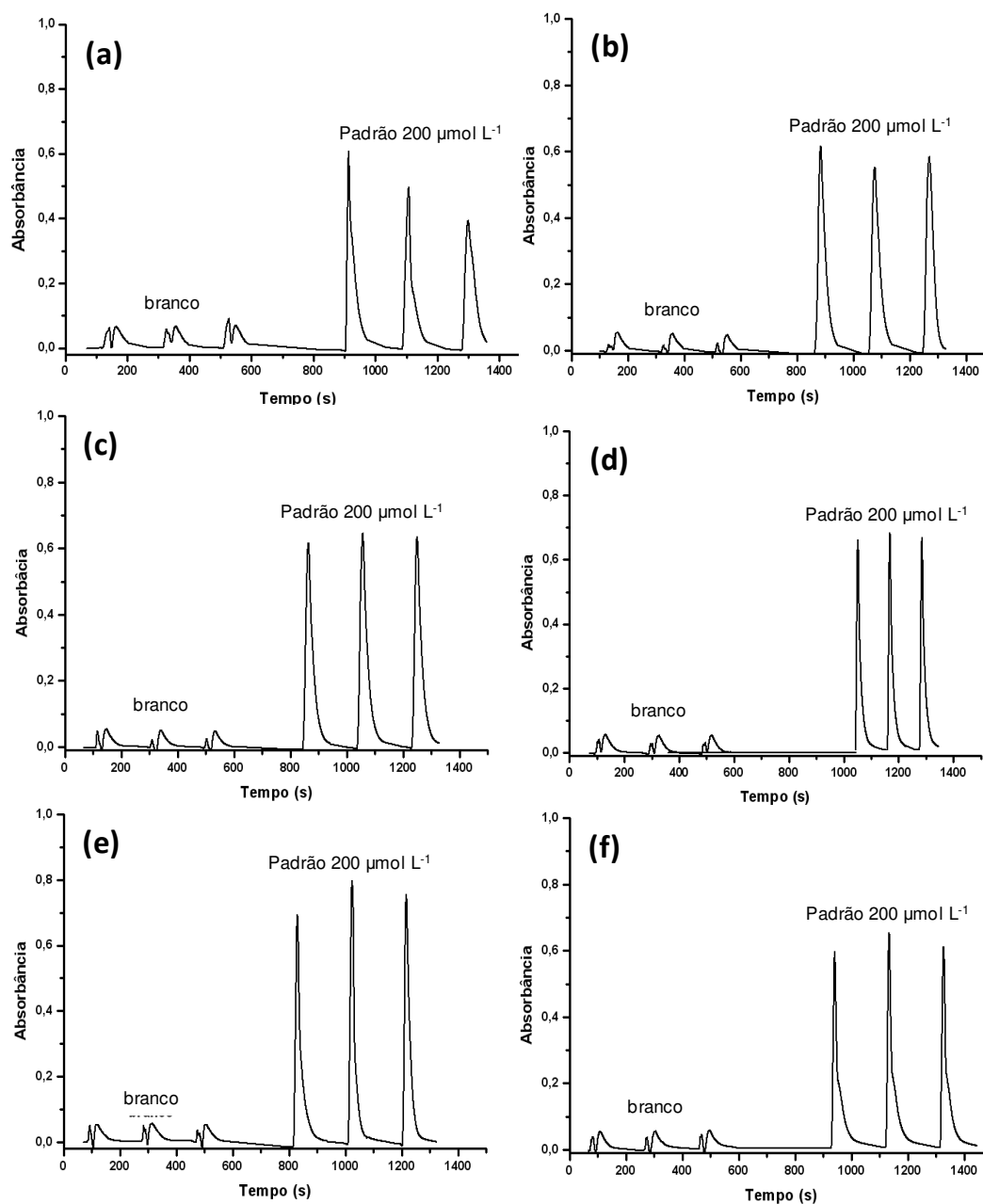


FIGURA 34 - Efeito do comprimento da bobina B<sub>3</sub>. **a, b, c, d, e, e f** correspondem a 50, 100, 150, 250, 350 e 400 cm respectivamente. Condições de trabalho: solução de hipoclorito 10% em meio alcalino  $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ ; solução ftalato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,0, solução de fenol  $0,48 \text{ mol L}^{-1}$  em meio alcalino  $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ ; bobinas de mistura B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, de 50 e 100 cm (d.i. 0,8 mm) respectivamente e temperatura da reação =  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Observa-se que a partir do reator de 100 cm de comprimento, os registros da solução de referência mostram perfis lisos indicando boa mistura. Os dados da TABELA 8, mostram que houve ganho de sinal até o comprimento de 350 cm. A atenuação observada no resultado obtido com o reator de 400 cm pode ser atribuída à dispersão, considerando-se que este efeito poderia ser maior que o ganho no desenvolvimento da reação. Embora, os resultados obtidos com reator de 250 cm sejam 5% menor em comparação com os obtidos com o reator de 350 cm, este reator foi escolhido, visando aumentar a frequência de amostragem, apresentando também como vantagem um erro relativo de 1,5 %.

TABELA 8 - Valores de absorvância para o estudo do comprimento da bobina B<sub>3</sub>.

Comprimento (cm)	Absorvância média		Razão Sol ref. / Branco
	branco	Solução de referência	
50	0,098 ± 0,003	0,407 ± 0,018	4,17
100	0,052 ± 0,003	0,585 ± 0,032	11,34
150	0,052 ± 0,003	0,633 ± 0,015	12,19
250	0,055 ± 0,002	0,711 ± 0,011	12,95
350	0,055 ± 0,003	0,750 ± 0,033	13,60
400	0,058 ± 0,002	0,623 ± 0,020	10,81

Solução de referência, alantóina 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$

#### 4.2.7 - Estudo do Efeito do Número de Ciclos e do Tempo de Inserção do Fenol

O efeito do volume e da mistura da solução de fenol na zona de amostra foi avaliado, mantendo constante o volume da amostra em 212,5  $\mu\text{L}$ , e variando o número de ciclos para a inserção da solução de fenol de 11 a 22. Os registros dos sinais obtidos nestes experimentos são mostrados na FIGURA 35.

