Rui Cerdeira de Campos Costa

APLICAÇÃO DA ANÁLISE POR INJECÇÃO SEQUENCIAL À AUTOMATIZAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS EM ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

2000

Rui Cerdeira de Campos Costa

Licenciado em Ciências Farmacêuticas (U.P.)

APLICAÇÃO DA ANÁLISE POR INJECÇÃO SEQUENCIAL À AUTOMATIZAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS EM ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

2000

À Nany,

por tudo

e muito mais...

A meus pais,

a quem tudo devo

e a quem tão pouco dei,

pálido testemunho de eterna gratidão...

ÍNDICE

PREÂMBULO

Agradecimentos.....viii

Resumo.....xii

Abstract.....xiii

Résumé.....xiv

Lista de abreviaturas.....xv

Organização da Dissertação.....xvii

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1.1 – Automatização em Química Analítica.....18

1.2 – Análise por Injecção Sequencial.....31

1.2.1 – Comparação com as técnicas de automatização discreta.....32

1.2.2 – Comparação com as técnicas de fluxo contínuo.....32

1.2.3 – Comparação com os métodos robotizados.....33

1.2.4 – Componentes fundamentais de um sistema SIA.....33

1.2.4.1 – Dispositivos de propulsão.....33

1.2.4.2 – Válvulas multiposição selectoras de fluidos.....34

1.2.4.3 – Reactor de armazenamento.....36

1.2.5 – Configurações dos sistemas SIA.....36

1.2.6 – Modos de operação em sistemas SIA.....38

1.2.6.1 – Procedimentos de diluição.....39

1.2.6.2 – Procedimentos de calibração.....39

1.2.6.3 – Procedimentos de transferência de massa através de uma interface.....40

1.2.7 – Detecção em SIA.....41

1.2.8 – Aplicações em análise química....42
1.3 – Espectrofotometria de Absorção Atómica....43
1.3.1 – Acoplamento da técnica SFA à FAAS....46
1.3.2 – Acoplamento da técnica FIA à FAAS....47
1.3.2.1 – Transporte e introdução das amostras....48
1.3.2.2 – Automatização das várias etapas da análise química....49
1.3.2.2.1 – Procedimentos de calibração....49
1.3.2.2.2 – Procedimentos de diluição....50
1.3.2.2.3 – Procedimentos de adição de reagentes....52
1.3.2.2.4 – Procedimentos de digestão....52
1.3.2.2.5 – Procedimentos de transferência de massa através de uma interface....53
1.3.3 – Acoplamento da técnica FIA à HGAAS e à ETAAS....55
1.3.4 – Desvantagens da associação das metodologias de fluxo contínuo à AAS....56
1.4 – Enquadramento e Objectivos Gerais do Trabalho....57
Referências Bibliográficas....58

***CAPÍTULO II** – ACOPLAMENTO DA TÉCNICA SIA À AAS*

2.1 – Introdução....65
2.2 – Componentes do sistema....66
2.3 – Acoplamento à FAAS....74
2.4 – Acoplamento à ETAAS....76
2.5 – Influência da inércia e da pulsação do escoamento....77
2.6 – Programa de controlo do sistema SIA....81
2.6.1 – Precisão do processo de cronometragem....83
2.7 – Optimização das montagens....84
2.8 – Procedimentos gerais de avaliação da qualidade dos resultados obtidos....85
2.8.1 – Avaliação do desempenho dos procedimentos automáticos....85
2.8.2 – Avaliação da exactidão....87
2.8.3 – Avaliação da repetibilidade....88
Referências Bibliográficas....89

CAPÍTULO III – *DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES ELEMENTARES EM ÁGUA*

3.1 – Caracterização hidrodinâmica da técnica SIA e do seu acoplamento à FAAS. Desenvolvimento de procedimentos de diluição para a determinação de Ca e Mg em águas minerais.....91

3.2 – Desenvolvimento de procedimentos de pré-concentração em fase sólida para a determinação de Pb, Cu e Mn em águas naturais.....102

CAPÍTULO IV – *DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES ELEMENTARES EM VINHO*

4.1 – Desenvolvimento de procedimentos de diluição para a determinação de Zn, Mn, Fe e Cu, e de pré-concentração em fase sólida para a determinação de Cu.....135

4.2 – Desenvolvimento de um procedimento de extracção líquido-líquido para a determinação de Fe(III).....154

