

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

DESENVOLVIMENTO DE INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS
ANALÍTICOS AUTOMÁTICOS COM DETECÇÃO
QUIMILUMINESCENTE E ESPECTROFOTOMÉTRICA

EDUARDO POGGI e BORGES*

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis

*bolsista da FAPESP

São Carlos - SP
2004

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

B732di

Borges, Eduardo Poggi e.

Desenvolvimento de instrumentos e procedimentos analíticos automáticos com detecção quimiluminescente e espectrofotométrica / Eduardo Poggi e Borges. -- São Carlos : UFSCar, 2005.

120 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Instrumentação. 2. Análise por injeção de fluxo. 3. Espectrofotometria. 4. Quimiluminescencia. I. Título.

CDD: 543.07 (20^a)

À minha esposa Cynthia
por todo apoio, amor e carinho.
e à minha filha Isabela,
que com o seu sorriso lindo
me enche de força e alegria.

Agradecimentos

- À amiga Paula Gervasio pela amizade, pelos conselhos, comentários críticos e por toda ajuda na escrita dos relatórios e desta tese.
- À Simone Vicente por todo companheirismo e compartilhamento de angústias e incertezas.
- À Beth Fernandes por toda ajuda durante meu doutorado, sem a qual dificilmente conseguiria respeitar algum prazo da PPGQ.
- Ao Prof. Boaventura pela amizade, orientação, discussões científicas e, principalmente, por permitir que eu conduzisse o meu trabalho de acordo com as minhas idéias. Também agradeço por todo conhecimento de eletrônica e instrumentação que me foi passado durante esses seis anos de convivência e, é claro, não posso deixar de agradecer pelo exemplo de vida e humildade.
- Ao Prof. Zagatto pelas discussões científicas e por todo apoio dado para que minha viagem ao exterior se concretizasse.
- Também aos Professores Chico Krug e Fernanda Giné que mesmo sem notar influenciaram na minha formação acadêmica.
- Ao Prof Dasgupta que também influenciou bastante minha formação, com o seu modo dinâmico e objetivo de fazer ciência.
- Aos técnicos do Laboratório de Química Analítica Henrique Bergamin Filho, Sheila, Fátima, Tatinha e Valdemir pelo apoio e ensinamentos práticos. Também ao Zezinho pela organização, pelas piadas e churrascos.
- Aos amigos de São Carlos Nilson e Fernando que ainda estão devendo aquela partida de boliche prometida antes de final do meu mestrado.
- A Cris Tumang por todos os conselhos desde os tempos de mestrado.
- Aos amigos do XIQSC.
- A todos os amigos do CENA e da UFSCar.
- Ao laboratório de Química Analítica Henrique Bergamin Filho do Cena pelo concessão da infraestrutura para a realização dos experimentos e ao Programa de Pós-Graduação em Química do DQ-UFSCar pela formação acadêmica.
- Aos meus pais e familiares, por todo apoio e incentivo.
- À FAPESP pela bolsa de doutorado e à CAPES pela bolsa sanduíche
- À Deus

Apresentação

Neste trabalho são propostos procedimentos analíticos controlados por computadores para a determinação de *L*-alanina, em linha de síntese, e de brometo em amostras deste aminoácido. Para isso, estão descritas as etapas desenvolvidas para as construções dos detectores empregados e a importância dos componentes eletrônicos necessários para a implementação de sistemas analíticos controlados por computador, em especial aqueles que empregam a análise por injeção em fluxo para o gerenciamento de soluções.

A tese é apresentada em capítulos, ordenados por assuntos e divididos em seções e sub-seções. No capítulo introdutório, é apresentada a justificativa seguida pelos objetivos principais deste trabalho. No capítulo 2, é apresentada uma breve discussão sobre o controle de sistemas analíticos em fluxo controlados por computador, bem como os circuitos eletrônicos e componentes necessários para sua implementação.

Nos capítulos 3 e 4, são propostos e caracterizados detectores de baixo custo para utilização em sistemas de análises em fluxo. No capítulo 3, é proposto um dispositivo para detecção de quimiluminescência e, no capítulo 4, é proposto um fotômetro de LED acoplado a um tubo poroso o qual foi utilizado para determinação de NO₂ na atmosfera. Este último trabalho foi realizado sob a supervisão do Prof. Purnendu. K. Dasgupta do Departamento de Química e Bioquímica da Texas Tech University, com bolsa do Programa de Doutorando no País com Estágio no Exterior (PDEE) da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

No capítulo 5, é proposto um sistema para determinação de *L*-alanina em linha de produção empregando reação enzimática e detecção quimiluminescente.

No capítulo 6, é proposto um sistema para determinação de brometo em amostras de alanina.

Para a finalização, no capítulo 7, para o direcionamento de novas pesquisas, são apresentadas a conclusão geral e as perspectivas futuras na área e, no capítulo 8, são apresentadas as referências bibliográficas utilizadas para a redação deste, e que estão devidamente citadas no decorrer da composição do trabalho.

Lista de Tabelas

| | |
|---|-----|
| Tabela 3.1 - Tabela com os desvios padrão de 70 leituras da linha de base obtidos com configuração eletrônica da Figura 3.7. | 28 |
| Tabela 3.2 - Características analítica do dispositivo de detecção obtidos com configuração eletrônica da Figura 3.7. | 29 |
| Tabela 3.3 - Características analíticas do dispositivo proposto empregando 1 ou 2 fotodiodos. | 31 |
| Tabela 3.4 - Comparação das características analítica do dispositivo de detecção descrito na Figura 3.7 (dispositivo 1) com a configuração eletrônica da Figura 3.8 (dispositivo 2). | 32 |
| Tabela 4.1 - Características analíticas em função do tempo de análise. | 48 |
| Tabela 4.2 - Curvas analíticas. | 52 |
| Tabela 5.1 - Atividade relativa da enzima L-AAOX para diferentes L-aminoácidos, usando L-fenilalanina como referência. | 61 |
| Tabela 5.2 - Resultado dos limites de detecção de peróxido de hidrogênio obtidos variando a concentração de luminol e hexacianoferrato de potássio. | 68 |
| Tabela 5.3 - Resultados obtidos. | 80 |
| Tabela 6.1 - Características analíticas em função do volume de amostra. | 100 |
| Tabela 6.2 - Teste de recuperação de brometo com soluções de referência preparadas em 0,1 % de alanina. | 102 |
| Tabela 6.3 - Teste de recuperação de brometo com soluções de referência preparadas em H ₂ O. | 102 |
| Tabela 6.4 - Tempo para que cada etapa fosse realizada no procedimento de determinação de brometo. | 103 |
| Tabela 6.5 - Concentração de brometo encontrado nas amostras. | 104 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 2.1 - Diagrama de blocos de um sistema de análises em fluxo controlado por um microcomputador..... | 5 |
| Figura 2.2 - Representação do circuito eletrônico para compatibilização de diferença de potencial e de corrente para acionamento dos dispositivos de comutação..... | 6 |
| Figura 2.3 - Esquema simplificado de um injetor comutador controlado por um computador..... | 7 |
| Figura 2.4 - Representação esquemática de uma válvula solenóide de três vias.. | 8 |
| Figura 3.1 - Esquema simplificado da reação quimiluminescente do luminol- H_2O_2 | 10 |
| Figura 3.2 - Esquema simplificado da reação quimiluminescente do sistema peróxi-oxalato..... | 13 |
| Figura 3.3 - Esquema simplificado da reação de quimiluminescência do $Ru(bipy)_3^{2+}$ | 14 |
| Figura 3.4 - Representação da cela de fluxo associada aos fotodetectores..... | 20 |
| Figura 3.5 - Esquema da configuração eletrônica utilizando o operacional LM308 para amplificação do sinal gerado pelos fotodiodos..... | 21 |
| Figura 3.6 - Esquema da configuração eletrônica utilizando o operacional AD524BD para amplificação do sinal gerado pelos fotodiodos..... | 22 |
| Figura 3.7 - Esquema da configuração eletrônica utilizando o operacional LM308 acoplado ao operacional AD524BD para amplificação do sinal gerado pelos fotodiodos..... | 22 |
| Figura 3.8 - Esquema da configuração eletrônica utilizando o operacional CA3140 para amplificação do sinal gerado pelos fotodiodos..... | 23 |
| Figura 3.9 - Diagrama de fluxo do sistema utilizado para avaliação do detector de quimiluminescência..... | 24 |
| Figura 3.10 - Sinais transientes obtidos com soluções de referência de H_2O_2 , utilizando configuração eletrônica representada na Figura 3.6.. | 28 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.11 - Sinais transientes obtidos para soluções de referência de H ₂ O ₂ , utilizando configuração eletrônica representada na Figura 3.7. | 29 |
| Figura 3.12 - Sinais transientes obtidos com o sistema modelo empregando 1 (I e II) ou 2 fotodetectores (III)..... | 32 |
| Figura 4.1 - Sistema de detecção de NO ₂ . a) esquema de montagem. b) foto do sistema montado. | 38 |
| Figura 4.2 - Conversor 12 V para 4,2 V..... | 39 |
| Figura 4.3 - Interface de potência utilizando transistor de efeito de campo | 40 |
| Figura 4.4 - Circuito eletrônico de amplificação do sinal gerado pelo fotodiodo. | 41 |
| Figura 4.5 - Sistema para geração de padrões gasosos de NO ₂ | 42 |
| Figura 4.6 - Gráfico da determinação da massa do tubo de permeação em função do tempo. | 44 |
| Figura 4.7 - Espectros..... | 45 |
| Figura 4.8 - Sinal transiente de soluções de nitrito de sódio utilizando o espectrofotômetro LED desenvolvido..... | 46 |
| Figura 4.9 - Registro típico dos sinais transientes obtidos com padrões gasosos de NO ₂ . Tempo de análise = 15 min. LED de referência = 840 nm. | 48 |
| Figura 4.10 - Registro típico dos sinais transientes obtidos com padrões gasosos de NO ₂ . Tempo de análise = 20 min. LED de referência = 840 nm. | 49 |
| Figura 4.11 - Registro típico dos sinais transientes para repetidas determinações do branco e 5 ppbv de NO ₂ . Tempo de análise = 15 min. LED de referência = 840 nm. | 49 |
| Figura 4.12 - Sinais obtidos com branco, 5, 10 e 20 ppbv NO ₂ | 51 |
| Figura 4.13 - Registro típico dos sinais transientes obtidos com padrões gasosos de NO ₂ . Tempo de análise = 10 min. LED de referência = 410 nm. | 52 |
| Figura 4.14 - Registro típico dos sinais transientes para repetidas determinações do branco e 5 ppbv de NO ₂ . Tempo de análise = 10 min. LED de referência = 410 nm. | 53 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.15 - Registro típico dos sinais transientes para repetidas determinações de 5 ppbv de NO ₂ . Tempo de análise = 10 min a cada 20 min de intervalo. LED de referência = 410 nm..... | 53 |
| Figura 5.1 - Esquema simplificado da reação entre aminoácido e Ru(bipy) ₃ ²⁺ .. | 58 |
| Figura 5.2 - Esquema simplificado da oxidação de um aminoácido catalisada pela AAOX..... | 60 |
| Figura 5.3 - Diagrama de fluxo do módulo de análise utilizado para estudos das variáveis experimentais para a determinação de L-alanina por medidas de quimiluminescência..... | 66 |
| Figura 5.4 - Diagrama de fluxos do sistema para determinação de L-alanina por medidas de quimiluminescência utilizando etapa de diluição em linha. | 67 |
| Figura 5.5 - Estudo da vazão da solução transportadora..... | 69 |
| Figura 5.6 - Estudo do volume da alça de amostragem. | 70 |
| Figura 5.7 - Estudo do efeito do pH da solução transportadora..... | 71 |
| Figura 5.8. Estudo do efeito da concentração de fosfato da solução transportadora..... | 72 |
| Figura 5.9 - Estudo do efeito da força iônica na reação enzimática. | 73 |
| Figura 5.10 - Estudo do efeito da concentração de (NH ₄) ₂ CO ₃ | 74 |
| Figura 5.11 - Estudo do efeito da concentração do ácido bromopropiônico. | 74 |
| Figura 5.12 - Estudo do efeito da concentração do ácido bromopropiônico utilizando coluna com resina aniônica forte no sistema de fluxo. | 75 |
| Figura 5.13. Estudo do efeito da concentração de diferentes sais no sinal analítico utilizando coluna com resina aniônica forte no sistema de fluxos..... | 76 |
| Figura 5.14. Registro dos sinais transientes..... | 77 |
| Figura 5.15 - Sinais transientes das soluções de referências e das amostras de L-alanina..... | 79 |
| Figura 6.1 - Diagrama de fluxos proposto para determinação automática de Br ⁻ por quimiluminescência. | 89 |

| | |
|--|-----|
| Figura 6.2 - Diagrama de fluxos do sistema para determinação de brometo por medidas de quimiluminescência utilizando etapa de pré-concentração. | 91 |
| Figura 6.3 - Comparação do sinal transiente obtido com a solução aceptora estática (curva I) com o sinal obtido com a solução aceptora pulsada (curva II) durante o período de enriquecimento..... | 94 |
| Figura 6.4 - Sinais transientes obtidos com o procedimento proposto para determinação de Br ⁻ empregando o permanganato de potássio como oxidante.. | 95 |
| Figura 6.5 - Estudo da concentração da solução de cloramina-T. | 97 |
| Figura 6.6 - Estudo da concentração da solução de luminol..... | 98 |
| Figura 6.7 - Estudo do comprimento da bobina de reação..... | 98 |
| Figura 6.8 - Estudo do tempo de limpeza. | 101 |
| Figura 6.9 - Sinais transientes obtidos com o sistema proposto para determinação de Br ⁻ | 104 |

Resumo

DESENVOLVIMENTO DE INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS AUTOMÁTICOS COM DETECÇÃO QUIMILUMINESCENTE E ESPECTROFOTOMÉTRICA

No presente trabalho são apresentados sistemas de análises em fluxo projetados para o controle do processo de síntese de *L*-alanina e para a determinação de brometo presente como contaminante no aminoácido. Os sistemas analíticos foram controlados por um computador, de forma que todas as etapas do procedimento de análise eram realizadas automaticamente sem a interferência do operador. Como os procedimentos foram propostos utilizando detecção quimiluminescente, inicialmente foi desenvolvido um luminômetro utilizando dois fotodiodos e uma cela de fluxo construída em acrílico. Em relação ao procedimento para determinação de *L*-alanina, foi utilizada a enzima *L*-aminoácido oxidase. Neste sistema, a amostra era inserida em um fluxo transportador e em seguida passava por uma coluna contendo a enzima. O peróxido de hidrogênio, formado na reação de oxidação do aminoácido pela enzima, foi determinado pela reação de quimiluminescência do luminol catalisada pelo hexacianoferrato de potássio. As espécies interferentes na reação enzimática foram eliminadas com o uso de uma resina aniônica forte. Como características analíticas pode-se citar uma faixa de resposta linear entre 0,5 e 25,0 mmol L⁻¹ e um limite de detecção de 0,08 mmol L⁻¹ de *L*-alanina. Com respeito ao sistema para determinação de brometo por quimiluminescência, foi utilizado o reagente cloramina-T para oxidação deste íon a Br₂ e posterior reação com o luminol. Para minimizar a interferência causada pela alanina, foi utilizada uma coluna preenchida com resina aniônica, que tinha a dupla função: concentrar os íons brometo e eliminar a alanina. Como características analíticas obteve-se uma resposta linear na faixa de concentração entre 0,010 e 1,000 mg L⁻¹ ($r=0,999$) e um limite de detecção estimado em 1 µg L⁻¹. Ainda neste trabalho, é relatado o desenvolvimento de um micro-dispositivo de fluxo de baixo custo para a determinação de NO₂ na atmosfera. Para a detecção do analito foi explorada a reação colorimétrica de Griss-Saltzman. O NO₂ foi coletado do ar atmosférico através de um microtubo de membrana porosa que devido à capacidade de transmitir luz, foi também utilizado como cela de fluxo. Para o monitoramento do produto colorido da reação, foi construído um espectrofotômetro utilizando LEDs (Light Emitting Diode) e um fotodiodo. Com a instrumentação proposta, obteve-se um baixo limite de detecção para NO₂ de 0,5 ppbv, um baixo consumo de reagente (100 µL por determinação) e um desvio padrão relativo de 5 % para amostras típicas de 5,0 ppbv. Outra característica analítica favorável deste sistema foi a possibilidade de operação contínua durante longos períodos de tempo (pelo menos 168 horas) sem a necessidade de calibração.

Abstract

DEVELOPMENT OF A DEVICE AND AUTOMATIC ANALYTICAL PROCEDURES EXPLOITING CHEMILUMINESCENT AND SPECTROPHOTOMETRIC DETECTION

In the present work is described computer-controlled flow systems designed for process control of *L*-alanine synthesis and for bromide determination in this amino acid, presented as a contaminant species. Since the analytical systems were computer controlled, all the procedures steps, such as, stopped flow, dilution, pH adjustment, analyte concentration and sample clean up, were performed without operator assistance. In order to carry out chemiluminescent reaction, a simple and low cost device (ca. US\$ 150) that comprises two photodiodes fixed in lab-made Perspex flow cell was proposed. Regarding *L*-alanina determination, it was exploited the *L*-amino acid oxidize enzyme reaction. In this system, the sample was injected into a carrier stream, passing through a column packed with this immobilized enzyme. The product of the amino acid oxidation, hydrogen peroxide, was determined by the chemiluminescent reaction with luminol. The interfering species of the enzymatic reaction was suppressed by coupling in the flow system a column packed with a strong anionic resin. A linear concentration range between 0.5 and 25 mmol L⁻¹ and a 0.08 mmol L⁻¹ limit of detection were some of the analytical characteristics of this system. Regarding the chemiluminescent bromide determination, the procedure was based on bromide oxidation by chloramine-T followed by the reaction of the formed bromine with luminol. In order to minimize the interference of alanina in the chemiluminescent reaction, a column packed with a strong anionic resin was used for analyte concentration and sample clean up. The analytical features obtained were a linear range between 0.010 and 1.000 mg L⁻¹ ($r=0.999$) and a limit of detection of 1 μg L⁻¹ of Br⁻. Also in this work is reported the development and the characterization of a low-cost device for NO₂ determination in atmosphere exploiting the Griess-Slatzman reaction. The NO₂ was sampled from the atmosphere by a porous membrane tube, which was also used as flow cell. To monitor the colored-forming reaction, it was constructed a dual-wavelength LED-based spectrophotometer. With the proposed device it was obtained a 0.5 ppbv limit of detection of NO₂, a low reagent consumption (100 μL per determination), 5 % relative standard deviation for 5 ppbv NO₂ sample concentration and long term stability, at least 168 hours without requiring calibration procedure.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS | 1 |
| 1.1. Objetivos | 2 |
| CAPÍTULO 2. SISTEMAS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO | 4 |
| CAPÍTULO 3. DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO DE BAIXO CUSTO PARA MEDIDAS POR QUIMILUMINESCÊNCIA | 9 |
| 3.1. Introdução..... | 9 |
| 3.1.1. Instrumentação para detecção de quimiluminescência | 15 |
| 3.2. Parte Experimental | 19 |
| 3.2.1. Equipamentos | 19 |
| 3.2.2. Soluções | 19 |
| 3.2.3. Montagem do dispositivo de detecção | 20 |
| 3.2.4. Procedimento experimental..... | 23 |
| 3.3. Resultados e Discussões | 24 |
| 3.3.1. Dispositivo utilizando LM308 | 26 |
| 3.3.2. Dispositivo utilizando AD524BD | 27 |
| 3.3.3. Dispositivo utilizando LM308 acoplado ao AD524BD..... | 28 |
| 3.3.4. Dispositivo utilizando CA3140..... | 30 |
| 3.4. Conclusões..... | 32 |
| CAPÍTULO 4. DESENVOLVIMENTO DE INSTRUMENTO COMPACTO, AUTOMÁTICO E DE BAIXO CUSTO PARA DETERMINAÇÃO DE DIÓXIDO DE NITROGÊNIO NA ATMOSFERA EXPLORANDO A REAÇÃO DE GRIESS-SALTZMAN | 34 |
| 4.1. Introdução..... | 34 |
| 4.2. Parte Experimental | 36 |
| 4.2.1. Construção do Coletor/detector de NO ₂ | 36 |
| 4.2.2. Circuitos eletrônicos..... | 39 |
| 4.2.3. Geração dos padrões gasosos de NO ₂ | 41 |
| 4.2.4. Reagentes e soluções..... | 42 |
| 4.2.5. Procedimento experimental..... | 43 |
| 4.3. Resultados e Discussões | 43 |
| 4.3.1. Preparação do tubo de permeação | 43 |
| 4.3.2. Escolha da fonte de radiação..... | 44 |
| 4.3.3. Avaliação do espectrofotômetro de LED..... | 46 |
| 4.3.4. Determinação de NO ₂ | 46 |

| | | |
|------|-----------------|----|
| 4.4. | Conclusões..... | 54 |
|------|-----------------|----|

CAPÍTULO 5. DETERMINAÇÃO DE L-ALANINA EM LINHA DE SÍNTESE UTILIZANDO REAÇÃO ENZIMÁTICA E DETECÇÃO QUIMILUMINESCENTE 55

| | | |
|------|-----------------|----|
| 5.1. | Introdução..... | 55 |
|------|-----------------|----|

| | | |
|------|--------------------------|----|
| 5.2. | Parte Experimental | 63 |
|------|--------------------------|----|

| | | |
|--------|--------------------|----|
| 5.2.1. | Equipamentos | 63 |
|--------|--------------------|----|

| | | |
|--------|----------------|----|
| 5.2.2. | Soluções | 63 |
|--------|----------------|----|

| | | |
|--------|---|----|
| 5.2.3. | Procedimento para imobilização da enzima <i>L</i> -aminoacido oxidase. | 64 |
|--------|---|----|

| | | |
|--------|--|----|
| 5.2.4. | Módulo de análise e Procedimento | 65 |
|--------|--|----|

| | | |
|--------|--------------------------|----|
| 5.2.5. | Síntese de alanina | 67 |
|--------|--------------------------|----|

| | | |
|------|-------------------------------|----|
| 5.3. | Resultados e Discussões | 68 |
|------|-------------------------------|----|

| | | |
|----------|---|----|
| 5.3.1.1. | Estudo das espécies concomitantes | 73 |
|----------|---|----|

| | | |
|----------|--|----|
| 5.3.1.2. | Preparo de amostra no sistema de análises em fluxo. | 76 |
|----------|--|----|

| | | |
|----------|-------------------------------------|----|
| 5.3.1.3. | Aplicação para amostras reais | 78 |
|----------|-------------------------------------|----|

| | | |
|------|-----------------|----|
| 5.4. | Conclusões..... | 81 |
|------|-----------------|----|

CAPÍTULO 6. DETERMINAÇÃO DE ÍONS BROMETO EM AMOSTRAS DE L-ALANINA 82

| | | |
|------|-----------------|----|
| 6.1. | Introdução..... | 82 |
|------|-----------------|----|

| | | |
|------|--------------------------|----|
| 6.2. | Parte Experimental | 87 |
|------|--------------------------|----|

| | | |
|--------|--------------------|----|
| 6.2.1. | Equipamentos | 87 |
|--------|--------------------|----|

| | | |
|--------|----------------|----|
| 6.2.2. | Soluções | 87 |
|--------|----------------|----|

| | | |
|--------|--|----|
| 6.2.3. | Procedimento experimental e diagrama de fluxos | 88 |
|--------|--|----|

| | | |
|----------|--|----|
| 6.2.3.1. | Sistema utilizando permanganato de potássio e câmara de difusão gasosa. | 88 |
|----------|--|----|

| | | |
|----------|-------------------------------------|----|
| 6.2.3.2. | Sistema utilizando Cloramina-T..... | 90 |
|----------|-------------------------------------|----|

| | | |
|------|-------------------------------|----|
| 6.3. | Resultados e Discussões | 91 |
|------|-------------------------------|----|

| | | |
|--------|---|----|
| 6.3.1. | Oxidação com permanganato de potássio | 91 |
|--------|---|----|

| | | |
|--------|---------------------------------|----|
| 6.3.2. | Oxidação pela cloramina-T | 95 |
|--------|---------------------------------|----|

| | | |
|--------|---|-----|
| 6.3.3. | Determinação de Brometo em amostras reais | 102 |
|--------|---|-----|

| | | |
|------|-----------------|-----|
| 6.4. | Conclusões..... | 104 |
|------|-----------------|-----|

CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....106

CAPÍTULO 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS108

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

Aminoácidos são unidades estruturais a partir das quais as proteínas são sintetizadas. Também servem de precursores de várias substâncias não protéicas, que desempenham papel fundamental para a manutenção da vida. Ao todo, são 20 α -aminoácidos comumente encontrados nas proteínas, também denominados de aminoácidos-padrão. Estas espécies têm em comum pelo menos um grupamento α -carboxílico e um α -aminogruppo, sendo diferenciadas entre si pela estrutura das cadeias laterais ligada ao carbono α .¹

Os vegetais são capazes de produzir todos os aminoácidos essenciais para a síntese de suas proteínas, porém, o homem e outros mamíferos são capazes de sintetizar apenas alguns destes aminoácidos essenciais. As proteínas contidas nos alimentos são a principal fonte de obtenção dessas substâncias.² Durante a digestão, as proteínas são quebradas nos aminoácidos constituintes antes da absorção pelo organismo. Proteínas animal e vegetal variam na quantidade e nos tipos de aminoácidos que as constituem.³

Para o estudo de síntese ou degradação de proteínas, uma poderosa ferramenta é a quantificação de um aminoácido marcado no sangue ou nos tecidos.⁴ Para isso, a técnica isotópica consiste, basicamente, em se fornecer ao organismo em estudo um composto químico no qual a razão isotópica $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ no aminoácido é diferente da natural, e em seguida avaliar a distribuição do isótopo no sistema em estudo. Aminoácidos com elevado enriquecimento no isótopo ^{15}N não são produzidos no Brasil, ou nos demais países da América do Sul, assim, para implementação de pesquisas envolvendo estes compostos, é necessária a sua importação, sendo que o seu alto custo dificulta o uso em grande escala.⁵

Pesquisadores do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Laboratório de Isótopos Estáveis) estão implantando uma linha de síntese de aminoácidos

com alto grau de enriquecimento em ^{15}N , produzidos a partir de $^{15}\text{NH}_3$, os quais serão utilizados em pesquisas nas áreas biomédicas e agrônomicas. Para a síntese da alanina utiliza-se como um dos reagentes, o ácido bromopropiônico. Assim, além do aminoácido, é obtido o íon brometo como produto da reação. Depois da etapa de purificação da alanina, o brometo pode ser detectado em baixas concentrações, como contaminante. Em mamíferos, o brometo atua no sistema nervoso central causando depressão e perda de memória, além de irritação gastrointestinal e lesões de pele. Portanto, no caso de uso deste aminoácido para fins de consumo humano ou animal, é de grande importância a disponibilidade de procedimentos analíticos, preferencialmente automáticos ou mecanizados para controlar a qualidade da matéria prima (grau de pureza), monitorar a linha de produção em várias etapas do processo, bem como determinar a quantidade de brometo presente no aminoácido.

1.1.Objetivos

Este Trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de procedimentos analíticos automáticos para a determinação *L*-alanina na linha de produção, visando facilitar o controle do processo de síntese desse aminoácido. Para a determinação desta espécie química avaliou-se a possibilidade da utilização de enzimas, por sua alta seletividade. Esses métodos, na maioria das vezes, são baseados em enzimas específicas, que resultam em um produto que pode ser facilmente determinado. No caso específico foi estudada a *L*-Aminoácido oxidase e o peróxido de hidrogênio formado na reação de oxidação do aminoácido pela enzima, o qual foi determinado empregando a reação de quimiluminescência do luminol catalisada pelo hexacianoferrato de potássio.

Devido à necessidade de quantificação dos subprodutos da síntese, pois estes afetam a qualidade do produto final, também foi desenvolvido um procedimento automático para a determinação de íons brometo com detecção quimiluminescente, de forma que fosse quantificado com o detector

desenvolvido. Considerando que o íon brometo não participa diretamente em reações de quimiluminescência, foram estudadas diversas formas de “ativação” deste íon para reação de quimiluminescência.

O emprego de reações quimiluminescentes como meio de detecção foi escolhido em vista da simplicidade da instrumentação necessária para sua implementação, aliada a alta sensibilidade obtida por estas reações. Portanto, como parte do projeto, o trabalho também teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de um detector de baixo custo para quantificação da quimiluminescência.

Ainda na linha de pesquisa que envolve o projeto e desenvolvimento de detectores para uso em sistemas de análises em fluxo, uma etapa do trabalho teve como objetivo a construção de um detector fotométrico de baixo custo para medidas de absorvância a duplo-feixe.

CAPÍTULO 2. SISTEMAS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO

Para a implementação dos procedimentos analíticos automáticos, foram utilizados sistema de análises por injeção em fluxo. A análise por injeção em fluxo foi proposta em 1975⁶ e tem como processo fundamental à introdução da amostra líquida em um fluido não segmentado, o qual a transporta em direção ao detector. Ao longo do percurso analítico, a amostra participa das etapas de tratamento referentes à determinação específica, tais como adição de reagentes, separação/concentração, diluição *etc.*⁷ A passagem da amostra processada pelo detector resulta em um sinal transiente proporcional ao teor da espécie química a ser determinada. Os sistemas de análises por injeção em fluxo possibilitam a automação de vários procedimentos analíticos tais como extração líquido-líquido, separação em fase sólida, difusão gasosa, diálise, adição de padrão, geração de hidretos, *etc.*⁸ A aceitação destes sistemas como ferramenta analítica é comprovada pelo número crescente de artigos científicos, livros e teses acadêmicas publicadas, congressos e reuniões científicas, e pela disponibilidade comercial de diversos analisadores produzidos por inúmeras companhias.⁹

Segundo FERREIRA e ROSSI,¹⁰ após uma extensa revisão bibliográfica sobre aplicações de reação por quimiluminescência, consideraram a análise por injeção em fluxo o processo mais utilizado para o monitoramento dessas reações em química analítica.

Com a popularização do microcomputador, seu uso se tornou mais comum em sistemas analíticos, substituindo complexos sistemas eletrônicos. Sua utilização se faz necessária, principalmente em procedimentos onde o controle exato do tempo é extremamente necessário para garantir uma boa repetibilidade das medidas, como é o caso da análise por injeção seqüencial^{11,12} e a multicomutação.¹³ Outra vantagem de sistemas analíticos controlados por computador, é a economia de reagente que se obtém quando se utilizam

válvulas, como por exemplo, válvulas solenóides de três vias. Pode-se programar o computador para que a introdução da solução de reagente no percurso analítico somente ocorra no momento em que este é necessário, evitando, assim, o desperdício.

Em consideração ao exposto acima, os procedimentos analíticos propostos neste trabalho, foram desenvolvidos utilizando um microcomputador para controle de todas as etapas do procedimento analítico, bem como para efetuar a aquisição de dados. Com a intenção de automatizar o procedimento e diminuir o consumo de reagente, os sistemas analíticos foram implementados empregando um injetor automático e válvulas solenóides. Na Figura 2.1 é apresentado um diagrama de blocos representando esquematicamente a estrutura básica de um sistema de análises em fluxo controlado por um microcomputador.

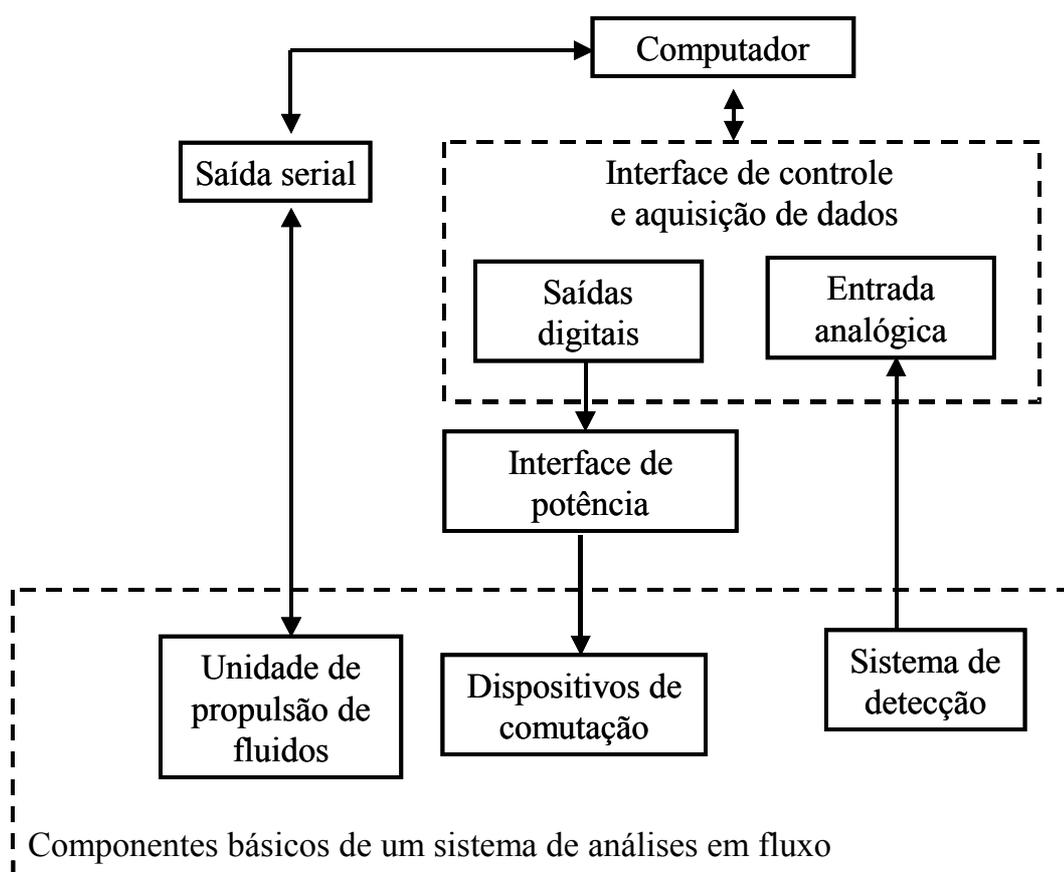


Figura 2.1 - Diagrama de blocos de um sistema de análises em fluxo controlado por um microcomputador. Setas indicam o sentido da comunicação.

Para controle do procedimento analítico e aquisição de dados, utilizou-se um computador PC compatível, Pentium III equipado com uma interface eletrônica PCL-711S (American Advantech Corp.), a qual possui duas portas de saída e duas de entrada de 8 bits cada; oito entradas analógicas multiplexadas e conversores analógico/digital e digital/analógico com resolução de 12 bits e tempo de conversão de 25 μ s. Como os sinais da interface são gerados em padrão TTL (do inglês Transistor-transistor logic), ou seja, com baixa intensidade de corrente e diferença de potencial de 5 V, foi necessário o uso de uma outra interface amplificadora de corrente, para o acionamento dos dispositivos de comutação, que exigem maiores intensidades de corrente, a qual é descrita a seguir.

Para compatibilizar a diferença de potencial e corrente necessária para acionamento dos dispositivos de comutação, as válvulas solenóides e o injetor automático foi construída uma interface de potência mostrada na Figura 2.2. Faz parte da interface um circuito integrado ULN2803, que possui internamente um arranjo de transistores do tipo npn. As entradas deste circuito, base dos transistores, foram ligadas na saída digital da interface PCL-711S e nas saídas do ULN2803, coletores, foram ligados aos comutadores. É interessante salientar que esta interface é de uso comum, portanto, também pode ser usada na saída da porta paralela dos computadores, onde geralmente são ligadas as impressoras.

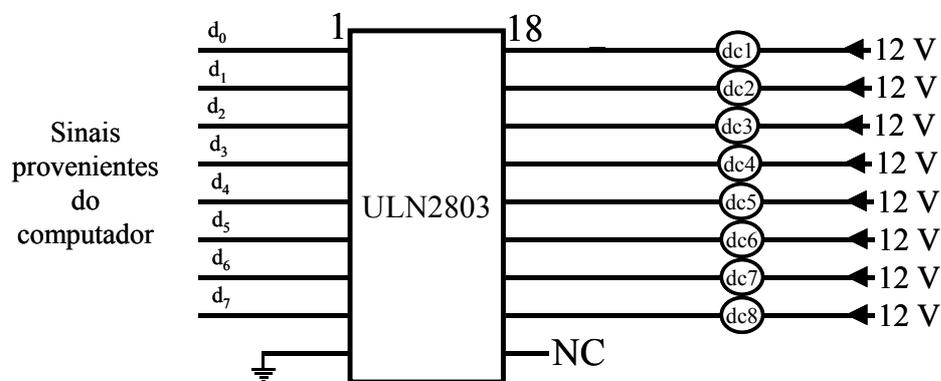


Figura 2.2 - Representação do circuito eletrônico para compatibilização de diferença de potencial e de corrente para acionamento dos dispositivos de comutação. dcn = dispositivos de comutação; NC = sem conexão.

O injetor controlado por computador foi construído de acordo com MARTELLI *et al.*¹⁴ O injetor empregava duas solenóides para efetuar o processo de comutação. As solenóides foram ligadas à interface de potência e com o comando do computador uma corrente fluía através delas, gerando um campo magnético que deslocava uma haste metálica, a qual movimentava a parte central do injetor da posição de amostragem para a posição de inserção de amostra e vice-versa. Um esquema simplificado do injetor é apresentado na Figura 2.3.

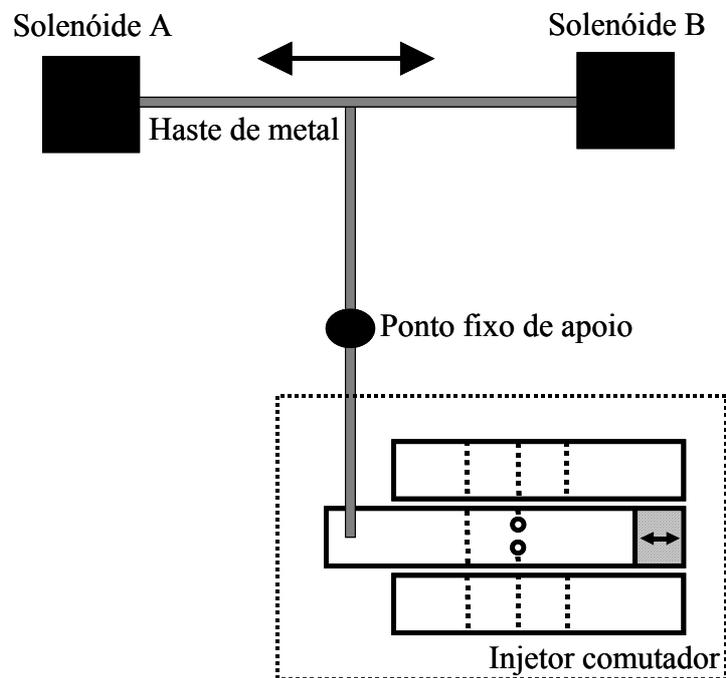


Figura 2.3 - Esquema simplificado de um injetor comutador controlado por um computador.