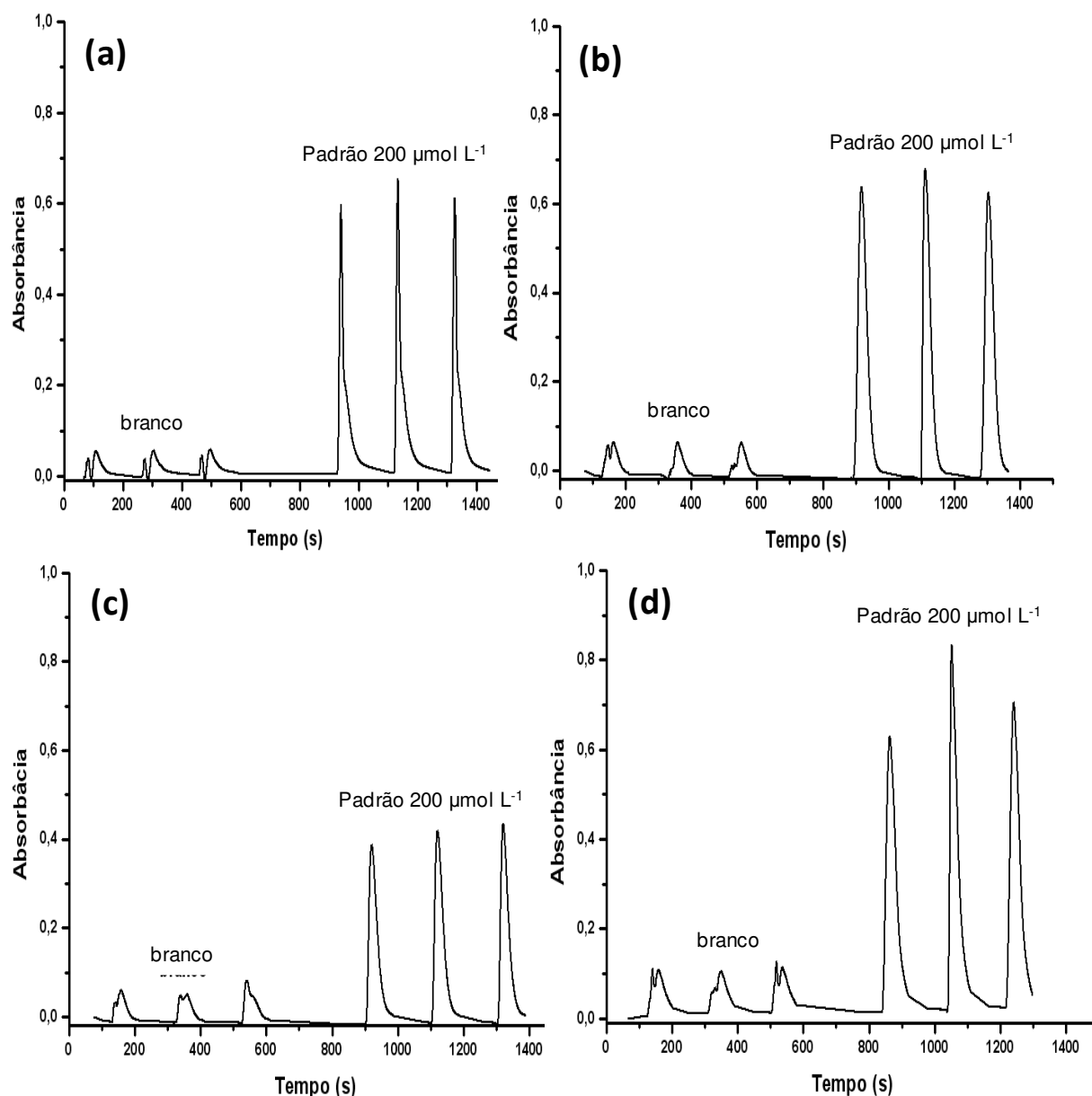


FIGURA 35 - Efeito do nº de ciclos e do tempo de abertura da válvula do fenol. **(a)** tempo = 0,4 s, n<sup>o</sup> ciclos = 16, v = 212,48 µL; **(b)** tempo = 0,3 s, n<sup>o</sup> ciclos = 15, v = 149,4 µL; **(c)** tempo = 0,2 s, n<sup>o</sup> ciclos = 22, v = 146,08 µL; **(d)** tempo = 0,4 s, n<sup>o</sup> de ciclos = 11, v = 146,08 µL. Condições de trabalho: solução de hipoclorito 10% em meio alcalino 0,15 mol L<sup>-1</sup>; solução ftalato 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 4,0, solução de fenol 0,48 mol L<sup>-1</sup> em meio alcalino 0,30 mol L<sup>-1</sup>; bobinas de mistura B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, de 50 e 100 cm (d.i. 0,8 mm) respectivamente e bobina de reação, B<sub>3</sub>, 250 cm (d.i. 0,8 mm), temperatura da reação = 40 °C.

No experimento **a**, foram realizados 16 ciclos de 0,4s resultando em um volume de 212,48  $\mu\text{L}$  de solução de fenol o qual apresentou absorbâncias de 0,057 e 0,624 com desvios de 0,002 e 0,029 respectivamente para o branco e solução padrão de alantoína 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . No experimento **b**, foram realizados 15 ciclos de 0,3 s resultando em um volume de 149,4  $\mu\text{L}$  da solução de fenol, o qual não afetou significativamente os perfis dos picos para o branco e para solução de referência. No experimento **c** foram realizados 22 ciclos de 0,2 s resultando em um volume de 146,08  $\mu\text{L}$  da solução de fenol. Neste experimento, como pode ser observado na TABELA 9, houve uma queda expressiva no sinal (64%). No experimento **d** foram realizados 11 ciclos de 0,4 s resultando em um volume de 146,08  $\mu\text{L}$  da solução de fenol. Nestes dois experimentos, os volumes das alíquotas da solução de fenol na zona da amostra foram iguais (146,08  $\mu\text{L}$ ), tendo em vista que os intervalos de tempo para acionamento das outras válvulas foram mantidos, então nos dois casos os volumes da zona da amostra eram idênticos. Entretanto, os registros são distintos, em termos de magnitude e repetibilidade, e não encontramos uma explicação para este efeito. Não podemos atribuir à deficiência de mistura, e nem ao tempo de reação, pois a bobina de reação é longa (250 cm), e a vazão de bombeamento foi mantida constante.

Considerando-se a altura máxima dos registros e a repetibilidade como parâmetros de interesse, o melhor resultado é o representado pelo conjunto de registros (**b**). Neste caso, foram empregados 15 ciclos de amostragem e intervalo de tempo de inserção de 0,3 s, portanto o volume da solução de fenol foi de 149  $\mu\text{L}$ . Esta condição operacional foi selecionada.

TABELA 9 - Valores de absorvância para o estudo do número de ciclos e do tempo de inserção da solução de fenol

Experimentos	Absorbância média		Razão Sol ref. / branco
	Branco	Solução de referência	
A	0,057 ± 0,002	0,625 ± 0,020	11,04
B	0,065 ± 0,001	0,647 ± 0,028	9,98
C	0,064 ± 0,015	0,414 ± 0,024	6,48
D	0,11 ± 0,00	0,723 ± 0,103	6,58

Solução de referência, alantoína 200 µmol L<sup>-1</sup>

#### 4.2.8 - Remoção dos Interferentes

Como a reação de Berthelot não é específica para *N*-ureídeos, a remoção dos potenciais interferentes é necessária antes que a quantificação da alantoína seja feita. Segundo MCCLURE e ISRAEL (1979) nos extratos de plantas inoculadas, os maiores interferentes são comumente os aminoácidos asparagina (10,5±2,7%), glicina (3,3±1,4%), ácido aspártico (1,1±0,8%), arginina (1,2±0,5%), lisina (0,6±0,3%) e histidina (0,8±0,3%), pois estão presentes em grandes quantidades. Os *N*-ureídeos não se ligam à resina de troca catiônica (PATTERSON, 1982), propriedade que torna possível a remoção de interferentes amínicos usando uma resina de troca catiônica adequada. Para verificar essa possibilidade, quatro amostras de extratos de plantas foram tratadas fora do percurso analítico com uma resina de troca catiônica. Os resultados são mostrados na TABELA 10.