CAPÍTULO V – *DETERMINAÇÃO DE Pd EM URINA HUMANA*.....171

CAPÍTULO V – *CONSIDERAÇÕES FINAIS*.....192

AGRADECIMENTOS

Tantas vezes o homem, movido por uma estranha força cuja a origem se desconhece, pensa que alcançou a resposta suprema..., mas rapidamente descobre que a solução que elaborou não é verdadeira, nem tão pouco o problema que o consome único no mundo. Apesar de tudo, é magnífica a força gerada no seio do erro. O homem erra e parte assim numa busca incessante, às vezes quase eterna, para um problema por vezes tão insignificante. Experimentam-se emoções indescritíveis que transportam o criador para um mundo só seu, onde é escravo de si e rei de ninguém. Mas mesmo assim, é fabulosa a sensação de leveza que se experimenta. Contemplamos a natureza e observamos impávidos a ascensão da teoria numa sublime criação artística, à qual tantos se rendem atónitos, dominados pelo espanto e pelo prazer de um mundo desconhecido.

Há, no entanto, quem confunda a verdadeira e sublime emoção deste mundo, e se sinta tentado a nele entrar a todo o custo. Criam-se assim soluções, que desde logo insignificantes na sua concepção, são falsas quanto aos pressupostos que assistem à sua realização. A criação é um acto espontâneo, desprovido de interesse, movido pelo sonho tantas vezes irrealizável que humildemente desponta de uma densa massa amorfa onde cresce a imaginação de cada um. Quando os sonhos que parecem impossíveis são falsamente realizados, a criação perde toda a sua virtude e beleza, e a arte de criar que a ela está subjacente transforma-se na arte de reproduzir a criação. Não é esta a verdadeira essência da ciência; não é este o grilhão que prende o homem a um destino que na mais pura essência não se compreende; é tão simplesmente um prazer que alimenta a alma e move o pensamento.

Quando me propuseram a realização do trabalho que aqui é apresentado, pensei por breves momentos que nunca seria capaz de alcançar esse mundo. Um mundo, onde as teorias florescem de um abismo profundo e desconhecido, numa permanente tentação de prazer acabando por se afundarem num turbilhão de desilusões e logo renascerem das cinzas. Agora

que termino, não posso deixar de ficar feliz por ter conseguido acabar aquilo que um dia me pareceu impossível. Alegro-me de o ter conseguido e congratulo-me de ter à minha volta pessoas que de uma ou de outra forma me ajudaram a levar esta barco a bom porto. Assim, e sem incorrer em algum esquecimento, queria apresentar os meus mais sinceros agradecimentos:

- em primeiro lugar, à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por me ter aceite como estudante de doutoramento;

- à Fundação para a Ciência e Tecnologia, outrora JNICT, através do seu programa PRAXIS XXI, pela concessão de um bolsa de doutoramento (PRAXIS XXI/BD/9544/96) sem a qual este trabalho teria sido uma miragem;

- ao Sr. Prof. Doutor Alberto da Nova Araújo, meu supervisor, o meu mais profundo reconhecimento pelo interesse que quase sempre depositou no decurso dos trabalhos que conduziram a esta dissertação de doutoramento. Se momentos houve onde a desilusão reinou, não menos verdade é que dela sempre nasceu um fruto que na essência tem a sua génese na pessoa que me orientou;

- ao Sr. Prof. Doutor José Luís Fontes da Costa Lima, enquanto director do serviço de Química-Física da mesma Faculdade, agradeço a oportunidade que me concedeu, ainda como estudante de licenciatura, de contactar com o mundo da investigação, por me ter proporcionado todos os meios para realização deste doutoramento e ainda por ter aceite a co-orientação deste trabalho;

- à Sra. Prof. Doutora Conceição Branco, agradeço a preocupação que demonstrou ao longo deste doutoramento;

- ao Shiao Jun, vulgo "Melga", senhor do "telefon" e do "funxio", pela bela amizade que sempre me prestou, ajudando-me desinteressadamente na compreensão de assuntos que eram para mim desconhecidos;

- Ao Agostinho, vulgo chefe, sportinguista ferrenho (mais do que eu), arouquense convicto e acérrimo defensor do idioma arouquense ("xe calhar"!!!), assíduo frequentador da Serra da Freita em profundas pesquisas faunísticas, teimoso q.b. e enfim um colega porreiro a quem agradeço aquelas horas ao fim da tarde onde a discussão tinha tudo, mas também ciência;