Outro dispositivo de comutação utilizado foi a válvula solenóide de três vias, NResearch, modelo 161TO31. Essa válvula, representada na Figura 2.4, possui uma entrada comum e duas saídas. A primeira saída (linha cheia), permite a passagem de solução quando a válvula se encontra desligada. A segunda saída (linha tracejada) permite a passagem de solução quando uma diferença de potencial é aplicada na válvula (no caso do modelo utilizado, 12V).

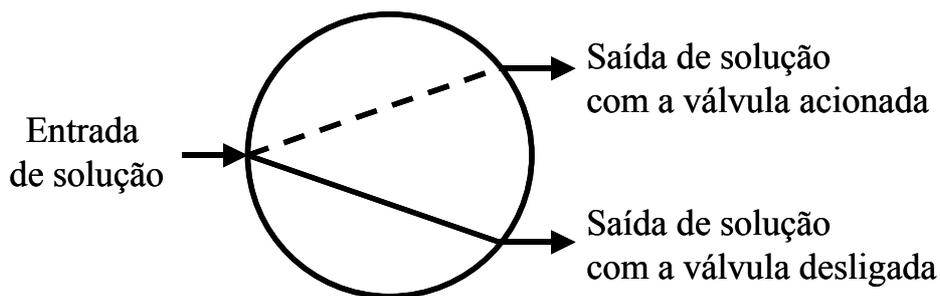


Figura 2.4 - Representação esquemática de uma válvula solenóide de três vias.

Ainda, para a montagem dos módulos de análises foram utilizados uma bomba peristáltica Ismatec, modelo Ipc 8, provida de tubos de Tygon com diferentes diâmetros interno para a propulsão das soluções e tubos de polietileno (0,8 mm d.i.) para confecção das linhas de transmissão, alças de amostragem e bobinas de reação.

O detector dos sistemas de análises em fluxo foram desenvolvidos como parte do projeto de doutorado e descrito em detalhes nos capítulos 3 e 4. Os mesmos foram constituídos de um fotodiodo acoplado a um sistema de amplificação, que também compatibilizava a impedância do sinal de saída do detector com a impedância de entrada do converso analógico/digital da interface PCL-711S.

Finalmente, para o controle dos dispositivos de comutação e aquisição de dados, foi desenvolvido um programa em linguagem VisiDaq 3.11. Esta linguagem de computador foi desenvolvida pelo próprio fabricante de interface eletrônica e por ser programável por objeto, permitia de forma fácil a elaboração de rotinas para o desenvolvimento do procedimento analítico.

CAPÍTULO 3. DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO DE BAIXO CUSTO PARA MEDIDAS POR QUIMILUMINESCÊNCIA

3.1. Introdução

A quimiluminescência é conhecida desde o final do século XIX, e pode ser definida como: produção de radiação eletromagnética por meio de reações químicas, em uma faixa do espectro que pode se estender do ultravioleta ao infravermelho.¹⁵ Diferentemente da maioria das reações que liberam apenas calor, essas reações geram produtos eletronicamente excitados, que emitem luz quando retornam ao estado fundamental. Tais reações são mais comuns em sistemas biológicos, onde este fenômeno é denominado de bioluminescência.¹⁶

As reações quimiluminescentes podem ocorrer em fase sólida, líquida ou gasosa. Esta última tem sido aplicada para determinação de poluentes inorgânicos na atmosfera, explorando reações com compostos de enxofre e de fósforo em chama rica em hidrogênio, ou ainda, reações de óxidos de nitrogênio com ozônio.¹⁶ Atualmente, as principais aplicações da quimiluminescência como meio de detecção em procedimentos analíticos, utilizam reações em fase líquida em meio aquoso e não-aquoso em matrizes de interesse em áreas como biomédica, toxicológica e ambiental.^{17,18}

A quimiluminescência destaca-se dos demais modos de detecção devido à ampla faixa de resposta linear em função da concentração. A sensibilidade, em geral, é alta devido a ausência de fonte de radiação externa, reduzindo ou eliminando assim problemas como luz difusa, espalhamento de luz, e ruídos provenientes da fonte. E como geralmente não necessita de discriminação de comprimentos de onda, a instrumentação necessária para sua implementação é relativamente simples, quando comparada com a de outros métodos ópticos,¹⁹ os quais necessitam de monocromador.

Para uma reação ser quimiluminescente, uma molécula no estado excitado deve ser produzida durante o curso da reação. Neste caso, três fatores essenciais estão associados ao fenômeno: a reação deve ser exotérmica, a fim de gerar energia suficiente para a formação do estado eletrônico excitado (para emissão na região do visível, o mínimo de energia requerida é de 180 kJ mol^{-1}); deve existir um caminho de reação para a formação do estado eletrônico excitado; a molécula no estado eletrônico excitado deve ser capaz de perder energia como um fóton ou ser capaz de passar esta energia para uma outra molécula (ativador).¹⁷

Teoricamente, se uma molécula ou o seu produto de oxidação for fluorescente, então existe a possibilidade de sua oxidação gerar quimiluminescência. Porém há muitas exceções para este princípio, e geralmente uma reação de quimiluminescência não pode ser prevista.¹⁷ Portanto a exploração dessas reações no contexto da química analítica é restrita a um limitado número de sistemas já estabelecidos, podendo ser destacados as reações com o luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) e as reações com peróxi-oxalatos.

O luminol foi primeiramente descrito na literatura em 1928 e, apesar de ser o composto luminescente mais familiar e com diversas aplicações, seu mecanismo de reação não é inteiramente estabelecido.²⁰ Sua reação com oxidantes fortes, em meio aquoso alcalino, gera uma luminescência azul, com comprimento de onda em torno de 425 nm. O oxidante mais utilizado é o peróxido de hidrogênio e a reação em meio aquoso só ocorre na presença de um catalisador. Um esquema simplificado da oxidação do luminol é dado na Figura 3.1 abaixo.

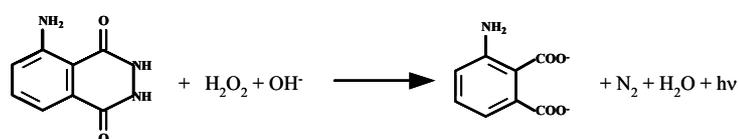


Figura 3.1 - Esquema simplificado da reação quimiluminescente do luminol- H_2O_2 . Ref. 21.

Vários tipos de catalisadores, enzimático ou mineral, são encontrados na literatura. No caso das enzimas são utilizadas a peroxidase (HRP ou ARP)^{22,23}, catalase,¹⁹ xantina oxidase,²⁴ entre outras. No caso dos minerais, vários metais são utilizados, em especial o Fe(III), Cu(II) e Co(II).¹⁷ O hexacianoferrato(III) também é muito utilizado, pois além de catalisador, atua como co-oxidante na reação. BOSTICK e HERCULES²⁵ relataram que, dentre os catalisadores minerais, o hexacianoferrato foi que apresentou melhor sensibilidade, boa faixa de resposta linear e produtos solúveis da reação, em comparação com os demais íons estudados, ou seja, Cu(II), Co(II), Ni(II) e $S_2O_8^{2-}$.

Segundo ROSE e WAITE²⁶ o termo “catalisador”, utilizado por vários autores, além de confuso é incorreto para os “catalisadores” metálicos, pois os íons metálicos não são reciclados como um catalisador verdadeiro, porém, nenhum termo mais apropriado é sugerido por estes autores. Neste trabalho o termo catalisador foi mantido para as substâncias que induzem a oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogênio.

Ainda considerando os metais de transição, a capacidade de um catalisador metálico de induzir a reação de oxidação do luminol depende da forma em que este se encontra em solução, ou seja, forma “livre” ou forma complexada. A eficiência de um metal complexado para catalisar a reação de oxidação do luminol dependerá do ligante, que provavelmente influencia as rotas de reação.²⁶ Por exemplo, o Cu(II), quando complexado por uma proteína, catalisa mais eficientemente a reação do luminol por peróxidos, que a sua forma livre,²⁷ enquanto que, o oposto ocorre quando complexado por aminoácidos.²⁸ O Fe(II), que na forma livre também catalisa esta reação, quando complexado pela maioria das substâncias orgânicas, perde sua eficácia como catalisador. Porém, quando o ligante é, por exemplo, o citrato, o metal complexado induz a reação mais eficientemente que a forma livre.²⁹ PAREJO *et al.*³⁰ conseguiram prolongar a emissão da reação entre $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 e o luminol de 2 s para 30 s empregando o complexo Co(II)-EDTA. A propriedade de um ligante em

aumentar ou diminuir a capacidade catalítica de um metal de transição foi explorada por diversos autores como alternativa para a determinação de diversas substâncias orgânicas por quimiluminescência.^{28,31,32}

A propriedade de uma substância em intensificar a emissão de luz na reação do luminol, prolongando e intensificando a emissão de luz,³³ como a de alguns ligantes mencionado no parágrafo anterior, tem sido bastante estudada, principalmente em relação aos catalisadores enzimáticos. Isto porque, apesar do luminol ser o reagente de quimiluminescência mais utilizado para fins analíticos, a sua eficiência de quimiluminescência não passa de 5 % em meio de sulfóxido de dimetil e 1,5 % em sistemas aquosos.¹⁹ Cada tipo de "intensificador de quimiluminescência" atua de diferente forma e mecanismo, dependendo do catalisador utilizado. Para sistemas luminol-peroxidase são utilizados derivados de fenol (por exemplo o p-iodofenol) que atuam como mediadores de transferência de elétrons, aumentando a eficiência da formação de radicais de luminol emissores de luz.¹⁹ Também haletos, como cloreto e brometo, em alta concentração, são empregados para intensificar a quimiluminescência tanto para sistemas peroxidase-luminol-H₂O₂,³³ quanto para sistemas Cr(III)-luminol-H₂O₂.^{34,35}

Dentre as desvantagens do uso do luminol como reagente para quimiluminescência, pode-se mencionar a sua alta susceptibilidade a diferentes variáveis experimentais. Por exemplo, alguns autores sugerem que a solução de luminol seja preparada com 3 dias de antecedência para sua "estabilização", sem que nenhuma explicação científica seja fornecida.³⁶ Segundo XIAO *et al.*³⁷ isto pode ser devido a absorção de CO₂ pela solução. Os autores demonstraram também que CO₂(aq) é responsável por diversas observações, cujos os mecanismos não foram totalmente esclarecidos, como por exemplo, a dependência da sensibilidade de alguns métodos na idade da solução do luminol³⁸ ou ganhos significativos de intensidade de radiação emitida, quando as soluções são preparadas em tampão carbonato ao invés de tampão borato.²² De

acordo com os autores, o CO_2 intensifica a emissão de luz da reação luminol/peróxido, pois este reage com peróxidos em meio alcalino, formando o radical peroxicarbonato ($^{\circ}\text{CO}_4^-$). Esse radical, por ser menos reativo que o radical hidroxila, reage seletivamente com o luminol, produzindo radicais de luminol que formarão intermediários excitados, os quais emitirão luz ao voltar para o estado fundamental. Por outro lado, o radical hidroxila ataca mais de um carbono do anel aromático do luminol, produzindo várias espécies que não necessariamente formarão intermediários excitados. Os autores também comentam que devido à dificuldade de remoção completa de gás carbônico da solução, muitos trabalhos na literatura podem ter sido influenciados pela presença de CO_2 .

Outro sistema de quimiluminescência que tem encontrado uma vasta aplicação na química analítica, com uma série de trabalhos na literatura, é o sistema peróxi-oxalato. A reação envolve a oxidação de derivados do éster oxalato de arila, geralmente por peróxido de hidrogênio, em presença de uma substância com baixos potenciais de oxidação e altos rendimentos quânticos de fluorescência, denominado de ativador.¹⁸ A reação é catalisada por uma base^{39,40} e um esquema da reação é mostrado na Figura 3.2.

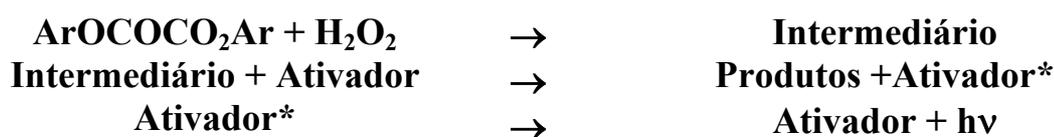


Figura 3.2 - Esquema simplificado da reação quimiluminescente do sistema peróxi-oxalato. Ref.41.

A presença de um ativador é necessária, pois o composto intermediário de alta energia, gerado na reação de oxidação, não é fluorescente e portanto, não pode emitir luz.¹⁹ A radiação emitida então, será característica do ativador, ao invés do reagente de quimiluminescência. Devido a este fato, o sistema peróxi-oxalato é muito utilizado para determinação de compostos fluorescentes⁴² ou compostos derivatizados com sondas fluorescentes.⁴³

O sistema peróxi-oxalato é o mais sensível sistema não biológico de quimiluminescência²⁰ e ainda apresenta a vantagem de ser menos susceptível as variáveis experimentais que o sistema do luminol, apesar da interferência de espécies que são facilmente oxidada, como brometo, iodeto, compostos organosulfurados e anilinas substituídas. Porém, a maior desvantagem deste sistema é a incompatibilidade dos oxalatos de arila mais comuns em meio aquoso, pois são poucos solúveis e instáveis neste solvente. Portanto, solventes orgânicos são um pré-requisito para a obtenção de máxima solubilidade e estabilidade.¹⁷

O problema relacionado com a solubilidade pode ser, de certa forma contornada, utilizando uma mistura de solventes, como por exemplo, acetronitrila-água,⁴⁴ ou ainda utilizando um derivado do ácido oxálico solúvel em meio aquoso.⁴⁵ Porém, a insolubilidade de alguns peróxi-oxalatos foi utilizada por *van ZONEM et al*⁴⁶ como uma vantagem para a construção de uma coluna com reagente em fase sólida para determinação de H₂O₂ em meio aquoso.

Recentemente, outro reagente que tem despertado bastante interesse científico na comunidade analítica é o tris(2,2'-bipiridil)rutênio(II) (Ru(bipy)₃²⁺). Este composto emite uma luz de cor alaranjada brilhante quando oxidado em meio ácido, passando para a forma Ru(bipy)₃³⁺, e subsequente redução com, por exemplo, hidróxido de sódio concentrado ou hidrazina.⁴⁷ A forma reduzida excitada é responsável pela emissão da radiação, como demonstrado no esquema simplificado da Figura 3.3.

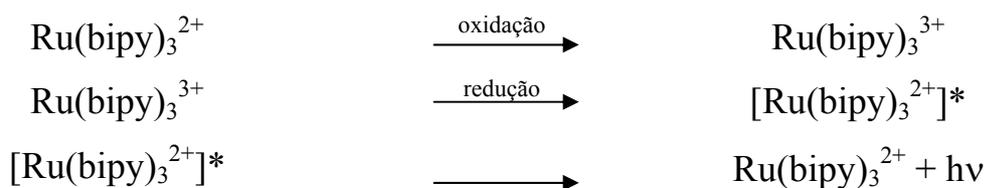


Figura 3.3 - Esquema simplificado da reação de quimiluminescência do Ru(bipy)₃²⁺. Ref. 47.

Este sistema apresenta uma série de aplicações em química analítica, podendo ser determinado diretamente por quimiluminescência, sem a necessidade de uma derivatização prévia, compostos orgânicos que reduza a forma $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$, como ácidos carboxílicos ou aminoácidos.⁴⁷ Esta característica é extremamente vantajosa, e tem sido utilizada como meio de detecção em cromatografia líquida.⁴⁸

Porém, devido à instabilidade do complexo $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$, este deve ser gerado momentos antes da análise, ou gerado em linha, para cromatografia líquida ou análise por injeção em fluxo. A oxidação do complexo em linha pode ser feita utilizando um reator contendo $\text{Ce}(\text{IV})$ ou dióxido de chumbo imobilizado,⁴⁷ ou ainda por via eletroquímica.⁴⁸ Esta última técnica possibilitou aos autores acoplarem os eletrodos na cela de fluxo, melhorando a sensibilidade do método, pois a luminescência só era gerada na cela de detecção.

A estratégia de gerar a luminescência apenas na cela de detecção, tem sido utilizada por diversos autores e com diferentes sistemas de quimiluminescência através da imobilização do reagente,⁴⁶ ou através da imobilização do catalisador na cela de fluxo.^{49,50} É possível ainda gerar na cela de fluxo condições favoráveis para a reação, como no trabalho proposto por WANG e YEUNG,⁵¹ que através da eletrólise do peróxido de hidrogênio era gerada condição alcalina para a oxidação do luminol.

3.1.1. Instrumentação para detecção de quimiluminescência

Em relação a instrumentação para a detecção de quimiluminescência, esta pode ser resumida em uma cela onde são adicionadas as soluções e um aparato para a quantificação da luz emitida. Os dispositivos de detecção são simples, em comparação com outras técnicas fotométricas, pois não existe uma fonte de radiação e um monocromador usualmente não é necessário, salvo em procedimentos em que se utilizam mais de um tipo de ativador para o sistema peróxi-oxalato.

As configurações dos sistemas para a detecção de quimiluminescência podem ser classificadas de acordo com o método de adição dos reagentes, ou seja em estáticos (batelada) e em fluxo.

Em sistemas estáticos, a amostra é colocada na cela de detecção do luminômetro e o reagente luminescente é adicionado utilizando-se uma seringa ou um injetor automático. A mistura das soluções é obtida pela rápida adição dos reagentes ou através de sistemas especiais de mistura. Apesar da simplicidade, luminômetros em batelada não são adequados para luminescência de curta duração (< 15 s), pois não se obtém resultados reprodutíveis.¹⁷ Outros métodos para a mistura das soluções da amostra e dos reagentes em sistemas estáticos são descritos na literatura,⁵² porém, a presença de componentes mecânicos tornam o sistema complexo.

A utilização dos sistemas em fluxo possibilitou o começo de uma nova era para os trabalhos utilizando quimiluminescência.²¹ Atualmente, a maioria dos trabalhos envolvendo reações quimiluminescentes utilizam sistemas em fluxo, em especial a análise por injeção em fluxo (FIA), pois esta é uma técnica que permite de forma simples e reprodutível a introdução da amostra e dos reagentes na cela de detecção e também permite realizar em linha, etapas de pretratamento, tanto químico quanto físico.⁵³ Com a análise por injeção em fluxo é possível obter ainda uma alta frequência analítica e um baixo consumo de reagentes, empregando uma instrumentação de baixa complexidade.⁷

Na literatura, a utilização de sistemas em fluxo para detecção de quimiluminescência foi inicialmente proposta por SEITZ e HERCULES,⁵⁴ em 1972, para determinação de Fe(II) em baixas concentrações, utilizando a propriedade catalítica deste metal na oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogênio. O diagrama de fluxos proposto pelos autores é muito parecido com os diagramas de fluxos apresentado por RUZICKA e HANSEN^{6,7} em trabalhos de análises por injeção em fluxo (FIA) publicados anos mais tarde. A amostra era introduzida por uma alça de amostragem em um fluxo transportador, que

conduzia a amostra até a cela de detecção, onde também eram introduzidas as soluções de luminol e de peróxido de hidrogênio.

Atualmente, a mistura em fluxo das soluções de amostra e reagentes de quimiluminescência é realizada de forma mais eficiente se feita antes da zona de amostra atingir o detector. A distância da confluência, onde as soluções se encontram, até a cela de fluxo é mantida a menor possível para minimizar perdas de radiação emitida.⁵³

Em relação à cela de detecção, na maioria desses trabalhos é o próprio reator onde ocorre a reação que resulta na emissão de radiação eletromagnética, o qual é colocado em frente à fotomultiplicadora. A cela é construída por um tubo de vidro com 1-2 mm de diâmetro interno, com a geometria em espiral achatada.⁵⁵

Outra forma que a cela de detecção pode apresentar é a de lâmina, que possui uma grande superfície transversal e uma pequena profundidade. Este tipo de cela de fluxo foi desenvolvida por STIEG e NIEMAM,⁵⁶ os quais também estudaram parâmetros que influenciam o seu desempenho e desenvolveram um modelo matemático para prever a intensidade da radiação emitida. Os autores concluíram que a intensidade da radiação emitida é aumentada quanto maior for a área transversal e a profundidade da cela, porém dificuldades de limpeza são um fator negativo para o uso em química analítica. Outros fatores que também devem limitar as dimensões da cela são a disponibilidade da solução da amostra e do reagente, pois quanto maior o volume da cela de fluxo maior será o gasto destas soluções.

Segundo LEWIS *et al.*,⁵³ apesar da cela em lâmina ser menos eficiente que a cela em espiral, ela é mais robusta, sendo possível sua utilização com diferentes sistemas de quimiluminescência, pois "a cela em espiral pode requerer modificações para otimizar o seu volume para diferentes tipos de reação",¹⁷ como por exemplo, o número de espirais.

É interessante salientar, que de acordo STIEG e NIEMAM,⁵⁶ a intensidade de luminescência detectada é apenas uma fração média de toda radiação gerada pela reação, pois os fótons que não são emitidos na direção ao detector, são detectados somente após refletir nas paredes da cela de fluxo. Portanto, a cela de fluxo deve ser capaz de coletar essa luz para melhorar o seu desempenho.

A luminescência é tipicamente medida por luminômetros de bancada, que utilizam fotomultiplicadoras como meio de detecção da radiação eletromagnética gerada na reação. Apesar da alta sensibilidade deste detector de radiação, este aparato está limitado ao laboratório devido ao tamanho, à fragilidade e ao custo. Aplicações que necessitam de medidas de campo, esbarram nesta dificuldade, portanto faz-se necessário o desenvolvimento de luminômetros de baixo custo e que possam ser operados em diferentes ambientes⁵⁷. Diante destas dificuldades, o número de trabalhos que utilizam fotodiodos para o monitoramento de reações de quimiluminescência é crescente na literatura^{22,58} e, apesar de não serem tão sensíveis como as celas fotomultiplicadoras, os fotodiodos são fáceis de usar e de pequeno tamanho, podendo ser acoplado à sistemas miniatura de análise.⁵⁷

Utilizando as vantagens dos fotodiodos descritas acima, neste capítulo, é proposto um dispositivo simples, robusto e de baixo custo para medidas por quimiluminescência em sistemas de análise em fluxo. Visando melhorar a sensibilidade, foi investigado o emprego de dois fotodiodos acoplados à cela de fluxo. O desempenho do dispositivo foi avaliado empregando como modelo a oxidação de luminol por peróxido de hidrogênio em meio alcalino.

3.2. Parte Experimental

3.2.1. Equipamentos

Além do detector, descrito em detalhes na seção 3.2.3 o módulo de análise foi construído empregando tubos de polietileno (0,8 mm d.i.) e confluências feitas em acrílico. A propulsão dos fluidos foi efetuada por uma bomba peristáltica Ismatec IPC-8, equipada com tubos de propulsão de Tygon. Para a inserção das soluções foi empregado um injetor proporcional com barra deslizante. Um microcomputador equipado com uma interface eletrônica (Advantech, PCL-711S) foi empregado para o monitoramento dos sinais.

3.2.2. Soluções

Com o intuito de comparar resultados obtidos com dados da literatura, todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água desmineralizada, baseando-se nas condições experimentais proposta por SHAW.⁵⁹

Solução tampão carbonato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, preparada dissolvendo-se 13,8 g de K_2CO_3 em 500 mL, e ajustando o pH para 10,5 com solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl.

Solução de luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, foi preparada pesando-se 0,0708 g de luminol (sigma), para em seguida dissolve-lo em solução tampão carbonato até o volume de 200 mL.

Solução de $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, foi preparada dissolvendo-se 1,318 g deste sal em 200 mL de H_2O .

Solução de permanganato de potássio $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 0,6307 g de KMnO_4 em 100 mL de água. Para padronização desta solução foi utilizado oxalato de sódio como padrão primário.

Solução estoque de peróxido de hidrogênio $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir de uma solução 30 % (Merck) e padronizada por titulação com solução

de permanganato de potássio. As soluções de referência (1×10^{-6} - 1×10^{-3} mol L^{-1} de H_2O_2) foram preparadas semanalmente por diluições sucessivas a partir da solução estoque. Quando não estavam sendo utilizadas, as soluções eram conservadas sob refrigeração.

3.2.3. Montagem do dispositivo de detecção

Para o monitoramento da radiação de quimiluminescente foi projetado e desenvolvido um dispositivo de detecção, constituído de três partes. A cela de fluxo, os fotodetectores e o circuito de amplificação do sinal.

A cela de fluxo possui uma superfície (face) transversal grande e de pequena profundidade, similar a empregada previamente para detecção por espectrofotometria em fase sólida,⁶⁰ e uma representação sua é mostrada na Figura 3.4. Uma tira de borracha puncionétrica de 1 mm de espessura foi inserida entre blocos de acrílico de 5 mm de espessura e fixados por três parafusos (não mostrados na figura), de forma a evitar vazamentos. Um dos blocos de acrílico possui dois furos transversais (0,8 mm), distantes 9 mm entre si, empregados para a entrada (E) e saída (S) dos fluidos. Um corte circular com área de 78 mm^2 foi feito na tira de borracha, definindo assim o volume de observação da cela. Quando em operação, a cela de fluxo ficava condicionada em uma caixa metálica aterrada e que impedia a incidência de luz exterior e minimizava o ruído de origem elétrico.

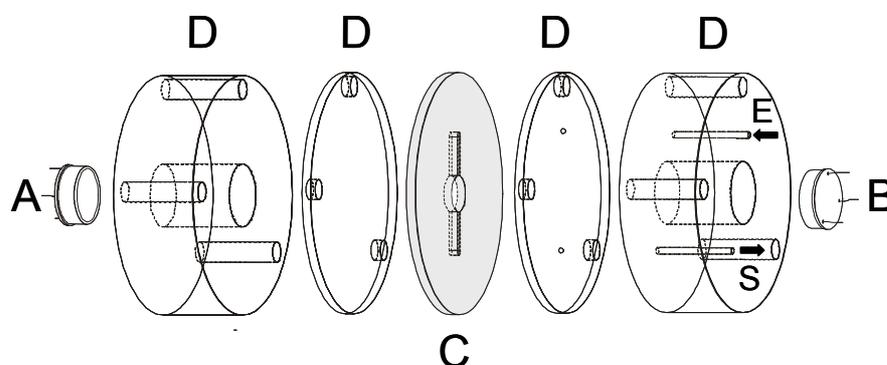


Figura 3.4 - Representação da cela de fluxo associada aos fotodetectores. A, B = fotodiodos. C = tira de borracha. D = peças de acrílico. E, S = entrada e saída das soluções.

Visando minimizar perdas de radiação emitida, a detecção da quimiluminescência foi efetuada empregando dois fotodiodos de silício (fotodiodo A e B na Figura 3.4) com 50 mm^2 de área sensível e máximo de resposta em 550 nm (OSD50-E). Todos os experimentos foram repetidos com apenas um dos dois fotodiodos ligado para avaliar o dispositivo de detecção e para poder comprovar o verdadeiro ganho de sinal utilizando dois detectores de luz.

Em relação ao circuito de amplificação de sinal, pouca informação é dada na literatura sobre este componente nos trabalhos que utilizam fotodiodos. Muitos utilizam amplificadores comerciais, ou quando são desenvolvidos, apenas ilustram o sistema com um diagrama de blocos. Com a finalidade de obter um sistema eletrônico que resultasse na melhor relação sinal/ruído, várias configurações foram testadas. Esses sistemas estão representados nas Figura 3.5 a 3.8 onde também estão identificados os componentes eletrônicos que compõe cada circuito.

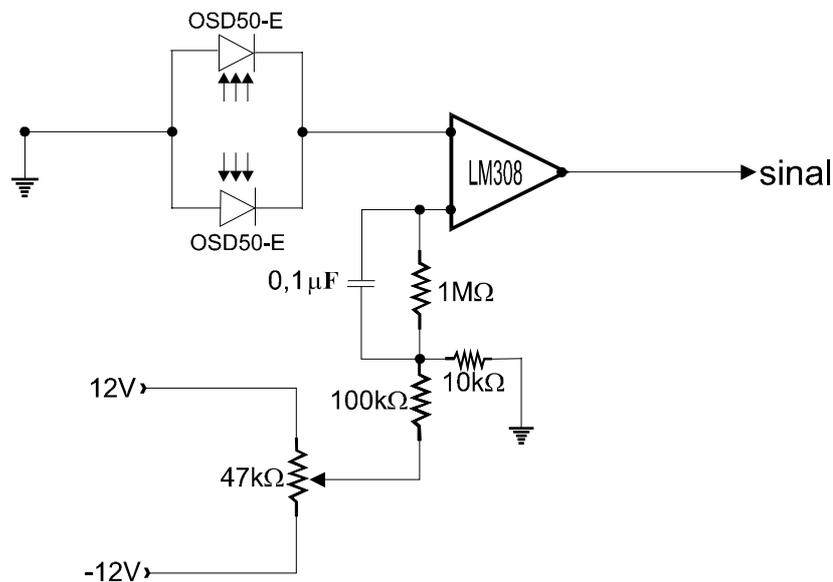


Figura 3.5 - Esquema da configuração eletrônica utilizando o operacional LM308 para amplificação do sinal gerado pelos fotodiodos.

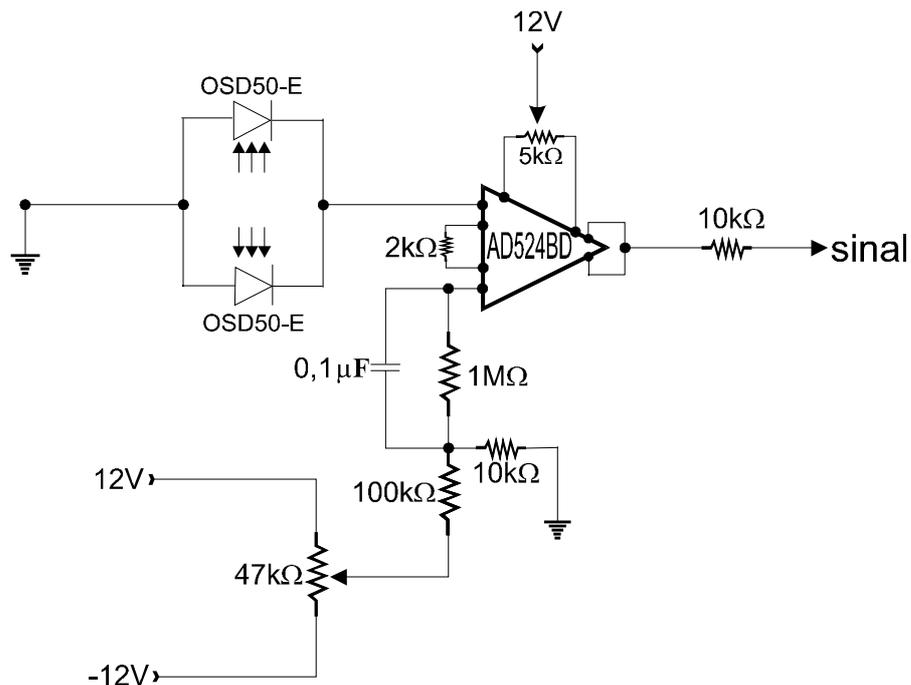


Figura 3.6 - Esquema da configuração eletrônica utilizando o operacional AD524BD para amplificação do sinal gerado pelos fotodiodos.

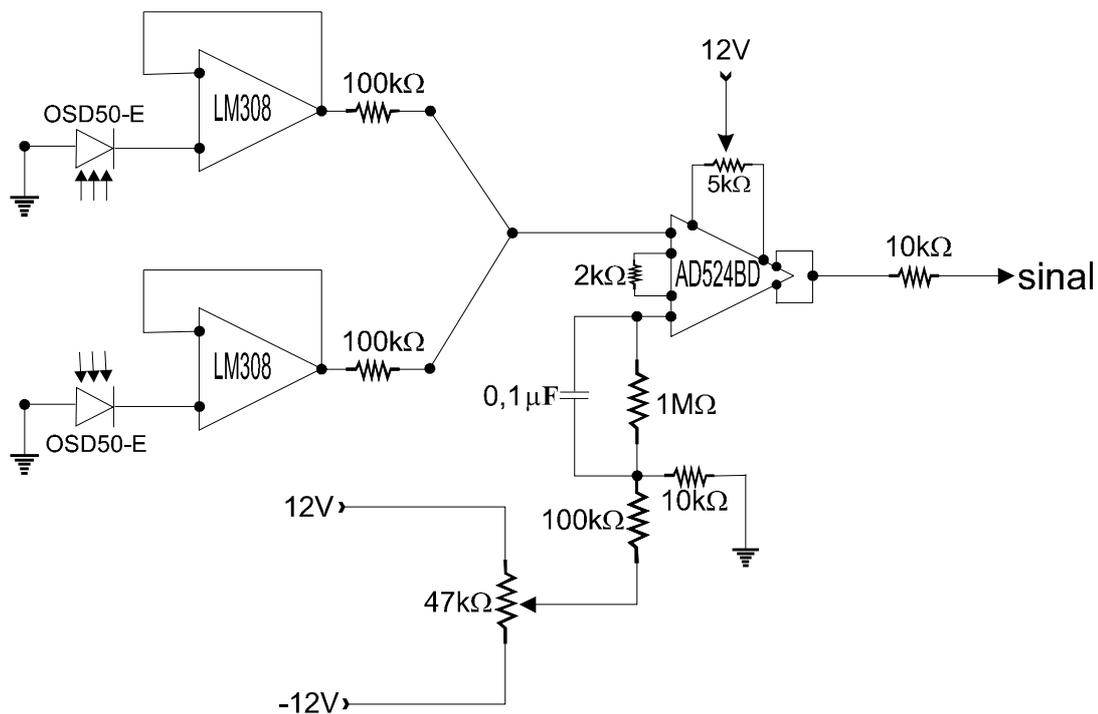


Figura 3.7 - Esquema da configuração eletrônica utilizando o operacional LM308 acoplado ao operacional AD524BD para amplificação do sinal gerado pelos fotodiodos.

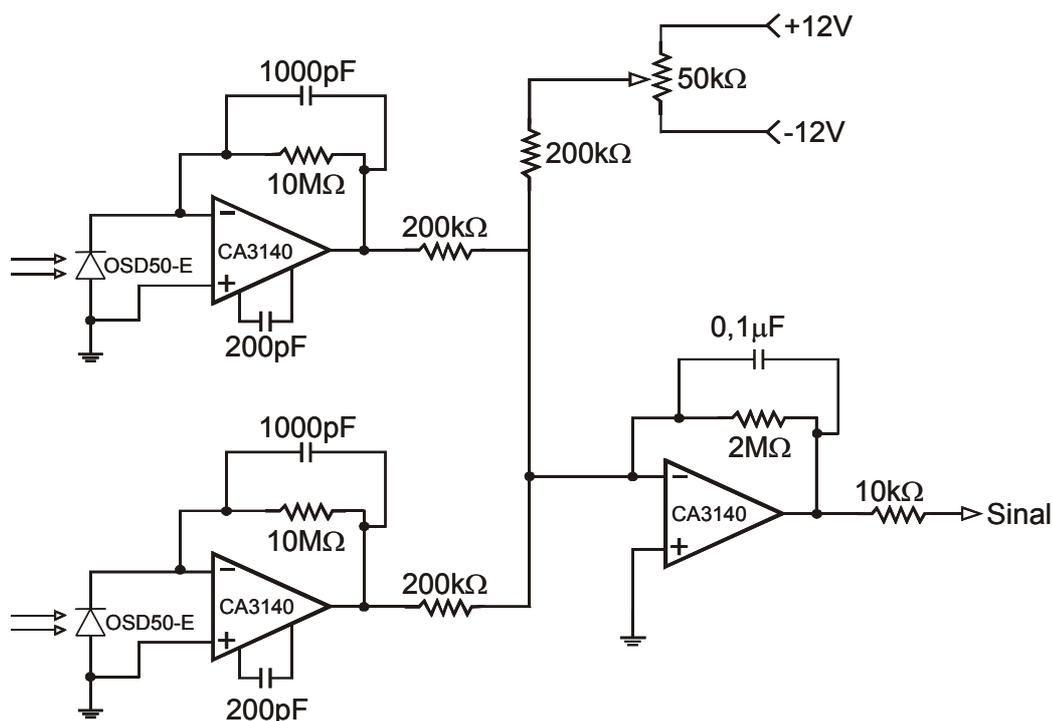


Figura 3.8 - Esquema da configuração eletrônica utilizando o operacional CA3140 para amplificação do sinal gerado pelos fotodiodos.

3.2.4. Procedimento experimental

Para a avaliação do desempenho do detector foi utilizada a reação de oxidação do luminol por peróxido de hidrogênio e catalisada por ferricianeto de potássio. Com o objetivo de comparar os resultados, o procedimento seguido foi baseado nas condições experimentais proposta por SHAW,⁵⁹ com pequenas modificações no diagrama de fluxo e nas concentrações dos reagentes para adequar ao tipo de geometria da cela de fluxo empregada.

Os experimentos foram realizados utilizando o sistema mostrado na Figura 3.9. Nesta configuração, o injetor (I) está na posição de amostragem. Após o preenchimento da alça de amostragem (L) o injetor era comutado para a posição de injeção. Em seguida a solução de amostra (A) era transportada pelo fluido carregador (Cs) e na confluência x era adicionada a solução de luminol (R1). A mistura ocorria durante o transporte através da bobina (B1) até confluir em y com a solução de hexacianoferrato de potássio(R2). A distância entre o ponto y e a cela de fluxo (D) era a menor possível, para minimizar perdas de

radiação. O sinal gerado em função da radiação detectada era lido pelo computador através da interface analógica/digital.