TABELA 10. Resultados do tratamento das amostras com a resina de troca catiônica

Amostras	Método proposto		Método comparativo	
	s/ tratamento	c/ tratamento	s/ tratamento	c/ tratamento
	----- $\mu\text{molL}^{-1}$ -----			
A1	132,2±4,8	70,4±1,6	71,7±9,1	71,5±6,9
A2	115,8±6,6	65,2±1,1	65,7±10,5	64,7±6,3
A3	125,5±1,2	55,6±1,5	55,3±6,3	56,7±7,8
A5	110,3±1,5	74,9±2,7	72,0±10,0	73,2±8,1

Como podem ser observados, para o procedimento proposto, os resultados referentes às amostras sem tratamento com a resina de troca catiônica, apresentaram valores maiores que os do procedimento comparativo. Entretanto, observa-se que os resultados obtidos com as amostras tratadas são comparáveis aos do método comparativo e mais precisos, indicando que, efetivamente, o tratamento prévio da amostra empregando resina de troca iônica, removeu os concomitantes que geram interferência. Aplicando o teste-*t* pareado entre estes resultados e os obtidos com método comparativo, não foi observada diferença significativa ao nível de 95% de confiança, o que comprova a eficiência do tratamento.

Observa-se na mesma TABELA que, para o método comparativo, as amostras com e sem tratamento com a resina não apresentaram diferenças significativa ao nível de confiança de 95% no teste *t* – pareado. Isto é devido à especificidade da reação de Rimini-Schryver.

### 4.3 - Método Comparativo

Visando verificar a exatidão do procedimento proposto para determinação de *N*-ureídos total, foram feitas determinações de *N*-ureídos total empregando o procedimento proposto e comparativo (VOGELS e van der DRIFT,

1970). As concentrações de *N*-ureídeos, foram obtidas por interpolação empregando as equações mostradas a seguir:

$$\text{Absorb} = 0,0077X + 0,0179; (R^2 = 0,9967) \quad \text{EQUAÇÃO 4}$$

$$\text{Absorb} = 0,0019X - 0,0068; (R^2 = 0,9995) \quad \text{EQUAÇÃO 5}$$

As EQUAÇÕES 4 e 5 correspondem às curvas analíticas obtidas processando as soluções de referência com o procedimento comparativo (VOGELS e van der DRIFT, 1970) e com o proposto, respectivamente. A letra X representa a concentração de alantoína em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

## 4.4 - Desempenho Analítico

### 4.4.1 – Módulo de Análise por Multicomutação em Fluxo – Segunda Configuração

O desempenho analítico do segundo sistema proposto foi avaliado mediante uma curva analítica, onde valores conhecidos de alantoína forneceram os valores de absorvância correspondente, com a qual se obteve o teor de alantoína nos extratos de tecido vegetal de soja tratados em linha, empregando a coluna contendo a resina de troca catiônica para remoção dos interferentes.

A FIGURA 36 mostra os registros correspondentes ao processamento das soluções de referência de alantoína e 14 amostras de extratos de folhas de soja. Na FIGURA 37 é mostrada a curva analítica obtida empregando a absorvância máxima de cada registro. Além da resposta linear em uma ampla faixa de concentração ( $30 - 260 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), caracterizada pelo coeficiente de regressão linear  $R^2 = 0,9995$ , observa-se que os registros apresentam boa repetibilidade e boa estabilidade ao longo do tempo, evidenciadas pela homogeneidade dos perfis dos mesmos.

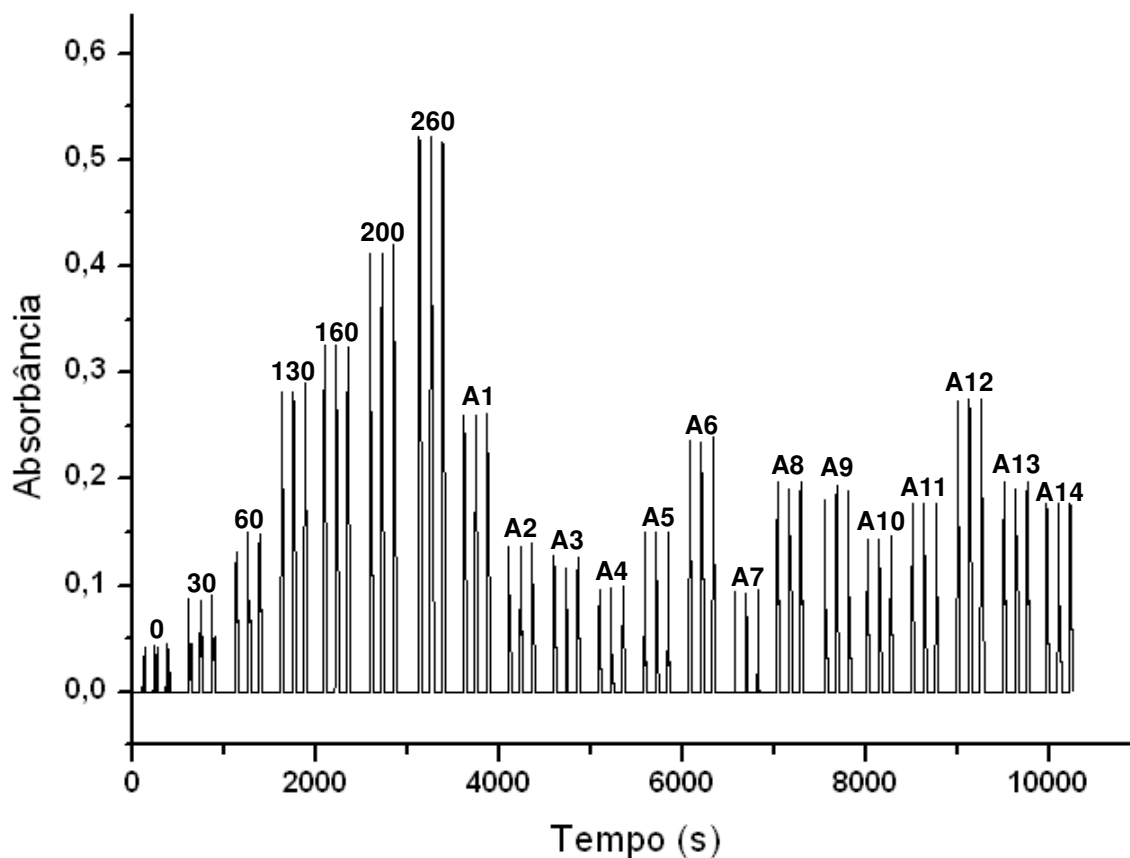


FIGURA 36 - Registros referentes ao processamento de soluções referências de alantoína e de 14 amostras de extratos de folhas de soja ( $n=3$ ). Da esquerda para a direita os registros correspondem sequencialmente às soluções de referência de 0; 30; 60; 130; 160; 200 e 260  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de alantoína e as amostras.