- à Carmo Vaz, artista da Invicta, engenheira de formação, defensora dos animais, cozinheira afamada, o meu apreço pela nobreza de carácter e pela amizade com que me brindou;

- à Goreti Sales, pelo seu temperamento impetuoso, pela genica de quem só pode ser da Santana, pelos muitos cigarros que inalei e pela amizade da qual não me esqueço;

- à Cristina Couto pela sua simpatia;

- ao Nestor Zarate e ao João Serrano, pela bela amizade com que me têm presenteado ao longo dos últimos anos;

- Ao João Santos pelas retroversões e toques informáticos (e nas costas também) naqueles momentos mais periclitantes, e já agora viva o Sporting;

- à Sra. Dra. Isabel Cardoso, revolucionária de longa data, a ela a minha mais profunda gratidão pela subtileza e astúcia na resolução dos problemas que só ela é capaz de tratar;

- ao José Catita e à Lúcia Saraiva, uma palavra amiga pelos problemas de fluxo que nos eram comuns;

- à Elvira Rodriguez pela sua amizade e consideração;

- à Carla Guimarães, à Carla Matos, à Cristina Almeida, à Ivone Valente, à Rita Catarino, à Adriana Pimenta, à Manuela Garrido e à Marlene Lúcio pela boa convivência;

- à Sra. Prof. Doutora Cristina Matos pela consideração que sempre tem demostrado por mim;

- à Sra. Dra. Aida Roque da Silva pela simpatia e gentileza no trato;

- à Sra. Prof. Doutora Salete Hipólito Reis pela sua belíssima simpatia e sem esquecer a sua disponibilidade na resolução dos problemas inerentes a equipamento do laboratório;

- à Sra. Prof. Doutora Beatriz Quinaz pela sua disponibilidade na aquisição dos reagentes que foram necessários à realização dos trabalhos que estão na base desta dissertação de doutoramento;

- ao Sr. Prof. Doutor Rui Lapa pela ajuda que me prestou na resolução de problemas pontuais de "soft" e "hardware";

- ao Sr. Prof. Doutor Julian Alonso e à sua trupe do Departamento de Química Analítica da Universidade Autónoma de Barcelona, pelas visitas guiadas em terras catalãs, principalmente junto àquela magnífica obra da engenharia moderna, que dá pelo nome de Mar & Magnum;

- à Mireia Baeza pela sua disponibilidade aquando da minha passagem por terras catalãs;

- à técnica Belmira e à Sra. Teresa pela sua ajuda na resolução daqueles problemas que ninguém vê e que toda a gente sente;

- ao Sr. Carlos Torres, a quem muito especialmente agradeço a sua disponibilidade na concepção de todas as peças em acrílico e poli(tetrafluoretileno) que foram utilizadas no desenvolvimento dos diversos sistemas automáticos;

- à D. Maria Alice e ao Sr. Luís Loureiro, a quem presto aqui o meu reconhecido apreço pela inesgotável ajuda que sei que é infinita na grandeza e no tempo;

- à minha irmã Sandra, que de uma ou outra forma sempre me ajudou;

- a meus pais, força viva da minha existência, lhes dedico este trabalho como sinónimo do mais profundo e puro carinho;

- por fim e mais do que tudo, à minha querida esposa, Fernanda de Campos Costa, a quem expresso bem alto o meu apreço, porque dela é força que me sustenta e me move em todos os momentos.

RESUMO

A automatização dos processos preparativos e de transporte de amostras tem contribuído para melhorar o desempenho de diversas técnicas instrumentais, sobretudo a Espectrofotometria de Absorção Atómica, embora as soluções encontradas denotem algumas carências tanto ao nível da versatilidade como da robustez das montagens.

A Análise por Injecção Sequencial (SIA) constitui na actualidade a técnica de microanálise com maiores capacidades para colmatar estas lacunas. Nesse sentido, a presente dissertação relata os estudos de avaliação do acoplamento da técnica SIA à AAS, quer na perspectiva da simples redução da influência das características físicas, quer na adequação da concentração das amostras ao intervalo de linearidade instrumental mediante o desenvolvimento procedimentos de diluição ou de pré-concentração, conforme a natureza das amostras.

ABSTRACT

The automatization of preparative processes and sample transport contributed to improve the performance of some instrumental techniques, specially Atomic Absorption Spectrometry (AAS), although the proposed solutions presented some drawbacks regarding the robustness and versatility of the manifolds.