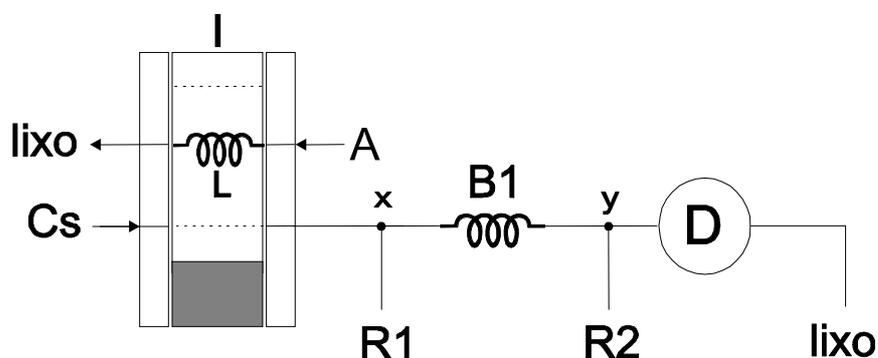


Figura 3.9 - Diagrama de fluxo do sistema utilizado para avaliação do detector de quimiluminescência. Cs = H₂O, L = alça de amostragem de 150 μ L. As setas indicam o sentido do bombeamento.

Para facilitar a avaliação do detector os experimentos foram efetuados de forma semelhante ao proposto por SHAW.⁵⁹ Os volumes do percurso analítico e da cela de fluxo eram 100 e 78 μ L, respectivamente, então, visando minimizar o efeito da dispersão, o volume da alça de amostragem foi fixado em 150 μ L. Esta condição era equivalente a amostra sendo bombeada continuamente, porém era operacionalmente mais fácil.

3.3. Resultados e Discussões

Apesar da quimiluminescência resultar na emissão de radiação eletromagnética em todas as direções, as configurações usualmente empregadas permitem a medida de apenas uma fração (geralmente < 50 %) da radiação emitida. Esta limitação resulta em um decréscimo inerente de sensibilidade. O dispositivo proposto consiste de uma cela de fluxos com espessura reduzida (1 mm) e janela de observação de 78 mm² (Figura 3.4). Esta configuração permite maximizar a quantidade de radiação detectada, visto que apenas a radiação emitida no sentido radial não incide sobre os fotodetectores. Adicionalmente, a espessura reduzida permite minimizar absorção de radiação pela solução.

Com o intuito de avaliar o desempenho global do dispositivo de detecção quimiluminescente, isto é, a cela de fluxo, os fotodiodos e o sistema eletrônico de amplificação de sinal, foram realizados experimentos com soluções de referência de peróxido de hidrogênio utilizando a reação quimiluminescente do luminol, catalisada por hexacianoferrato(III) de potássio.

Primeiramente a solução estoque de peróxido de hidrogênio foi padronizada com a solução de permanganato e o resultado da sua concentração foi estimado como $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 . Portanto as concentrações das soluções de referência utilizadas foram: 1,25 a $1250,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

Como comentado anteriormente, para efeito de comparação, foi reproduzido o sistema para determinação de peróxido de hidrogênio proposto por SHAW.⁵⁹ Algumas modificações com respeito a concentração, vazão de bombeamento e ordem de adição dos reagentes foram feitas com a finalidade de adequar o sistema de fluxo à geometria da cela de fluxo e a geração de menor volume de efluente.

No trabalho citado, as soluções de luminol e do catalisador eram misturadas em uma bobina de reação antes da adição da solução da amostra. As soluções, então, seguiam para uma câmara de mistura e em seguida, para a cela de fluxo, que era o bulbo de uma pipeta de 10 mL. Devido ao grande volume da cela, a mistura entre as soluções se completava nela. Para contornar o problema de mistura insuficiente sem que houvesse perda da radiação gerada, foi utilizado o diagrama de fluxo mostrado na Figura 3.9. O sistema é semelhante ao proposto por MARTELLI *et al.*⁶¹ Primeiramente, era realizada a mistura das soluções de amostra e luminol, a solução do catalisador era adicionada segundos antes da entrada da zona de amostra na cela de fluxo. Um pequeno aumento na altura máxima do sinal foi observada nesta configuração, quando comparada com a configuração onde as soluções de luminol e de hexacianoferrato eram adicionadas ao mesmo tempo à zona da amostra próximo da cela de fluxo. Essa diferença de sinal observada se deve à reação do luminol com o

hexacianoferrato. Uma mistura prévia desses reagentes de quimiluminescência em linha promovia a diminuição de suas respectivas concentrações e, conseqüentemente, o sinal analítico.

As vazões das soluções também foram modificadas para diminuir a geração de efluente, e conseqüentemente diminuir o volume de resíduo a ser tratado. Porém, para manter as condições analíticas proposta por SHAW,⁵⁹ as concentrações das soluções foram aumentadas. No trabalho deste autor, as vazões do luminol, da solução transportadora e do catalisador eram 3,4 mL min⁻¹, portanto, a vazão final era 10,2 mL min⁻¹. No presente trabalho foi utilizado 1 mL min⁻¹ para as solução de luminol e hexacianoferrato e 4 mL min⁻¹ para a solução transportador. As concentrações das soluções apresentada na parte experimental (3.2.2), foram preparadas para que a concentração final de cada reagente na cela de fluxo fossem idênticas às concentrações do sistema de fluxo proposto na literatura,⁵⁹ isto é, $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $3.3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para o luminol e para o catalisador, respectivamente.

Devido à relativa falta de informação na literatura com respeito ao sistema eletrônico empregado para a amplificação do sinal gerado pelos fotodiodos, foram estudadas quatro configurações eletrônicas e para cada uma delas foram avaliados parâmetros como a relação sinal ruído, estabilidade da linha de base e limite de detecção. Este ultimo parâmetro foi calculado de acordo com as recomendações da IUPAC,⁶² porém, devido a ausência de sinal do branco analítico, utilizou-se várias leituras da linha da linha de base para o cálculo do desvio padrão do branco instrumental, utilizado para a estimativa do limite de detecção.

3.3.1. Dispositivo utilizando LM308

O primeiro sistema eletrônico estudado é mostrado na Figura 3.5. Este sistema utiliza um amplificado operacional LM308, que é de baixo custo e é facilmente encontrado no comércio local de componentes eletrônicos. Porém os

resultados obtidos com esta configuração eletrônica não foram muito promissores. Apesar do sistema apresentar boa resposta para soluções de peróxido de hidrogênio mais concentrada que $125,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, nenhuma resposta foi obtida para soluções mais diluídas que $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Ainda com esse arranjo eletrônico não se obteve boa precisão. O coeficiente de variação observado era da ordem de 8,0 % para 20 medidas de uma solução $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 .

3.3.2. Dispositivo utilizando AD524BD

Diante das limitações do circuito integrado LM308, este foi substituído pelo amplificador operacional AD524BD, Figura 3.6. Este é um amplificador de instrumentação desenvolvido para aplicações que requerem alta precisão e exatidão e tem como características baixo nível de ruído, ampla faixa de resposta linear e baixa flutuação de voltagem, ou seja, baixa flutuação da linha de base. Ele ainda pode operar na faixa de temperatura de -40 a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ e não necessita de componentes externos para ajuste de ganho.

Na Figura 3.10 é apresentado um registro dos resultados obtidos com a injeção de soluções de referência de H_2O_2 na faixa de concentração de $6,25$ a $1250,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Com esta configuração eletrônica, o dispositivo apresentou uma resposta linear na faixa de $6,25$ a $125 \mu\text{mol L}^{-1}$, com coeficiente de correlação linear $r = 0,998$ e a equação da curva analítica do logaritmo da intensidade máxima de quimiluminescência em função do logaritmo da concentração foi: $\log I = 0,75 \times \log[\text{H}_2\text{O}_2] + 4,46$.

Outras características analíticas obtidas com este sistema foi um desvio padrão de 12 mV para 70 leituras da linha de base, obtendo-se uma relação sinal/ruído de 5,5 injetando-se uma solução referência de $6,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 . Com este sistema foi possível estimar um limite de detecção igual a $2,78 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 , e um coeficiente de variação observado da ordem de 3,6 % para 20 medidas de uma solução $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 .

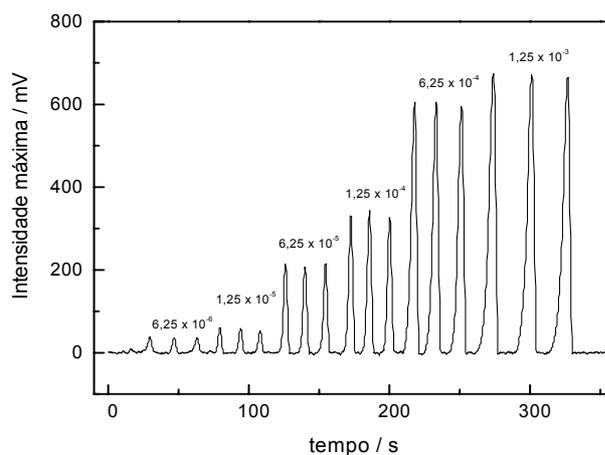


Figura 3.10 - Sinais transientes obtidos com soluções de referência de H_2O_2 , utilizando configuração eletrônica representada na Figura 3.6. Os números indicam as concentrações das soluções em mol L^{-1} .

3.3.3. Dispositivo utilizando LM308 acoplado ao AD524BD

Visando melhorar o desvio padrão da linha de base e conseqüentemente melhorar o limite de detecção o circuito eletrônico da Figura 3.6 foi modificado, acoplado cada fotodiodo a um amplificador operacional LM308. Conforme indicado na Figura 3.7 as saídas dos operacionais LM308 estão conectadas à entrada não inversora do amplificador operacional AD524BD. Nesta configuração os sinais gerados pelos dois fotodiodos são somados e amplificados. Com este arranjo o sinal ficou menos susceptível a indução de ruídos eletrônicos comuns em transmissão de baixos níveis de correntes. O ruído da linha de base diminuiu cerca de dez vezes, podendo ser observado na Tabela 3.1 o resultado do desvio padrão de 70 leituras da linha de base. Nesta tabela encontram-se também os desvios padrão da leitura da linha de base para o mesmo sistema eletrônico da Figura 3.7, obtidos utilizando em cada caso apenas um fotodiodo.

Tabela 3.1 - Tabela com os desvios padrão de 70 leituras da linha de base obtidos com configuração eletrônica da Figura 3.7.

| Fotodiodo | Desvio Padrão (mV) |
|-----------|--------------------|
| A + B | 0,9 |
| A | 0,6 |
| B | 0,7 |

Na Figura 3.11 é apresentado os sinais transientes obtidos com soluções de referência de H_2O_2 . Novamente o mesmo experimento foi realizado com os dois fotodiodos (curva I) e repetido com o fotodiodo A (curva II) e o fotodiodo B (curva III). Pela figura é possível notar, claramente, que o sinal obtido com os dois detectores é quase o dobro do sinal obtido com qualquer um dos detectores sozinho. Na Tabela 3.2 é apresentado o valor de vários parâmetros, onde é possível também confirmar a observação feita na Figura 3.11.

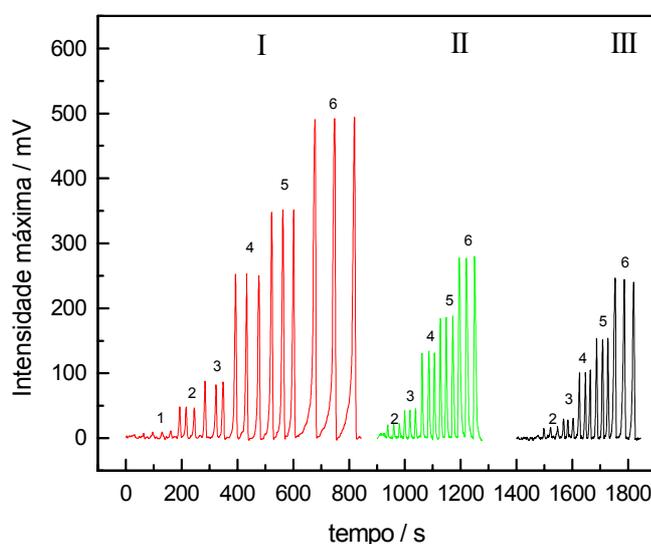


Figura 3.11 - Sinais transientes obtidos para soluções de referência de H_2O_2 , utilizando configuração eletrônica representada na Figura 3.7. Curva I utilizando dois fotodiodos, curva II utilizando fotodiodo A e curva III utilizando fotodiodo B. Os números de 1 a 6 indicam respectivamente as concentrações de 1,25, 6,25, 12,5, 62,5, 125,0 e 625,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 .

Tabela 3.2 - Características analítica do dispositivo de detecção obtidos com configuração eletrônica da Figura 3.7.

| Fotodiodo | s/r^a | CV^b % | Faixa linear $\mu\text{mol L}^{-1}$ | Equação da reta ^c | r^d | LD^d $\mu\text{mol L}^{-1}$ |
|-----------|---------|--------------------|--|-------------------------------|-------|---|
| A+B (I) | 55,6 | 2,0 | 6,25 – 125,0 | $\log I = 0,67 \log C + 5,18$ | 0,997 | 0,68 |
| A (II) | 36,7 | 6,7 | 6,25 – 125,0 | $\log I = 0,70 \log C + 5,01$ | 0,997 | 1,00 |
| B (III) | 22,9 | 8,2 | 6,25 – 125,0 | $\log I = 0,75 \log C + 5,13$ | 0,998 | 1,43 |

^a S/r = relação sinal/ruído estimado para uma solução de $6,25 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2

^b CV = coeficiente de variação, estimado com 20 determinações de uma solução $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 .

^c I = intensidade máxima do sinal analítico e C = concentração de peróxido.

^d r = coeficiente de correlação linear.

^e LD = limite de detecção.

3.3.4. Dispositivo utilizando CA3140

Estudando mais profundamente os amplificadores de instrumentação foi observado que estes não são os dispositivos eletrônicos ideais para se trabalhar com a soma de sinais, pois eles não podem ser tratados simplesmente como amplificadores operacionais. Adicionalmente foi verificado que as montagens dos circuitos utilizando o amplificador de instrumentação não eram as mais adequadas. O ajuste da linha de base estava ligada antes da etapa de amplificação (Figura 3.7) assim com isto o ruído proveniente da fonte de alimentação também era amplificado e, conseqüentemente, aumentando o ruído da linha de base.

Devido ao fato de o amplificador de instrumentação AD524BD ser um componente eletrônico de custo elevado e de difícil aquisição, mais tempo foi investido para o desenvolvimento do dispositivo de detecção que utilizasse apenas componentes de fácil aquisição. Desta forma o dispositivo poderia ser facilmente reproduzido para as pesquisas do grupo envolvendo detecção quimiluminescentes e também espectrofotométricas. Neste sentido foi utilizado um arranjo de amplificadores operacionais CA3140 para o condicionamento dos sinais gerados pelos fotodiodos.

O diagrama deste circuito eletrônico é mostrado na Figura 3.8. Os terminais de saída de cada fotodiodo foram conectados às entradas inversoras de dois amplificadores operacionais para geração de sinal em condição de impedância. Os terminais de saída destes dispositivos foram conectados a um amplificador configurado como somador de sinais, que também permitia o ajuste de zero (*offset*).

A razão sinal/ruído foi estimada para cada um dos fotodetectores (fotodiodo A e B) empregando a configuração com os dois fotodiodos. Para tanto, foram considerados os desvios padrão de 500 leituras da linha base (1,0 - 1,7 mV) e o sinal máximo referente à uma solução contendo $7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de

H₂O₂ (medidas em triplicata). Como nos dispositivos descritos anteriormente, um aumento significativo da razão sinal/ruído também foi observado com o emprego dos dois fotodetectores (Tabela 3.3), indicando que o efeito do aumento da porcentagem de radiação detectada é mais significativo que o aumento no nível de ruído. Outras características analíticas estimadas são mostradas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Características analíticas do dispositivo proposto empregando 1 ou 2 fotodiodos

| Fotodiodo | Sinal / ruído ¹ | Equação da reta ² | LD ³ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) |
|-----------|----------------------------|-----------------------------------|---|
| A (I) | 28,3 | $S = 16,8 + 3,24 C$ ($r=0,998$) | 1,1 |
| B (II) | 20,0 | $S = 26,4 + 3,27 C$ ($r=0,999$) | 1,6 |
| A+B (III) | 54,0 | $S = 27,5 + 4,79 C$ ($r=0,999$) | 0,80 |

¹ Estimada considerando os sinais para uma solução $7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ H₂O₂ (n=3) e 500 medidas da linha base;

² S - sinal máximo (mV); C – concentração de H₂O₂ ($\mu\text{mol L}^{-1}$);

³ Limite de detecção estimado em nível de confiança de 99,7 %.

Sinais transientes obtidos com soluções de referência, mostrados na Figura 3.12, indicam um aumento de sensibilidade de *ca* 50 %, com o emprego dos dois fotodetectores. Uma resposta linear foi obtida para concentrações de H₂O₂ entre 2,50 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H₂O₂ (Tabela 3.3). Considerando o desvio padrão de 500 leituras da linha base, o limite de detecção foi estimado (de acordo com as recomendações da IUPAC⁶²) em 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em nível de confiança de 99,7 %. Coeficiente de variação foi estimado em de 0,9 % a partir de 20 medidas empregando uma solução contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H₂O₂.

Comparando os resultados obtidos com os dispositivos utilizando o AD524BD (Figura 3.7) e CA3140 (Figura 3.8), apresentados na Tabela 3.4, pode-se afirmar que os dispositivos propostos apresentaram praticamente o mesmo desempenho analítico, porém a última configuração investigada apresentou um custo significativamente inferior e a vantagem de se utilizar componentes de fácil aquisição no mercado nacional.

Tabela 3.4 - Comparação das características analítica do dispositivo de detecção descrito na Figura 3.7 (dispositivo 1) com a configuração eletrônica da Figura 3.8 (dispositivo 2).

| Dispositivo | Sinal / ruído ¹ | Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | LD ² ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | Custo ³ (US\$) |
|-------------|----------------------------|--|---|------------------------------|
| 1 | 55,6 | 6,25 – 125,00 (0,997) | 0,68 | 350,00 |
| 2 | 54,0 | 2,50 – 500,00 (0,999) | 0,80 | 150,00 |

¹ Estimada considerando os sinais para uma solução de $6,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 para o dispositivo 1 e uma solução $7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 para o dispositivo 2;

² Limite de detecção estimado em nível de confiança de 99,7 %.

³ Custo total do dispositivo (fotodiodos e demais componentes eletrônicos) incluindo taxas e impostos.

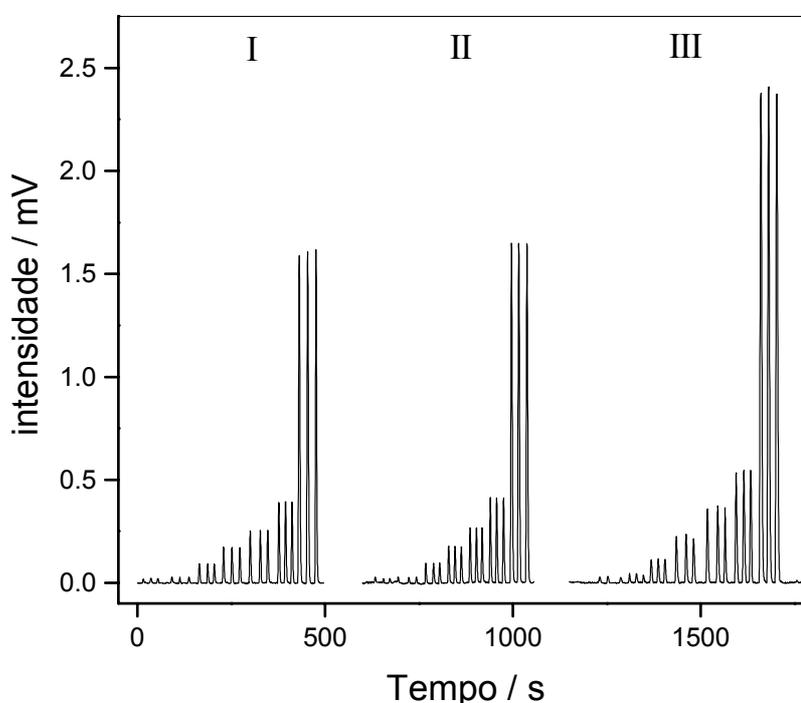


Figura 3.12 - Sinais transientes obtidos com o sistema modelo empregando 1 (I e II) ou 2 fotodetectores (III). Da esquerda para direita os sinais são referentes a três injeções de 2,5, 7,5; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 e $500,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio

3.4. Conclusões

Os dispositivos propostos utilizando tanto o AD524BD (Figura 3.7), quanto o CA3140 (Figura 3.8), descritos na Parte Experimental, apresentaram um desempenho analítico comparável ao citado na literatura empregando detecção com fotomultiplicadora e hexacianoferrato como catalisador. No trabalho proposto por SHAW,⁵⁹ foi obtido um limite de detecção igual a 0,11

$\mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. Porém, neste artigo, o autor estimou o limite de detecção em nível de confiança de 94,4 %, ou seja, $k = 2$, enquanto no presente trabalho foi estimado em nível de confiança de 99,7 %, $k = 3$. Calculando-se o limite de detecção como sugere o artigo, obteve-se $LD = 0,04 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 . Contudo, baseado nos experimentos realizados pode-se afirmar que este valor não corresponde com a realidade, optando-se então em adotar as recomendações da IUPAC.

Também empregando a mesma reação química e utilizando uma fotomultiplicadora, BOSTICK e HERCULES²⁵ obtiveram um limite de detecção de $0,007 \mu\text{mol L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$, utilizando $k=2$. A faixa de resposta linear também foi maior que a obtida no presente trabalho, $0,01 - 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. Porém, mesmo neste caso, os desempenhos dos dispositivos de detecção aqui propostos não foram muito inferiores, podendo assim afirmar que são adequados para aplicações analíticas utilizando reações de quimiluminescência. O limite de detecção pode ainda ser melhorado mediante a utilização de um fotodiodo com máximo de resposta em torno de 420 nm, em vez de 550 nm do fotodiodo empregado.

O dispositivo de detecção de quimiluminescência apresentou como vantagens em relação às fotomultiplicadoras um baixo custo, baixo consumo de energia e facilidade de minituarização. Estas últimas características possibilitam a utilização deste detector para medidas em campo.

CAPÍTULO 4. DESENVOLVIMENTO DE INSTRUMENTO COMPACTO, AUTOMÁTICO E DE BAIXO CUSTO PARA DETERMINAÇÃO DE DIÓXIDO DE NITROGÊNIO NA ATMOSFERA EXPLORANDO A REAÇÃO DE GRIESS-SALTZMAN

4.1. Introdução

Seguindo a linha de projeto e desenvolvimento de detectores óticos de baixo custo utilizando fotodiodos, neste capítulo é proposto um fotômetro de LED acoplado a um tubo poroso o qual foi utilizado para determinação de NO_2 na atmosfera. A construção de tal dispositivo se justifica, pois nos centros urbanos, o gás dióxido de nitrogênio é um dos principais poluentes da atmosfera e é um dos principais contribuintes para a formação da chuva ácida. A emissão direta de NO_2 é relativamente pequena, sendo a principal fonte desse gás proveniente da oxidação do NO durante a queima de combustíveis. Em ambientes fechados e pequenos, a concentração pode atingir até 200 ppbv. Em uma cozinha, por exemplo, a concentração de NO_2 é 30 vezes superior quando gás liquefeito de petróleo (GLP) é utilizado.⁶³

Para a determinação de NO_2 vários métodos são encontrados na literatura, entre eles destacam-se: conversão do NO_2 a NO e posterior detecção deste gás por quimiluminescência em fase gasosa baseando-se na reação com o O_3 ; fluorescência induzida por laser; espectrometria de absorção ótica diferencial; quimiluminescência em fase líquida baseando-se na reação entre o luminol e NO_2 ; e, principalmente a espectrometria de absorção molecular, utilizando a clássica reação de Griss-Saltzman.⁶⁴

O instrumento de quimiluminescência em fase gasosa é comumente utilizado para determinações contínuas em estações de monitoramento de ar. Esse instrumento é encontrado comercialmente e possui um bom limite de detecção. Porém, seu custo é muito elevado e devido às suas dimensões, não é

um instrumento apropriado para estudos que requerem a determinação da concentração de NO_2 em vários locais de análise. Nesse mesmo aspecto, também se encontra a fluorescência induzida por laser e espectrometria de absorção ótica diferencial.⁶⁵ Em relação ao método envolvendo a reação da reação de quimiluminescência com o luminol, apesar deste apresentar uma boa sensibilidade, a baixa instabilidade do luminol limita o uso desse método para análise de campo, além de requerer calibrações constantes.

O método baseado na reação colorimétrica de Griess-Saltzman⁶⁶ é o método de referência para a determinação de NO_2 .⁶⁵ Por sua vez, essa metodologia apresenta como vantagens, quando comparado às outras normalmente empregadas, a simplicidade do procedimento bem como a sua implementação empregando equipamentos de baixo custo e comuns em laboratórios de análises.⁶³ Neste método, NO_2 é absorvido em uma solução composta por diversos reagentes, onde o NO_2 é reduzido a HONO que, posteriormente, forma um composto estável de coloração vermelho-violeta ($\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$).⁶⁷ Como desvantagem, pode-se mencionar a necessidade da utilização de borbulhadores de vidro para a dissolução do NO_2 , dificultando assim a utilização deste método em análise de campo.⁶³ Como alternativa a essa limitação, foram propostos a retenção em fase sólida⁶³ e a utilização de membranas de difusão gasosa^{65,67}. Segundo PASQUINI e DA SILVA,⁶⁸ a utilização de membranas de difusão gasosa previne interferências causadas por partículas presentes em amostras gasosas.

Atualmente, um dos claros objetivos da ciência e tecnologia do novo milênio é a miniaturização. Em Química Analítica não é diferente e muitos dos benefícios da micro-instrumentação pode-se destacar a redução do peso, do volume, do consumo de energia, do gasto de reagentes, do tempo de análise e custo do dispositivo,⁶⁹ características que tornam esses dispositivos ideais para medidas em campo.

Neste trabalho, é proposta a construção de um micro-dispositivo para a determinação de NO_2 na atmosfera. O sistema analítico foi projetado para ser confiável, portátil, de baixo custo e capaz de realizar todos os procedimentos analíticos sem a necessidade de intervenção do operador. Para atingir esses objetivos, utilizou-se a reação de Griess-Saltzman para a determinação de NO_2 e, para o monitoramento da formação do composto colorido empregou-se um espectrofotômetro baseado em LED (do inglês Light Emitting Diode). LEDs são o meio mais eficiente de produção de luz monocromática (com largura de banda que permite o emprego como fonte de radiação em detecção fotométrica) e são pequenos e baratos, ideal para sistemas analíticos miniaturizados. Devido à sua estabilidade e confiabilidade, atualmente, os LEDs são aplicados em diversos sistemas analíticos,^{70,71} inclusive em sistemas comerciais.⁷²

Para a amostragem gasosa, foi utilizado um microtubo de membrana porosa, o que propiciou a permeação do NO_2 . Devido à capacidade desse tubo de transmitir luz, em pequenos comprimentos, esse também foi utilizado como cela de fluxo. Esse tipo de arranjo simplificou o desenho do sistema, implementando a construção de um sistema de detecção compacto, além da miniaturização do mesmo.

4.2. Parte Experimental

4.2.1. Construção do Coletor/detector de NO_2 .

Como mencionado acima, para a amostragem de NO_2 foi utilizado um tubo permeável a gás, PTFE poroso (Poreflon®, Sumitomo Electric Fine Polymer) com 50% de porosidade, 1 mm de diâmetro interno e 2 mm de diâmetro externo. Devido à característica do tubo de possuir um índice de refração próximo ao índice de refração da água ($\text{RI} = 1,33$), foi explorada a capacidade de transmissão de luz em pequenos comprimentos, como por exemplo, de 1 a 5 cm.⁷³ Este tubo não se comporta como um guia de onda,⁷⁴

como aquele construído a partir do Teflon® AF (RI = 1,29). Porém, devido à uma maior taxa de transferência gasosa, instrumentos construídos com 5 cm deste tubo podem possuir a mesma sensibilidade de instrumentos construídos com 50 cm de Teflon® AF.⁷³

O detector de NO₂ é esquematicamente mostrado na Figura 4.1a. Na Figura 4.1b, é mostrada uma foto do instrumento montado no laboratório. Para a sucção do ar atmosférico foi utilizado um “cooler” (C - Figura 4.1a) de 25 mm de diâmetro operado a 4,2 V (TT-25, Eagletech Computers). Esse “cooler” é um tipo de ventilador utilizado para refrigeração do microprocessador de computadores portáteis (“laptop”) e tem a capacidade de aspirar ar a uma vazão de 23 L/min. O “cooler” (C) foi acoplado a um tubo (ST) construído a partir de uma seringa descartável de 30 cc, com 21,5 mm de diâmetro interno. O Tubo de PTFE poroso - Poreflon® - (PT) foi conectado entre duas peças de plástico em “T” e, nesse conjunto, foram acopladas duas fibras ópticas de 0,5 mm de d.i., que foram inseridas até 5 mm dentro do tubo de PTFE. Uma fibra óptica conduzia luz proveniente da fonte de radiação e a outra fibra conduzia a luz transmitida até o fotodetector.

O frasco contendo o reagente (R) foi protegido do NO₂ utilizando uma coluna contendo carvão ativo na entrada de ar. Para controlar o fluxo da solução de reagente foi utilizada uma válvula solenóide (SV) de duas vias.

Como fonte de radiação para monitoramento da formação do composto colorido foi utilizado um LED com máximo de emissão em 536 nm (L1). Como fonte de radiação para ser utilizada como referência, foi utilizado LED (L2) com máximos de emissão em 410 ou 840 nm. Todos os LEDs foram acionados aplicando-se uma corrente de 30 mA.

Como fotodetector foi utilizado um fotodiodo (PD) contendo integrado a seu corpo um amplificador operacional baseado em um conversor corrente – voltagem (OPT 301, Texas Instruments). O sinal proveniente do fotodiodo era

amplificado e o sinal obtido registrado por um computador através de um conversor analógico/digital.

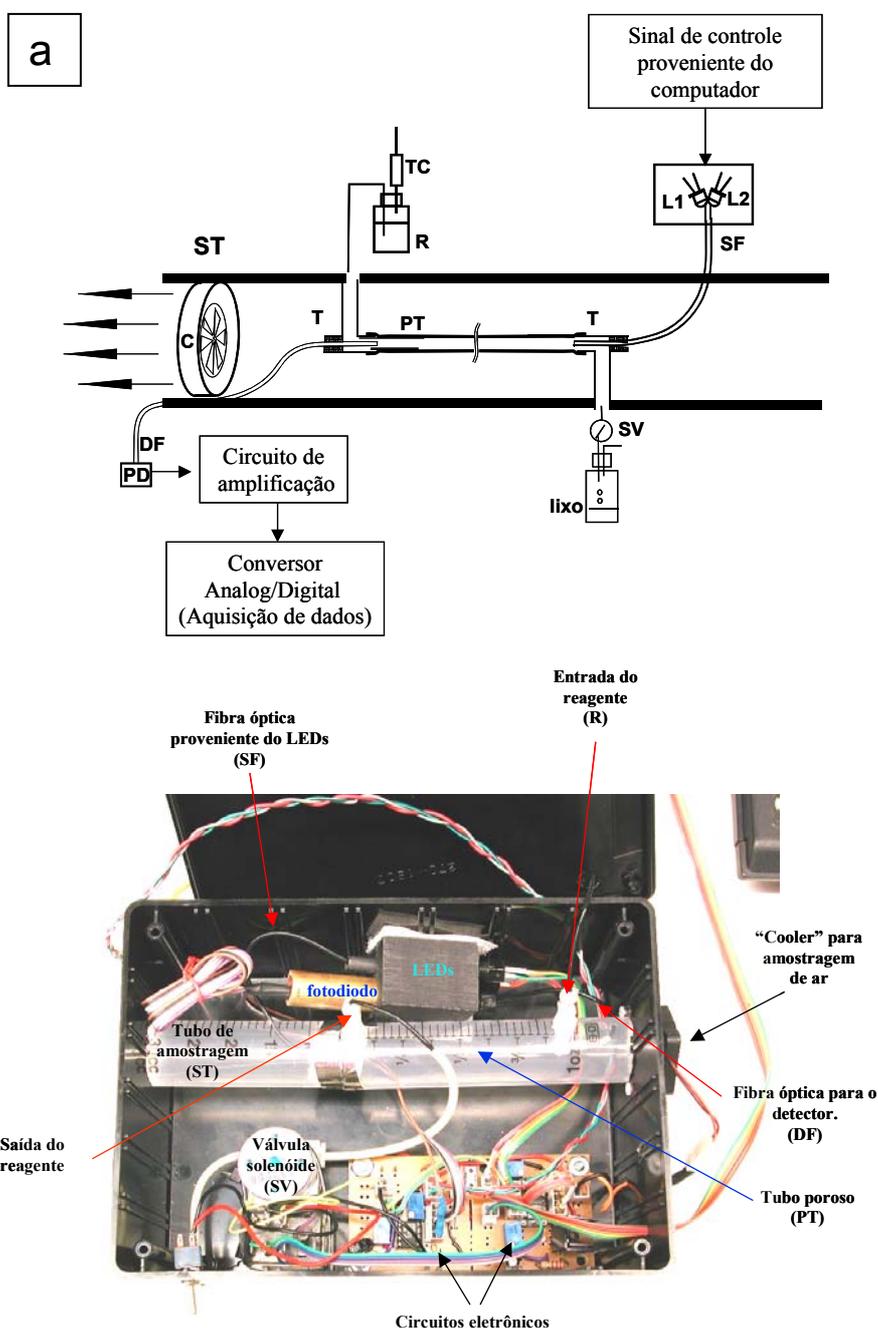


Figura 4.1 - Sistema de detecção de NO_2 . a) esquema de montagem: Líquido flui pela ação da gravidade, controlado por válvula solenóide SV. R: reagente de Griss-Saltzman; TC: coluna de carvão ativo; T: confluência em forma de “T”; PT: tubo Poreflon[®] com 1 mm d.i.; L1 e L2: LED verde e de referência; SF: fibra óptica que conduz a radiação emitida pelos LEDs; DF: fibra óptica que conduz a luz transmitida para o detector; PD: fotodiodo; C: “Cooler” de 25 mm (ventilador utilizado para refrigeração de microprocessador de laptop); ST: Tubo de uma seringa descartável de 30 cc. b) foto do sistema montado.

Para o controle do processo analítico e aquisição de dados, foi desenvolvido um programa de computador que controlava a abertura da válvula solenóide, o acionamento dos LEDs, a aquisição de dados e calculava a absorbância de acordo com a Equação 4.1.

$$\text{Abs} = \text{Log} [(V_r - V_d)/(V_s - V_d)] \dots \dots \dots \text{Equação 4.1}$$

Onde, para o sinal de resposta do fotodiodo, V_r quando somente o LED de referência encontrava-se ligado, V_s quando somente o LED de 536 nm encontrava-se ligado e, V_d quando nenhum dos dois estava ligado.

4.2.2. Circuitos eletrônicos

Para a amplificação do sinal gerado pelo fotodiodo, acionamento da válvula solenóide e dos LEDs pelo computador e para converter uma diferença de potencial de 12 V para 4,2 V, foram construídos os circuitos eletrônicos mostrados abaixo.

Para converter uma diferença de potencial de 12 V para uma de 4,2 V foi utilizado o circuito eletrônico mostrado na Figura 4.2.

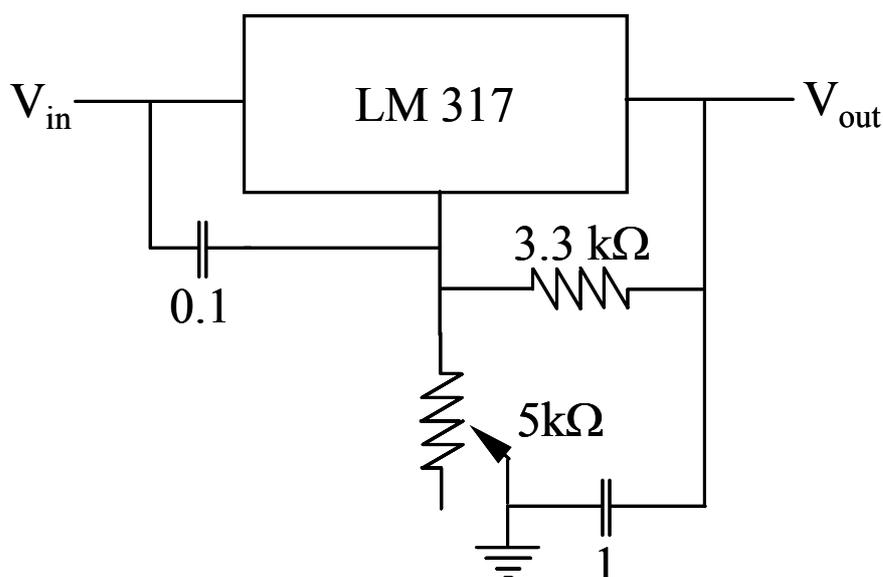


Figura 4.2 - Conversor 12 V para 4,2 V.

Para permitir que o computador acionasse a válvula solenóide e os dois LEDs, foi construída uma interface eletrônica, conforme esquema da Figura 4.3. Esse circuito recebia o sinal do computador e fornecia a potência necessária para o acionamento dos componentes. O circuito da Figura 4.3 difere do circuito mostrado na Figura 2.2 basicamente no tipo de transistor utilizado para o acionamento dos dispositivos. Enquanto que no circuito da Figura 2.2 foi utilizado um arranjo de transistores clássicos no circuito da Figura 4.3 foi utilizado transistores de efeito de campo (IRLD014). Essa diferença deve-se à necessidade de uma maior velocidade no acionamento intermitente dos LED.