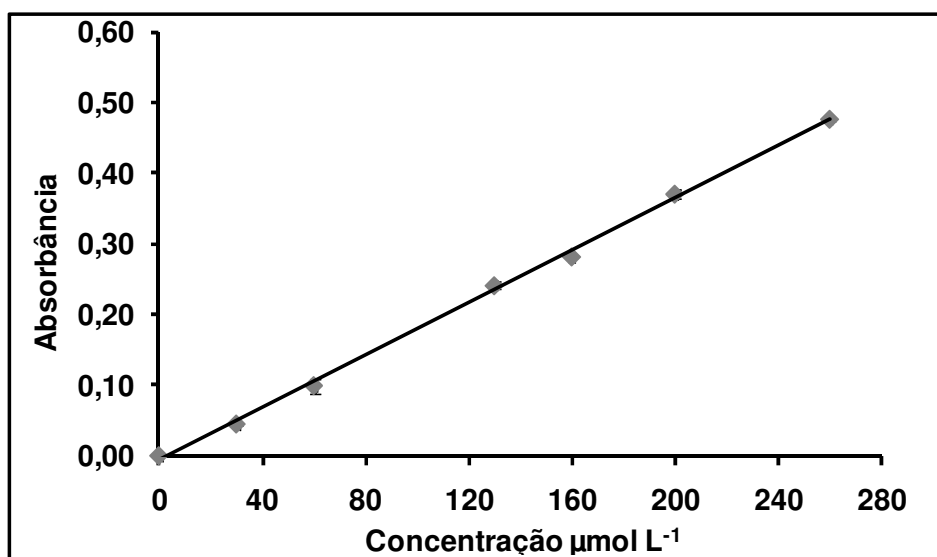


FIGURA 37 - Curva analítica referente ao processamento de soluções referência de alantoína (n=3) com o procedimento proposto. Concentrações usadas: 0, 30, 60, 130, 160, 200 e 260  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

As características analíticas deste sistema são mostradas na TABELA 11, na qual se observa algumas vantagens em relação ao método comparativo: faixa de resposta linear mais ampla, melhor coeficiente de regressão linear e menor limite de detecção (LD). Outras características importantes tais como desvio padrão relativo (RSD) de 3% (n = 6) e frequência de amostragem de 22 determinações por hora, também foram observadas.

TABELA 11. Características analíticas

Parâmetros	Método proposto(n=3)	Método comparativo* (n=2)
Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	30 - 260	30 - 160
(R <sup>2</sup> )	0,9995	0,9967
RSD (%)	<3	<5
LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	1	2
Equação da reta	$Y = 0,0019x - 0,0068$	$Y=0,0077x + 0,0179$
Frequência de amostragem (det/h)	22	-

\* (VOGELS E van der DRIFT, 1970)

O procedimento proposto foi comparado ao procedimento de PATTERSON e colaboradores (1982) e na TABELA 12 são apresentadas algumas figuras de mérito. Observa-se que o procedimento proposto apresenta vantagens significativas, principalmente em relação ao volume gasto de fenol e consumo dos reagentes por determinação.

TABELA 12 – Figuras de mérito entre os procedimentos proposto e comparativo \*

Figuras de mérito	Método proposto (n=3)	Método Patterson* (n=2)
volume de fenol ( $\mu\text{L det}^{-1}$ )	149,4	696
volume de amostra ( $\mu\text{L det}^{-1}$ )	212,48	58
massa de fenol ( $\text{mg det}^{-1}$ )	6,7	22,9
massa de $\text{NaClO}_4$ ( $\text{mg det}^{-1}$ )	0,530	0,434
massa de ftalato ( $\text{mg det}^{-1}$ )	8,6	10,0
Frequência de amostragem ( $\text{det h}^{-1}$ )	22	35

\* (PATTERSON, *et.al.*,1982)

O método desenvolvido foi aplicado à quantificação de alantoína em amostras de extratos de folhas de soja. Os resultados encontrados são apresentados na TABELA 13.

TABELA 13. Comparação de resultados

Amostras	Método	Método
	proposto (n=3)	comparativo (n=2)
μmol N-ureídeos/g de massa seca		
A1	67,55±0,02	68,22±0,28
A2	27,72±0,03	27,58±0,50
A3	24,55±0,055	25,09±0,55
A4	15,39±0,25	15,11±0,61
A5	31,97±0,12	32,41±0,88
A6	59,64±0,36	59,90±2,71
A7	13,84±0,26	13,41±0,59
A8	47,13±0,26	47,05±0,90
A9	45,12±1,00	44,42±0,67
A10	30,09±0,52	29,45±0,28
A11	40,76±0,10	40,69±0,72
A12	72,00±0,24	72,65±0,55
A13	47,52±0,49	47,41±0,88
A14	40,74±0,10	40,55±1,55

Aplicando-se o teste  $t$  – pareado entre os resultados obtidos com os dois procedimentos, obteve-se o seguinte valor  $t_{cal} = 0,0343$ . Considerando-se que o valor de  $t_{tabelado}$  para 95% de confiança (n-1) é 2,160, pode-se afirmar que não há diferença significativa para este nível de confiança.

Na FIGURA 38 é mostrada a correlação obtida, para as 14 amostras, entre os procedimentos proposto e comparativo. Observa-se nesta FIGURA, que houve boa resposta linear caracterizada pelo coeficiente de regressão linear  $R^2 = 0,99994$  equação da reta  $Y = 0,99344X + 0,26616$ .