Sequential Injection Analysis (SIA) is, nowadays, the most adequate microanalysis technique to solve these problems. Thus, in this thesis is described the evaluation of the combination of SIA/AAS aiming the reduction of the influence of sample physical characteristics and the adjustment of sample concentration to the instrumental linear range either by dilution or preconcentration, according to the nature of the samples.

RÉSUMÉ

L'automatization des processes préparatifs et de transport des échantillons a contribué por améliorer la performance de quelques techniques instrumentaux, surtout la Spectrophotometry d'Absorption Atomic, mais cependant presentent des problèmes au niveau de la robustesse et versatilité des systèmes.

L'Analyse par Injeccion Sequential (SIA) est aujourd'hui, la technique de microanalyse plus capable de résoudre ces problèmes. Dans cette thèse on décrit des études d'évaluation de l'accouplement de la technique SIA à la AAS soit pour réduire l'influence des caractéristiques physiques des échantillons, soit pour ajuster la concentration des échantillons au intervalle de linéarité instrumental à travers du développment des procédés de diluition ou de pré-concentration, dependent de la nature des échantillons.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrofotometria de absorção atómica (Atomic absorption spectrometry)
APDC	Pirrolidinoditiocarbamato de amónio (Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate)
C18	Sílica revestida com grupos funcionais octadecilo
CDA	Análise por dispersão controlada (Controle dispersion analysis)
CE	Eficiência de concentração (Concentration efficiency)
DCP-AES	Espectrofotometria de emissão atómica com plasma de arco de corrente contínua (Direct current plasma atomic emission spectrometry)
DFA	Análise por fluxo descontínuo (Discontinuous flow analysis)
EF	Factor de enriquecimento (Enrichment factor)
ETAAS	Espectrofotometria de absorção atómica com atomização electrotérmica (Electrothermal atomic absorption spectrometry)
FAAS	Espectrofotometria de absorção atómica com atomização por chama (Flame atomic absorption spectrometry)
FIA	Análise por injecção em fluxo (Flow injection analysis)
FTIR	Espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy)
HGAAS	Espectrofotometria de absorção atómica com geração de hidretos (Hydrid generation atomic absorption spectrometry)
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução (High performance liquid chromatography)
LOD	Limite de detecção (Limit of detection)
LOQ	Limite de quantificação (Limit of quantification)
ICP-AES	Espectrofotometria de emissão atómica com plasma de rádio-frequência (Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry)

ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma de rádio-frequência (inductively coupled plasma mass spectrometry)
MCFA	Análise por fluxo contínuo mono-segmentado (Monosegmented continuous flow analysis)
MIBK	Metilisobutilcetona
PVC	Poli(cloreto de vinilo)
PTFE	Poli(tetrafluoroetileno)
RSD	Desvio padrão relativo (Relative standard deviation)
SFA	Análise por fluxo segmentado (Segmented flow analysis)
STPF	Forno com plataforma e temperatura estabilizada (Stabilized temperature platform furnace)
THGA	Atomizador de grafite com aquecimento transversal (Transverse heated grafite atomizer)

De um modo geral, optou-se por motivos de conveniência por utilizar as abreviaturas derivadas da designação anglo – saxónica.

ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Os assuntos que constam da presente dissertação foram distribuídos por capítulos, num total de seis.

O primeiro Capítulo, denominado *"Introdução"*, serve fundamentalmente para estabelecer uma visão generalizada do trabalho conduzido sobre os assuntos aos quais está subordinado o tema desta tese. Começa-se por introduzir o tema da automatização como uma ferramenta essencial para a melhoria do desempenho das metodologias analíticas de rotina. Neste contexto atribui-se particular destaque às metodologias de fluxo contínuo pois é nesse grupo de técnicas que a Análise por Injecção Sequencial se insere. Faz-se igualmente referência às vantagens obtidas em Espectrofotometria de Absorção Atómica pelo uso acoplado de sistemas de fluxo contínuo.

No Capítulo II, designado por *"Acoplamento da técnica SIA à AAS"* efectua-se uma descrição genérica da montagem que serviu de base a todas as outras que constam desta dissertação, assim como do procedimento de optimização e avaliação do desempenho das diversas montagens propostas.

Do Capítulo III a V apresentam-se os resultados dos trabalhos experimentais realizados, através da compilação dos artigos científicos redigidos no decurso do período correspondente à sua realização.