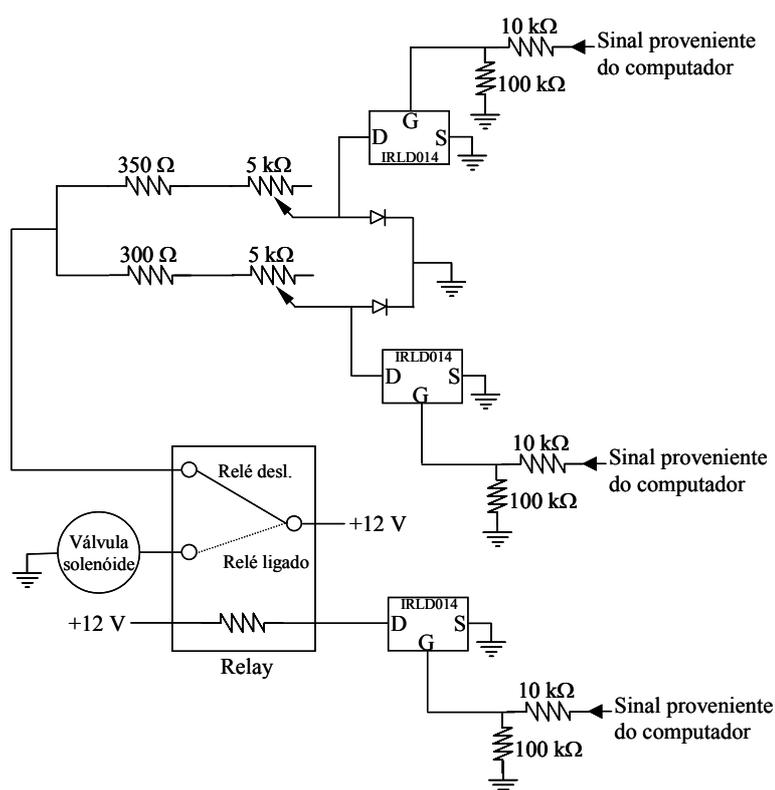


Figura 4.3 - Interface de potência utilizando transistor de efeito de campo

Para a detecção da variação da luz transmitida, foi utilizado o fotodiodo OPT 301. Para a amplificação do sinal gerado por esse fotodetector, foi construído o circuito da Figura 4.4. É interessante salientar que o fotodiodo foi colocado dentro de um tubo de cobre para diminuir indução de ruídos externos,

e por esse mesmo motivo, todos os componentes foram montados em um único circuito impresso.

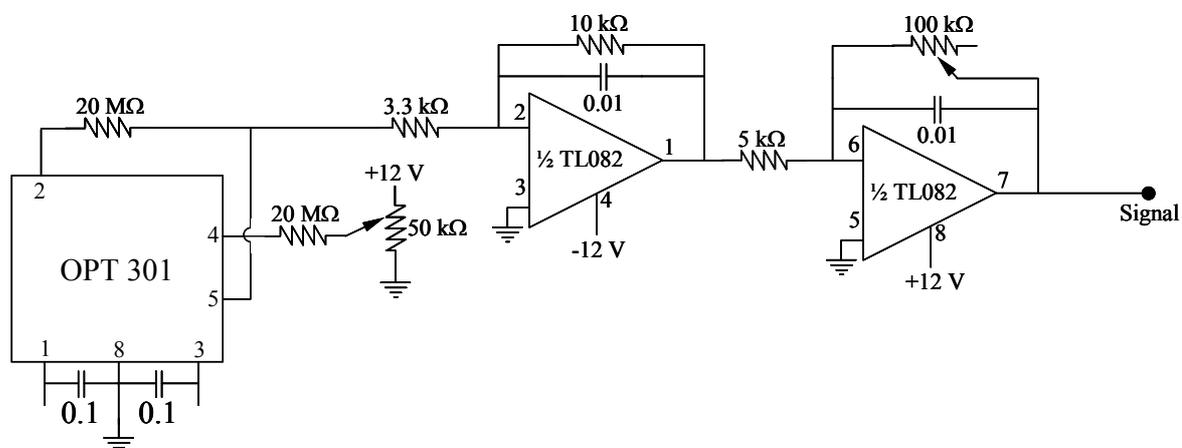


Figura 4.4 - Circuito eletrônico de amplificação do sinal gerado pelo fotodiodo.

4.2.3. Geração dos padrões gasosos de NO_2 .

Para gerar os padrões gasosos de NO_2 , foi utilizado um tubo de permeação. Tubos de permeação são tubos poliméricos ou tubo de metais contendo uma membrana polimérica que contém na fase líquida a espécie de interesse.⁷⁵ O gás difunde através da membrana polimérica a uma taxa constante, denominada de taxa de permeação. A partir desse aspecto, foi possível a obtenção de padrões gasosos mediante a passagem de um gás de arraste, idealmente livre da espécie de interesse, com diferentes vazões.⁷⁶

Para a construção do tubo de permeação contendo NO_2 foi utilizado um tubo de aço inoxidável com uma membrana de Teflon com 1 mm de espessura. Inicialmente, o tubo, previamente pesado, foi colocado em um banho de acetona com gelo seco para liquefazer o NO_2 puro proveniente de um cilindro. Depois de liquefeito uma quantidade satisfatória de NO_2 , o tubo foi fechado e sua massa determinada para quantificação de NO_2 liquefeito no tubo. A massa do tubo foi determinada, semanalmente, para cálculo da taxa de permeação.

Na Figura 4.5 encontra-se o sistema para a geração de padrões gasosos de NO_2 . Como a taxa de permeação depende da temperatura, o tubo de permeação foi mantido em um banho de temperatura controlada. De acordo com o esquema

da figura, ar ambiente foi previamente purificado por colunas contendo sílica gel e carvão ativado. Em seguida, o ar purificado foi dividido em duas porções: uma para arrastar o NO₂ proveniente do tubo de permeação e outra para ser utilizado como diluente. As vazões eram mantidas por um controlador de fluxo (MF) e a concentração de NO₂, na saída do sistema, foi calculada de acordo com a Equação 3.2.

$$C \text{ (ppbv)} = [(P/MW) * 22.4] / (F_n + F_d) \dots \dots \dots \text{Equação 4.2}$$

Onde C é a concentração de NO₂ no gás, P é a taxa de permeação, MW é o peso molecular, F_n é a vazão do gás de arraste e F_d é a vazão do gás diluente.

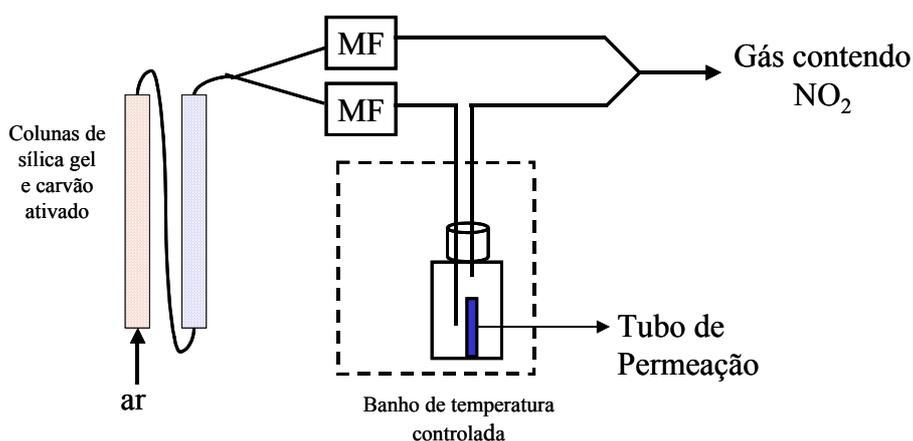


Figura 4.5 - Sistema para geração de padrões gasosos de NO₂. MF = controlador de fluxo.

4.2.4. Reagentes e soluções

Solução absorvente: em um balão de 100 mL foram adicionados 0,5 g de ácido sulfanílico, 5 mL de ácido acético glacial e 5 mg de N-(1-Naftil)-Etilenodiamina dihidroclorato e água desionizada até completar o volume.

Solução estoque de Nitrito de sódio: 2,03 g de nitrito de sódio foram dissolvidos em água desionizada e em seguida o volume foi completado para 1 L.

4.2.5. Procedimento experimental

O ciclo analítico se iniciava com o a abertura da válvula solenóide (SV). Por meio da força da gravidade, o tubo poroso era preenchido com uma solução nova de reagente. Durante este período, os LED eram desligados para a medida do sinal de escuro, V_d da Equação 1. Após um determinado período de tempo, selecionado pelo operador, a válvula SV era desligada, interrompendo o fluxo do reagente. Os LEDs eram acionados, de forma alternada, para o monitoramento do composto colorido formado pela reação entre a solução de Griss-Saltzman e o NO_2 difundido através do tubo poroso. Durante o tempo de parada da solução do reagente, os sinais V_s e V_r eram registrados ao longo do tempo pelo computador para posterior cálculo da absorbância. Terminado o tempo de análise, também determinado pelo operador, a válvula SV era acionada, dando início a um novo ciclo analítico.

4.3. Resultados e Discussões

4.3.1. Preparação do tubo de permeação

Depois de preparado o tubo de permeação, de acordo com a diferença de massa, calculou-se que a quantidade condensada de NO_2 foi de 0,94096 g. O tubo então foi colocado no banho de temperatura controlada, a 30 °C, e foi permitida a passagem do gás de arraste a uma vazão de 0,2 SLPM (SLPM = L min^{-1} nas condições normais de temperatura e pressão). Depois de 24 horas, tempo esse suficiente para que atingisse o equilíbrio térmico no tubo, a massa do tubo foi novamente determinada. O valor obtido nesse experimento foi utilizado como massa inicial para os cálculos. Periodicamente (semanalmente), o tubo foi pesado, e a taxa de permeação foi determinada pelo coeficiente angular da curva obtida empregando a massa do tubo em função do tempo. Na Figura 4.6 é apresentado o gráfico, através do qual determinou-se uma taxa de permeação igual a 160 ng min^{-1} .

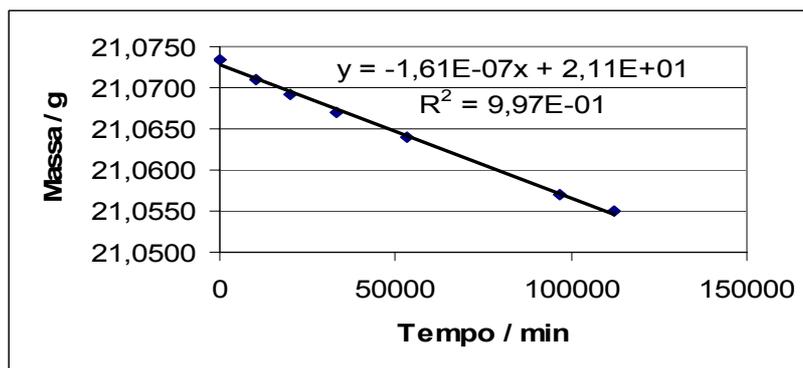


Figura 4.6 - Gráfico da determinação da massa do tubo de permeação em função do tempo.

Utilizando-se a Equação 4.2, a uma vazão de 0,2 SLPM, determinou-se uma concentração de NO_2 de 389 ppbv. Para efeito de comparação, a concentração de NO_2 presente no gás de arraste foi também determinada pelo método padrão de Griss-Saltzman,⁶⁶ utilizando um borbulhador. Por esse método, determinou-se uma concentração de 383 ppbv de NO_2 para o gás de arraste bombeado à mesma vazão.

4.3.2. Escolha da fonte de radiação.

Na Figura 4.7, são apresentados os espectros de absorção do reagente de Griss-Saltzman puro e misturado com nitrito de sódio. Também na figura, encontra-se o espectro de emissão dos LEDs de 536, 410 e 840 nm. O branco do reagente não possui absorbância significativa acima de 400 nm. Com a adição de NO_2^- , que forma o mesmo produto que a reação de NO_2 , observa-se uma banda de absorção com máximo em 540 nm. Ainda considerando a Figura 4.7, é possível observar que a banda de emissão do LED verde ($\lambda_{\text{max}} = 536 \text{ nm}$) mostra uma excelente sobreposição sobre a banda de absorção do produto colorido. Como o produto da reação estudada não absorve radiação acima de 650 nm, o LED de 840 nm torna-se ideal para ser usado como fonte de radiação de referência. Esse segundo comprimento de onda é importante para correção e compensação de problemas como microbolhas no percurso óptico, vibrações, etc.

Para os experimentos iniciais, o LED de 840 nm foi utilizado como referência. Porém, devido à perda de água por evaporação/difusão da solução de reagente contida no tubo, um alto sinal de branco foi observado, isso, devido ao aumento da concentração do reagente. É importante ressaltar que, no ambiente do laboratório, este efeito não foi significativo, pois os padrões gasosos tinham sempre o mesmo valor de umidade. Porém, em uma análise de campo, esse efeito deve ser considerado como um possível problema para não se obter falsas concentrações de NO_2 .

Para compensar e/ou minimizar este efeito, foi utilizado como fonte de radiação de referência um LED com máximo de emissão em 410 nm. Nesse comprimento de onda, o valor de absorbância não muda significativamente em função da concentração de nitrito (Figura 4.7). No entanto, toda mudança de absorbância que ocorrer para a região de 536 nm, que não seja a reação de formação do composto colorido, ocorrerá para a região de 410 nm. Complementando isso, quando empregando o LED de 410 nm como referência, mediante o aumento da absorbância causada pela evaporação de água, os valores obtidos serão corrigidos utilizando a Equação 4.1.

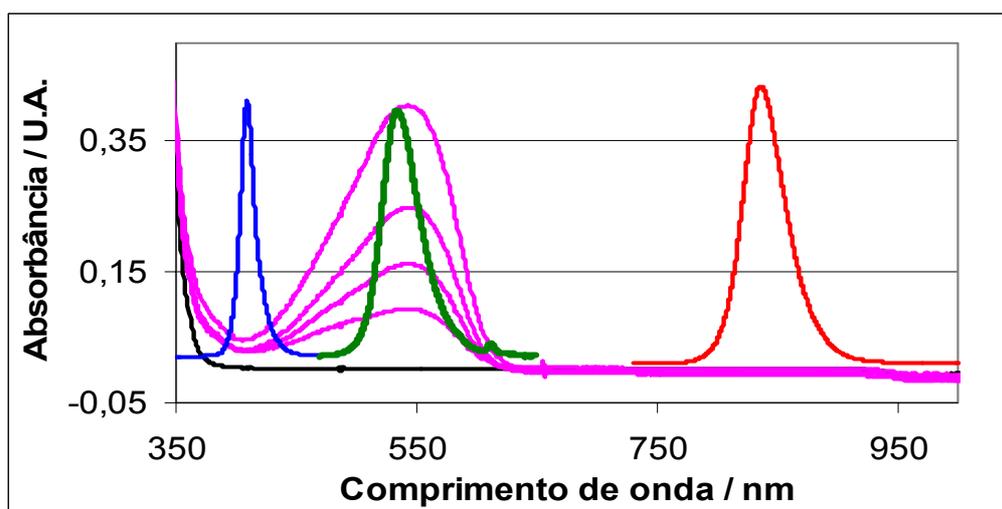


Figura 4.7 - Espectros. Linha preta é o espectro de absorbância do reagente de Griss-Saltzman. Linhas rosas são os espectros de absorbância do reagente de Griss-Saltzman com nitrito de sódio nas concentrações 0, 2, 4, 6 e 10 mmol L^{-1} . Linhas azul, verde e vermelha são, respectivamente, o espectro de emissão do LED de 410 nm, 536 nm e 840 nm.

4.3.3. Avaliação do espectrofotômetro de LED.

Para avaliar o desempenho do detector, foram utilizadas soluções de referência preparadas a partir de nitrito de sódio. Utilizando uma bomba peristáltica e um injetor proporcional foi montado um sistema de análise por injeção em fluxo em linha única. Foi utilizado o próprio reagente como a solução transportadora e, as soluções de nitrito foram injetadas no sistema. Como o intuito era de apenas avaliar o detector, variáveis como vazão da solução transportadora, bobina de reação e comprimento da alça de amostragem foram arbitrariamente selecionados. Na Figura 4.8 é apresentado o resultado obtido nesse estudo, e é possível constatar que o detector pode ser utilizado para o monitoramento da reação de Griss.

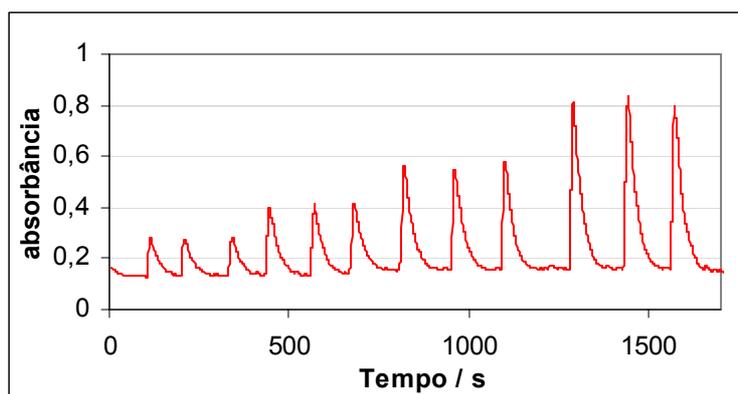


Figura 4.8 - Sinal transiente de soluções de nitrito de sódio utilizando o espectrofotômetro LED desenvolvido. Da esquerda para direita 2, 4, 6 e 10,0 mmol L⁻¹ de nitrito de sódio. Absorbância calculada de acordo com a Equação 4.1. LED de referência = 840 nm.

4.3.4. Determinação de NO₂

Inicialmente, o detector de NO₂ foi construído utilizando o tubo de polipropileno Acurel PP®. Porém, à medida que o tempo de parada de fluxo aumentava, ocorria uma deposição do reagente na parede interna do tubo, limitando assim sua capacidade de transmitir luz. Isso era observado após 5 minutos de parada do fluxo do reagente. Para contornar esse efeito, foi adicionado um tenso ativo (Zonyl FSN) ao reagente. Contudo, ao utilizar essa

solução, o tubo perdeu completamente a capacidade de transmitir luz. Isso devido à penetração das moléculas do tenso ativo nos poros da membrana, que, como conseqüência, aumentou o índice de refração do tubo, até perda completa da capacidade de transmitir luz.

Foi observado o mesmo efeito de deposição do reagente nas paredes internas quando foi testado o tubo Poreflon®. Porém, deve ser ressaltado que isso só era observado para tempos de parada de fluxo superiores a 30 minutos, o que possibilitou a utilização desse material para análises com intervalos de tempo inferiores à aqueles. Outra vantagem, é a etapa de limpeza do reagente aderido em suas paredes empregando água, lembrando que para o tubo Acurrel® foi necessário a utilização de metanol.

Um dos fatores que afetam a sensibilidade é o comprimento do tubo.⁷³ À medida que há aumento no comprimento do tubo maior é a sensibilidade, isso, devido ao aumento do percurso óptico e da área de transferência de massa pela difusão gasosa. Porém, como o tubo utilizado não é propriamente dito um guia de onda, como o teflon AF®, quanto maior o comprimento do tubo menor será a quantidade de luz que chegará ao detector. Dos LEDs utilizados o que tinha menor luminosidade era o lede verde (536 nm), portanto, o aumento do comprimento do tubo ficou limitado a esse LED. Até 6 cm de tubo foi possível obter uma transmissão de luz em quantidade satisfatória. Acima de 6 cm, a quantidade de luz que chegava ao detector não tinha intensidade suficiente e, dessa forma, comprometia a precisão dos resultados. Modificando o tipo de fonte de reação, maiores comprimentos de tubos poderiam ser utilizados, porém, como o objetivo do trabalho era a construção de um instrumento portátil, miniaturizado e de baixo custo, buscou-se outra forma para aumentar a sensibilidade do método proposto.

Outro fator que afeta a sensibilidade é o tempo de análise, ou seja, o tempo que é permitido para o reagente ficar na cela de fluxo. Quanto maior o tempo maior será a quantidade de NO₂ absorvida pelo reagente e,

consequentemente, maior será o tempo de reação. Fator esse muito importante, visto que se trata de uma reação de cinética lenta, 15 min seriam necessários para completar a reação.^{63,66}

Depois de constatada a possibilidade de utilização do sistema analítico para determinação de NO₂, foi estudado o efeito do tempo de análise. Na Tabela 4.1 encontram-se os resultados obtidos variando-se o tempo entre 5 e 30 minutos. Os resultados também podem ser observados na Figura 4.9, onde é mostrado um registro típico para concentração de NO₂ entre 5,0 e 40 ppbv para um tempo de análise de 15 minutos. Na Figura 4.10, é mostrado o registro para um tempo de análise de 20 minutos. Nessa mesma figura é possível observar a capacidade do sistema em distinguir pequenas diferenças de concentrações de NO₂ (4,7; 6,2 e 9,2 ppbv). A repetibilidade das medidas é possível ser observada na Figura 4.11, onde é mostrada várias determinações do branco e do padrão gasoso de 5,0 ppbv.

Tabela 4.1 - Características analíticas em função do tempo de análise.

| Tempo de análise (min) | Equação da reta $y = ax + b$ | Faixa de concentração (ppbv) | Coefficiente de correlação linear. (R) | Limite de detecção (ppbv) |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|--|---------------------------|
| 5 | $y = 0,005x + 0,010$ | 5,0 – 40,0 | 0,9992 | 0,6 |
| 10 | $y = 0,010x + 0,029$ | 5,0 – 40,0 | 0,9999 | 0,5 |
| 15 | $y = 0,022x + 0,037$ | 4,7 – 9,3 | 0,999 | 0,3 |
| 15 | $y = 0,019x - 0,014$ | 5,0 – 40,0 | 0,998 | 0,3 |
| 20 | $y = 0,030x + 0,061$ | 4,7 – 9,3 | 0,998 | 0,2 |
| 25 | $y = 0,038x + 0,096$ | 4,7 – 9,3 | 0,9997 | 0,2 |
| 30 | $y = 0,047x + 0,129$ | 4,7 – 9,3 | 0,9998 | 0,2 |

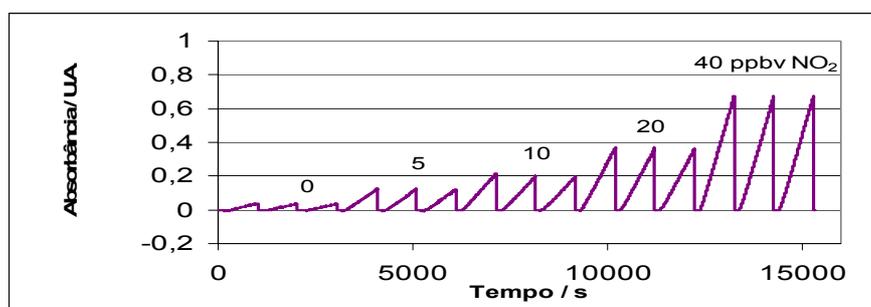


Figura 4.9 - Registro típico dos sinais transientes obtidos com padrões gasosos de NO₂. Tempo de análise = 15 min. LED de referência = 840 nm.

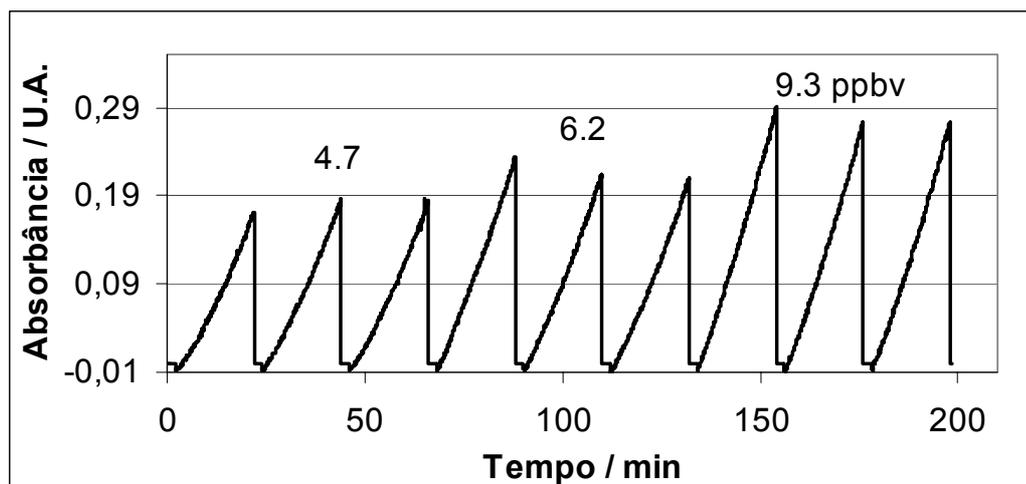


Figura 4.10 - Registro típico dos sinais transientes obtidos com padrões gasosos de NO₂. Tempo de análise = 20 min. LED de referência = 840 nm.

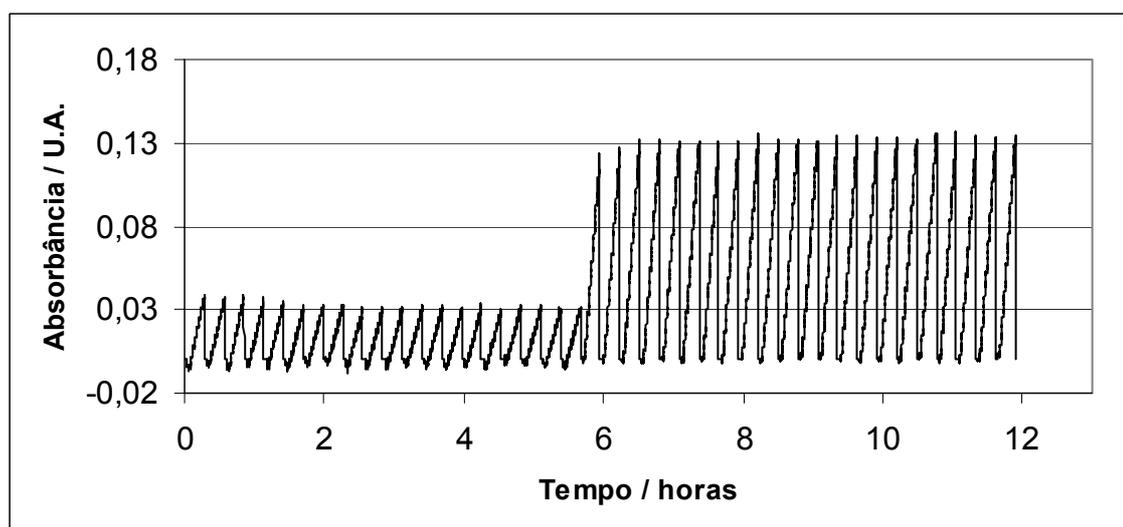


Figura 4.11 - Registro típico dos sinais transientes para repetidas determinações do branco e 5 ppbv de NO₂. Tempo de análise = 15 min. LED de referência = 840 nm.

Nota-se na Tabela 4.1 que apesar do aumento do coeficiente angular com o aumento do tempo de análise, o limite de detecção não diminui na mesma proporção. Nesse caso, quanto maior o tempo de análise maior também é o desvio padrão relativo das 20 medidas do branco (ar com ausência de NO₂). Portanto, levando em consideração o compromisso entre sensibilidade e frequência analítica, para os experimentos seguintes, foi adotado um tempo de análise de 10 minutos. Com o sistema, foi obtido um desvio padrão relativo igual a 2,4 % para 20 medidas de um padrão gasoso de 5,0 ppbv de NO₂ e

devido ao baixo limite de detecção obtido o sistema mostrou-se adequado para o monitoramento de NO_2 na atmosfera. O sistema proposto apresentou ainda um baixo consumo de reagente, em função do baixo volume da cela de fluxo, aproximadamente $50 \mu\text{L}$.

Porém, quando utilizando o LED de 840 nm como fonte de radiação de referência, o sistema ficou susceptível à variação de umidade do ar atmosférico. Quanto mais seco o ar amostrado pelo “cooler” maior será a evaporação de água do reagente e, portanto, maior será o acréscimo de sinal devido ao aumento da concentração de reagente. Para corrigir essa interferência, utilizou-se como fonte de radiação de referência um LED com máximo de emissão em 410 nm. Nessa região do espectro a absorbância do reagente de Griss-Saltzman muda muito pouco em função da concentração de NO_2 (ou nitrito), porém, acompanha as mudanças que ocorrem na região de 536 nm, que não são provenientes da formação do composto colorido. Com a estratégia adotada, o aumento na concentração do reagente, devido à evaporação de água, será corrigida pelo LED de referência, assim como as perturbações físicas tais como vibrações e formação de microbolhas.

Para avaliar a eficiência dessa estratégia, para corrigir o sinal devido à evaporação de água, foram realizadas determinações de NO_2 com ar saturado com H_2O e com ar seco. Para gerar o ar saturado, o gás diluente foi borbulhado em um frasco contendo água antes de confluir com o gás vindo do tubo de permeação.

Na Figura 4.12 é mostrado um resumo dos resultados obtidos quando utilizando ar saturado e ar seco. Na figura, é mostrada a resposta do detector para o branco e para concentrações entre 5,0, 10,0 e 20,0 ppbv. O traço preto representa a absorbância calculada da forma tradicional (Equação 4.3 abaixo) para o ar seco. O traço rosa idem, porém, para o ar saturado com H_2O . Observa-se para essa última situação que quase não existe sinal do branco, pois não há a evaporação de água do reagente. Observa-se também que os sinais obtidos com

o ar seco são maiores do que aqueles obtidos com o ar saturado, resultando em falsas medidas de concentração. Ainda na Figura 4.12 encontram-se os traços azul e vermelho, que correspondem a absorbância calculada com a Equação 4.1 utilizando ar seco e ar saturado, respectivamente. É importante observar na figura que não há diferenças significativas entre traços azul e vermelho. Também quando comparado com o traço rosa (resultado obtido utilizando ar saturado com H₂O), os traços azul e vermelho não apresentaram diferenças significativas. Esses resultados mostram que a estratégia adotada para corrigir a flutuação do sinal em função da umidade do ar foi eficiente.

$$\text{Absorbância} = \text{Log} [(V_a - V_d)/(V_s - V_d)] \dots \dots \dots \text{Equação 4.3}$$

onde V_s = sinal de resposta do fotodiodo com o reagente na cela de fluxo, V_a = sinal de resposta do fotodiodo com água na cela de fluxo e V_d sinal de resposta do fotodiodo com o LED desligado.

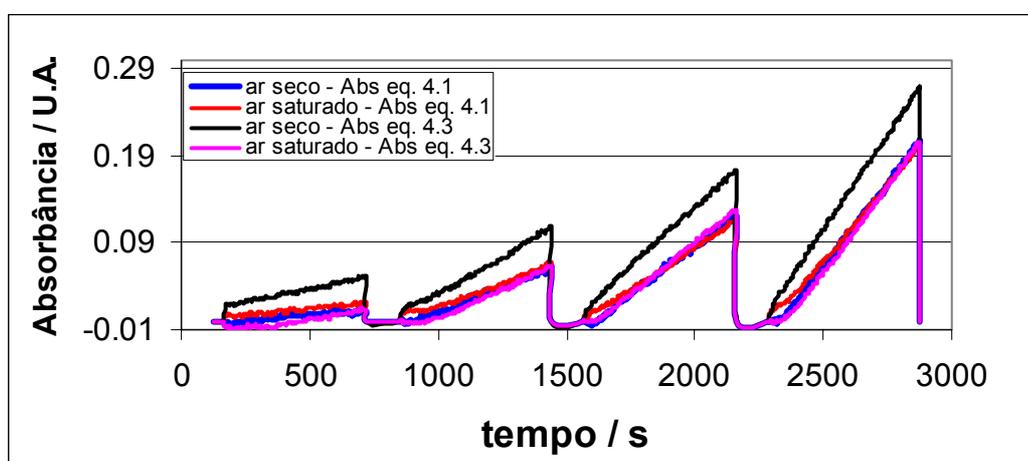


Figura 4.12 - Sinais obtidos com branco, 5, 10 e 20 ppbv NO₂. Traços preto e rosa correspondem a absorbância calculada de acordo com a equação 4.3 utilizando, respectivamente ar seco e saturado com H₂O. Traços azul e vermelho correspondem a absorbância calculada de acordo com a equação 4.1 utilizando, respectivamente ar seco e saturado com H₂O.

Uma vez definida a estratégia de compensação da evaporação de água do reagente, calcularam-se as figuras de mérito do sistema. O sistema de detecção de NO₂ foi operado continuamente durante 7 dias. Durante esse período, utilizando os padrões gasosos, foram construídas 4 curvas analíticas, em

intervalos de 48 horas. Na Figura 4.13, é apresentado o registro típico de uma dessas curvas. Na Tabela 4.2 encontram-se as equações da regressão linear bem como o coeficiente de correlação linear obtido para cada curva. Através das equações da reta é possível observar a estabilidade do sistema, visto que há pouca diferença entre os coeficientes. De acordo com esses resultados, o sistema é eficiente por longos períodos de tempo.

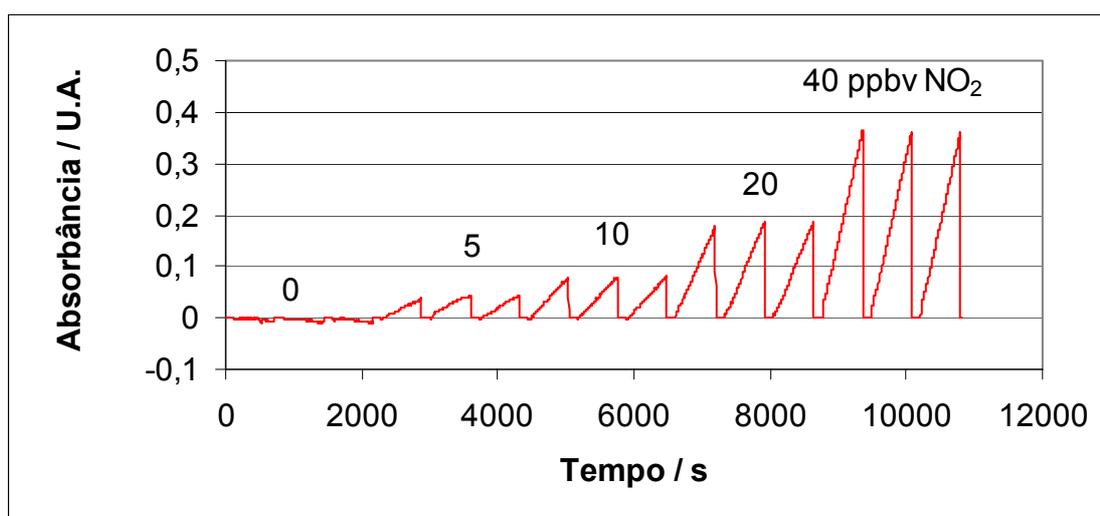


Figura 4.13 - Registro típico dos sinais transientes obtidos com padrões gasosos de NO₂. Tempo de análise = 10 min. LED de referência = 410 nm.

Tabela 4.2 - Curvas analíticas.

| Curva | Equação da reta $y = ax + b$ | Coefficiente de correlação linear |
|-------|---------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | $y = 0,0088x - 0,009$ | 0,998 |
| 2 | $y = 0,0093x - 0,008$ | 0,9997 |
| 3 | $y = 0,0092x - 0,006$ | 0,997 |
| 4 | $y = 0,0095x - 0,007$ | 0,9992 |

Na Figura 4.14, são apresentados os resultados de várias medidas do branco e 5,0 ppbv de NO₂, demonstrando a repetibilidade do sistema. Na Figura 4.15, também são mostradas repetições para a determinação de 5 ppbv de NO₂, porém, para uma frequência de amostragem menor do que aquela apresentada na Figura 4.14, mostrando a versatilidade do programa de controle, que pode ser adaptado de acordo com as necessidades analíticas.

Com o LED de 410 nm como fonte de radiação de referência, o sistema de detecção de NO_2 apresentou um desvio padrão relativo da ordem de 5 % para gases com concentração de 5,0 ppbv de NO_2 e limite de detecção igual a 0,5 ppbv de NO_2 para um tempo de análise de 10 minutos.

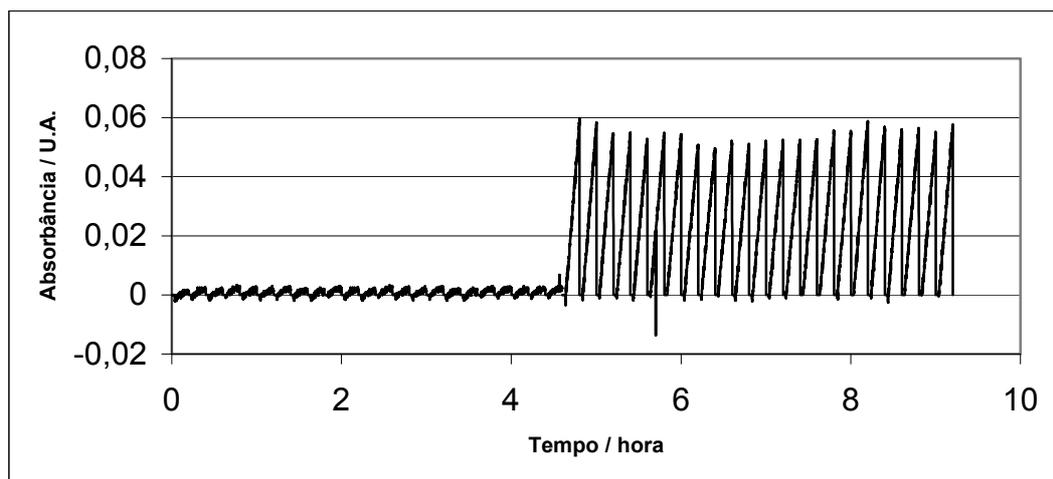


Figura 4.14 - Registro típico dos sinais transientes para repetidas determinações do branco e 5 ppbv de NO_2 . Tempo de análise = 10 min. LED de referência = 410 nm.

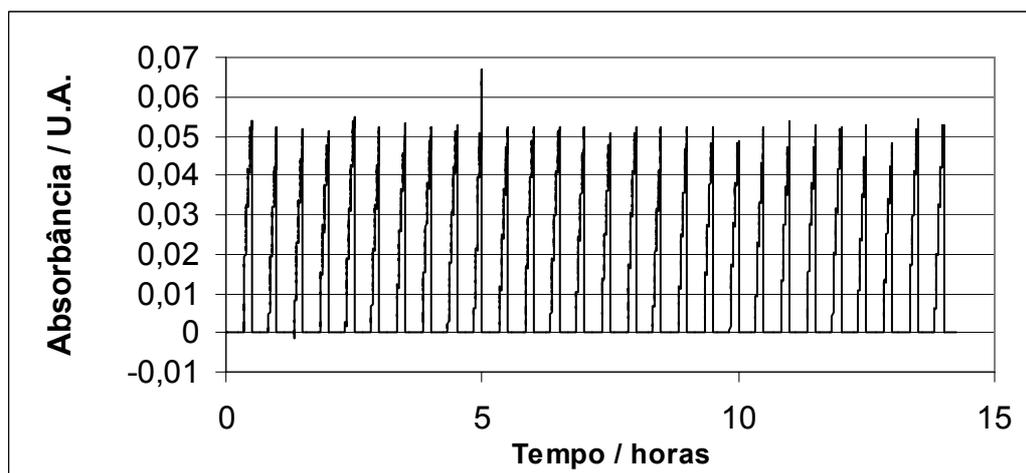


Figura 4.15 - Registro típico dos sinais transientes para repetidas determinações de 5 ppbv de NO_2 . Tempo de análise = 10 min a cada 20 min de intervalo. LED de referência = 410 nm.