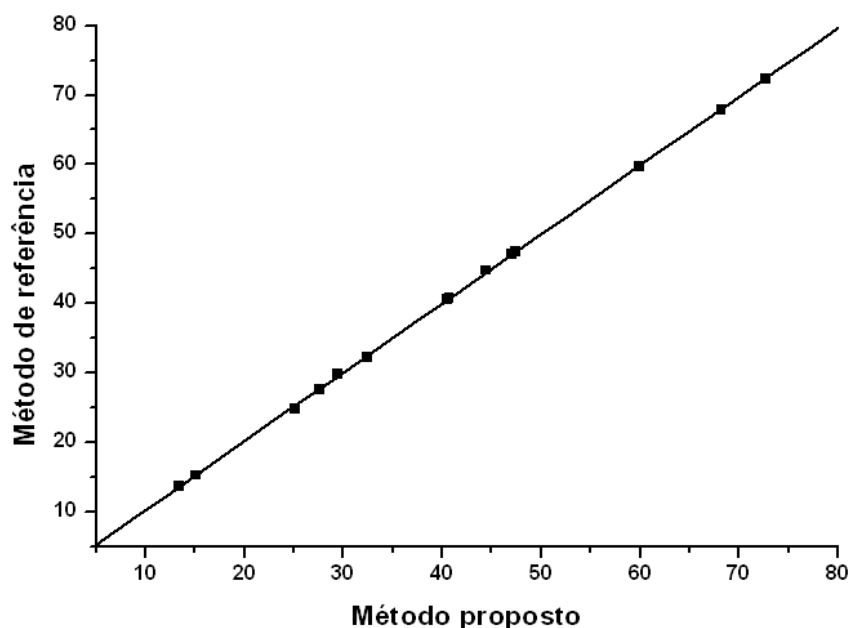


FIGURA 38 - Correlação entre os procedimentos proposto e comparativo (n = 14).

#### 4.4.2 – Módulo de Análise por Multicomutação em Fluxo – Terceira Configuração

A FIGURA 39 mostra os registros correspondentes ao processamento das soluções de referência de alantoína, empregando o terceiro módulo de análise (FIGURA 22, pág. 42). Observa-se que os registros apresentam boa repetibilidade, e boa estabilidade ao longo do tempo e, além disso, variação desprezível da linha de base. Tomando-se os valores máximo de absorbância como parâmetro de interesse, verificou-se que os resultados apresentam uma ótima correlação linear, caracterizada pela equação  $Y = 0,001X - 0,003$  ( $R^2 = 0,999$ ), onde Y e X representam a absorbância e a concentração de N-ureídos ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), respectivamente. O limite de detecção estimado considerando-se LD igual  $3\sigma/s$ , foi  $8,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  alantoína. Outras características importantes tais como desvio padrão relativo (RSD) de 3% (n = 6), e freqüência de amostragem de 39 determinações por hora, também foram observadas.

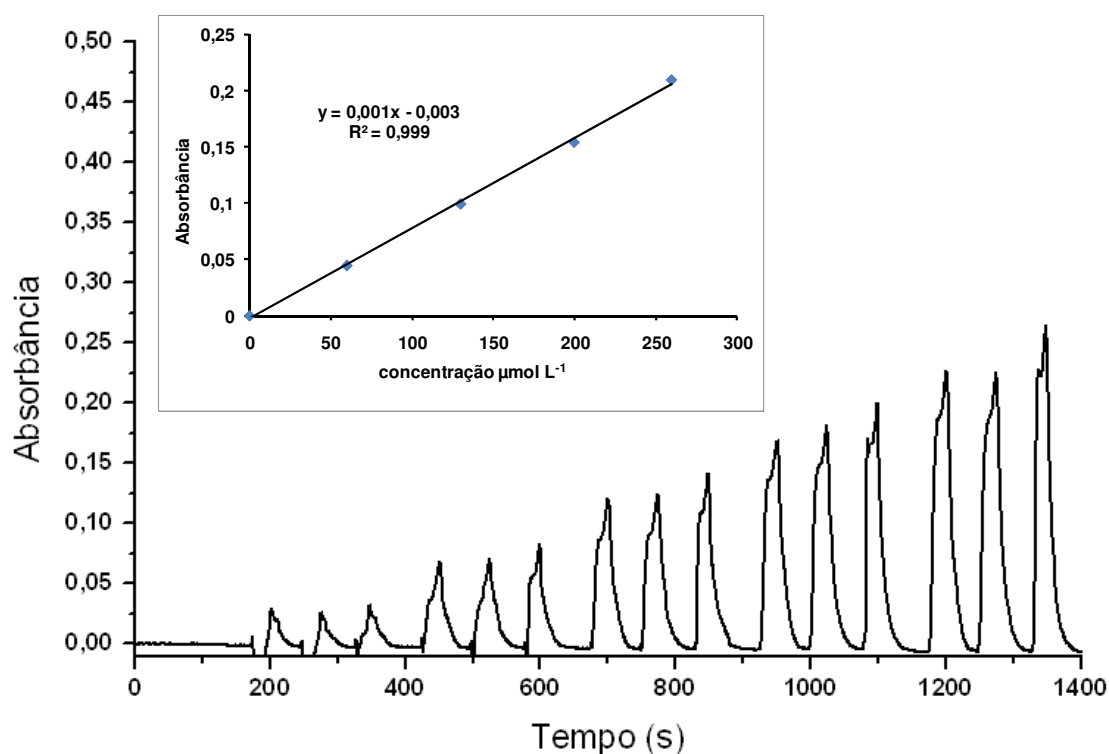


FIGURA 39 - Registros referentes ao processamento de soluções referência de alantoína e a curva analítica correspondente. Concentrações usadas: 0, 60, 130, 200 e 260  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

O terceiro procedimento proposto foi comparado ao procedimento de PATTERSON e colaboradores (1982) e na TABELA 14 são apresentadas as figuras de mérito. Observa-se que o terceiro procedimento proposto apresenta vantagens expressivas, quando comparado ao sistema de PATTERSON e colaboradores (1982), principalmente em relação aos volumes de fenol usado, de efluente gerado, consumo dos reagentes e frequência de amostragem. Por outro lado, quando comparado ao segundo módulo proposto, observa-se que a frequência de amostragem do terceiro sistema é 44% maior, entretanto o consumo de reagentes por determinação é maior.



TABELA 14 – Figuras de mérito entre os procedimentos proposto e de Patterson \*

Figuras de mérito	Método proposto* (n=3)	Método proposto** (n=3)	Método de Patterson *** (n=2)
volume de fenol (mL h <sup>-1</sup> )	3,278	9,750	24,36
volume de efluente (mL h <sup>-1</sup> )	120	120	153,6
volume de amostra (mL h <sup>-1</sup> )	4,8	6,47	2,03
massa de fenol (mg det <sup>-1</sup> )	6,7	11,28	22,9
massa de NaClO (mg det <sup>-1</sup> )	0,530	0,417	0,434
massa de ftalato (mg det <sup>-1</sup> )	8,6	13,6	10,0
Faixa linear (μmol L <sup>-1</sup> )	30-260	60-260	****
R <sup>2</sup>	0,999	0,999	****
RSD (%)	3	3	****
Frequência de amostragem (det h <sup>-1</sup> )	22	39	35

\*segundo sistema proposto; \*\*terceiro sistema proposto; \*\*\*(PATTERSON, *et.al.*,1982);

\*\*\*\* Valores não encontrados na referência pesquisada.

## 5 - Conclusões

Os sistemas propostos apresentaram frequência de amostragem e resultados analíticos com alta precisão e exatidão, assim podemos concluir que podem ser empregados para a determinação de *N*-ureídos em material vegetal, em substituição ao procedimento manual.