Por último, o Capitulo VI, denominado *"Considerações finais"*, serve para reunir as conclusões parcelares enunciadas em cada um dos artigos que constam dos capítulos desta dissertação, com particular relevo para as vantagens das metodologias propostas face às existentes.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

"Toda a verdade inédita começa como
heresia e acaba como ortodoxia."
Thomas Huxley

1.1 Automatização em Química Analítica

A imprensa de Gutemberg e a Revolução Industrial constituem marcos históricos evidentes da necessidade humana em melhorar o rendimento dos processos produtivos com impacto social. Esta necessidade determinou o desenvolvimento do conceito de automatização, cuja importância nas mais diversas áreas é sobejamente conhecida.

A automatização começou por incidir fortemente a nível industrial, já que era nesta área que a melhoria dos níveis de produtividade e qualidade, e a redução dos custos de produção era mais exigida. Inicialmente centrou-se no desenvolvimento de máquinas que tinham a capacidade de executar de forma mais rápida e precisa tarefas específicas. Contudo, o progresso científico e tecnológico determinou que o impacto das máquinas nos processos produtivos fosse tão significativo, que constatamos hoje que em muitos casos são elas a estabelecer o ritmo de trabalho dos operadores humanos. As implicações do conceito de automatização fizeram-se sentir não só a nível económico, mas também a nível social com uma forte tendência para a especialização dos serviços e necessidade de re-qualificação técnica dos recursos humanos das empresas.

Apesar da industria ter sido a principal impulsionadora do desenvolvimento e aplicação do conceito de automatização, muitas outras, como é o caso da prestação de serviços (comércio, transportes) e das ciências (medicina, farmácia, física, química)[1], acabaram por adoptar esse conceito, movidas na essência igualmente por interesses de natureza social. Hoje é uma realidade sobre a qual assenta a valorização social e a economia mundial, e sem a qual a vida certamente seria mais difícil.

A aplicação do conceito de automatização requer por um lado a existência de um procedimento que se deseja automatizar e por outro uma técnica necessária para executar a automatização do procedimento em causa. No caso das análises químicas, a aplicação do conceito de automatização é bastante mais recente comparativamente ao que aconteceu a nível da industria. Na verdade, a aplicação do conceito de automatização às análises químicas em grande escala ganhou folgo principalmente a partir da década de cinquenta com o desenvolvimento da técnica de Análise por Fluxo Segmentado (SFA, do inglês *Segmented Flow Analysis*) proposta por Skeegs[2]. Desde essa data a pesquisa em química analítica tem-se centrado parcialmente na automatização de metodologias analíticas clássicas, procurando melhorá-las no que diz respeito a parâmetros importantes como sejam a exactidão, a precisão, a sensibilidade, a selectividade, a segurança e os custos de análise. Relativamente a este último, a sua importância faz-se sentir a vários níveis, nomeadamente na redução do consumo

de amostras e reagentes, no aumento dos ritmos de determinação e do número de espécies analisadas por amostra, e ainda na redução do grau de especialização dos operadores humanos aos quais se destinam esses sistemas. As vantagens da aplicação do conceito da automatização manifestam-se não só na execução das chamadas análises de rotina, com particular relevo para o aspecto económico, mas também na realização de estudos fundamentais, no ensino da química e no desenvolvimento de sensores químicos e outros equipamentos.

O conceito de automatização tem também servido para melhorar o desempenho das técnicas instrumentais conhecidas através da construção de interfaces entre a química e a instrumentação, que permitem por um lado a monitorização contínua do sinal proveniente do detector e por outro a obtenção de mais informação através da realização de várias leituras por amostra. Com o forte progresso da informática, particularmente visível ao nível da aquisição e tratamento dos dados, os sistemas tem evoluído por um lado no sentido de uma maior fiabilidade e robustez, e por outro no sentido da introdução de um certo grau de autonomia permitindo-lhes adaptar-se consoante o tipo de amostra em análise e reduzindo desse modo a intervenção do analista[3].

Apesar de todos os aspectos enunciados, a automatização não está isenta de desvantagens; desde logo aumenta a distância entre o operador e a experiência, criando-se por vezes um estado de confiança excessiva que reduz o sentido crítico com eventuais perdas de qualidade e quantidade de informação e exploração incompleta do potencial dos instrumentos. Adicionalmente, o desejo para simplificar as determinações analíticas traz aos investigadores novos problemas, como seja, a padronização dos resultados. Mesmo assim, é notória a tendência da maioria dos laboratórios químicos para utilizar a automatização na monitorização de processos industriais, na caracterização ambiental, no estabelecimento de quadros clínicos e no controlo de qualidade das matérias–primas e produtos acabados.