4.4. Conclusões

Nesta etapa do trabalho, foi desenvolvido um mini-dispositivo automático para a determinação de NO_2 na atmosfera. A detecção baseou-se na reação colorimétrica de Griss-Saltzman e para mensuração do produto colorido foi construído um fotômetro utilizando LEDs (Light Emitting Diode). O instrumento é compreendido de um coletor de gases, cela de fluxo, fonte de radiação e fotodetector e todos os componentes foram condicionados na mesma unidade, que resultou em um instrumento compacto. Além disso, o sistema analítico, com dimensões reduzidas, teve ainda como vantagem o baixo consumo de reagente. Nesse caso, evidenciando que com a cela de fluxo de aproximadamente 50 μL , para garantir a ausência do efeito de memória (interferência causada pela amostra anterior), foram necessários apenas 100 μL da solução do reagente em cada ciclo analítico.

Deve ser considerado ainda que o sistema apresentou um baixo custo, pois não foram utilizados bomba peristáltica e espectrofotômetro comercial (equipamentos de maior custo em sistemas automáticos de análises químicas). Foram utilizados apenas componentes eletrônicos simples, baratos e de fácil aquisição, sendo o fotodiodo e a válvula solenóide os componentes de maior custo, ou seja, US\$ 10,00 e US\$ 50,00, respectivamente.

Deve-se ainda ressaltar que o sistema analítico desenvolvido realiza automaticamente todas as etapas do procedimento de análises e pode ser operado por longos períodos de tempo (~ 168 horas) sem a necessidade de calibração ou de interferência do operador. Apesar das mudanças na capacidade do tubo poroso em transmitir de luz, devido à deposição do reagente nas paredes internas do tubo, o sistema analítico apresentou uma boa estabilidade devido à utilização de uma fonte de luz de referência, que corrigiu, além das perturbações físicas, a flutuação do sinal em função da evaporação de água.

CAPÍTULO 5. DETERMINAÇÃO DE L-ALANINA EM LINHA DE SÍNTESE UTILIZANDO REAÇÃO ENZIMÁTICA E DETECÇÃO QUIMILUMINESCENTE

5.1. Introdução

A determinação da quantidade e do tipo de aminoácido é extremamente importante no campo da medicina e da bioquímica, auxiliando no diagnóstico de desordem do metabolismo⁷⁷ e doenças degenerativas.⁷⁸ Recentemente, as determinações destas espécies químicas têm despertado interesse no campo da tecnologia de alimentos, visto que os aminoácidos são úteis para a determinação de propriedades nutricionais, e estão intimamente ligados às características sensoriais.⁷⁹ Nas áreas industriais e agro-industriais, a determinação de aminoácidos também tem sido explorada como meio de controle de qualidade de produtos,⁸⁰ sendo possível a identificação de contaminação bacteriológica, adulteração e tempo de prateleira em produtos derivados de leite.⁸¹

A cromatografia líquida de troca iônica e mais recentemente a cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de fase reversa, tem sido utilizada como principal técnica para separação e determinação de aminoácidos.⁸² Porém, aminoácidos não são facilmente detectados diretamente por meio de técnicas espectrofotométricas, pois a maioria dos aminoácidos absorve radiação eletromagnética na região ultravioleta, entre 220 e 254 nm. Em vista disso, é necessário o emprego de técnicas de derivatização, “pre-column” ou “post-column” para a detecção espectrofotométrica ou espectrofluorimétrica de baixas concentrações.⁸³ Um dos métodos mais tradicionais, que utiliza a derivatização “post-column”, se baseia na reação com ninidrina.⁸⁴ O produto resultante dessa reação apresenta uma coloração azul intensa. Apesar de sensível, esse método apresenta uma série de desvantagens, por exemplo,

interferência causada pela amônia e por aminas primárias, o que resulta em altos valores de branco.⁸²

Outros reagentes têm sido sugeridos para a derivatização dos aminoácidos pré ou post-column,⁸⁴ e dentre eles estão o ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), o ortoftaldialdeído (OPA), a fluorescamina, o fenilisotiocianato (PTC), etc. Embora apresentem uma melhor sensibilidade em relação aos métodos sem derivatização, estes têm como desvantagens longo tempo para a determinação e/ou alto custo dos reagentes.⁸⁵

A cromatografia em fase gasosa também tem sido empregada para a determinação de aminoácidos,⁸⁴ porém, são necessárias etapas de isolamento dos aminoácidos e de derivatização para a produção de seus derivados voláteis. Com a proposta da eletroforese capilar, muitos trabalhos foram desenvolvidos utilizando esta técnica para a determinação de aminoácido.⁸⁶

Excluindo os métodos citados acima, para a determinação espectrofotométrica de um aminoácido em uma mistura complexa, alguns procedimentos descritos na literatura se baseiam em reações específicas com o aminoácido alvo, para produzir um composto que possa ser detectado.⁸⁷ Entretanto, são necessárias várias etapas de processamento da amostra, tornando esses métodos muito morosos.

Recentemente, aminoácidos contendo grupos sulfídricos, como a cisteína e a metionina, foram determinados indiretamente com a cloramina-T. O método se baseia, na primeira etapa, na oxidação dos aminoácidos pela cloramina-T. Posteriormente, o excesso de reagente remanescente era determinado, considerando como sinal analítico a diminuição da concentração da cloramina-T.⁸⁸ Para a determinação da cloramina-T, foi utilizada a reação em solução ácida de iodeto, produzindo o íon tri-iodeto, detectado amperometricamente. O sistema foi aplicado para formulações farmacêuticas e veterinárias e apresentou como características analíticas limite de detecção de 0,06 mg L⁻¹ para cisteína e

0,1 mg L⁻¹ para metionina, coeficiente de variação menor que 1,1 % e uma frequência analítica de 220 determinações por hora.

Os métodos baseados na diminuição da atividade catalítica de um íon metálico na presença de aminoácidos têm sido propostos, os quais utilizam tanto técnicas de detecção espectrofotométrica⁸⁹ como quimiluminescência.²⁸ Apesar de apresentarem boa sensibilidade, esses métodos não são seletivos, sendo portanto, empregados em análises em fluxo para a determinação da concentração de aminoácido total,⁹⁰ ou como detecção “post-column” em cromatografia líquida²⁸ e eletroforese capilar.^{91,92}

Aplicada a quimiluminescência, esta estratégia se baseia na supressão de radiação emitida pelo sistema luminol-H₂O₂ utilizando Cu(II), Co(II) ou outro metal de transição como catalisador. Devido ao fato do catalisador complexado não induzir a reação de quimiluminescência como o metal “livre”, um sinal negativo era gerado devido à supressão de luz, quando um aminoácido, ou qualquer outro complexante, fosse injetado no fluxo transportador. Esta estratégia foi, inicialmente, utilizada em 1975 para a determinação de aminoácido total,²⁸ depois em 1985 empregando HPLC²⁸ e mais recentemente, 1996 e 1998 empregando a eletroforese capilar.^{91,92} É interessante destacar que, devido à diferença entre as constantes de formação do complexo entre o metal e cada aminoácido, diferentes limites de detecção e sensibilidades foram obtidas.²⁸

Também, explorando a supressão na emissão de luz, YANG *et al.*⁹³ utilizaram a interferência causada pelos aminoácidos no sistema quimiluminescente luminol-BrO⁻, como forma de detecção indireta de aminoácidos. Em meio alcalino, o BrO⁻ reagia com o luminol gerando uma intensa luz azul. A presença de um aminoácido, ou qualquer substância que reagia com o BrO⁻ causando uma diminuição de sua concentração, diminuía a luz emitida na reação de quimiluminescência. A diferença na emissão de luz era, então, utilizada como sinal analítico. Devido a falta de seletividade, o método de

detecção foi utilizado em um sistema de eletroforese capilar para determinações de aminoácidos em formulações farmacêuticas.

Uma forma de detecção direta de aminoácido por quimiluminescência⁴⁸ foi obtida empregando-se a reação com o tris(2,2'-bipiridil)rutênio(II) ($\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$). Esse composto emite uma luz de cor alaranjada brilhante quando oxidado em meio ácido, passando para a forma $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$, e subsequente redução com hidróxido de sódio concentrado ou hidrazina,⁴⁶ por exemplo. A forma reduzida excitada é responsável pela emissão da radiação. Na Figura 5.1 encontra-se um esquema simplificado da reação deste composto com aminoácidos.



Figura 5.1 - Esquema simplificado da reação entre aminoácido e $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$. Ref.48.

Além de aminoácidos, com este sistema de quimiluminescência, é possível também determinar diretamente compostos orgânicos que reduzam a forma $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$, como por exemplo, ácidos carboxílicos.⁴⁸ Esta característica é extremamente vantajosa, e tem sido utilizada como meio de detecção em cromatografia líquida.

Porém, devido à instabilidade do complexo $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$, o mesmo deve ser gerado imediatamente antes da análise, ou gerado em linha, para cromatografia líquida ou análise por injeção em fluxo. No caso citado acima, a oxidação do complexo em linha foi realizada por via eletroquímica,⁴⁸ com o acoplamento dos eletrodos na cela de fluxo, o que melhorou a sensibilidade do método, pois a luminescência só era gerada na cela de detecção.

Ainda em relação à quimiluminescência, o reagente N-bromosuccinimida (NBS) em meio alcalino foi utilizado para determinação de amino-compostos.⁹⁴ A reação é intensificada na presença de aldeídos, porém, foi observado que ácido húmico intensificava seletivamente a reação de NBS com glicina, teonina e arginina. A reação de quimiluminescência foi empregada em sistemas de análises em fluxo e aplicada para determinação desses três aminoácidos em formulações farmacêuticas. O sistema analítico mostrou-se rápido e simples, podendo ser analisadas 115 amostras por hora.

Recentemente, COSTIN *et al.*⁹⁵ estudaram os melhores reagentes de quimiluminescência e as melhores condições experimentais para a determinação seletiva de prolina, tirosina, fenilalanina e triptofano, utilizando sistemas de análises em fluxo. Segundo os autores, prolina foi o único aminoácido a emitir radiação na reação com tris(2,2'-bipiridil)rutênio(III), enquanto que a histidina catalisava seletivamente a reação entre luminol e Mn(II). Permanganato de potássio reagiu seletivamente com tirosina em pH 6,75. Utilizando uma coluna de C18, foi possível determinar simultaneamente fenilalanina e triptofano com a reação de quimiluminescência envolvendo Cu(II)-aminoácido e peróxido de hidrogênio. Todos os métodos apresentaram um coeficiente de variação melhor que 5 % e foi possível a determinação seletiva de cada aminoácido citado acima em uma mistura sintética de 20 aminoácidos.

Atualmente os métodos analíticos baseados em reações enzimáticas têm despertado grande interesse, especialmente devido à alta seletividade. Esses métodos, na maioria das vezes, são baseados em enzimas específicas, que resultam em um produto que pode ser facilmente determinado. Geralmente, são utilizadas as enzimas do tipo oxidase, que apresentam alta estabilidade, longo tempo de vida útil e não necessitam de coenzimas ou cofatores, como é o caso das enzimas do tipo desidrogenase.⁹⁶ O principal produto da reação do substrato com sua respectiva oxidase é o peróxido de hidrogênio, o qual pode ser determinado utilizando diversas técnicas de detecção:^{79,82} potenciometria;

amperometria; espectrofotometria; fluorimetria e quimiluminescência. Aliado ao processo de análises por injeção em fluxo, os métodos enzimáticos apresentam ainda como vantagens, alta frequência analítica e alta sensibilidade.⁵⁸

Porém, no caso da determinação de aminoácidos, ainda não foi encontrada uma enzima específica para cada espécie, sendo utilizada uma enzima que reage com o maior número de aminoácidos, a *L*- ou *D*- aminoácido oxidase,^{81,97} e são encontradas na maioria dos trabalhos envolvendo aminoácidos. Essas oxidases, abreviadas aqui de *L*-AAOX e *D*-AAOX, são flavoproteínas, que catalisam a oxidação de um aminoácido formando entre outros produtos,⁹⁸ NH_4^+ e H_2O_2 . Na Figura 5.2 é mostrado um esquema simplificado desta reação.

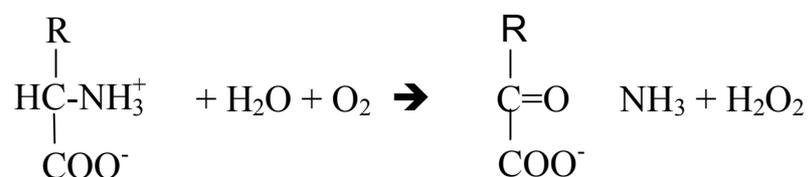


Figura 5.2 - Esquema simplificado da oxidação de um aminoácido catalisada pela AAOX. Ref. 99.

Na verdade, a reação da Figura 5.2 ocorre em duas etapas. Na primeira, ocorre a redução da enzima pelo aminoácido e na segunda, a reoxidação da enzima pelo oxigênio molecular. Na presença de baixas concentrações de oxigênio ou altas concentrações de aminoácido, a enzima reduzida, na primeira etapa, pode reagir com mais de um aminoácido, para depois ser oxidada lentamente pelo oxigênio.⁹⁹

Na Tabela 5.1, são mostrados os valores de atividade relativa da enzima *L*-AAOX para diferentes aminoácidos, em relação à *L*-fenilalanina, obtidas com um sistema para detecção do H_2O_2 formado por quimiluminescência. Como pode ser observado, a maior desvantagem da utilização de AAOXs não específica é que, dependendo do aminoácido, diferentes atividades serão obtidas, o que impossibilita a determinação de aminoácidos totais.⁸¹ Portanto, a maioria dos trabalhos que utilizam tanto a *L*-AAOX como *D*-AAOX tem como finalidade a determinação da razão *L*-aminoácido/*D*-aminoácido (indicador de

contaminação bacteriológica),⁸¹ o monitoramento de fermentações (produção de queijo, por exemplo),¹⁰⁰ como detector em cromatografia líquida¹⁰¹ ou outro método de separação.⁹⁷

Tabela 5.1 - Atividade relativa da enzima *L*-AAOX para diferentes *L*-aminoácidos, usando *L*-fenilalanina como referência.

| Substrato | Atividade Relativa ^a (%) |
|--------------------------|-------------------------------------|
| <i>L</i> -leucina | 153,6 |
| <i>L</i> -arginina | 134,8 |
| <i>L</i> -fenilalanina | 100,0 |
| <i>L</i> -isoleucina | 88,4 |
| <i>L</i> -metionina | 79,7 |
| <i>L</i> -lisina | 56,5 |
| <i>L</i> -valina | 42,0 |
| <i>L</i> -triptofano | 31,3 |
| <i>L</i> -asparagina | 28,4 |
| <i>L</i> -histidina | 14,8 |
| <i>L</i> -cisteína | 13,9 |
| <i>L</i> -tionina | 2,1 |
| Glicina | 1,6 |
| <i>L</i> -serina | 0,8 |
| <i>L</i> -prolina | 0,0 ^b |
| <i>L</i> -hidroxiprolina | 0,0 ^b |
| <i>L</i> -aspartato | 0,0 ^b |
| <i>L</i> -glutamato | 0,0 ^b |

^a - Condições de reação: 25 mL de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de substrato para 0,21 unidade de enzima;

^b - não foi observada atividade por quimiluminescência .

Dentre os trabalhos encontrados na literatura que empregam a *L*-AAOX para a oxidação de aminoácidos, todos utilizam a enzima de forma imobilizada. Dessa forma, a enzima pode ser reutilizada várias vezes. A técnica de imobilização utilizada na maioria dos trabalhos é a imobilização covalente. Esta técnica consiste em ligar um aminoácido não essencial da estrutura da enzima em um suporte ativado como, por exemplo, celulose, polímeros sintéticos ou vidro.¹⁰² Segundo MOTTOLA,¹⁰² esta é a técnica de imobilização mais utilizada em sistemas de análise em fluxo.

Quanto à técnica de detecção dos produtos da reação enzimática, foram utilizadas: detecção amperométrica,⁸¹ detecção potenciométrica¹⁰³ com eletrodo sensível a NH₃; detecção potenciométrica¹⁰⁴ com eletrodo modificado sensível a NH₃; e detecção do H₂O₂ por quimiluminescência.¹⁰⁵

No caso específico de determinação de *L*-alanina, esse aminoácido tem sido seletivamente determinado através do emprego da enzima alanina desidrogenase. Como produto da reação enzimática obtém-se NH_3 em quantidade proporcional à concentração de *L*-alanina. Para a determinação da amônia foram empregadas diversas técnicas de detecção, tais como: amperométrica,¹⁰⁶ potenciométrica (com eletrodo sensível a amônia)¹⁰⁷ e espectrofotométrica.¹⁰⁸ Para essa última, foi utilizado um sistema de análises em fluxo empregando uma câmara de difusão gasosa. A amônia gerada na reação enzimática difundia para uma solução acceptora, onde era determinada utilizando o reagente *o*-ftaldeído (OPA). Essa última estratégia de detecção apresentou um limite de detecção $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ de *L*-alanina e uma frequência analítica de 15 determinações por hora. Porém apresentou como desvantagem uma severa interferência de amônia e a necessidade de utilizar um cofator NAD^+ para o desenvolvimento da reação enzimática.

Empregando enzimas do tipo desidrogenase, *L*-leucina foi seletivamente determinada com detecção quimiluminescente. O método se baseava, primeiramente, na reação do aminoácido com *L*-leucina desidrogenase na presença de NAD^+ , com a formação de NADH entre outros produtos. Em seguida, a partir da oxidação do NADH pela enzima NADH oxidase, era formado o peróxido de hidrogênio. O H_2O_2 formado, por sua vez, reagia com o luminol na presença da enzima peroxidase, emitindo luz proporcional à quantidade do aminoácido. As três enzimas eram imobilizadas juntas em suportes poliméricos que foram condicionados na cela de fluxo. O sistema de fluxo foi aplicado para amostras de plasma e apresentou uma frequência analítica de 25 amostras por hora e limite de detecção de 10 nM. A desvantagem deste procedimento é a necessidade de utilização de pelo menos duas enzimas para a produção de peróxido de hidrogênio, o que encarece o custo da determinação.

Visando facilitar o controle do processo de síntese de *L*-alanina nesta etapa do trabalho é proposto um procedimento analítico automático para a determinação deste aminoácido em linha de produção. Para a determinação de *L*-alanina foi utilizada a enzima *L*-aminoácido oxidase, devido as vantagens expostas nesta introdução. Para a detecção do peróxido de hidrogênio formado na reação de oxidação do aminoácido pela enzima, foi empregando a reação de quimiluminescência do luminol catalisada pelo hexacianoferrato de potássio.

5.2. Parte Experimental

5.2.1. Equipamentos

Além dos equipamentos descritos no capítulo 2 e do detector descrito no capítulo 3, para a montagem dos módulos de análises foram utilizados duas colunas 15 mm x 5 mm d.i. construídas em acrílico para condicionamento da resina aniônica forte AG1-X8 e da enzima imobilizada, esferas de vidro modificadas com aminopropil e banho com temperatura controlada Nova Técnica, NT 245.

5.2.2. Soluções

Solução tampão carbonato 0,2 mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 13,8 g de K₂CO₃ em 500 mL de água destilada, e ajustando-se o pH para 10,5 com solução 0,1 mol L⁻¹ de HCl.

Soluções de tampão fosfato com concentrações entre 0,01 e 0,3 mol L⁻¹ e com pH entre 7,0 e 8,0 foram preparadas a partir de uma solução estoque de 1,0 mol L⁻¹ de KH₂PO₄ e 1,0 mol L⁻¹ NaOH.

Soluções de tampão borato pH 8,5 e 9,0 foram preparados a partir de uma solução estoque de 0,1 mol L⁻¹ de H₃BO₃ e 0,1 mol L⁻¹ de NaOH.

Soluções 1,0 – 10 mmol L⁻¹ de luminol, foram preparadas dissolvendo-se de 0,035 a 0,350 g de 3-aminoftalidrazida (sigma) em solução tampão carbonato 0,2 mol L⁻¹ até o volume de 200 mL.

Soluções 10 - 100 mmol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆], foram preparadas dissolvendo-se 0,659 – 6,590 g deste sal em 200 mL de H₂O.

Soluções 0,01, 0,001 e 0,0001 mol L⁻¹ de ácido bromopropiônico foram preparadas a partir de uma solução 0,1 mol L⁻¹, a qual foi preparada dissolvendo-se 1,53 g em 100 mL de H₂O.

Solução estoque 1,0 mol L⁻¹ de *L*-alanina foi preparada dissolvendo-se 8,9 g de *L*-alanina (Merck) em 100 mL de H₂O. As soluções de referência foram preparadas a partir da solução estoque por diluições apropriadas em H₂O ou em 0,15 mol L⁻¹ de NaOH. Quando não estavam sendo utilizadas, as soluções eram conservadas sob refrigeração.

Solução estoque 1 x 10⁻² mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio foi preparada a partir de uma solução 30 % v/v (Merck). As soluções de referência 1 x 10⁻⁶ – 1 x 10⁻³ mol L⁻¹ de H₂O₂ foram preparadas a partir da solução estoque por diluições sucessivas. Quando não estavam sendo utilizadas, as soluções eram conservadas sob refrigeração.

Solução de glutaraldeído 2,5 % v/v foi preparado por adição de 2,5 mL de glutaraldeído 50 % (Merck) em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) até o volume de 50 mL.

5.2.3. Procedimento para imobilização da enzima *L*-aminoacido oxidase.

Para o desenvolvimento do procedimento e determinação de *L*-alanina, foi utilizada a enzima *L*-aminoacido oxidase, obtida do veneno da cobra **crotalus adamanteus** (cascavel americana). Nessa etapa, luvas e máscaras foram utilizadas para evitar o contato com o material biológico.

A enzima foi imobilizada de acordo com o procedimento descrito anteriormente por PUCHADES *et al.*¹⁰⁵ Em uma primeira etapa, 0,1 g de esferas de vidro de aminopropil (200-400 mesh) foram ativadas com 3 mL de uma solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v) em solução tampão fosfato pH 7,0. A mistura foi condicionada em um frasco, onde foi borbulhado argônio durante 30 minutos para remoção de oxigênio. Após esse intervalo de tempo, o frasco foi fechado, deixando a reação ocorrer por mais 30 minutos. Em seguida, as esferas de vidro foram lavadas com água destilada utilizando um filtro de vidro sinterizado. Na segunda etapa, foi misturado 3 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) com 10 mg da enzima e, posteriormente, essa mistura foi adicionada sobre as esferas ativadas. A mistura foi condicionada em um frasco colocado dentro de um banho de gelo e novamente para remoção de oxigênio, foi borbulhado argônio durante os primeiros 30 minutos. Em seguida, o frasco foi fechado e deixado na geladeira por 2,5 horas. Após este tempo, as esferas contendo a enzima imobilizada foram lavadas com tampão fosfato (pH 7,0) a 4 °C e colocadas em uma coluna de 1,5 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro interno. Quando não estava sendo utilizada, a coluna era mantida na geladeira a 4 °C.

5.2.4. Módulo de análise e Procedimento

Os experimentos iniciais para a determinação de *L*-alanina por quimiluminescência utilizando a enzima *L*-aminoácido oxidase imobilizada, foram realizados com o sistema mostrado na Figura 5.3. Nessa configuração, o injetor (I) está na posição de amostragem. Após o preenchimento da alça de amostragem (L), o injetor era comutado para a posição de injeção. Em seguida, a solução de amostra (A) era transportada pelo fluido transportador (Cs) passando através da coluna contendo a enzima. Na confluência *x* era adicionada a solução de luminol (R1) e na confluência *y* a solução de hexacianoferrato (R2), como catalisador da reação entre o luminol e o peróxido de hidrogênio formado na

reação enzimática. O sinal gerado, em função da radiação detectada, era lido pelo computador através da interface analógica/digital.

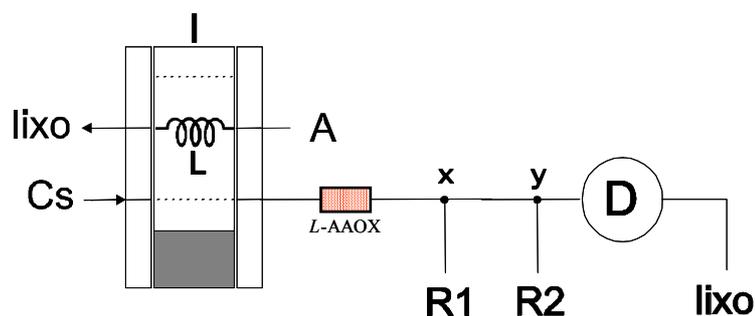


Figura 5.3 - Diagrama de fluxo do módulo de análise utilizado para estudos das variáveis experimentais para a determinação de *L*-alanina por medidas de quimiluminescência. Cs = tampão fosfato, R1 = luminol e R2 = hexacianoferrato. L = alça de amostragem. As Setas na figura indicam o sentido do bombeamento

Devido às condições extremas do meio de síntese da alanina (25 % de NH_3), para não desnaturar a enzima, as amostras eram diluídas e o pH ajustado. Para realizar esse tratamento da amostra automaticamente em linha, a técnica proposta por REIS *et al.*¹⁰⁹ da reamostragem foi utilizada (zone sampling). Para isso, utilizou-se o sistema de fluxo apresentado na Figura 5.4. Nesse sistema, foi utilizado um injetor automático controlado por um microcomputador.

Após o preenchimento da primeira alça de amostragem (L1), o injetor era comutado para a posição de injeção, conforme mostrado na Figura 5.4. Em seguida, a solução de amostra era transportada pelo fluido diluente (Fd), através de uma bobina (Bd). Nessa bobina, devido aos fenômenos de dispersão, a amostra era diluída e o pH ajustado. Depois de um determinado intervalo de tempo, quando o injetor era comutado para a posição alternativa, parte da zona de amostra era selecionada pela segunda alça de amostragem (L2), e então, o conteúdo desta alça seguia para uma coluna (de 1,5 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro interno) preenchida com uma resina aniônica forte AG1-X8 (para eliminação de espécies interferentes) e em seguida para determinação de alanina, semelhante ao sistema mostrado na Figura 5.3.

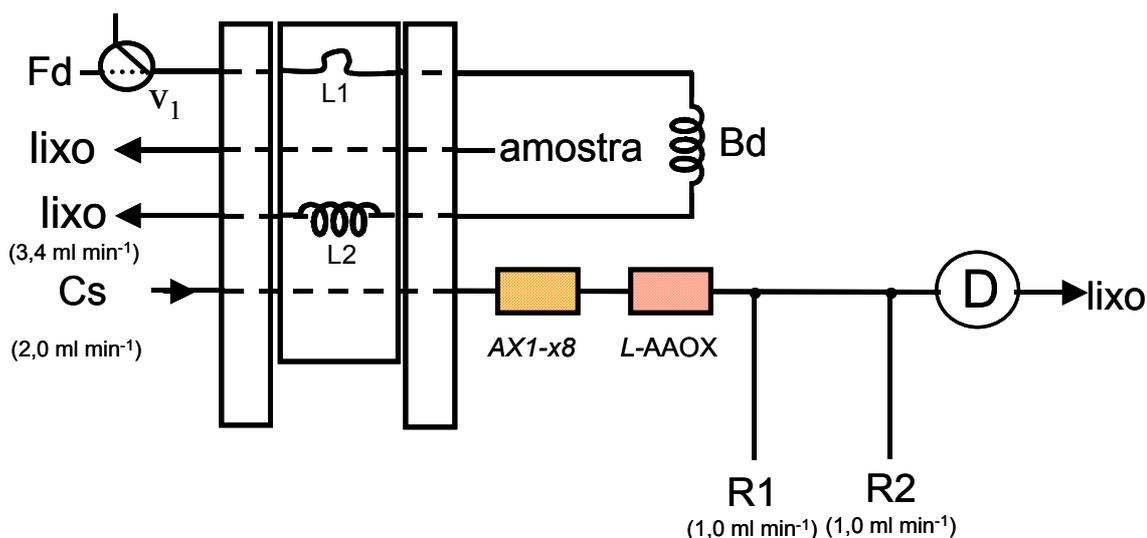


Figura 5.4 - Diagrama de fluxos do sistema para determinação de L-alanina por medidas de quimiluminescência utilizando etapa de diluição em linha. Cs = tampão fosfato, Fd = fluido de diluente, R1 = luminol, R2 = hexacianoferrato e Bd = bobina de diluição de 1000 μL ; L1 = alça de amostragem de 10 μL , L2 = alça de reamostragem de 100 μL . Setas indicam o sentido do bombeamento das soluções.

5.2.5. Síntese de alanina

Para a realização da síntese do aminoácido marcado, foi utilizado o procedimento descrito na referência 110. Para a síntese foram utilizados os reagentes nas seguintes proporções: 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 5 g de ácido bromopropiônico e 100 ou 150 mL de $^{15}\text{NH}_3$ 25 % (v/v). Os reagentes foram misturados em um balão de fundo redondo, e deixado por 48 horas sob leve agitação. Depois de 48 horas, o balão foi colocado em um evaporador rotativo, para a recuperação da amônia marcada e concentração da L-alanina. Em seguida, para precipitação do aminoácido, foi adicionado metanol na solução resultante. O aminoácido foi lavado e recristalizado três vezes para eliminação de impurezas. Depois da última lavagem, o aminoácido foi seco em um dessecador a vácuo e, posteriormente, pesado.

Segundo OLIVEIRA,¹¹⁰ o excesso de NH_3 (100 a 150 mL) é necessário para deslocar a amilação do α -haloácido, para a formação de aminas primárias, garantindo assim o máximo de rendimento na produção de alanina.

5.3. Resultados e Discussões

Para a determinação de *L*-alanina foi utilizada uma coluna preenchida com a enzima *L*-AAOX. Esta enzima oxida os *L*-aminoácidos resultando, como produto, o H_2O_2 , que foi determinado com a reação de quimiluminescência envolvendo o luminol e catalisada pelo hexacianoferrato de potássio.

Inicialmente, antes da utilização da enzima, as concentrações das soluções de luminol e hexacianoferrato foram otimizadas de forma a obter o menor limite de detecção possível. Soluções de referência de peróxido de hidrogênio foram processadas em um sistema de fluxos semelhante ao da Figura 5.3, porém, sem a utilização da coluna preenchida com a enzima imobilizada. Para esse estudo, foi adotada uma vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ para o transportador e $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ para os outros dois reagentes. Foi utilizado ainda um volume de solução de referência de $250 \text{ } \mu\text{L}$, os resultados podem ser observados na Tabela 5.2. De acordo com os resultados mostrados na tabela, pode-se observar que com exceção da concentração do catalisador de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, não houve diferença significativa entre os limites de detecção calculados para as soluções de luminol com concentração entre $1,0$ e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Portanto, para os demais experimentos, foi adotada a concentração de luminol de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Em relação à solução de hexacianoferrato, a concentração adotada foi de $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$, pois, como comentado acima não foram obtidos bons resultados com concentrações de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do catalisador, quando utilizando $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de luminol.

Tabela 5.2 - Resultado dos limites de detecção de peróxido de hidrogênio obtidos variando a concentração de luminol e hexacianoferrato de potássio.

| Concentração de luminol (mmol L^{-1}) | Concentração de hexacianoferrato (mmol L^{-1}) | Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$) |
|---|--|--|
| 1,0 | 10,0 | 10,5 |
| 1,0 | 50,0 | 1,25 |
| 1,0 | 100,0 | 1,50 |
| 5,0 | 10,0 | 0,64 |
| 5,0 | 50,0 | 0,95 |
| 5,0 | 100,0 | 1,13 |
| 10,0 | 10,0 | 1,01 |
| 10,0 | 50,0 | 0,52 |
| 10,0 | 100,0 | 0,89 |

Depois de definidas as concentrações dos reagentes de quimiluminescência, iniciou-se o estudo das variáveis do sistema de fluxo apresentado na Figura 5.3. A primeira variável estudada foi a vazão da solução transportadora, pois esta desempenha um papel vital no procedimento, definindo o tempo disponível para a oxidação do aminoácido. Para este experimento foi utilizada uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato a pH 7,5 como fluido transportador. Os demais parâmetros tais como vazão da solução de luminol e hexacianoferrato e volume da alça de amostragem foram fixados em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e em $50 \text{ }\mu\text{L}$, respectivamente. Na Figura 5.5 são mostrados os resultados obtidos variando-se a vazão da solução transportadora em 0,4, 1,0, 1,6 e $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. Na figura são mostrados também, entre parênteses, o tempo necessário para a limpeza do sinal analítico, ou seja, o intervalo de tempo entre o máximo do sinal analítico até o seu retorno a linha de base. Pode-se observar que, quando empregando vazões menores, foram obtidos sinais maiores, devido ao tempo disponível de reação entre a enzima e o substrato. Porém, o tempo requerido para a limpeza foi excessivamente longo. Devido ao compromisso entre sensibilidade e frequência analítica, a vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ foi selecionada para a solução transportadora.

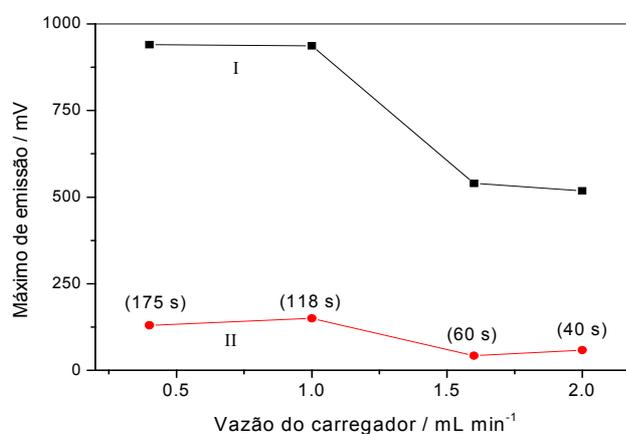


Figura 5.5 - Estudo da vazão da solução transportadora. Curva I – 50 mmol L^{-1} de *L*-alanina; Curva II – 5 mmol L^{-1} de *L*-alanina. Valores entre parênteses referem-se ao tempo de limpeza do sinal transiente.

Na etapa seguinte, o volume da alça de amostragem foi avaliado entre 10 e 150 μL , e os resultados desse experimento encontram-se na Figura 5.6. Na figura, pode-se observar que o sinal é crescente até o volume de 75 μL , e a partir disso o ganho de sinal não foi significativo. Contudo, soluções com concentrações abaixo de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ foram detectadas quando se empregaram volumes de amostra maiores que 100 μL . Considerando-se esse resultado, o valor do volume da alça de amostragem foi selecionado em 100 μL .

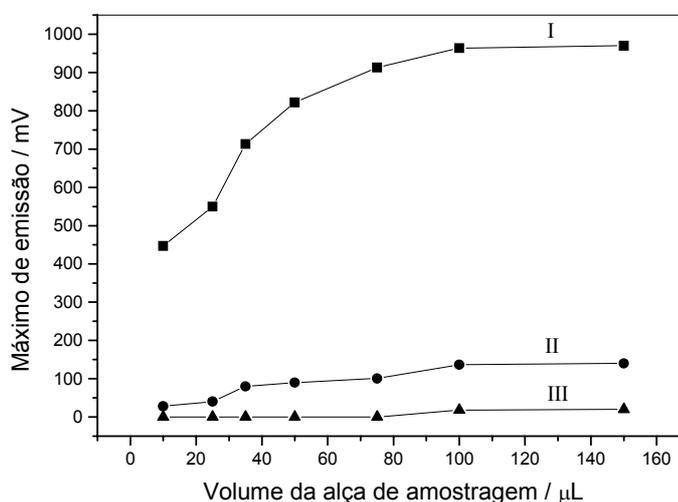


Figura 5.6 - Estudo do volume da alça de amostragem. Curva I – 50 mmol L^{-1} de *L*-alanina; curva II – 5 mmol L^{-1} de *L*-alanina; curva III – 0,5 mmol L^{-1} de *L*-alanina.

Em seguida, foram avaliados os efeitos da concentração hidrogeniônica e da concentração da solução tampão utilizada como solução transportadora. É interessante salientar que, para esses experimentos, a concentração do tampão carbonato, utilizado para preparar a solução de luminol, foi aumentado para $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, para garantir que qualquer diferença observada no sinal analítico fosse gerada pelas diferentes condições experimentais da reação enzimática. A atividade da enzima foi avaliada variando-se o pH da solução transportadora, como pode ser observado na Figura 5.7. Para a realização desse experimento, foi utilizada uma solução de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de *L*-alanina. Na figura, nota-se que, a

magnitude de sinal analítico foi maior quando utilizado uma solução transportadora com pH 8,5. Porém, foi observado que nesse valor de pH, a atividade da enzima cessou rapidamente, com menos de 500 determinações, isto devido à instabilidade das esferas de vidro modificadas em valores de pH maiores que 8,5.¹⁰⁸ Utilizando as soluções transportadoras com pHs menores que 8,0, foi possível utilizar a coluna por mais de 1000 determinações. Portanto, visando utilizar cada coluna com o maior número de determinações possíveis, como fluido transportador foi empregado tampão fosfato em pH 8,0.

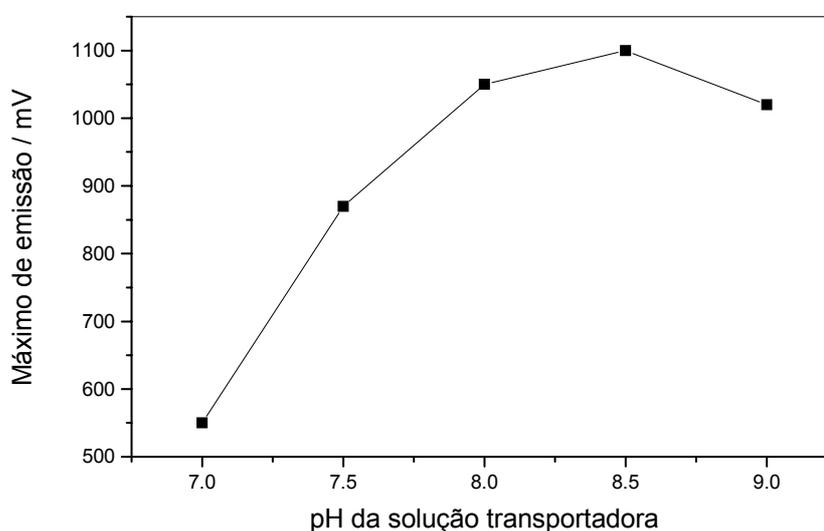


Figura 5.7 - Estudo do efeito do pH da solução transportadora. Dados obtidos com uma solução de referência 20 mmol L⁻¹ de *L*-alanina preparada em H₂O.