O emprego de um fotômetro baseado em LED como fonte de radiação, mostrou ser uma alternativa ao emprego de espectrofotômetro comercial, o que afeta de modo favorável o custo da instrumentação.

Os sistemas analíticos como um todo apresentaram excelente desempenho, incluindo estabilidade ao longo do tempo, baixo nível de ruído, funcionamento totalmente controlado por software, possibilidade de uso por pessoas com pouco domínio de eletrônica e informática.

A faixa de resposta linear entre 30 e 260  $\mu\text{mol L}^{-1}$  é compatível com os requisitos necessário para atender a demanda nas áreas de pesquisa em nutrição de plantas, em que é necessária a determinação de *N*-ureídos em tecidos de soja (HUNGRIA, 1994).

Os resultados discutidos refletem o desempenho global do módulo de análise, do fotômetro e do procedimento analítico, então podemos concluir que o objetivo do trabalho foi alcançado. Neste sentido, se pode afirmar que o mesmo é adequado para fornecer resultados analíticos de qualidade para pesquisa envolvendo Microbiologia do Solo e a Fixação Biológica de Nitrogênio.

O terceiro módulo de análise foi projetado tendo como foco o aumento da frequência de amostragem, empregando um sistema híbrido constituído por um injetor automático e um conjunto de válvulas solenóide. Neste caso, visava-se associar as vantagens dos processos de fluxo monossegmentado por ar e a multicomutação. Os resultados obtidos permitem concluir que o mesmo é viável, entretanto não houve tempo hábil para concluir as otimizações referentes ao consumo de reagentes e realizar o processamento de amostras.

## 6 - Tratamento dos Resíduos Gerados

O Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP possui laboratório de tratamento de resíduos químicos que gerencia e trata os resíduos produzidos por todo o Centro. Todo resíduo gerado durante o desenvolvimento deste trabalho foi armazenado em galões plásticos, identificados por etiquetas contendo: responsável, tipo de resíduo, característica do resíduo, cuidados a tomar e o diagrama de perigo (diagrama de Hommel).

O Diagrama de Hommel utiliza cores para indicar se a substância é reativa (amarelo), inflamável (vermelho), tóxica (azul) ou perigosa (branco) e os números de 0 – 4 para indicar o grau de atividade, sendo 0 pouco reativo (estável) e 4 muito reativo (tóxico ou facilmente inflamável). A maior parte dos resíduo gerados no desenvolvimento deste trabalho utilizou o rótulo mostrado na FIGURA 38, pois possui características oxidantes (oxy), sendo que o contato com a pele, ingestão ou inalação pode ser fatal (4), necessitando o uso de equipamentos de proteção individual (epi).

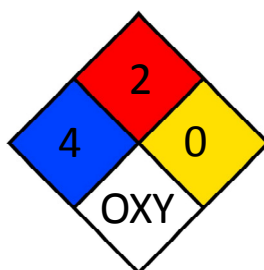


FIGURA 40. Diagrama de Hommel para resíduos de fenol.

Este resíduo foi tratado, de acordo com procedimento adotado pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP para o tratamento de resíduos fenólicos no qual se faz uso dos Processos Oxidativos Avançados (POA), resultando em uma degradação > 99% (TAVARES, *et al.* 2006).

## 7 - Referências Bibliográficas

ALCÂNTARA, R. M. C. M. *Metabolismo do Carbono nos Nódulos*. Seropédica: (Documentos 253 / Embrapa Agrobiologia), 2008. p. 27.

ATKINS, C. A. "Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule". IN: *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*. DILWORTH, M. J. & GLENN, A. R., (Eds.). Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 293-319.

BARNETT, N. W.; LENEHAN, C. E. & LEWIS, S. W. "Sequential injection analysis: an alternative approach to process analytical chemistry". *Trac, Trends Anal. Chem.*, **18** (5): 346, 1999.

BERGAMIN FILHO, H.; MEDEIROS, J. X.; REIS, B. F. & ZAGATTO, E. A. G. "Solvent-extraction in continuous-flow injection analysis - determination of molybdenum in plant material". *Anal. Chim. Acta*, **101**, (1): 9, 1978a.

BERGAMIN FILHO, H.; REIS, B. F.; JACINTHO, A. O. & ZAGATTO, E. A. G. "Ion-exchange in flow-injection analysis - determination of ammonium-ions at the mg/l level in natural-waters with pulsed Nessler reagent". *Anal. Chim. Acta*, **117**, (6): 81, 1980.

BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E. A. G.; KRUG, F. J. & REIS, B. F. "Merging zones in flow injection analysis .1. Double proportional injector and reagent consumption". *Anal. Chim. Acta*, **101**, (1): 17, 1978b.

BERGENSEN, F. J. *Root nodules of legumes, structure and functions. Botanical research studies*. 1. Chichester, 1982. p. 164.

CRISPINO, C. C.; FRANCHINI, J. C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLE, R. N. R.; LOUREIRO, M. F.; SANTOS, E. N.; CAMPO, R. J. & HUNGRIA, M. *Adução nitrogenada na cultura da soja*. Londrina: (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 75), 2001.

DECNOPWEEVER, L. G. & KRAAK, J. C. "Determination of sulphite in wines by gas-diffusion flow injection analysis utilizing spectrophotometric pH-detection". *Anal. Chim. Acta*, **337** (2): 125, 1997.

DOMNAS, A. "Amide metabolism in yeasts .1. Phenol-hypochlorite method for estimation of amides and related compounds in uptake studies". *J. Biochem.*, **50** (1): 46, 1961.

EMBRAPA, URL <http://www.cnpso.embrapa.br>, acesso em 15/04/2010.

FACCHIN, I.; MARTINS, J. W.; ZAMORA, P. G. P. & PASQUINI, C. "Single-phase liquid-liquid-extraction in monosegmented continuous-flow systems". *Anal. Chim. Acta*, **285**, (3): 287, 1994.