Em relação à concentração do tampão, na Figura 5.8 são apresentados os resultados obtidos variando-se a sua concentração entre 0,01 e 0,3 mol L⁻¹. Observa-se que, com o acréscimo da concentração do tampão fosfato, houve um decréscimo na emissão de luz. Esse resultado é comparável com a literatura¹¹¹, quando utilizada esta mesma enzima.

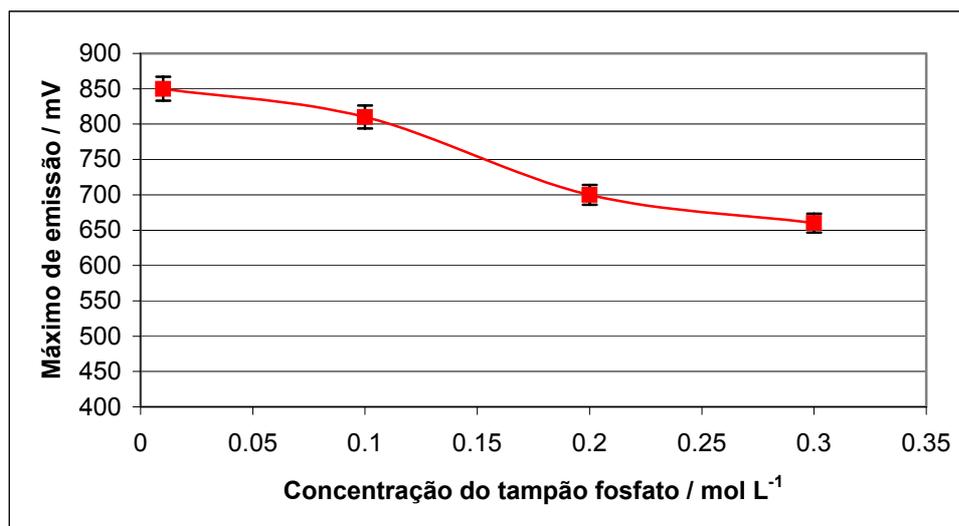


Figura 5.8. Estudo do efeito da concentração de fosfato da solução transportadora. Dados obtidos com uma solução de referência 20 mmol L⁻¹ de *L*-alanina preparada em H₂O.

Para avaliar se esse decréscimo no sinal em função do aumento da concentração do tampão fosfato era consequência do aumento da força iônica, soluções de referência de 20,0 mmol L⁻¹ foram preparadas com diferentes concentrações de KBr. Os resultados podem ser observados na Figura 5.9. Na Figura 5.9A, como solução transportadora foi utilizada a solução de tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ e na Figura 5.9B, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹. Como pode ser observado nas figuras, o sinal decresce como o aumento da força iônica, indicando que a diminuição do sinal, em função do aumento da concentração do tampão, é devido ao efeito da força iônica. Adicionalmente, esse efeito é menos expressivo quanto maior a concentração de fosfato no carregador. Como pode ser observado na Figura 5.9B, não há diferença significativa entre os sinais das soluções de referência preparadas em água, 0,001 e 0,01 mol L⁻¹ de KBr. Conclui-se que, quando a força iônica da amostra for menor que a força iônica do transportador não há interferência na reação enzimática, no entanto, quando a força iônica for igual ou maior que a força iônica do transportador, será observado um decréscimo do sinal.

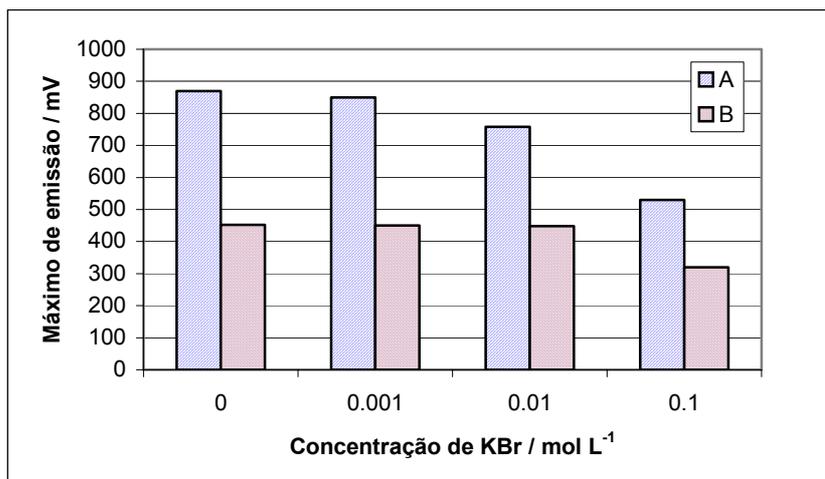


Figura 5.9 - Estudo do efeito da força iônica na reação enzimática. Solução transportadora A - tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ (pH 8,0); B - tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0).

Foi avaliada a influência da temperatura, para finalizar os estudos das variáveis que influenciam na reação enzimática. Uma curva analítica foi processada no sistema de fluxo com a coluna a temperatura ambiente (25 °C) e imersa em um banho de temperatura controlada a 35 °C. Foram calculados os limites de detecção para as duas situações e os resultados foram: LOD (25°C) = 0,35 mmol L⁻¹; LOD (35°C) = 0,15 mmol L⁻¹. Apesar de ter sido obtido um limite de detecção duas vezes melhor utilizando a coluna a 35 °C, para os demais experimentos foi utilizada a coluna enzimática a temperatura ambiente, com objetivo de manter a configuração do sistema o mais simples possível.

5.3.1.1. Estudo das espécies concomitantes

Depois de dimensionado o sistema de fluxos, avaliou-se o efeito de cada componente da matriz na oxidação enzimática da *L*-alanina.

A primeira espécie estudada foi (NH₄)₂CO₃. Na Figura 5.10 é apresentado o resultado de soluções de referência de *L*-alanina, para soluções com e sem adição de carbonato de amônio, na figura denominada de concentração igual a 0. Para assegurar que nenhuma diferença de sinal fosse causada pela diferença de pH, todas as soluções foram ajustadas em pH 8,0. Foi utilizada uma solução transportadora contendo tampão fosfato com concentração 0,01 mol L⁻¹.

Observando-se a figura pode-se concluir que, a interferência causada por esse sal, para concentrações acima de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, deve-se ao acréscimo da força iônica.

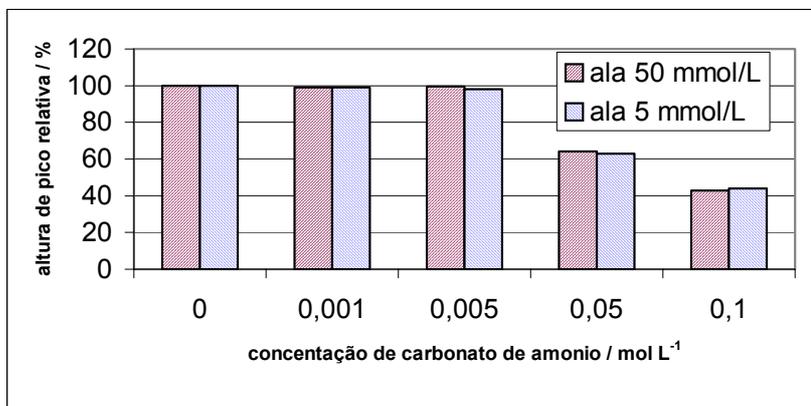


Figura 5.10 - Estudo do efeito da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

O mesmo estudo foi repetido utilizando-se $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ no lugar de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Foram utilizadas as mesmas concentrações do experimento anterior, e os resultados obtidos foram semelhantes ao apresentado na Figura 5.10.

Outra substância utilizada na síntese de alanina, e aqui avaliada, foi o ácido bromopropiônico. Soluções de referência de *L*-alanina de 50 mmol L^{-1} foram preparadas em $10,0$, $1,0$ e $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido bromopropiônico. Os resultados são apresentados na Figura 5.11. É possível observar que houve uma queda no sinal analítico para todas as concentrações do ácido.

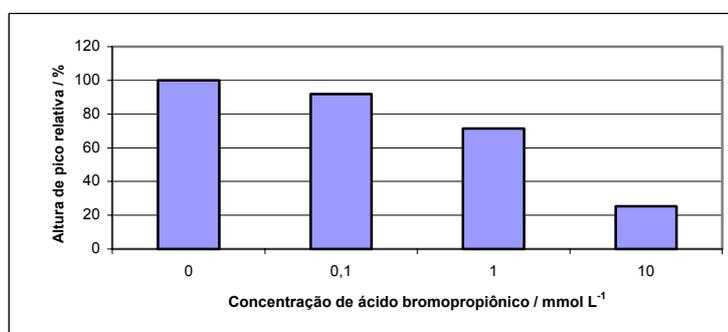


Figura 5.11 - Estudo do efeito da concentração do ácido bromopropiônico.

Para avaliar se esta interferência era devida à reação enzimática ou à reação de quimiluminescência, o mesmo teste foi realizado sem a coluna contendo a enzima e utilizando-se soluções de referência de peróxido de hidrogênio com ácido bromopropiônico. Contudo, não foi observada a mesma supressão no sinal analítico examinado na Figura 5.11, concluindo, então, que se tratava de uma inibição enzimática.

Para contornar esta interferência, várias estratégias foram utilizadas, como por exemplo, o uso de uma coluna com uma resina XAD-4, para reter o ácido. Porém, a interferência só foi eliminada com o uso de uma coluna preenchida com a resina aniônica AG1-X8, adaptada antes da coluna enzimática. Na Figura 5.12 é apresentado o resultado obtido com as mesmas soluções utilizadas para a confecção da Figura 5.11. Na figura, nota-se que a influência do ácido bromopropiônico foi praticamente eliminada.

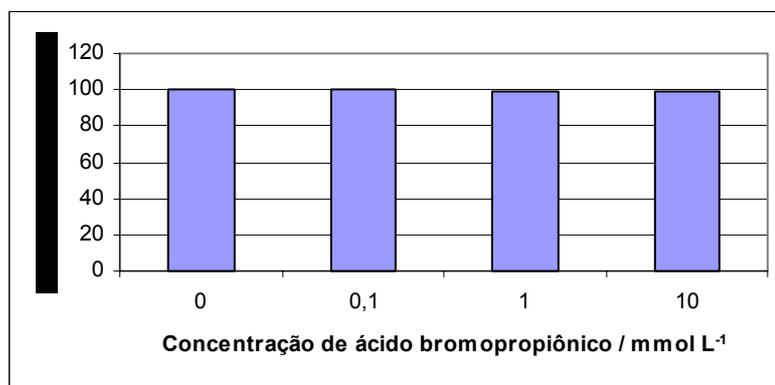


Figura 5.12 - Estudo do efeito da concentração do ácido bromopropiônico utilizando coluna com resina aniônica forte no sistema de fluxo.

Soluções de referência com diferentes concentrações de KBr, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ foram novamente processadas no sistema analítico, mas utilizando-se a coluna aniônica antes da coluna com a enzima imobilizada. Na Figura 5.13 são apresentados os resultados, podendo-se observar que o efeito causado pela diferença da força iônica entre as soluções foi praticamente eliminado, visto que não houve diferença significativa entre as alturas dos picos.

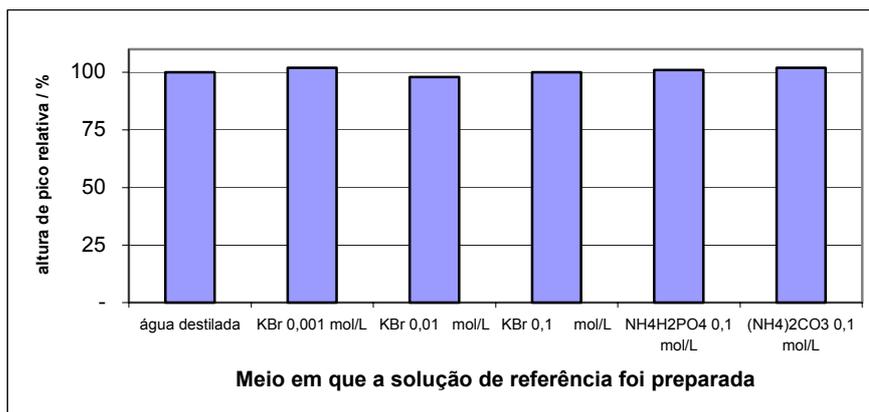


Figura 5.13. Estudo do efeito da concentração de diferentes sais no sinal analítico utilizando coluna com resina aniônica forte no sistema de fluxos.

5.3.1.2. Preparo de amostra no sistema de análises em fluxo.

O meio de síntese é constituído por 100 mL de NH₃ a 25 % (v/v), além do ácido bromopropiônico e do carbonato de amônio. Caso fosse injetada uma alíquota da solução de síntese diretamente no sistema de fluxos, provavelmente, ocorreriam danos para a enzima *L*-AAOX.

Para tornar a solução de amostra em condições mais apropriadas para a reação enzimática, a amostra foi diluída 100 vezes e o pH ajustado. Para que o sistema fosse totalmente automático, estas etapas analíticas foram realizadas no sistema de análises em fluxo utilizando-se a estratégia de reamostragem (“zone-sampling”).¹⁰⁹ Essa estratégia consiste em injetar uma alíquota da solução de amostra em um fluxo transportador e devido aos fenômenos de dispersão da zona de amostra, será formado um gradiente de concentração ao longo do percurso analítico. Depois de um determinado intervalo de tempo, a zona de amostra passa por uma outra alça de amostragem no percurso analítico, capaz de coletar diferentes porções da zona de amostra. Esta operação foi realizada utilizando o sistema de fluxos apresentado na Figura 5.4. Na Figura 5.14, é apresentado um registro utilizando este sistema de fluxo. Foi utilizada uma alça de amostragem de 10 µL em L1, L2 permaneceu em 100 µL, Bd foi estabelecida em 200 cm. A vazão de aspiração da solução de diluição foi estabelecida a

maior possível e mantida em $3,4 \text{ mL min}^{-1}$. Com a válvula V_1 (Figura 5.4) foi possível economizar esta solução e, conseqüentemente, gerar menos efluente.

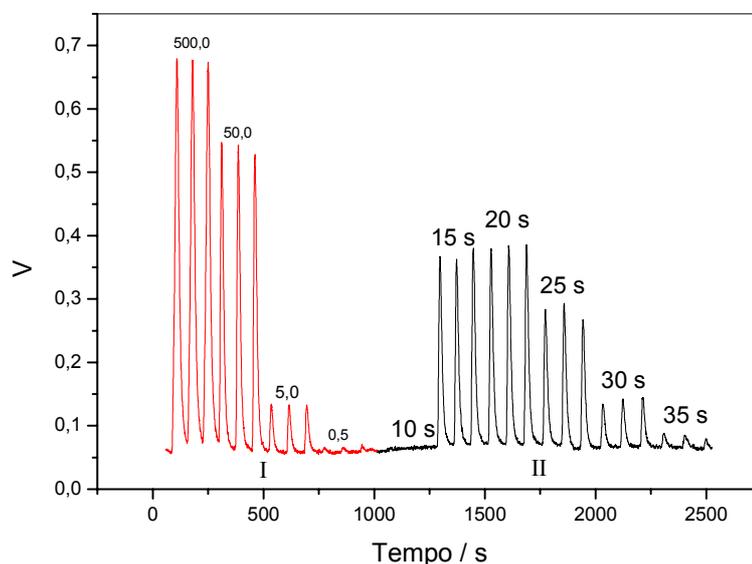


Figura 5.14. Registro dos sinais transientes. Registro I – sinais gerados com o sistema da Figura 5.3; números indicam a concentração da solução de referência em mmol L^{-1} . Registro II – sinais gerados com o sistema da Figura 5.4 e solução de referência de 500 mmol L^{-1} ; números indicam intervalo de tempo aguardado antes da reamostragem.

Na Figura 5.14 encontram-se dois conjuntos de registros de sinais. O primeiro foi obtido com soluções de referência de *L*-alanina e o sistema da Figura 5.3. O segundo foi obtido com uma solução de referência de 500 mmol L^{-1} de *L*-alanina e foi variado o tempo de espera para o acionamento do injetor, reamostrando, assim, diferentes partes da zona de amostra. Comparando o registro I com o registro II, pode-se afirmar que, com o tempo de 30 s de reamostragem foi possível diluir em 100 vezes a solução de 500 mmol L^{-1} .

Bobinas de menor (100 cm) e de maior (300 cm) comprimento foram também avaliadas. No caso da bobina de 100 cm foi necessário um tempo de 25 s para se obter o mesmo fator de diluição. Porém, os resultados obtidos não foram tão precisos como os resultados mostrados na Figura 5.14. Com a bobina de 300 cm foi possível obter um fator de diluição de 100 vezes com tempos de 25 s e 50 s. Com o tempo de 25 s foi coletada da zona de amostra a porção anterior ao máximo de concentração, e com 50 s foi coletada a porção posterior.

Segundo REIS *et al.*,¹⁰⁹ sinais mais precisos são obtidos quando reamostrada porções da zona de amostra posterior ao máximo de concentração, ou seja, a cauda do sinal. Com o compromisso entre precisão e frequência analítica foi então selecionado o tempo de 30 s empregando a bobina de 200 cm.

Para garantir o ajuste de pH das soluções de amostra, como solução de diluição (Fd – Figura 5.4) foi utilizada $0,18 \text{ mol L}^{-1}$ de KH_2PO_4 . Estudos paralelos mostraram que essa concentração foi suficiente para ajustar o pH das soluções de amostra em aproximadamente 8,0.

5.3.1.3. Aplicação para amostras reais

O sistema analítico, para a determinação de *L*-alanina, foi projetado para a determinação do aminoácido em linha de síntese. Porém, como a linha de síntese ainda não se encontra em funcionamento, o sistema foi aplicado para síntese em escala laboratorial.

Foram realizadas 3 sínteses, como descrito no item 5.2.5. Devido ao fato da linha de síntese não estar em operação, não foi possível uma amostragem periódica ao longo do período de síntese, sendo possível somente a coleta de amostra do balão de reação em dois momentos: após 48 horas do início da síntese e após a extração de amônia. Como as alíquotas foram coletadas e diluídas manualmente, utilizo-se portanto o sistema de fluxos mostrado na Figura 5.3, porém inserindo-se também no percurso analítico a coluna preenchida com a resina AG1-X8.

Na Figura 5.15 são apresentados os sinais transientes obtidos. Na Figura 5.15A encontram-se os sinais obtidos com amostras coletadas antes da extração de amônia e na Figura 5.15B os sinais obtidos com as amostras coletadas depois da extração. Na Tabela 5.3 encontram-se os resultados obtidos com a análise das amostras reais e sintéticas, soluções onde foram simulado a solução de amostra.

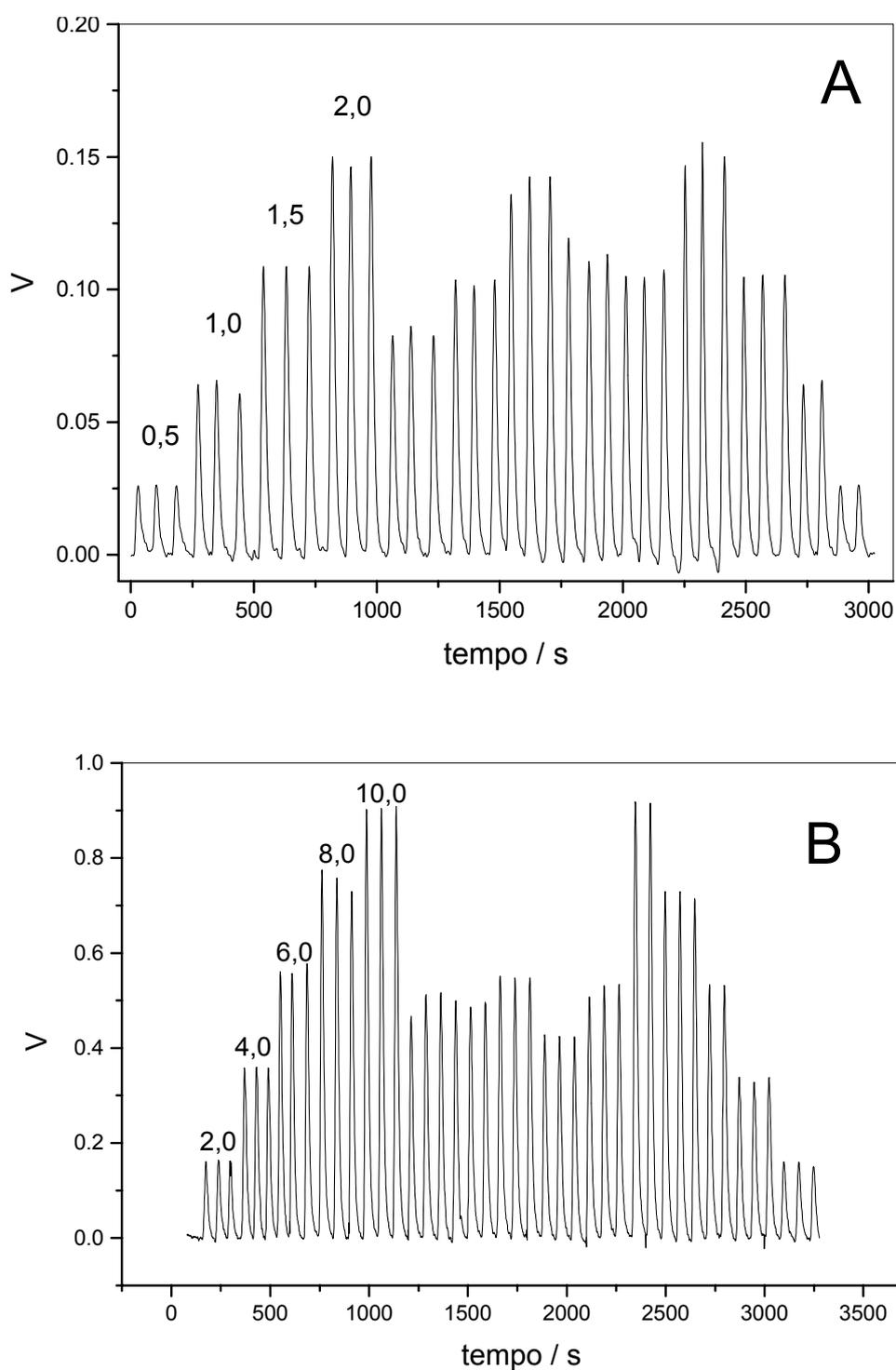


Figura 5.15 - Sinais transientes das soluções de referências e das amostras de *L*-alanina. A – amostras coletadas depois de 48 horas de síntese. B – amostras coletadas depois da extração de NH₃. Nos dois registros são mostradas as soluções de referência seguidas pelas soluções de amostra e depois novamente pelas soluções de referência. Os números indicam a concentração em mmol L⁻¹.

Tabela 5.3 - Resultados obtidos.

| Amostras | <i>L</i> -alanina adicionada (mmol/L) | <i>L</i> -alanina encontrada (mmol/L) | Recuperação (mL) |
|----------|---|---|---------------------|
| 1 | | 1,21 ± 0,04 | |
| 2 | | 1,46 ± 0,04 | |
| 3 | | 1,06 ± 0,04 | |
| 1 | 0,64 | 1,72 ± 0,07 | 93% |
| 2 | 0,31 | 1,69 ± 0,04 | 95% |
| 3 | 0,70 | 1,85 ± 0,03 | 105% |
| 4* | 2,13 | 1,99 ± 0,07 | 88% |
| 5* | 1,62 | 1,69 ± 0,06 | 104% |
| 6* | 1,75 | 1,59 ± 0,03 | 91% |
| 7* | 1,57 | 1,50 ± 0,01 | 96% |
| 8 | | 6,17 ± 0,06 | |
| 9 | | 4,87 ± 0,01 | |
| 10 | | 5,9 ± 0,1 | |
| 11* | 5,54 | 5,82 ± 0,03 | 105% |
| 12* | 5,43 | 5,59 ± 0,07 | 103% |

* amostras sintéticas

Como características analíticas obteve-se com o procedimento proposto uma faixa de linearidade entre 0,5 e 25 mmol L⁻¹ de *L*-alanina com um coeficiente de correlação linear igual a 0,9998, um limite de detecção igual 0,08 mmol L⁻¹ de *L*-alanina, um coeficiente de variação menor que 4 % para 10 medidas de uma solução 1 mmol L⁻¹ de *L*-alanina e um consumo de 0,2 mg de luminol e 16,4 mg de hexacianoferrato por determinação. Foi ainda observado uma recuperação na faixa de 88 – 105 % de *L*-alanina nas amostras sintéticas e nas amostras reais nas quais foram adicionado o analito. Como frequência analítica, com o sistema proposto foi possível o processamento de 44 amostras por hora.

Como o luminol e o hexacianoferrato reagem entre si emitindo radiação de quimiluminescência, não foi possível o emprego de válvula solenóide para economia de reagente durante as etapas de diluição. Isso porque não foram obtidos sinais estáveis de linha de base com o acionamento intermitente das válvulas. Segundo *VAN DER LINDEN*,¹¹² o estabelecimento de uma linha de base é importante para compensar flutuações nos sinais analíticos. Ainda,

segundo os autores, o estabelecimento de uma linha de base é uma das vantagens do emprego da análise por injeção em fluxo sobre métodos contínuos de análise. Porém, para economia de reagente, quando o sistema não estivesse sendo utilizado, o programa responsável pelo controle do procedimento analítico e aquisição de dados desligava a bomba automaticamente, mediante comunicação com a porta serial RS 232 do computador.

Outra característica favorável do sistema proposto foi a estabilidade da linha de base. Ligando e desligando o sistema cinco vezes, em um período de 8 horas, não foram observadas diferenças superiores a 5 % na medida dos sinais analíticos das soluções de referência e a diferença relativa no valor da linha de base, para este mesmo período, foi inferior a 7 %. Essas características são extremamente desejáveis, principalmente quando o analisador é destinado para auxílio no controle de processos.¹¹²

5.4. Conclusões

O sistema de análises em fluxo proposto para a determinação de *L*-alanina mostrou-se adequado para a quantificação deste analito obtendo-se boas taxas de recuperação do aminoácido. As interferências das espécies presentes no meio reacional foram suprimidas mediante ao uso de uma coluna aniônica forte. Ainda com o uso da resina no sistema de fluxos foi possível minimizar a influência das variáveis experimentais na reação enzimática, por exemplo, a força iônica, o que tornou o procedimento mais robusto.

O sistema mostrou-se estável durante um longo período de tempo e a enzima imobilizada em esferas de vidro com porosidade controlada pode ser utilizada por pelo menos dois meses. Apesar da etapa de coleta e preparo da amostra ter sido realizada manualmente, o sistema proposto é capaz de realizar a etapa de diluição e ajuste de pH automaticamente explorando a estratégia de reamostragem.

CAPÍTULO 6. DETERMINAÇÃO DE ÍONS BROMETO EM AMOSTRAS DE *L*-ALANINA

6.1. Introdução

O bromo existe em amostras ambientais principalmente na forma de íon brometo e exerce uma considerável influência na flora e na fauna.¹¹³ O brometo pode contaminar poços de água através da intrusão de água de mar, ou através da poluição¹¹⁴ e, durante o tratamento de água para o consumo humano, pode ser oxidado a bromato, que por sua vez é suspeito de ser uma substância carcinogênica.¹¹⁵

Em seres humanos o brometo atua no sistema nervoso central. Antigamente era utilizado como hipnótico, substância que determina o grau variado de depressão do sistema nervoso central tal como os álcoois benzoazepínicos e barbitúricos. Porém, atualmente seu uso está condenado pelas autoridades médicas, devido aos efeitos colaterais que produzem, por exemplo irritação gastrointestinal e lesões de pele, decorrentes do poder cumulativo. No sistema nervoso central, este íon substituí o íon cloreto e, conseqüentemente, vai modificando as funções das células nervosas.¹¹⁶ Sua ingestão continuada pode causar brominismo, uma doença que pode acarretar a perda de memória, entre outros sintomas.¹¹⁷

Após a síntese da alanina, mesmo depois de purificada, o brometo ainda pode permanecer presente no produto final em baixas concentrações. Portanto, para fins de consumo humano ou animal, é de grande importância o conhecimento da quantidade do brometo presente no aminoácido.

Para a determinação de brometo, além do método clássico de titulação de precipitação¹¹⁸ ou potenciométrica,^{119,120} existem vários outros meios. O emprego de eletrodos íon-seletivos é o procedimento mais utilizado para este fim.^{121,122}

Métodos espectrofotométricos normalmente possuem adequada sensibilidade para determinação de brometo em baixas concentrações ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) e são muito utilizados em aplicações práticas, porém, quando utilizados em procedimentos em batelada, a análise pode demorar de 1-2 horas por determinação.¹¹³

O procedimento baseado na reação com o vermelho fenol é provavelmente o método espectrofotométrico mais comum para determinação de brometo, e aliado a técnica de análises por injeção em fluxo, pode determinar-se até 80 amostras por hora,^{114,123} além de proporcionar meios para a eliminação ou diminuição de interferências causadas por íons cloreto, amônio e material orgânico dissolvido. O procedimento se baseia na oxidação do brometo a bromo por hipoclorito, ou mais recentemente por cloramina-T, que em seguida reage com vermelho fenol em meio ácido, formando um composto colorido (azul de bromofenol) proporcional a concentração de brometo.¹²⁴

Outro procedimento espectrofotométrico para a determinação de íons brometo é através da exploração de seu potencial catalítico em reações de oxido-redução. Vários sistemas químicos foram utilizados, como por exemplo, a oxidação do violeta de pirocatecol por peróxido de hidrogênio;¹²⁵ ou oxidação de 4,4'-bis(dimetilamino)difenilmetano por cloramina-T.¹²⁶ Esses procedimentos foram realizados em fluxo, e obtiveram adequado limite de detecção (4 e $1 \mu\text{g L}^{-1}$) e, com exceção do iodeto e amônio, os demais íons não apresentaram interferência dentro das concentrações que estes íons normalmente se encontram em águas naturais.

Métodos espectrofluorimétricos também têm sido propostos na literatura. Assim como o procedimento do vermelho fenol, o procedimento fluorimétrico é baseado na reação com o bromo gerado na oxidação do brometo. No caso do trabalho proposto por VILCHEZ *et al.*¹²⁷ o brometo foi oxidado por hipoclorito, seguida da reação do bromo gerado com fluoresceína, diminuindo assim a quantidade deste em solução. O decréscimo de fluorescência foi utilizado como

sinal analítico. O método apresentou um limite de detecção de $3 \mu\text{g L}^{-1}$ e foi aplicado para determinação de brometo em águas naturais.

Com respeito a métodos instrumentais de análises químicas, a cromatografia iônica pode ser utilizada para a determinação de brometo, com um bom limite de detecção ($10 \mu\text{g L}^{-1}$).¹¹³ Apesar de ser um método conveniente de separação de íons, quando a matriz possui muitos elementos, a eficácia da técnica é geralmente diminuída, necessitando de etapas de pré-extração do analito ou compatibilização de matriz.¹²⁸ A eletroforese capilar também tem sido empregada¹¹⁵ e com bons limites de detecção ($15 \mu\text{g L}^{-1}$).

Em sistemas de análises em fluxo, analitos voláteis podem ser separados dos interferentes e outros componentes da matriz da amostra e transportados em um fluxo acceptor de composição bem definida através do uso de membranas de difusão gasosa. Diferentes condições de reação para otimização da separação gás-líquido e para a detecção da espécie separada podem então ser realizadas separadamente. Como na maioria dos sistemas em fluxo, essas separações gás-líquido não são realizadas em condições de equilíbrio, os valores de taxa de transferência de massa se situam entre de 5 e 20%. Apesar desta baixa transferência comprometer a sensibilidade, o uso de membranas de difusão gasosa para separação gás-líquido compensa pelo ganho na seletividade, principalmente quando é explorada a discriminação cinética.⁸ No caso de haletos, o processo de difusão utilizando membranas de TPFE foi aplicado para determinação indireta de cloreto.¹²⁹ O cloreto foi oxidado pelo permanganato de potássio em meio ácido a 50°C e o Cl_2 , produto da reação de oxidação, foi detectado amperometricamente na solução acceptora. O limite de detecção obtido foi $0,36 \text{ mg L}^{-1}$ de Cl^- e o sistema analítico foi utilizado para determinação deste haleto em águas minerais. Sistema semelhante foi utilizado para brometo e iodeto, porém com detecção espectrofotométrica de Br_2 e I_2 .¹³⁰

Em relação aos métodos explorando reações quimiluminescentes, poucos trabalhos são encontrados na literatura para a determinação de brometo. Isto

porque o brometo, como os outros haletos, não reage e tão pouco catalisa as reações mais comuns de quimiluminescência. É necessário transformar o brometo em uma espécie ativa na reação de emissão de luz.

PILIPENKO *et al.*¹¹³ desenvolveram um método sensível (limite de determinação igual a $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$) e seletivo para a determinação de brometo em águas por quimiluminescência. O procedimento foi baseado na oxidação seletiva deste íon por dicromato de potássio em ácido sulfúrico. O Br_2 produto da reação de oxidação era em seguida extraído da solução oxidante por um fluxo de gás (N_2), que o transportava em direção a um frasco contendo luminol em meio alcalino e posicionado dentro de um luminômetro. Como resultado, uma luz intensa gerada era proporcional a concentração de brometo. O mesmo grupo desenvolveu procedimentos para determinação de cloreto¹³¹ e iodeto,¹¹³ baseado na mesma estratégia, mas com oxidantes diferentes. Porém, a necessidade de vidrarias especiais torna o método pouco atrativo.

Outro procedimento para determinação de brometo por quimiluminescência foi apresentado por SHAKIR e FAIZULLAH.¹³² Segundo os autores, o método era baseado na catálise homogênea do bromo, gerado a partir do brometo, na reação de oxidação do luminol por peróxido de hidrogênio. A diferença deste método para os demais consistiu na oxidação do brometo por bromato em meio ácido, que segundo os autores, não participa da reação com o luminol, não sendo, portanto, necessária sua prévia separação. Porém, o método proposto sofria severas interferências de íons metálicos, que atuam como catalisador da reação de quimiluminescência, sendo necessário um lento e trabalhoso procedimento em batelada para separação desses íons, ou seja, 45 min sob agitação com resina catiônica forte, além de uma coluna contendo a mesma resina no percurso analítico do sistema de fluxo. Comparado com o método proposto por PILIPENKO *et al.*,¹¹³ este método apresentou uma menor tolerância a íons cloreto, a interferência deste íon foi observada apenas com concentrações cinco vezes maior que a de brometo, e uma severa interferência

de iodeto observada para concentrações 10 vezes menor que a do analito de interesse. Também, a faixa de trabalho das soluções de referência foi 1000 vezes mais concentrada que o método proposto por PILIPENKO *et al.*,¹¹³ além do sistema não ter sido aplicado à amostra real.

Para a determinação de vários ânions com o luminol, entre eles o brometo, sem a necessidade de sua transformação em uma espécie ativa, como nos trabalhos anteriormente citados,^{113,132} é descrita por COOPER e SPURLIN.¹³³ Neste trabalho, o luminol foi imobilizado em uma coluna contendo uma resina aniônica e, mediante a passagem de ânions pela coluna, o luminol era liberado, reagindo com peróxido de hidrogênio e hexacianoferrato. Portanto, a radiação emitida era proporcional a quantidade de luminol liberado pelos ânions presentes em solução. Devido à falta de seletividade, a reação foi utilizada como detecção "post-column" em cromatografia iônica. O método foi aplicado para determinação de Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , Br^- e SO_4^{2-} , e apresentou um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para esses íons.

Uma reação não muito comum de quimiluminescência foi utilizada por SAKAI *et al.*¹³⁴ para a determinação de vários ânions, entre eles o brometo. A emissão de radiação eletromagnética, na faixa do vermelho e infravermelho, era resultante da reação de neutralização de ácido nítrico com hidróxido de potássio na presença de Fe(III). Com a adição de ânions inorgânicos a emissão era suprimida. Devido à falta de seletividade, a reação foi utilizada como detecção "post-column" em cromatografia iônica. O método não apresentou um bom limite de detecção para brometo, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e, apesar de realizados estudos para determinação de Br^- , NO_2^- , NO_3^- , Cl^- , e SO_4^{2-} , o método foi aplicado somente para determinação dos três últimos ânions em águas de rio e subterrânea.

Devido à necessidade de quantificação dos subprodutos da síntese de aminoácido, pois estes afetam a qualidade do produto final, nesta etapa do trabalho foi desenvolvido um procedimento automático para a determinação de íons brometo com detecção quimiluminescente, de forma que fosse quantificado

com o detector descrito no capítulo 3. Para a viabilidade do procedimento, o brometo foi “ativado” mediante a sua oxidação a Br_2 e posterior reação deste halogênio com luminol.

6.2. Parte Experimental

6.2.1. Equipamentos

Para a montagem dos módulos de análises foram utilizados os equipamentos descritos no capítulo 2, como válvulas solenóides, injetor comutador automático, bomba peristáltica e tubos de polietileno para confecção das linhas de fluxos, alças de amostragem e bobinas de reação. O detector utilizado é o mesmo descrito no capítulo 3, Figura 3.8. Também foram utilizados uma coluna 15 mm x 5 mm d.i.construída em acrílico para condicionamento da resina aniônica forte AG1-X8. Para realização de alguns experimentos foram utilizados ainda banho de temperatura controlada Nova Técnica, NT 245 e uma câmara de difusão gasosa construída em acrílico equipada com uma fita de Teflon®, DuPont.

6.2.2. Soluções

Solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de luminol, preparada dissolvendo-se 0,035 g de luminol (sigma) em solução tampão $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ carbonato até o volume de 200 mL.

Solução de permanganato de potássio foi preparada dissolvendo-se uma massa deste sal suficiente para saturar 200 mL de H_2O . Esta solução saturada foi fervida por aproximadamente 30 min e então filtrada em vidro sinterizado para remoção de MnO_2 e excesso de KMnO_4 . Em seguida, em um balão de 200 mL, 100 mL desta solução foi acidificada com 33 mL de ácido sulfúrico concentrado. O volume final completado com o restante da solução saturada, resultando em uma solução 3 mol L^{-1} de H_2SO_4 .

Solução estoque $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH foi preparada dissolvendo-se 20,00 g de NaOH em 500 mL de H_2O . Soluções de NaOH foram preparadas a partir de apropriadas diluições desta solução.

Solução $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2SO_4 a partir de uma solução estoque $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ deste ácido.

Soluções 0,01, 0,10, 1,00, e 2,00 % de cloramina-T (m/v) foram preparadas dissolvendo-se, respectivamente, 0,1, 1 e 2 g de cloramina-T tri-hidratado (Merck) em água destilada e em seguida completando-se o volume para 100 mL.

Solução de estoque $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Br^- foi preparada a partir de KBr (Merck). Inicialmente, o sal foi secado por 2 horas em uma estufa a 70°C . Em seguida, foi resfriado em temperatura ambiente empregando um dessecador a vácuo, e pesaram-se 0,1489 g para 1000 mL de H_2O . Dessa solução, as soluções de referência foram preparadas por diluições apropriadas em água ou em 0,1 % de *L*-alanina.

As amostras foram preparadas dissolvendo-se 0,1 g de *L*-alanina sintetizada em 100 mL de H_2O e processadas diretamente no sistema analítico.

6.2.3. Procedimento experimental e diagrama de fluxos

6.2.3.1. Sistema utilizando permanganato de potássio e câmara de difusão gasosa

A primeira tentativa para a determinação em fluxo de baixas concentrações de brometo por medidas de quimiluminescência, foi realizada utilizando o sistema de fluxos mostrada na Figura 6.1. A estratégia adotada foi a da Multicomutação¹³.

Como mostrado na Figura 6.1, todas as válvulas estão desligadas, de modo que, somente a solução transportadora está sendo bombeada pelo sistema. O ciclo analítico inicia-se mediante ao acionamento simultâneo das válvulas V_1 - V_3 durante um intervalo de tempo. Com isso, o fluxo transportador é

interrompido e as soluções de amostra e de oxidante são introduzidas no ponto **x**, e transportadas para a câmara de difusão gasosa, onde parte do Br_2 formado irá se difundir para a solução aceptora (NaOH). Depois de um intervalo de tempo preestabelecido, as válvulas V_4 e V_5 são acionadas, permitindo que as soluções de luminol e aceptora confluem no ponto **y**, onde se iniciará a reação de quimiluminescência entre o luminol e o Br_2 . Durante o período que as válvulas V_4 e V_5 são acionadas, o sinal proveniente do fotodiodo é registrado pelo computador para futuro tratamento de dados, sendo uma leitura realizada a cada 0,1 s.

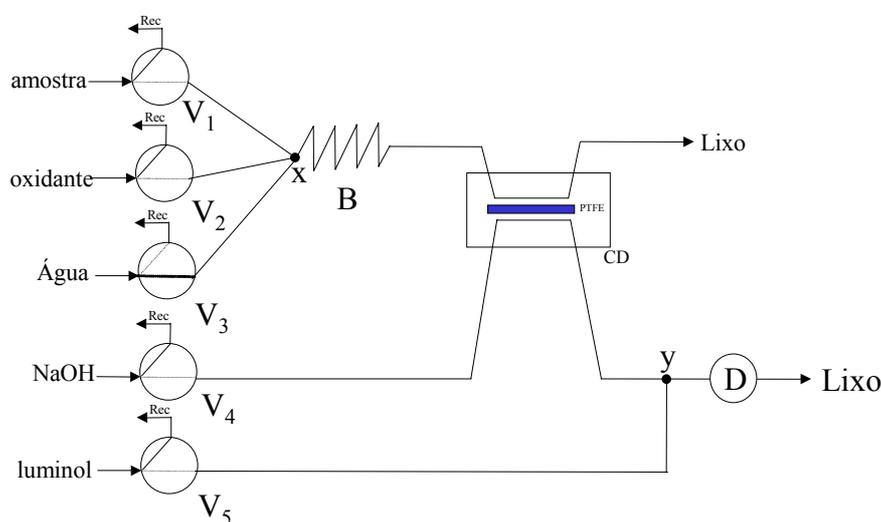


Figura 6.1 - Diagrama de fluxos proposto para determinação automática de Br^- por quimiluminescência. B – bobina de reação, CD – câmara de difusão gasosa, PTFE – membrana de teflon, D – detector de quimiluminescência, Rec – recuperação da solução, V_{1-5} – válvulas solenóides de três vias, x e y – pontos de confluência.

Com o intuito de otimizar o sistema analítico da Figura 6.1 e obter máximo de sensibilidade e consumo mínimo de reagentes, vários parâmetros foram estudados. Com relação a reação de oxidação, foram avaliadas as concentrações dos reagentes, proporções no sistema de fluxos, tempo e temperatura de reação. Com relação à reação entre o Br_2 formado na solução doadora e o luminol, foram estudadas a composição da solução aceptora e a concentração da solução de luminol. Também foi estudado o tempo de enriquecimento, sendo este parâmetro intimamente ligado à sensibilidade, ao tempo de análise e ao consumo de amostra e reagente.

6.2.3.2. Sistema utilizando Cloramina-T

Diante das dificuldades encontradas para determinação de brometo em amostras de alanina utilizando o sistema de fluxos mostrado na Figura 6.1, foi estudada a viabilidade de determinação de brometo por quimiluminescência utilizando a cloramina-T como oxidante. Os experimentos iniciais foram conduzidos em um sistema clássico de análises por injeção em fluxo com duas confluências, similar ao mostrado na Figura 3.9, porém aplicado para determinação de brometo por quimiluminescência. Na configuração que é mostrado na figura, o injetor (I) está na posição de amostragem. Após o preenchimento da alça de amostragem (L), o injetor era comutado para a posição de injeção. Em seguida, a solução de amostra (A) era transportada pelo fluido transportador (Cs) e na confluência x era adicionada a solução de cloramina-T (R1). A reação de oxidação ocorria durante o transporte da zona de amostra através da bobina (B1). Na confluência y a solução de luminol (R2) era adicionada, iniciando a reação de quimiluminescência. O sinal gerado, em função da radiação detectada, era lido pelo computador através da interface analógica/digital.

Depois de definidas as melhores condições experimentais, foi utilizado o sistema de fluxos apresentado na Figura 6.2. Esse sistema utiliza uma coluna preenchida com uma resina aniônica forte para a concentração de brometo e eliminação da interferência gerada pela alanina. Neste sistema foi utilizado um injetor automático e válvulas solenóides controlados por um microcomputador. Após o preenchimento da alça de amostragem (L), o injetor era comutado para a posição de injeção, posição mostrada na figura. Em seguida, a solução de amostra era transportada através da coluna pelo fluido transportador (água), onde o brometo era retido. Depois de um determinado intervalo de tempo, o injetor era comutado para a posição de amostragem, as válvulas V_1 e V_2 eram acionadas (permitindo o fluxo de cloramina-T e luminol, respectivamente) e o

conteúdo retido na coluna era eluído e transportado pelo sistema de fluxos para a detecção dos íons brometo.

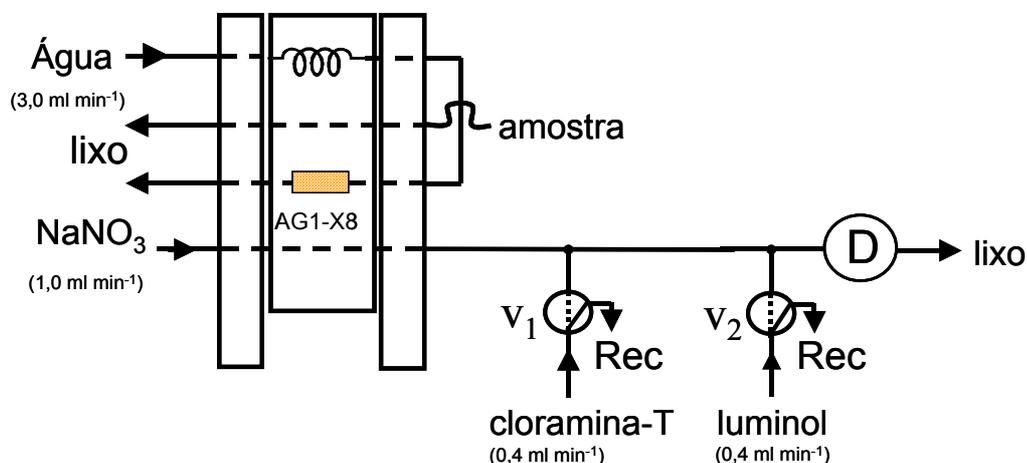


Figura 6.2 - Diagrama de fluxos do sistema para determinação de brometo por medidas de quimiluminescência utilizando etapa de pré-concentração.

6.3. Resultados e Discussões

6.3.1. Oxidação com permanganato de potássio

Como reagente oxidante, inicialmente, foi utilizado o permanganato de potássio, porém antes da reação de quimiluminescência, foi necessário o uso de uma câmara de difusão gasosa para a separação do Br₂ formado, pois o meio oxidante era muito extremo e com isso inviabilizava a reação com o luminol.

Foi então utilizado o sistema de fluxos mostrado na Figura 6.1. Nesse sistema, a estratégia de multicomutação foi utilizada, a qual permitia, com o uso de válvulas, a inserção das soluções somente durante a etapa em que elas eram necessárias. A estratégia de amostragem binária¹³ não foi utilizada, devido ao uso da câmara de difusão gasosa. Caso as soluções fossem aspiradas, a vida útil da membrana de teflon ficaria comprometida, assim como a eficiência da separação gás-líquido, que é maior quando os dois lados da membrana têm a mesma pressão. Adicionalmente, devido a alta viscosidade da solução do oxidante (preparada em H₂SO₄ entre 1 e 6 mol L⁻¹) o mecanismo de inserção de

pequenas alíquotas de amostra e oxidante ficou impreciso, obtendo-se desvios padrão relativos da ordem de 30 %.

Escolhendo arbitrariamente vazões iguais para amostra e oxidante (1 mL min^{-1}) e aproximadamente um tempo de 30 s para o desenvolvimento da reação (200 cm da bobina B, Figura 6.1), experimentos mostraram que, quanto maior a concentração de permanganato maior foi o sinal obtido. Portanto, para um ganho de sensibilidade, foi utilizada uma solução saturada. Em relação à acidez, concentrações de ácido sulfúrico maiores que 3 mol L^{-1} resultaram em soluções instáveis, sendo observado a evolução de oxigênio proveniente da decomposição do permanganato de potássio. Como as bolhas de gás no sistema de fluxos atrapalhavam o procedimento, a concentração de H_2SO_4 foi mantida em 3 mol L^{-1} .

Em relação a estudos da reação de Br_2 com luminol, pouco, ou quase nada foi encontrado até o momento na literatura, porém, em relação a reação Cl_2 -luminol, vários trabalhos são encontrados. Segundo MARINO e INGLE¹³⁵, como no pH ótimo para o desenvolvimento da reação de quimiluminescência a razão $[\text{ClO}^-]/[\text{HClO}]$ é máxima, os autores propõem que a espécie responsável pela reação com o luminol é o ClO^- . Porém, segundo GONZALEZ-ROBLEBO *et al.*¹³⁶, baseados na razão de formação, o ácido hipocloroso é o responsável pela reação com o luminol em uma primeira etapa, formando um intermediário que, posteriormente, em meio alcalino formará um composto que emitirá luz.

Segundo os autores,^{135,136} a melhor solução aceptora é a que possui pH entre 3 e 5, pois em valores de pH menores a reação com o luminol não se desenvolvia e em valores de pH mais elevados o hipoclorito em baixas concentrações “virtualmente desaparecia” quase que instantaneamente. Outros trabalhos utilizando outros meios de detecção, preferiram os aceptores ácidos ao básicos.¹²⁹ Porém, para o caso do Br_2 , no presente trabalho, só foram obtidos sinais quando a solução aceptora era preparada em pH maior que 7.

A vazão da solução aceptora também foi variada entre $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e 2 mL min^{-1} . Quanto maior a vazão da solução aceptora maior foi o sinal analítico obtido. Isto provavelmente se deve a reação de quimiluminescência, pois quanto maior a vazão, a mistura entre as soluções ocorrerá de forma mais vigorosa e conseqüentemente, maior será a emissão de luz. Porém, no caso de vazões muito altas, ocorria facilmente a ruptura da membrana de teflon e, devido a baixa repetibilidade obtida com vazão de 2 mL min^{-1} , a vazão foi mantida em 1 mL min^{-1} .

Ganhos de sensibilidade foram obtidos com o aumento da temperatura até $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Acima dessa temperatura não foi observado nenhum ganho de sensibilidade e acima de $80 \text{ }^\circ\text{C}$, devido a decomposição do permanganato e conseqüente liberação de substâncias que reagem com o luminol, altos valores de branco foram observados ($> 1 \text{ V}$), impossibilitando a determinação de concentrações menores que $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Br^- .

Em relação à concentração do luminol, assim como nos trabalhos encontrados na literatura para determinação de hipoclorito,^{135,136} neste trabalho foi observado que a quantidade de luz emitida é crescente à medida que cresce a concentração de luminol. Porém, em concentrações acima de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de luminol pouco ganho no sinal analítico foi observado. Portanto, para a obtenção do máximo de sinal com o mínimo gasto possível de reagente, a concentração de luminol adotada foi de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Com as condições descritas acima, foi possível a determinação de Br^- na faixa de concentração entre 10 e 100 mg L^{-1} com um volume de $100 \text{ } \mu\text{L}$ de solução de amostra. Com enriquecimento de Br_2 na solução aceptora, a detecção de concentrações menores foi possível, proporcionalmente ao volume de amostra utilizado. Maior magnitude de sinal foi obtido com 3 mL de solução de amostra, 3 minutos de abertura das válvulas V_1 - V_3 (Figura 6.1), portanto foram necessários 240 s para passagem completa da zona de amostra. Maiores volumes de amostra implicariam em um aumento do tempo de análise, porém, para não

sacrificar a frequência analítica e obter um boa sensibilidade, o volume da solução de amostra foi fixado em 3 mL.

Segundo MILOSAVLJVIC *et al.*,¹³⁷ o transporte de massa da solução doadora para a solução acceptora é mais eficiente quando a última está em movimento. Utilizando uma das principais vantagens da estratégia da multicomulação, que é a inserção discreta de uma solução, por meio da abertura programada da válvula solenóide, pulsos da solução acceptora foram inseridos no sistema de fluxos durante o período de enriquecimento. Com esta estratégia, foi possível renovar a solução em contato com a membrana. O resultado é apresentado na Figura 6.3, na qual pode ser observado um ganho de *ca.* 50 % na altura de pico quando utilizada esta estratégia em relação a solução acceptora estática.

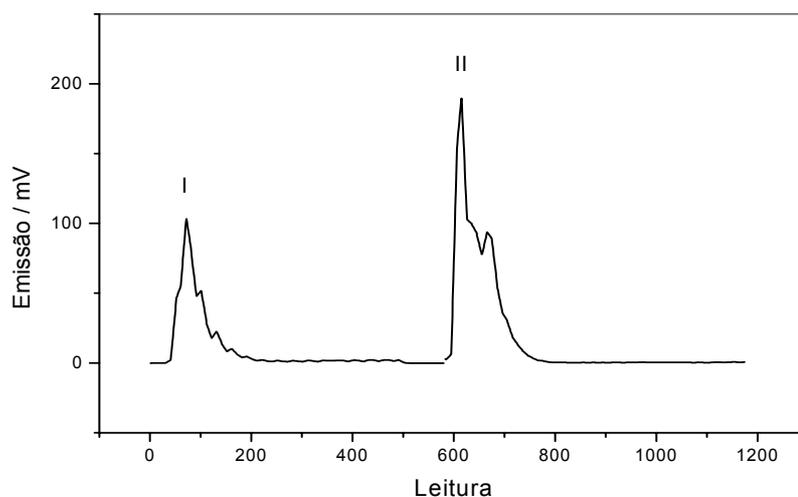


Figura 6.3 - Comparação do sinal transiente obtido com a solução acceptora estática (curva I) com o sinal obtido com a solução acceptora pulsada (curva II) durante o período de enriquecimento. Foi utilizado o sistema da Figura 6.1 com bobina de 100 cm em banho com temperatura controlada a 40 °C e uma solução 100 mg L⁻¹ de Br⁻ solução de amostra.

Utilizando soluções de referência, uma curva analítica foi obtida na faixa de concentração entre 1,0 e 200,0 µg L⁻¹ de Br⁻, com um coeficiente de correlação linear $r = 0,999$ e obtendo-se um limite de detecção de 0,8 µg L⁻¹ de Br⁻. Com uma curva na faixa de concentração entre 0,1 e 50,0 mg L⁻¹ também

foi observado uma boa linearidade, sendo obtido um $r = 0,999$. Na Figura 6.4 é apresentado um gráfico dos sinais transientes obtidos com soluções de referência de Br^- utilizando o procedimento proposto. Na Figura 6.4a é apresentado a emissão de quimiluminescência quantificada pelo detector em função do número de leituras, enquanto na Figura 6.4b, é apresentado em função do tempo. Devido ao longo tempo de enriquecimento, a opção de mostrar os sinais transientes em função do número de leitura foi adotada para poder exibir um grande número de sinais analíticos sem que eles ficassem distorcidos. Na Figura 6.4b é possível observar o surgimento de 1 pico a cada 300 s, sendo este o tempo de cada ciclo analítico(240 segundos para a etapa de oxidação/enriquecimento e 60 s para a etapa de detecção quimiluminescente).

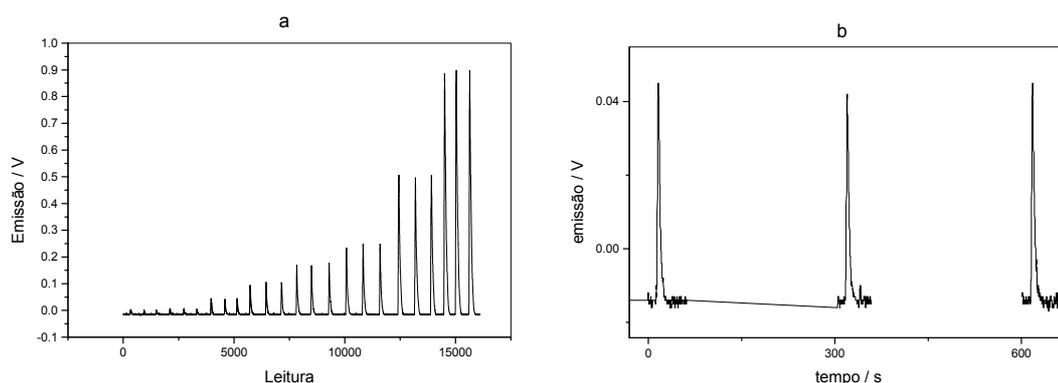


Figura 6.4 - Sinais transientes obtidos com o procedimento proposto para determinação de Br^- empregando o permanganato de potássio como oxidante. a – em função do número de leituras; da esquerda para direita os sinais são referentes a três injeções de 1,0; 5,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0, 200,0 e 400,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Br^- . b – em função do tempo (s) três sinais obtidos com uma solução de referência 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Br^- .

6.3.2. Oxidação pela cloramina-T

No item 6.3.1 foi proposto um procedimento automático em fluxo para determinação de íons brometo na faixa de concentração entre 1,0 e 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando medidas por quimiluminescência. O procedimento baseou-se na oxidação de Br^- a Br_2 , seguida da separação desse do meio oxidante através de

uma membrana de difusão gasosa. No fluxo acceptor, o Br_2 era transportado em direção à cela de fluxos, onde reagia com o luminol, emitindo luz como produto da reação. Porém, apesar do bom limite de detecção obtido ($0,8 \mu\text{g L}^{-1}$), o sistema se mostrou extremamente lento e quando empregado para determinação de brometo em amostras reais, a presença de alanina suprimiu totalmente o sinal analítico.

Com o objetivo de contornar as limitações apresentadas pelo sistema descrito na Figura 6.1 e simplificar o sistema, outros agentes oxidantes foram testados. A cloramina-T foi o reagente que apresentou melhores resultados. Este por sua vez é um reagente empregado em diversos procedimentos que necessitam de uma etapa de oxidação.⁸⁸ Por meio de testes preliminares, foi observado que em certas condições experimentais este reagente interagiu pouco com o luminol, emitindo uma fraca radiação, produzindo uma linha de base estável e de baixo valor em torno de 5 mV. Portanto, foi possível monitorar a reação de quimiluminescência entre Br_2 e o luminol na presença da cloramina-T.

Nos estudos preliminares foi utilizado um sistema clássico de análises por injeção em fluxo similar ao representado na Figura 3.9. Porém, para controle dos tempos envolvidos em cada etapa da análise e para economizar os reagentes, foi utilizado o sistema apresentado na Figura 6.2. Esse sistema possui um injetor proporcional e válvulas solenóides controladas por um computador. O emprego do injetor proporcional se justifica devido à utilização da coluna de troca-iônica, a qual requer mudanças no sentido dos fluxos durante as etapas de concentração e de eluição. A maneira mais eficiente para realizar esta inversão de fluxos é obtida utilizando o injetor proporcional.¹³⁸

Para gerar pouco efluente, as vazões foram arbitrariamente selecionadas como $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ para o fluido transportador (Cs) e $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ para as soluções de cloramina-T (R1) e de luminol (R2). Os experimentos iniciais foram conduzidos utilizando uma solução de referência de brometo com concentração de 10 mg L^{-1} e uma alça de amostragem de grande volume, $500 \mu\text{L}$, para evitar

influência dos efeitos de dispersão. As demais variáveis do sistema analítico foram estudadas pelo método univariado e os estudos de cada parâmetro são mostrados a seguir.

A primeira variável a ser estudada foi a concentração da solução de cloramina-T. A concentração desse reagente foi variada entre 0,01 e 2 % (m/v) e os resultados podem ser observados na Figura 6.5. De acordo com a figura, é possível observar que o máximo de sinal analítico foi obtido com uma solução de cloramina-T com concentrações de 0,1 %.

Apesar do potencial de oxidação da cloramina-T aumentar com o aumento da concentração hidrogeniônica,¹³⁹ quando o reagente foi preparado em tampão acetato (pH = 4,7), foi observado uma diminuição do sinal, devido à alteração do pH ótimo da reação do luminol (10,5). Como não havia variação no pH das soluções de amostras, a solução do reagente oxidante não precisou ser tamponada, sendo então este reagente preparado em água destilada.

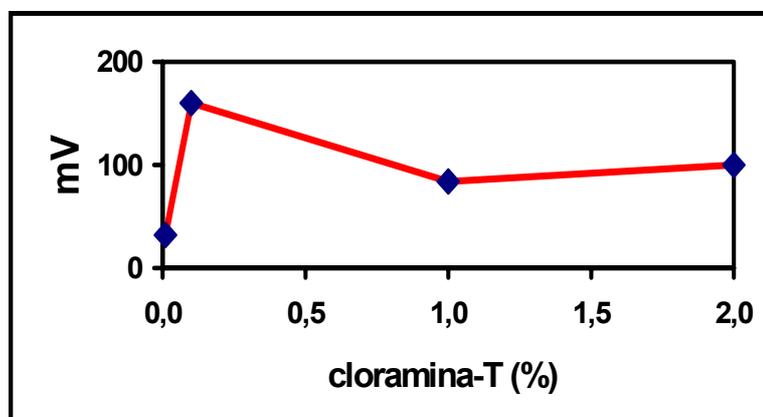


Figura 6.5 - Estudo da concentração da solução de cloramina-T.

A concentração do luminol foi variada entre 1×10^{-6} e 1×10^{-2} mol L⁻¹. Os resultados obtidos, empregando solução de referência de 10,0 e 20,0 mg L⁻¹ de brometo, respectivamente, são mostrados na Figura 6.6. Como pode ser observado na figura, o sinal é crescente até a concentração de 1×10^{-3} mol L⁻¹, acima desse valor de concentração de luminol, não houve ganho de sinal analítico. Este resultado é concordante com o resultado observado anteriormente no sub-item anterior (6.3.1), e também nos trabalhos encontrados na literatura,

para determinação de hipoclorito.^{135,136} Portanto, para a obtenção do máximo de sinal com o mínimo gasto possível de reagente, a concentração de luminol adotada foi de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

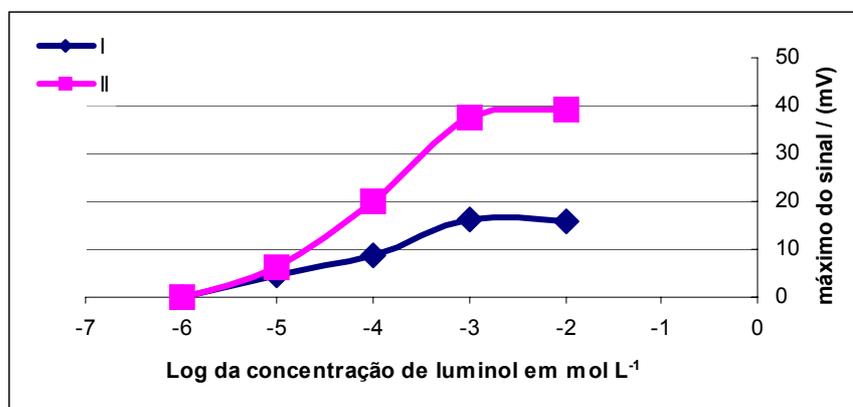


Figura 6.6 - Estudo da concentração da solução de luminol. I – $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Br^- , II – $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Br^- .

Com respeito ao comprimento da bobina de reação, na Figura 6.7 é apresentada a influência desse parâmetro em relação ao sinal analítico. Como pode ser observado na figura, a oxidação do brometo com a cloramina-T é uma reação de cinética rápida, pois não houve diferença significativa entre os sinais analíticos variando-se o comprimento da bobina entre 0 e 250 cm. Com a ausência da bobina de reação, não foram observados problemas de mistura entre as soluções de amostra e cloramina-T, e o valor do coeficiente de variação obtido foi menor que 2 %. Portanto, somente um tubo de 10 cm foi utilizado como percurso entre a confluência *x* e *y*, da Figura 3.9 e, conseqüentemente, da Figura 6.2.

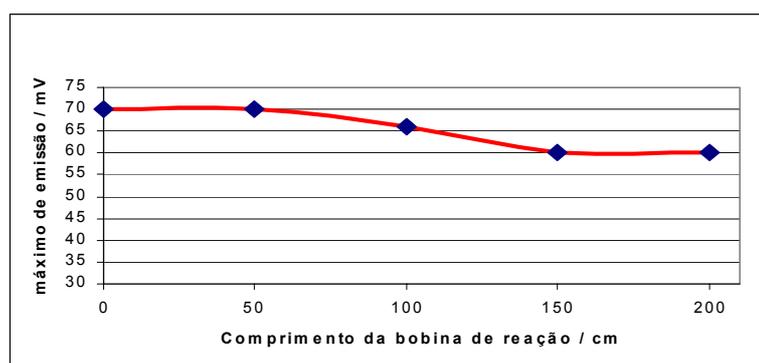


Figura 6.7 - Estudo do comprimento da bobina de reação.

Com as variáveis do sistema de análises em fluxo otimizadas, foram processadas as soluções de referência entre 0 e 100,0 mg L⁻¹ e com os resultados analíticos foi estimado coeficiente de correlação linear $R = 0,999$ ($n = 7$), coeficiente de variação menor que 2 %, para uma solução de referência de 10,0 mg L⁻¹ e um limite de detecção de 0,5 mg L⁻¹ de Br⁻. Apesar de ser estável e preciso, o sistema não apresentou uma sensibilidade adequada para as concentrações de brometo, considerando aquelas encontradas na amostra (< 1 mg L⁻¹). Como não havia separação entre a solução oxidante e a solução de luminol, qualquer tentativa de melhorar o limite de detecção, mediante a otimização de outras variáveis experimentais, como temperatura, por exemplo, aumentava a interação entre a cloramina-T e o luminol e, conseqüentemente, o procedimento era inviabilizado.

Apesar da baixa sensibilidade, testou-se a viabilidade da determinação de brometo na presença do aminoácido, assim soluções de 10, 20 e 30 mg L⁻¹ de Br⁻ foram preparadas em 0,1 % de alanina. No entanto, com as soluções contendo alanina, o sinal de quimiluminescência foi totalmente suprimido, provavelmente, devido à reação do Br₂ com o aminoácido, prejudicando a reação com o luminol. De fato, esta supressão de quimiluminescência já foi proposta na literatura como meio de detecção de aminoácidos.⁹³

Considerando o discutido acima, para pré-concentrar o brometo e eliminar a interferência causada pela alanina, foi utilizada uma coluna preenchida com uma resina AG1-X8 (aniônica forte).

Para pré-concentrar e separar os íons brometo da matriz da amostra, foi utilizado o diagrama de fluxos apresentado na Figura 6.2. Inicialmente, foi estudada a influência do volume da amostra considerando as várias características analíticas. Variando-se o comprimento da alça de amostragem (L-Figura 6.2), o volume de amostra foi de 1,5, 3,0, 4,5 e 6,0 mL, respectivamente. Para esse

experimento, foram utilizadas soluções de referência preparadas em água destilada.

Como descrito no procedimento experimental, a alça de amostragem era preenchida com as soluções de referência e injetadas no sistema analítico. Quando todo conteúdo da alça de amostragem passasse pela coluna, o injetor imediatamente voltava ao seu estado original, para que o analito fosse eluído. Na Tabela 6.1 encontram-se as características analíticas obtidas com o sistema proposto. De acordo com os dados da tabela, é possível notar que com o acréscimo do volume de amostra, melhor é a sensibilidade, porém, com um acréscimo na geração de efluente e um decréscimo na frequência analítica. Como a concentração de brometo nas soluções de amostras encontravam-se na faixa de 0,1 e 1 mg L⁻¹, optou-se por manter o volume de 1,5 mL de amostra, ou seja, 300 cm de alça de amostragem.

Tabela 6.1 - Características analíticas em função do volume de amostra.

| Característica Analítica | Volume de amostra | | | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| | 1,5 mL | 3,0 mL | 4,5 mL | 6,0 mL |
| Equação da reta | $y = 0,034x + 0,120$ | $y = 0,128x + 0,738$ | $y = 0,264x + 0,532$ | $Y = 0,322x + 1,82$ |
| Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 100 – 1000 | 50 - 1000 | 10 – 500 | 10 – 500 |
| Lim. de detecção* ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 8,95 | 2,35 | 1,13 | 0,93 |
| Amostras por hora | 40 | 30 | 24 | 20 |
| Vol. luminol (mL) | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| Vol. Cloramina-T(mL) | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| Vol. NaNO ₃ (mL) | 1,5 | 2 | 2,5 | 3,0 |
| Vol. Total(mL) | 2,3 | 2,8 | 3,3 | 3,8 |

* limite de detecção calculado de acordo com as recomendações da IUPAC⁶²

É interessante salientar que, o gasto das soluções de luminol e de cloramina-T foi o mesmo para todos os estudos, pois estas soluções só foram utilizadas na etapa de eluição do analito, mediante ao acionamento das válvulas.

Definido o volume de amostra, que resultou em adequada sensibilidade, o sistema foi estudado com uma solução de 0,5 mg L⁻¹ de brometo em 0,1 % de alanina. Os resultados obtidos nesse estudo foram comparados com aqueles obtidos com uma solução de Br⁻ preparada em água. Aplicando-se a mesma

estratégia empregada no estudo acima, ou seja, comutando o injetor assim que todo conteúdo da alça de amostragem passasse pela coluna, não foi obtido nenhum sinal de quimiluminescência. Então, foi avaliado um intervalo de tempo para que o fluxo de água que transportava a amostra, lavasse a coluna, eliminando assim a alanina remanescente.

Os resultados de recuperação, em função do intervalo de tempo para limpeza da coluna, encontram-se na Figura 6.8. Observa-se que com o acréscimo do tempo de limpeza, houve um acréscimo na recuperação do brometo até se estabilizar a partir de 150 s. Porém, as recuperações não ultrapassaram a taxa de 88 %, provavelmente, devido ao fato de que parte da alanina presente na solução de amostra estava desprotonada, ficando também retida na coluna aniônica. Para contornar esse problema, substituiu-se o transportador água por um transportador contendo ácido. Contudo, mesmo empregando soluções de ácidos diluídos, devido ao efeito da ação das massas, o brometo retido da coluna foi eluído pelos ânions desse ácido.

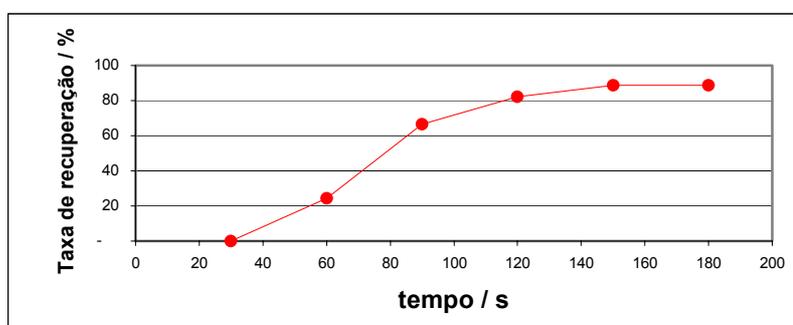


Figura 6.8 - Estudo do tempo de limpeza.

Para melhoria do fator de recuperação, as soluções de referência de brometo foram preparadas em 0,1 % de alanina. Na Tabela 6.2 são apresentados os resultados de recuperação obtidos. Para comparação, na Tabela 6.3 também são apresentados os resultados obtidos com soluções de referência preparadas em água. Nessa última tabela, pode-se observar que não foi obtido fator de

recuperação maior do que 84 %, enquanto que, para soluções preparadas em alanina foram obtidos valores entre 94 e 104 % (Tabela 6.2).

Tabela 6.2 - Teste de recuperação de brometo com soluções de referência preparadas em 0,1 % de alanina.

| Amostra | Br ⁻ na amostra | Br ⁻ adicionado(mg/l) | Br ⁻ encontrado | Recuperação |
|---------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|-------------|
| 1 | 0,451 | 0,100 | 0,555 | 104,4% |
| 2 | 0,221 | 0,100 | 0,317 | 96,0% |
| 2 | 0,221 | 0,250 | 0,474 | 101,2% |
| 3 | 0,352 | 0,100 | 0,456 | 104,0% |
| 4 | 0,331 | 0,100 | 0,425 | 94,0% |

Tabela 6.3 - Teste de recuperação de brometo com soluções de referência preparadas em H₂O.

| Amostra | Br ⁻ na amostra | Br ⁻ adicionado(mg/l) | Br ⁻ encontrado | Recuperação |
|---------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|-------------|
| 2 | 0,190 | 0,100 | 0,273 | 83,0% |
| 3 | 0,293 | 0,100 | 0,373 | 80,0% |
| 4 | 0,273 | 0,100 | 0,357 | 84,0% |
| 0.5 | 0,000 | 0,500 | 0,392 | 78,4% |
| 0.4 | 0,000 | 0,400 | 0,336 | 84,0% |
| 0.2 | 0,000 | 0,200 | 0,155 | 77,5% |

6.3.3. Determinação de Brometo em amostras reais

Com a definição de todas as variáveis experimentais, o sistema foi aplicado para a determinação de brometo em amostras de *L*-alanina, sintetizadas no laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Foi dissolvido aproximadamente 0,1 g de amostra em 100 mL em água destilada e, posteriormente, processadas no sistema de fluxos apresentado na Figura 6.2. O tempo para que cada etapa do procedimento fosse realizado encontra-se descrito na Tabela 6.4. É interessante salientar que, cada ciclo analítico corresponde a todas as etapas necessárias para a realização do procedimento, e o tempo total de cada ciclo é de 180 s, ou seja, o sistema é capaz de executar 20 determinações por hora. Contudo, devido à presença das válvulas V₁ e V₂, os reagentes cloramina-T e luminol só fluem pelo percurso

analítico durante 60 s, entre $t = 150$ s e $t = 210$ s, isto é, $t = 30$ s do próximo ciclo. Durante todo o ciclo de análise, o computador realiza a aquisição de dados.

Tabela 6.4 - Tempo para que cada etapa fosse realizada no procedimento de determinação de brometo

| Etapa | Eventos que ocorrem nesta etapa | Posição do Injetor* | Tempo (s) |
|-------|---|---------------------|-----------|
| 1 | Preenchimento da alça de amostragem | A | --- |
| 2 | Comutação do injetor para deslocar a amostra em direção a coluna, para concentração e limpeza. | B | 0 |
| 3 | As válvulas V_1 e V_2 são desligadas (caso não seja o primeiro ciclo analítico) | B | 30 |
| 4 | Volta do injetor a posição de amostragem para eluição do analito da coluna e para o preenchimento de uma nova amostra na alça de amostragem. Também, nesta etapa, são acionadas as válvulas V_1 e V_2 das soluções de cloramina-T e luminol, respectivamente. | A | 150 |
| 5 | Comutação do injetor para deslocar uma nova amostra em direção a coluna, para concentração e limpeza, dando início a um novo ciclo analítico. | B | 180 |

* A = injetor na posição de amostragem; B = injetor na posição alternativa (como mostrado na Figura 6.2).

Na Figura 6.9 são apresentados os sinais transientes obtidos com soluções de referência de Br^- , e os sinais obtidos de algumas amostras. Na Tabela 6.5 são apresentados os resultados obtidos na análise de 7 amostras. Com o procedimento proposto, obteve-se uma faixa de linearidade entre 0,100 e 1,00 mg L^{-1} de Br^- com um coeficiente de correlação linear igual a 0,999. O limite de detecção foi de 8,95 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Br^- . Outras características analíticas foram um coeficiente de variação igual a 3,0 % para 10 medidas de uma solução 0,100 mg L^{-1} de Br^- e um consumo de 0,07 mg de luminol e 0,4 mg de cloramina-T por determinação. A exatidão foi comprovada pelo método de adição de padrão, e foi observada recuperação de brometo na faixa entre 94 e 104 % (Tabela 6.5).