- GINÉ, M. F.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; KRUG, F. J. & JACINTHO, A. O. "A simple procedure for standard additions in flow-injection analysis - spectrophotometric determination of nitrate in plant-extracts". *Anal. Chim. Acta*, **155**: 131, 1983.
- GLENISTER, R. & LARUE, T. "Measuring ureides". IN: *Symbiotic Nitrogen Fixation Technology*. ELKAN, G. H. (Ed.). Nova Iorque, Marcel Dekker, 1987. p. 307-320.
- HALVERSON, L. J. & STACEY, G. "Signal exchange in plant-microbe interactions". *Microbiol. Rev.*, **50** (2): 193, 1986.
- HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K. & BURNS, R. C., "Acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation - laboratory and field evaluation". *Plant Physiol.*, **43** (8): 1185, 1968.
- HERRIDGE, D. F. & PEOPLES, M. B. "Ureide assay for measuring nitrogen-fixation by nodulated soybean calibrated by <sup>15</sup>N methods". *Plant Physiol.*, **93** (2): 495, 1990.
- HOPKINS, W. G. *Introduction to Plant Physiology*. Nova Iorque, ed. John Wiley & Sons, 1995. 464 p.
- HOROWITZ, P. & HILL, W. *The art of electronics*. Cambridge, ed. Cambridge University Press, 1980, cap. 9.
- CONAB, URL [http://www.conab.gov.br/download/safra/6levant\\_de\\_safra.pdf](http://www.conab.gov.br/download/safra/6levant_de_safra.pdf) – Safra 05/06 - acesso em 15/04/2010
- HUNGRIA, M. "Metabolismo do carbono e do nitrogênio nos nódulos". In: *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R. S., (Eds.). Brasília, Embrapa SPI, 1994. p. 249-283.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; CRISPINO, C. C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLI, R. N. R.; MENDES, I. C. & ARIHARA, J. "Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N<sub>2</sub> fixation and of N fertilizer to grain yield". *Can. J. Plant Sci.*, **86**: 927, 2006.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. & ARAÚJO, R. S. "Fixação biológica do N<sub>2</sub> em feijoeiro". IN: *Biologia dos solos de Cerrados* HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. & ARAÚJO, R. S., (Eds.). Planaltina, EMBRAPA, 1997. p.189-294.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. & PERES, J. R. R. "Fixação biológica do nitrogênio em soja". IN: *Microrganismos de importância agrícola*. ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M., (Eds.). Brasília: EMBRAPA, 1994. p.9-89.
- ICARDO, M. C.; MATEO, J. V. G. & CALATAYUD, J. M. "Multicommutation as a powerful new analytical tool". *Trac, Trends Anal. Chem.*, **21** (5): 366, 2002.
- KAMOGAWA, M. Y. & NOGUEIRA, A. R. A. "Flow system to gas capture from a nebulized solution". *Anal. Chim. Acta*, **479** (2): 167, 2003.

KRONKA, E. A. M.; REIS, B. F.; KORN, M. & BERGAMIN, H. "Multicommutation in flow analysis .5. Binary sampling for sequential spectrophotometric determination of ammonium and phosphate in plant digests". *Anal. Chim. Acta*, **334** (3): 287, 1996.

LAPA, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C. & SANTOS, J. L. M. "Fluorimetric determination of isoniazid by oxidation with cerium(IV) in a multicommutated flow system". *Anal. Chim. Acta*, **419** (1): 17, 2000.

LEDGARD, S. F. & STEELE, K. W. "Biological nitrogen fixation en mixed legume-grass pastures". *Plant Soil*, **141**:137, 1992.

LUCA, G. C. & REIS, B. F. "Simultaneous photometric determination of albumin and total protein in animal blood plasma employing a multicommutated flow system to carried out on line dilution and reagents solutions handling". *Spectrochim. Acta, Part A*, **60** (3): 579, 2004.

MALCOLMELAWES, D. J. & PASQUINI, C. "A novel-approach to non-segmented flow-analysis .3. Nitrate, nitrite and ammonium in waters". *J. Autom. Chem.*, **10** (4): 192, 1988.

MATSUMOTO, T.; YATAZAWA, M. & YAMAMOTO, Y. "Incorporation of <sup>15</sup>N into allantoin in nodulated soybean plants supplied with <sup>15</sup>N". *Plant Cell Physiol.*, **18**: 459-462, 1977.

McCLURE, P. R. & ISRAEL, D. W. "Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants". *Plant Physiol.*, **64** (3): 411, 1979.

MICHALOWSKI, J.; KOJLO, A.; TROJANOWICK, M.; SZOSTEK, B. & ZAGATTO, E. A. G. "Simultaneous determination of sucrose and reducing sugars using indirect flow-injection biamperometry". *Anal. Chim. Acta*, **271** (2): 239, 1993.

MIRANDA, C. E. S.; REIS, B.F.; BACCAN, N.; PACKER, A. P. & GINÉ, M. F. "Automated flow analysis system based on multicommutation for Cd, Ni and Pb on-line pre-concentration in a cationic exchange resin with determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry". *Anal. Chim. Acta* **453** (2): 30, 2002.

MOREDA-PINEIRO J.; CERVERA, M.L. & DE LA GUARDIA M. J. "Direct determination of arsenic in sea-water by continuous-flow hydride generation atomic fluorescence spectrometry". *Anal. Atom. Spectrom.*, **12** (12): 1377, 1997.

MÜLLER, L. "Taxonomia e Morfologia", IN: *A soja no Brasil*. MIYASAKA, S. & MEDINA, J. C. (Eds.): Campinas ITAL, 1981, p. 65-108.

MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K. & BISSELING, T. "Symbiotic nitrogen fixation". *Plant Cell*, **7**:869, 1995.

NEVES, M. C. P.; DIDONET, A. D.; DUQUE, F. F. & DÖBEREINER, J. "Rhizobium strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans". *J. Exp. Bot.*, **36**:

1179, 1985.

NOGUEIRA, A. R. A.; BRIENZA, S. M. B.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C. & ARAÚJO, A. N. J. "Flow injection system with multisite detection for spectrophotometric determination of calcium and magnesium in soil extracts and natural waters". *Agr. Food Chem.*, **44**: 165, 1996.

PAIM, A. P. S.; ALMEIDA, C. M. N. V.; REIS, B. F.; LAPA, R. A. S.; ZAGATTO, E. A. G. & LIMA, J. L. F. C. "Automatic potentiometric flow titration procedure for ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28** (6): 1221, 2002.

PASQUINI, C. & OLIVEIRA, W. A. "Monosegmented system for continuous-flow analysis - spectrophotometric determination of chromium(vi), ammonia, and phosphorus". *Anal. Chem.*, **57**, (13): 2575, 1985.

PATTERSON, T. G.; GLENISTER, R. & LARUE, T.A. "Simple estimate of ureides in soybean tissue". *Anal. Biochem.*, **119** (1): 90, 1982.

PEOPLES, M. B.; SUDIN, M. N.; HERRIDGE, D. F.; "Translocation of nitrogenous compounds in symbiotic and nitrate-fed amide-exporting legumes". *J. Exp. Bot.*, **38** (189):567, 1987.

REINBOTHE, H. & MOTHE, K. "Urea, ureides, and guanidines in plants". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **13**: 129, 1962.

REIS, B. & F. BERGAMIN, H. "Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo". *Quím. Nova*, **16**(6), 570, 1993.

REIS, B. F. "Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento". *Quim Nova*, **19**(1), 51, 1996.

REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C. & LAPA, R. A. "Multicommutation in flow-analysis .1. Binary sampling - concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests". *Anal. Chim. Acta*, **293** (1-2):129, 1994.

ROCHA, F. R. P. & REIS, B. F. "A flow system exploiting multicommutation for speciation of inorganic nitrogen in waters". *Anal. Chim. Acta*, **409** (1-2): 227, 2000

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, application and trends". *Anal. Chim. Acta*, **468**: 119, 2002.

RODENAS-TORRALBA, E.; VENTURA-GAYETE, J.; MORALES-RUBIO, A.; GARRIGUES, S. & DE LA GUARDIA, M. "Multicommutation Fourier transform infrared determination of benzene in gasoline". *Anal. Chim. Acta*, **512** (2): 215, 2004.

RUZICKA, J. & HANSEN, E. H. "Flow injection analyses .1. New concept of fast

continuous-flow analysis". *Anal. Chim. Acta*, **78** (1): 145,1975.

RUZICKA, J. & MARSHALL, G. D. "Sequential injection - a new concept for chemical. Sensors, process analysis and laboratory assays". *Anal. Chim. Acta*, **237** (2): 329, 1990.

RUZICKA, J. "The 2nd coming of flow-injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, **261** (1-2): 3, 1992.

RUZICKA, J. & HANSEN, E. R. *Flow Injection Analysis*, 2<sup>nd</sup> Ed. Nova Iorque, Wiley & Sons, 1988. p. 498.

SILVA, F. V., SOUZA, G. B. FERRAZ, L. F. M. & NOGUEIRA, A. R. A. "Determination of chloride in milk using sequential injection automated conductimetry". *Food Chem.*, **67** (3): 317, 1999.

SILVA, M. B.; BORGES, S. S.; PERDIGÃO, S. R. W. & REIS, B. F. "Green chemistry-sensitive analytical procedure for photometric determination of orthophosphate in river and tap water by use of a simple LED-based photometer". *Spectrosc. Lett.*, **42** (6-7): 356, 2009.

SINCLAIR, T. R. & SERRAJ, R.; "Legume nitrogen-fixation and drought". *Nature*, **378** (6555): 344, 1995

SIQUEIRA, J. O. & FRANCO, A. A. *Biotecnologia do Solo: Fundamentos e Perspectivas*. Brasília, Ministério da Educação e Cultura, 1988. p.191.

SIQUEIRA, J. O. & MOREIRA, F. M. S. "Fixação Biológica do Nitrogênio atmosférico". IN: *Microbiologia e bioquímica do solo*. SIQUEIRA, J. O. & MOREIRA, F. M. S. (Eds.). Lavras: UFLA, 2002. p.399-471.

SKEGGS, L. T. "An automatic method for colorimetric analysis". *Am. J. Clin. Pathol.*, **28** (3): 311, 1957.

SOUZA, I. G.; BERGAMIN FILHO, H.; KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V.; REIS, B. F. & GINÉ, M. F. "On-line electrolytic dissolution of alloys in flow-injection analysis .3. Multielemental analysis of stainless-steels by inductively coupled plasma atomic emission-spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, **245**: 211, 1991.

SOUZA, R. A. *A cultura da soja no Brasil: definindo parâmetros para avaliação de risco ambiental à microbiota do solo e à fixação biológica do nitrogênio*. Londrina, Programa de Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais – UEL, 2006. Dissertação de mestrado, 45 p.

SPRENT, J. I. "Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae". *Plant Cell Environ.*, **3**:35, 1980.

STREETER, J. G. "Allantoin and allantoic acid in tissues and stem exudate from field-grown soybean plants". *Plant Physiol.*, **63** (3): 478, 1979.



TAVARES, G. A.; GIOVANNINI, J. G.; OLIVEIRA, C. R. & BENDASSOLLI, J. A. "Alternativas para o tratamento de resíduos líquidos contendo fenol e avaliação da toxicidade dos efluentes empregando bulbos de cebola". *Analytica*, **4**, (22): 66, 2006.

TUMANG, C. D.; DE LUCA, G. C.; FERNANDES, R. N., REIS, B. F. & KRUG, F. J. "Multicommutation in flow analysis exploiting a multizone trapping approach: spectrophotometric determination of boron in plants". *Anal. Chim. Acta*, **374** (1): 53, 1998.

VANSTADEN, J. F. & TALJAARD, R. E. "Determination of sulphate in natural waters and industrial effluents by sequential injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, **331** (3): 271, 1996.

VARGAS, M. A. T. & HUNGRIA, M. "Fixação biológica do N<sub>2</sub> na cultura da soja". IN: *Biologia dos Solos de Cerrados*. VARGAS, M. A. T. & HUNGRIA, M. (Eds.). Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 297-360.

VIEIRA, J. A. *Estudo comparativo de sistemas de análises químicas em fluxo empregando FIA com multicomutação e amostragem binária, FIA com amostragem sanduiche, Fluxo monossegmentado e injeção seqüencial*. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Química - UNICAMP, 2001. Tese de doutorado.

VIEIRA, J. A.; RAIMUNDO JUNIOR, I. M.; REIS, B. F.; MONTENEGRO, M. C. B. & ARAUJO, A. N. "Monosegmented flow potentiometric titration for the determination of chloride in milk and wine". *J. Braz. Chem. Soc.*, **14** (2): 259, 2003.

VIEIRA, R. F.; VIEIRA, C. & VIEIRA, R. F. *Leguminosas graníferas*. Vicosa, UFV, 2001. 206 p.

VOGELS, S. G. D.; van der DRIFT, C. "Differential analysis of glyoxylate derivatives". *Anal. Biochem.*, **33**: 143, 1970.

YOUNG, E. G. & CONWAY, C. F. "On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction". *J. Biol. Chem.*, **142**: 839, 1942.

ZAGATTO, E. A. G.; ARRUDA, M. A. Z.; JACINTHO, A. O. & MATTOS, I. L. "Compensation of the Schlieren effect in flow-injection analysis by using dual-wavelength spectrophotometry". *Anal. Chim. Acta*, **234**: 153, 1990.

ZAGATTO, E. A. G.; KRUG, F. J.; BERGAMIN FILHO, H.; JORGENSEN, S. S. & REIS, B. F. "Merging zones in flow injection analysis .2. Determination of calcium, magnesium and potassium in plant material by continuous-flow injection atomic-absorption and flame emission spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, **104** (2): 279, 1979a.

ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F.; BERGAMIN FILHO, H. & KRUG, F. J. "Isothermal distillation in flow injection analysis - determination of total nitrogen in plant-material". *Anal. Chim. Acta*, **109**, (1): 45, 1979.

ZAITSU, K.; NAKAYAMA, M. & OHKURA, Y. "Sensitive flow-injection determination of L-lactate in human-blood with immobilized enzyme columns and fluorimetric detection". *Anal. Chim. Acta*, **201**, 351, 1987.

ZHENG, X. W. & ZHAN, Z. J. "Flow-injection chemiluminescence determination of isoniazid using on-line electrogenerated  $\text{BrO}^-$  as oxidant". *Analyst*, **124**, 763, 1999.