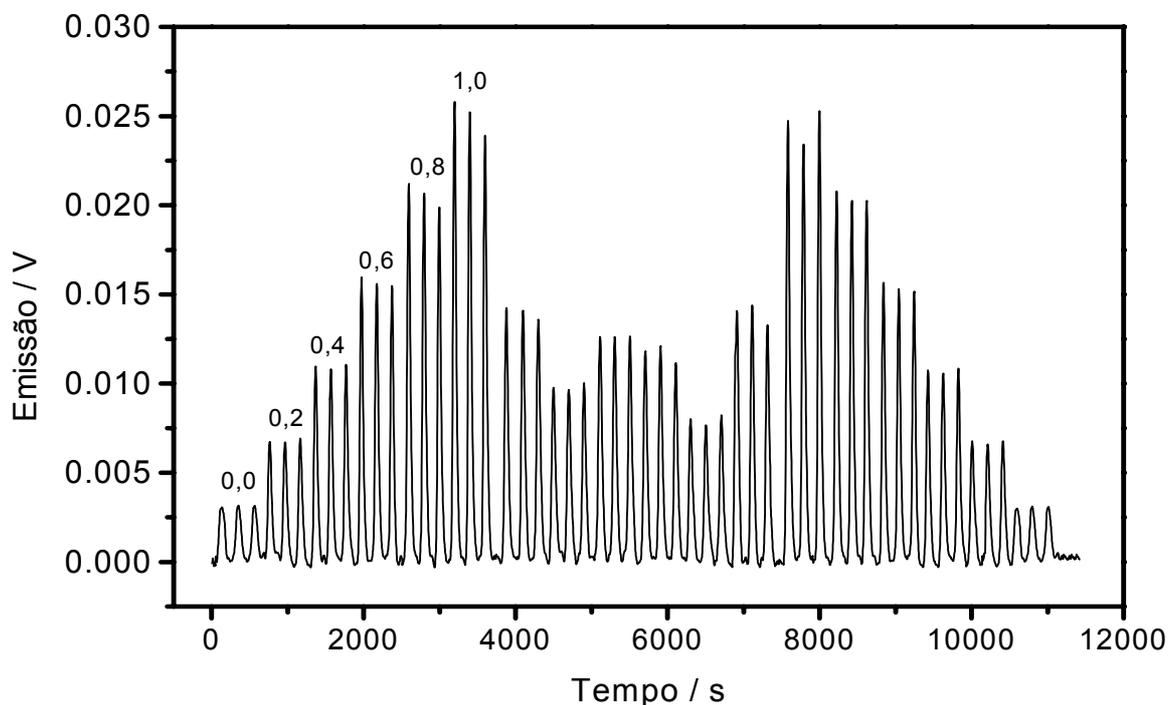


Figura 6.9 - Sinais transientes obtidos com o sistema proposto para determinação de Br⁻. Foi utilizado o sistema da Figura 6.2. Números no gráfico indicam a concentração de Br⁻ em mg L⁻¹.

Tabela 6.5 - Concentração de brometo encontrado nas amostras.

| Amostra | Br ⁻ (mg L ⁻¹) | Massa de ALA (g) | mg de Br ⁻ em 1 g ALA | CV*(%) |
|---------|---------------------------------------|------------------|----------------------------------|--------|
| 1 | 0,451 ± 0,006 | 0,1032 | 0,437 ± 0,006 | 1,3 |
| 2 | 0,221 ± 0,003 | 0,0939 | 0,235 ± 0,004 | 1,5 |
| 3 | 0,352 ± 0,003 | 0,1020 | 0,345 ± 0,003 | 0,9 |
| 4 | 0,331 ± 0,006 | 0,1010 | 0,328 ± 0,006 | 1,7 |
| 5 | 0,47 ± 0,01 | 0,1000 | 0,47 ± 0,01 | 2,5 |
| 6 | 0,305 ± 0,003 | 0,1002 | 0,305 ± 0,003 | 1,1 |
| 7 | 0,153 ± 0,002 | 0,0963 | 0,160 ± 0,002 | 1,3 |

*CV = coeficiente de variação

6.4. Conclusões

O sistema de fluxos proposto para a determinação de brometo utilizando a cloramina-T como agente oxidante apresentou um bom desempenho analítico e mostrou-se adequado para a determinação desse ânion em amostras de alanina. O sistema realiza as etapas do procedimento automaticamente. Uma vez

fornecidos os parâmetros experimentais, o programa de controle e aquisição de dados executava o procedimento sem a necessidade de intervenção do operador. Além disso, a automação do procedimento analítico possibilitou uma economia de reagente, pois mediante o uso de válvulas solenóides os reagentes só eram inseridos no sistema de fluxos quando eram necessários, resultando em menor geração de efluente e, conseqüentemente, um menor custos por análise.

CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Face ao exposto, pode-se dizer que a utilização de um computador para o controle de sistemas de análises em fluxo permitiu o desenvolvimento de procedimentos analíticos automáticos, além de contar com características vantajosas no que se refere ao gasto de reagente e facilidade operacional. Isso foi demonstrado nos capítulos 4, 5 e 6, para os sistemas de determinação de NO_2 , *L*-alanina e brometo, os quais apesar de requererem uma série de etapas analíticas, tais como, parada de fluxo, diluição, pré-concentração, limpeza da amostra, etc, todas elas foram realizadas automaticamente sem a necessidade de interferência do operador. Outra vantagem patente do uso desses sistemas analíticos é a adição controlada de reagentes, que é economicamente atraente.

Com respeito aos sistemas de detecção, descritos nos capítulos 3 e 4, concluiu-se que ambos são adequados para a utilização em sistemas de análises em fluxo. O projeto destes se destacam pela simplicidade e baixo custo. Este trabalho reforçou o conceito que a utilização do computador permitiu a substituição de sistemas eletrônicos complexos para o monitoramento, a aquisição e tratamento dos dados analíticos. No caso do analisador de NO_2 , conforme no capítulo 4, foi possível utilizar dois LEDs com acionamento intermitente para medida de absorvância. O computador era responsável pelo acionamento dos LEDs e pela aquisição de dados, separação dos sinais e cálculo do valor de absorvância. Foi possível assim corrigir interferências tanto físicas como químicas, ou sejam, vibrações, microbolhas, efeito Schlieren e deposição do reagente nas paredes da cela de fluxos, etc. É interessante salientar que essas operações poderiam ser realizadas sem o auxílio de um computador, contudo, seria necessário um conhecimento profundo em eletrônica para o desenvolvimento de um sistema capaz de realizar todas as etapas descritas acima.

Em relação à utilização de enzima no sistema de análises em fluxo proposto para determinação de *L*-alanina, esta se mostrou vantajosa, pois, como a enzima não sofreu interferência de amônia, foi possível o desenvolvimento de sistemas mais simples, sem a necessidade de separação dessa espécie da matriz da amostra, como é o caso dos métodos espectrofotométricos, visto que os reagentes cromogênicos para determinação de aminoácidos também reagem com a amônia.

Em continuidade aos trabalhos propostos, sugere-se a determinação de glicina em linha de síntese. A determinação deste aminoácido foi proposta no projeto de pesquisa original, porém, a glicina reage muito pouco com a *L*-aminoácido oxidase, a sua determinação por reação enzimática e detecção quimiluminescente foi inviabilizada. Para que isso ocorra, será desenvolvido um procedimento espectrofotométrico utilizando a ninidrina como reagente cromogênico. Como esta substância também reage com amônia, serão estudadas diversas formas de ou separação desta espécie da matriz da amostra. Neste aspecto, em estudos preliminares, devido à alta solubilidade da amônia em temperatura ambiente, os resultados não foram promissores quando alcalinizando a amostra e posterior borbulhamento com gás inerte para remoção do NH_3 .

Uma outra alternativa seria o aquecimento até o ponto de ebulição da amostra alcalinizada e posterior borbulhamento com gás inerte. Porém, devido à perda de água, no processo de ebulição será necessário usar uma substância estável como traçador, para compensar o efeito de concentração do analito devido a perda de água. Também será estudado o uso de membranas de difusão gasosa para separação da amônia. Como o processo de difusão não é eficiente, será usada a estratégia de aprisionamento químico (“chemical trapping”), para aumentar a eficiência do processo.

CAPÍTULO 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LEHNINGER, A. L. *Princípios de Bioquímica*. 2 ed. São Paulo, Sarvier, 1995. 839p.
2. OLSCHIEWSKI, H.; ERLINKÖTTER, A.; ZABOROSCH, C. & CHEMNITIUS, G. C. "Screen-printed enzyme sensors for *L*-lysine determination". *Enzyme Microb. Technol.*, **26**:537, 2000.
3. VÄÄNÄNEN, P. P. S. & KOIVISTOINEN, P. E. "Determination of protein in foods: Comparison of net protein and crude protein (Nx6.25) values". *Food Chem.*, **57**:27, 1996.
4. van EIJK, H. M. H.; ROOYAKKERS, D. R.; WAGENMAKERS, A. J. M.; SOETERS, P. B. & DEUTZ, N. E. P. "Isolation and quantitation of isotopically labeled amino acids from biological samples". *J. Chromatogr., B*, **691**:287, 1997.
5. TRIVELIN, P. C. O.; SALATI, E. & MATSUI, E. "Enriquecimento Isotópico de ^{15}N por Cromatografia de Troca Iônica. Produção de Sulfato de Amônio Enriquecido em ^{15}N ". *Energia Nuclear e Agricultura*, Piracicaba, 1 (2): 59-75, jul/dez., 1979.
6. RUZICKA, J & HANSEN, E. H. "Flow injection analyses. 1. New concept of fast continuous-flow analysis". *Anal. Chim. Acta*, **78**:154, 1975.
7. RUZICKA, J. & HANSEN, E. H. "Flow Injection Analysis". 2nd ed., New York, Ed. John Wiley e Sons, 1988, 498p.
8. FANG, Z. "Flow Injection Separation and Preconcentration". 1st ed. Weinheim, Germany; VCH, 1993, 259p.
9. SEGUNDO, M. A. & RANGEL, A. O. S. S. "Flow analysis: a critical view of its evolution and perspectives". *J. Flow injection Anal.*, **9**:3, 2002.
10. TROJANOWICZ, M. "Flow Injection Analysis. Instrumentation and Applications". World Scientific Publishing Co. Singapore, 2000, 479p.
11. FERREIRA, E. C. & ROSSI, A. V. "A Quimiluminescência como Ferramenta Analítica: do Mecanismo a Aplicações da Reação do Luminol em Métodos Cinéticos de Análise". *Quim. Nova*, **25**:1003, 2002.

12. RUZICKA J. & MARSHALL, G. D. "Sequential injection - a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays" *Anal Chim Acta*, **237**:329, 1990.
13. OLIVEIRA, P. C. C. & MASINI, J. C. "Sequential injection determination of chromium(VI) by transient oxidation of brucine with spectrophotometric detection and in-line dilution". *Analyst* **123**:2085, 1998.
14. REIS, B.F.; GINÉ, M. G.; 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**:129, 1994.
15. MARTELLI, P. B.; REIS, B. F.; KORN, M. & RUFINI, I. A. "The use of ion exchange resin for reagent immobilization and concentration in flow systems. Determination of nickel in steel alloys and iron speciation in waters". *J. Braz. Chem. Soc.*, **8**:479, 1997.
16. ALBERTIN, R.; ARRIBAS, M. A. G.; BASTOS, E. L.; ROPKE, S.; SAKAI, P. N.; SANCHES, A. M. M.; STEVANI, C. V.; UMEZU, I. S.; YU, J. & BAADER, W. J. "Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para a sala de aula". *Quím. Nova*, **21**(6):772, 1998.
17. ISACSSON, U. & WETTERMARK, G. "Chemiluminescence in analytical-chemistry". *Anal. Chim. Acta*, **68**:339, 1974.
18. ROBARDS, K. & WORSFOLD, P. J. "Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence". *Anal. Chim. Acta*, **266**:47, 1992.
19. STEVANI, C. V. & BAADER, W. J. "O sistema quimiluminescente peróxi-oxalato". *Quím. Nova*, **22**:715, 1999.
20. DODEIGNE, C.; THUNUS, L. & LEJEUNE, R. "Chemiluminescence as a diagnostic tool. A review". *Talanta*, **51**:415, 1999.
21. GUNDERMANN, K. D. & McCAPRA, F. "Chemiluminescence in Organic Chemistry". Berlim, Springer-Verlag, 1987. 217p.
22. PALILIS, L. P. & CALOKERINOS, A. C. "Analytical applications of chemiluminogenic reactions". *Anal. Chim. Acta*, **413**:175, 2000.
23. HAYASHI, K.; SASAKI, S.; IKEBUKURO, K. & KARUBE, I. "Highly sensitive chemiluminescence flow injection analysis system using

- microbial peroxidase and a photodiode detector". *Anal. Chim. Acta*, **329**:127, 1996.
24. MARSHALL, R. W. & GIBSON, T. D.; "Determination of sub-nanomole amounts of hydrogen-peroxide using an immobilized enzyme flow cell - application to the determination of ethanol". *Anal. Chim. Acta*, **266**:309, 1992.
 25. ROGEN, H. A. H.; VAN DER HORST, H. M.; VAN OOSTERHOUT, A. J. M.; BULT, A. & VAN BENNEKOM, W. P. J. "Application of xanthine oxidase-catalyzed luminol chemiluminescence in a mouse interleukin-5 immunoassay". *J. Immunol. Methods*, **197**: 161, 1996.
 26. BOSTICK, D. T. & HERCULES, D. M. "Quantitative-determination of blood-glucose using enzyme induced chemiluminescence of luminol". *Anal. Chem.*, **47**(3): 447, 1975.
 27. ROSE, A. L. & WAITE, T. D. "Chemiluminescence of luminol in the presence of iron(II) and oxygen: Oxidation mechanism and implications for its analytical use". *Anal. Chem.* **73**(24): 5909, 2001.
 28. LI, Z. P.; LI, K. A. & TONG, S. Y. "Study of the catalytic effect of copper(II)-protein complexes on luminol-H₂O₂ chemiluminescence reaction and its analytical application". *Anal. Lett.* **32** (5):901, 1999
 29. MACDONALD A. & NIEMAN T. A. "Flow-injection and liquid-chromatography detector for amino-acids based on a postcolumn reaction with luminol". *Anal. Chem.* **57**(4): 936, 1985.
 30. SAITOH, K.; HASEBE, T.; TESHIMA, N.; KURIHARA, M. & KAWASHIMA, T. "Simultaneous flow-injection determination of iron(II) and total iron by micelle enhanced luminol chemiluminescence" *Anal. Chim. Acta*, **376**(2): 247, 1998.
 31. PAREJO, I; PETRAKIS, C. & KEFALAS, P. J. "A transition metal enhanced luminol chemiluminescence in the presence of a chelator" *J. Pharmacol. Toxicol.* **43**(3): 183, 2000.
 32. KOERNER P. J. & NIEMAN T. A. "Luminol chemi-luminescence hplc reaction detector for amino-acids and other ligands". *Mikrochim. Acta*, **2** (1-3): 79, 1987.
 33. CUI, H.; MENG, R.; JIANG, H.; SUN, Y. & LIN, X. "Inhibition of luminol and lucigenin chemiluminescence by reducing organic compounds" *Luminescence*, **14**(3):175, 1999.

34. COLLAUDIN, A. B. & BLUM, L. J. "Enhanced luminescent response of a fibre-optic sensor for H₂O₂ by a high-salt-concentration medium" *Sensor. Actuat. B-Chem.* **39**(1-3): 189, 1997.
35. BAUSE, D. E. & PATTERSON, H. H. "Enhancement of luminol chemiluminescence with halide-ions". *Anal. Chem.* **51**(13): 2288, 1979.
36. XIAO, C.; KING D. W.; PALMER, D. A. & WESOLOWSKI, D. J. "Study of enhancement effects in the chemiluminescence method for Cr(III) in the ng 1(-1) range" *Anal. Chim. Acta*, **415**(1-2): 209, 2000.
37. NAKAMURA, H.; TAKANA, H.; HASEGAWA, M. MASUDA, Y.; MASUDA, Y.; ARIKAWA, Y.; NOMURA, Y.; IKEBUKURO, K. & KARUBE, I. "An automatic flow-injection analysis system for determining phosphate ion in river water using pyruvate oxidase G (from *Aerococcus viridans*)". *Talanta*, **50**(4): 799, 1999.
38. XIAO, C.; PALMER, D. A.; WESOLOWSKI, D. J.; LOVITZ, S. B. & KING, D. W. "Carbon dioxide effects on luminol and 1,10-phenanthroline chemiluminescence", *Anal. Chem.*, **74**(9): 2210, 2002.
39. LAN, Z. H. & MOTTOLA, H. A. "Carbon dioxide-enhanced luminol chemiluminescence in the absence of added oxidant" *Analyst*, **121** (2): 211, 1996.
40. JOHNSON, T. & IRGUM, K. "New nucleophilic catalysts for bright and fast peroxyoxalate chemiluminescence". *Anal. Chem.* **72**(7): 1373, 2000.
41. HADD, A. G.; SEEBER, A. & BIRKS, J. W. "Kinetics of two pathways in peroxyoxalate chemiluminescence". *J. Org. Chem.*, **65**(9): 2675, 2000.
42. NEUVONEN, H. A "Two-intermediate model for imidazole-promoted peroxyoxalate chemiluminescence". *J. Biolum. Chemilum.* **12**(5): 241, 1997.
43. HONDA, K.; SEKINO, J. & IMAI, K. "Bis(2,4-dinitrophenyl) oxalate as a chemi-luminescence reagent in determination of fluorescent compounds by flow-injection analysis". *Anal. Chem.*, **55**(6): 940, 1983.
44. DeFILLIPO, K. A. & GRAYESKI, M. L. "Flow-injection chemiluminescent method for an enzyme-labeled DNA probe". *Anal. Chim. Acta*, **249**(1): 155, 1991.
45. van ZONEM, P.; KAMMINGA, D. A.; GOOIJER, C.; VELTHORST, N. H.; FREI, R. W. & GÜBITZ, G. "Quenched peroxyoxalate

- chemiluminescence as a new detection principle in flow-injection analysis and liquid-chromatography". *Anal. Chem.*, **58**(6): 1245, 1986.
46. GRAYESKI, M. L.; WOOLF, E. J. & HELLY, P. J. "Quantitation of enzymatically generated hydrogen-peroxide based on aqueous peroxyoxalate chemiluminescence". *Anal. Chim. Acta*, **183**: 207, 1986.
 47. van ZOONEM, P.; KAMMINGA, D. A.; GOOIJER, C.; VELTHORST, N. H. & FREI, R. W. "A solid-state chemi-luminescence detector for hydrogen-peroxide based on an immobilized luminophore - application to rain water". *Anal. Chim. Acta*, **174**: 151, 1985.
 48. GERARDI, R. D.; BARNETT, N. W. & JONES, P. "Two chemical approaches for the production of stable solutions of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) for analytical chemiluminescence". *Anal. Chim. Acta*, **388**(1-2): 1, 1999.
 49. JACKSON, W. A. & BOBBITT, D. R. "Chemiluminescent detection of amino-acids using in-situ generated Ru(bpy)₃⁽³⁺⁾". *Anal. Chim. Acta*, **285**(3): 309, 1994.
 50. HANAOKA, S.; LIN, J. M. & YAMADA, M. "Chemiluminescent flow sensor for H₂O₂ based on the decomposition of H₂O₂ catalyzed by cobalt(II)-ethanolamine complex immobilized on resin". *Anal. Chim. Acta.*, **426**(1): 57, 2001.
 51. MARSHALL, R. W. & GIBSON, T. D. "Determination of sub-nanomole amounts of hydrogen-peroxide using an immobilized enzyme flow cell - application to the determination of ethanol". *Anal. Chim. Acta*, **266**(2): 309, 1992.
 52. WANG, Y. & YEUNG, E. S. "Indirect detection method for liquid-chromatography based on electrogenerated luminol chemiluminescence". *Anal Chim Acta*, **266**(2): 295, 1992.
 53. BOWLING, J. L.; DEAN, J. A.; GOLDSTEIN, G. & DALE, J. "Rapid-determination of chromium in natural-waters by chemiluminescence with a centrifugal fast analyser". *Anal. Chim. Acta*, **76**(1): 47, 1975.
 54. LEWIS, S. W; PRICE, D. & WORSFOLD, P. J. "Flow-injection assays with chemiluminescence and bioluminescence detection - A review". *J. Biolum. Chemilum.*, **8**(4): 183, 1993.
 55. SEITZ, W. R. & HERCULES, D. M. "Determination of trace amounts of iron(ii) using chemiluminescence analysis". *Anal. Chem.*, **44**(13): 2143, 1972.

56. BURGUERA, J. L. & TOWNSHEND, A. "Flow-injection analysis for monitoring chemi-luminescent reactions". *Anal. Chim. Acta*, **114**: 209, 1980.
57. STIEG, S. & NIEMAN, T. A. "Experimental and theoretical considerations of flow cell design in analytical chemiluminescence". *Anal. Chem.* **50**(3): 401, 1978.
58. SIMPSON, M. L.; SAYLER, G. S.; PATTERSON, G.; NIVENS, D. E.; BOLTON, E. K. ROCHELLE, J. M.; ARNOTT, J. C.; APPLGATE, B. M. RIPP, S. & GUILLORN, M. A. "An integrated CMOS microluminometer for low-level luminescence sensing in the bioluminescent bioreporter integrated circuit". *Sensor. Actuat. B-Chem.* **72**(2): 134, 2001.
59. JANASEK, D. & SPOHN, U. "An enzyme-modified chemiluminescence detector for hydrogen peroxide and oxidase substrates". *Sensor. Actuat. B-Chem.* **39**(1-3): 291, 1997.
60. SHAW, F. "Development and construction of an analyzer for the determination of the hydrogen-peroxide content of natural-water using a chemi-luminescent reaction". *Analyst*, **105**: 11, 1980.
61. REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G.; COSTA, A. C. S. & KORN, M. "Construção de uma cela de fluxo para medidas por espectrofotometria em fase sólida". *Quím. Nova*, **23**(1), 116, 2000.
62. MARTELLI, P. B.; REIS, B. F.; ARAÚJO, A. N. & MOTENEGRO, M. C. B. S. M. "A flow system with a conventional spectrophotometer for the chemiluminescent determination of lactic acid in yoghurt". *Talanta*, **54**(5): 879, 2001.
63. ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, "Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit". *Analyst*, **112**(2): 199, 1987.
64. UGUCIONE, C.; GOMES NETO, J. A. & CARDOSO, A. A. "Método colorimétrico para determinação de dióxido de nitrogênio na atmosférico com preconcentração em coluna de C-18. Seleção de variáveis em QSAR". *Quim. Nova*, **25**(3): 353, 2002.
65. MCCLENNY, W. A.; WILLIAMS, E. J.; COHEN, R. C. & STUTZ, J. "Preparing to measure the effects of the NO_x - methods for ambient air monitoring of NO, NO₂, NO gamma, and individual NO_Z species". *J. Air. Waste. Manage.*, **52**(5): 542, 2002.

66. SCHEPERS, D.; SCHLZE, G. & FRENZEL, W. "Spectrophotometric flow-through gas sensor for the determination of atmospheric nitrogen-dioxide", *Anal. Chim. Acta*, **308**(1-3): 109, 1995.
67. LODGE, J. P. "Methods For Air Sampling And Analysis", 3rd ed., Lewis, Ann Arbor, MI, 1989, p. 389.
68. MILANI, M. R. & DASGUPTA, P. K. "Measurement of nitrogen dioxide and nitrous acid using gas-permeable liquid core waveguides". *Anal. Chim. Acta*, **431**(2): 169, 2001.
69. PASQUINI, C. & da SILVA, M.D.H. "Determination of gaseous analytes in flow systems. A review". *J. Brazil Chem. Soc.* **10**(2): 85, 1999.
70. LUQUE DE CASTRO, M.D. & GAMIZ-GRACIA, L. "Miniaturisation: a well-defined trend in separation and preconcentration techniques". *Anal. Chim. Acta*, **351**: 23, 1997.
71. DASGUPTA, P. K.; EOM, I. Y.; MORRIS, K. J. & LI, J. "Light emitting diode-based detectors absorbance, fluorescence and spectroelectrochemical measurements in a planar flow-through cell". *Anal. Chim. Acta*, **500**: 337, 2003.
72. COMITRE, A. L. D. & REIS, B. F. "Liquid-liquid extraction procedure exploiting multicommutation in flow system for the determination of molybdenum in plants". *Anal. Chim. Acta*, **479**, 185, 2003.
73. <http://www.oceanoptics.com/products/usbls450.asp>
74. TODA K.; YOSHIOKA, K. I.; OHIRA, S. I. LI, J. & DASGUPTA, P. K. "Trace gas measurement with an integrated porous tube collector/long-path absorbance detector", *Anal. Chem.*, **75**(16): 4050, 2003.
75. LI, Q.; MORRIS, K. A.; DASGUPTA, P. K.; RAIMUNDO, I. M. & TEMKIN, H. "A portable flow injection analyzer with liquid-core waveguide based fluorescence, luminescence, and long path length absorbance detector". *Anal. Chim. Acta*, **479**:151, 2003.
76. BARRAT, R. S. "The preparation of standard gas-mixtures - a review". *Analyst*, **106**: 817, 1981.
77. MITCHELL, G.D. "A review of permeation tubes and permeators". *Separ. Purif. Method.*, **29**(1): 119, 2000.
78. HONAOKA, S.; LIN, J. M. & YAMADA, M. "Chemiluminescence behavior of the decomposition of hydrogen peroxide catalyzed by

- copper(II)-amino acid complexes and its application to the determination of tryptophan and phenylalanine". *Anal. Chim. Acta*, **409**(1-2): 65, 2000.
79. LI, B. & ZHANG, Z. "Chemiluminescence flow biosensor for determination of total D-amino acid in serum with immobilized reagents". *Sensor. Actuat. B-Chem.*, **69**(1-2): 70, 2000.
80. PARRA, M. J. A.; MATEOS, A. A.; MATA, M. M. & de MARIA, C. G. "Enzymatic flow-injection determination of L-phenylalanine using the stopped-flow and merging-zones techniques". *Talanta*, **47**(1): 121, 1998.
81. OLSCHIEWSKI, H.; ERLenkÖTTER, A.; ZABOROSCH, C. & CHEMNITIUS, G. C. "Screen-printed enzyme sensors for L-lysine determination". *Enzyme Microb. Tech.*, **26**(7): 537, 2000.
82. VARADI, M.; ADANYI, N.; SZABO, E. E. & TRUMMER, N. "Determination of the ratio of D- and L-amino acids in brewing by an immobilised amino acid oxidase enzyme reactor coupled to amperometric detection". *Biosens. Bioelectron.*, **14**(3): 335, 1999.
83. SILVESTRE, M. P. C. "Review of methods for the analysis of protein hydrolysates" *Food Chem.*, **60**(2): 263, 1997.
84. FAN, X. J.; YOU, J. M.; KANG, J. W.; OU, Q. Y. & ZHU Q. C. "New reagents for determination of amino acids by liquid chromatography with pre-column fluorescence derivatization". *Anal. Chim. Acta*, **367**(1-3): 81, 1998.
85. FOUNTOULAKIS, M. & LAHM, H. W. "Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins". *J. Chromatogr. A*, **826**(2): 109, 1998.
86. ZAIA, D. A. M.; RIBAS, K. C. L. & ZAIA, C. T. B. V. "Spectrophotometric determination of cysteine and/or carbocysteine in a mixture of amino acids, shampoo, and pharmaceutical products using p-benzoquinone". *Talanta*, **50**(5): 1003, 1999.
87. KLAMPFL, C.W.; BUCHBERGER, W.; TUNER, M. & FRITZ, J.S. "Determination of underivatized amino acids in beverage samples by capillary electrophoresis". *J. Chromatogr. A*, **804**(1-2): 349, 1998.
88. CHRISTENSEN, H. N.; RIGGS, T. R. & RAY, N.E. "Glycine determination in tissues - conditions for valid analysis by method of Alexander, Landwehr, and Seligman". *Anal. Chem.* **23**(10): 1521, 1951.
89. ICARO, M. C.; ESTRELA, O. A.; SAJEWICZ, M.; MATEO, J. V. G. & CLATAYUD, J. M. "Selective flow-injection biamperometric

- determination of sulfur-containing amino acids and structurally related compounds". *Anal. Chim. Acta*, **438**(1-2): 281, 2001.
90. JANJIÉ, T. J. & MILOVANOVIÉ, G. A. "New kinetic method for determination of ultramicro quantities of organic substances - determination of amino-acids (glycine, dl-serine, dl-phenylalanine, dl-glutamic acid, and l-arginine)". *Anal. Chem.* **45**(2): 390, 1973.
 91. PANTEL, S. & WEISZ, H. "Catalytic-kinetic determination of copper and l-histidine with use of a luminostat", *Anal. Chim. Acta*, **74**(2): 275, 1975.
 92. ZHANG, Y.; HUANG, B. & CHENG, J. "On-line indirect chemiluminescence detection in capillary electrophoresis". *Anal. Chim. Acta*, **363** (2-3): 157, 1998.
 93. LIAO, S. & WHANG, C. "Indirect chemiluminescence detection of amino acids separated by capillary electrophoresis". *J. Chromatogr. A*, **736**(1-2): 247, 1996.
 94. YANG, W.; ZHANG, Z. & DENG, W. "A capillary electrophoresis detection scheme for underivatized amino acids based on luminol-BrO⁻ chemiluminescence system". *Talanta*, **59**(5): 951, 2003.
 95. MICHALOWSKI, J. & KOJLO, A. "Use of amino-carbonyl reaction and chemiluminescence detection to the flow-injection determination of some amino acids". *Talanta*, **54**(1): 107, 2001.
 96. COSTIN, J. W.; FRANCIS, P. S. & LEWIS, S.W. "Selective determination of amino acids using flow injection analysis coupled with chemiluminescence detection". *Anal. Chim. Acta*, **480**(1): 67, 2003.
 97. LUONG, J. H. T.; BOUVRETTE, P. & MALE, K. B. "Developments and applications of biosensors in food analysis". *Trends. Biotechnol.*, **15**(9): 369, 1997.
 98. COOPER, J. C.; DANZER, J. & SCHMIDT, H. L. "enhanced selectivity in flow-injection analysis for l-amino-acids using electro dialysis with amino-acid oxidation". *Anal. Chim. Acta*, **282**(2): 369, 1993.
 99. BLOCKHOLT, R.; MASEPOHL, B.; KURFT, V. WITTMANN-LIEBOLD, B. & PISTORIUS, E. K. "Partial amino acid sequence of an L-amino acid oxidase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC6301, cloning and DNA sequence analysis of the AOXA gene". *B.B.A. - Gene Struct. Expr.*, **1264**(3): 289, 1995.

100. WELLNER, D. & MEISTER, A. "Studies on mechanism of action of l-amino acid oxidase". *J. Biol. Chem.*, **236**(8): 2357, 1961.
101. LEMIEUX, L.; PUCHADES, R. & SIMARD, R. E. "Free amino-acids in cheddar cheese - comparison of quantitation methods". *J. Food. Sci.*, **55**(6): 1552, 1990.
102. YAO, T. & WASA, T. "High-performance liquid-chromatographic detection of l-amino and d-amino acids by use of immobilized enzyme electrodes as detectors". *Anal. Chim. Acta*, **209**(1-2): 259, 1988.
103. MOTTOLA, H. A. "Enzymatic preparations in analytical continuous-flow systems". *Anal. Chim. Acta*, **145**: 27, 1983.
104. JOHANSSON, G.; EDSTROM, K. & OGREN, L. "Enzyme reactor electrode for determination of amino-acids". *Anal. Chim. Acta*, **85**(1): 55, 1976.
105. LEE, Y & HUH, M. H. "Development of a biosensor with immobilized L-amino acid oxidase for determination of L-amino acids". *J. Food. Biochem.*, **23**(2): 173, 1999.
106. PUCHADES, R.; LEMIEUX, L. & SIMARD, R.E. "Free amino-acids in cheddar cheese - comparison of quantitation methods". *J. Food Sci.*, **55**(6): 1552, 1990.
107. PALLESCHI, G.; VOLPE, G.; COMPAGNONE, D.; LAVAGNINI, M.G.; MOSCONE, D. & AMINE, A. "Amperometric alanine electrode". *Anal. Lett.*, **26**(7):1301, 1993.
108. NIKOLELIS, D. P. "Kinetic determination of l-alanine and l-alanine dehydrogenase with an ammonia gas-sensing electrode". *Anal. Chim. Acta*, **167**: 381, 1985.
109. MANA, H. & SPOHN, U. "Selective flow injection procedures for the determination of nitrogen containing analytes by gasdialytic-fluorimetric detection of enzymatically generated ammonia". *Anal. Chim. Acta*, **325**(1-2): 93, 1996.
110. REIS, B. F.; JACINTHO, A. O.; MORTATTI, J.; ZAGATTO, E. A. G; BERGAMIN Fo, H. & PESSENDA, L. C. R. "Zone-sampling processes in flow-injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, **123**: 221, 1981.
111. OLIVEIRA, C. R. Síntese De Alanina e Glicina com Elevado Enriquecimento No Isótopo ¹⁵N, Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura - USP, 2001, Dissertação de mestrado, 75 p.

112. JURGENS, H.; KABUSS, R.; PLUMBAUM, T.; WEIGEL, B.; KRETZMER, G.; SCHUGERL, K.; ANDRES, K.; IGNATZEK, E. & GIFFHORN, F. "Development of enzyme-cartridge flow-injection analysis for industrial-process monitoring .1. Development and characterization". *Anal. Chim. Acta*, **298**(2): 141, 1994.
113. VAN DER LINDEN, W. E. "Flow-injection analysis in online process-control". *Anal. Chim. Acta*, **179**: 91, 1986.
114. POLIPENKO, A. T.; TERLETSKAYA, A. V. & ZUI, O.V. "Determination of iodide and bromide by chemi-luminescence methods coupled with dynamic gas extraction". *Fresen. Z. Anal. Chem.* **335**(1): 45, 1989.
115. TWENGSTRÖM, S. & ANFÄLT, T. "The determination of bromide in natural-waters by flow-injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, **179**:453, 1986.
116. RANTAKOKKO, P.; NISSINEN, T. & VARTIAINEN, T. "Determination of bromide ion in raw and drinking waters by capillary zone electrophoresis". *J. Chromatogr. A*, **839** (1-2): 217, 1999.
117. SILVA, P. *Farmacologia*. 5^a ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S.A., 1998, 1314p.
118. HOROWITZ, B. Z. "Bromism from excessive cola consumption" *J. Toxicol-Clin. Toxic.*, **35**(3): 315, 1997.
119. SKOOG, D. A.; WEST, D. M. & HOLLER, F. J. *Analytical Chemistry, An introduction*. 6th ed. Philadelphia, Saunders College Publishing, 1994, 612p.
120. PROKOPOV, T. S. "Determination of traces of chloride and bromide ions by potentiometric titration". *Mikrochim. Acta*, **2**: 401, 1968.
121. NI, Y. N. & WU, A. G. "Simultaneous determination of halide and thiocyanate ions by potentiometric precipitation titration and multivariate calibration". *Anal. Chim. Acta*, **390**(1-3): 117, 1999.
122. MASADOME, T.; ASANO, Y. & NAKAMURA, T. "Flow injection determination of bromide ion in a developer using bromide ion-selective electrode detector". *Talanta*, **50**(3): 595, 1999.
123. BARET, M.; MASSART, D. L.; FABRY, P.; MENARDO, C. & CONESA, F. "Halide ion-selective electrode array calibration". *Talanta*, **50**(3): 541, 1999.

124. FREEMAN, P. R.; HART, B. T & McKELVIE, I.D. "Dual flow-injection analysis system for determining bromide and reactive phosphorus in natural-waters". *Anal. Chim. Acta*, **282**(2): 379, 1993.
125. JONES, D. R. "Difficulties with the chloramine-tert-phenol red method for bromide determination". *Talanta*, **36**(12): 1243, 1989.
126. YONEHARA, N.; KAWASAKI, A.; SAKAMOTO, H. & KAMADA, M. "Spectrophotometric determination of traces of bromide based on its catalysis of the pyrocatechol violet hydrogen peroxide reaction". *Anal. Chim. Acta*, **206** (1-2): 273, 1988.
127. YONEHARA, N.; CHAEN, S.; TOMIYASU, T. & SAKAMOTO, H. "Flow injection-spectrophotometric determination of trace amounts of bromide by its catalytic effect on the 4,4'-bis(dimethylamino)diphenylmethane-chloramine T reaction". *Anal. Sci.* **15**(3): 277, 1999.
128. VILCHEZ, J. L.; MANZANO, E.; AVIDAD, R.; ORBE, I. & CAPITANVALLVEY, L. F. "Spectrofluorometric determination of traces of bromide". *Mikrochim. Acta*, **113**(1-2): 29, 1994.
129. HU, W.; CAO, S.; TOMINAGA, M. & MIYAZAKI, A. "Direct determination of bromide ions in sea water by ion chromatography using water as the mobile phase". *Anal. Chim. Acta*, **322** (1-2): 43, 1996.
130. NIKOLIC, S. D. MILOSAVIJEVIC, E. B.; HENDRIX, J. L. & NELSON, J. H. "Indirect determination of chloride by gas-diffusion flow-injection with amperometric detection" *Analyst*, **116**(1): 49, 1991.
131. MOTOMIZU, S. & YODEN, T. "Porous membrane permeation of halogens and its application to the determination of halide-ions and residual chlorine by flow-injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, **261**(1-2): 461, 1992.
132. ZUI, O.V. "Chemiluminescence method for the determination of chloride in waters using dynamic gas extraction of chlorine". *Fresen. J. Anal. Chem.*, **351**(2-3): 209, 1995.
133. SHAKIR, I. M. A. & FAIZULLAH, A. T. "Determination of bromide using flow-injection and chemi-luminescence detection". *Analyst*, **114**(8): 951, 1989.
134. COOPER, M. M. & SPURLIN S. R. "Chemiluminescent method for flow-injection analysis of anions". *Anal. Lett.* **19**(23-24): 2221, 1986.

135. SAKAI, H.; FUJIWARA, T. & KUMAMARU, T. "Determination of inorganic anions in water samples by ion-exchange chromatography with chemiluminescence detection based on the neutralization reaction of nitric acid and potassium hydroxide". *Anal. Chim. Acta*, **331**(3): 239, 1996.
136. MARINO, D. F. & INGLE JR, J. D. "Determination of chlorine in water by luminol chemi-luminescence". *Anal Chem.* **53**(3): 455, 1981.
137. GONZALEZ-ROBLEDO, D.; SILVA, M. & PEREZ-BENDITO, D. "Determination of hypochlorite in waters by stopped-flow chemi-luminescence spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, **228**(1): 123, 1990.
138. MILOSAVLJEVIC, E. B.; SOLUJIC, L.; HENDRIX, J. L. & NELSON, J. H. "Flow-injection gas-diffusion method for preconcentration and determination of trace sulfide". *Anal. Chem.*, **60**:2791, 1988.
139. Krug, F. J.; Bergamin F., H. & Zagatto, E. A. G. "Commutation in flow-injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, **179**: 103, 1986.
140. HAHN, M.; LIEBAU, A.; RUTTINGER, H. H. & THAMM, R. "Electrochemical investigation of chloramine-T". *Anal. Chim. Acta*, **289**(1): 35, 1994.
-