Quando a automatização é utilizada para melhorar um determinado procedimento analítico, a sua intervenção pode fazer-se sentir ao nível de uma ou mais etapas do processo analítico: nomeadamente nas operações preliminares, na medição e transdução do sinal

analítico, e na aquisição e processamento do sinal. Enquanto a primeira e a última são da responsabilidade do analisador a segunda é referente ao detector[4].

Uma das primeiras ideias utilizadas para automatizar procedimentos manuais, sobretudo aqueles que são rotineiros e lentos, consistiu no desenvolvimento de sistemas que reproduziam de forma mecânica o esforço humano. Assim, surgiram os Sistemas Automáticos Discretos (*Automatic Batch Analysers*), cuja eficiência está ainda bem patente na sua forte implantação nos laboratórios de análises clínicas.

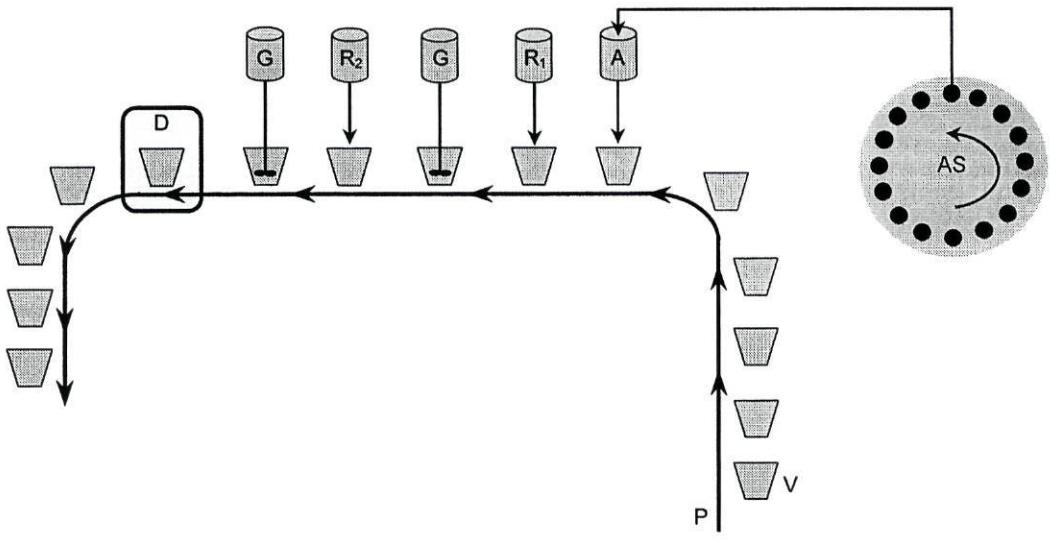


Figura 1.1 Representação esquemática de um Sistema Automático Discreto. P – carrossel ou tapete rolante; V – vasos de reacção; AS – amostrador; A, R_1, R_2 – buretas de adição das amostras e dos reagentes R_1 e R_2; G – agitadores; D – detector.

Tratam-se actualmente de sistemas constituídos por pratos rotativos onde se instalam vasos com amostras e diferentes soluções reagentes e onde por rotação daqueles juntamente

com um conjunto de pipetas móveis é possível desde simplesmente definir tomas de amostra e adicionar-lhes diferentes reagentes, até submete-las a diferentes processos físicos, como seja, aquecimento antes da etapa de leitura, que se efectua por exposição do vaso ao dispositivo de detecção (Figura 1.1). Neste tipo de sistemas cada amostra preserva sempre a sua identidade, sendo as medidas realizadas em condições de equilíbrio físico e químico.

A par das técnicas de automatização discreta, desenvolveram-se a partir da década de cinquenta as técnicas de fluxo contínuo das quais a Análise por Fluxo Segmentada (SFA) é considerada a primeira. O fundamento desta técnica baseia-se na aspiração de volumes reduzidos de amostra para um sistema tubular onde decorrem os processos químicos de determinação, que culminam com a detecção instrumental colocada em fim de linha (Figura 1.2). A individualidade das amostras é assegurada através da segmentação do fluxo com bolhas de ar, removidas imediatamente antes da realização da medida. Apesar das potencialidades exibidas por esta técnica, sobretudo na perspectiva da micro-análise, é de referir que a obtenção de informação efectua-se em condições de equilíbrio químico e físico, à semelhança dos procedimentos convencionais[5].

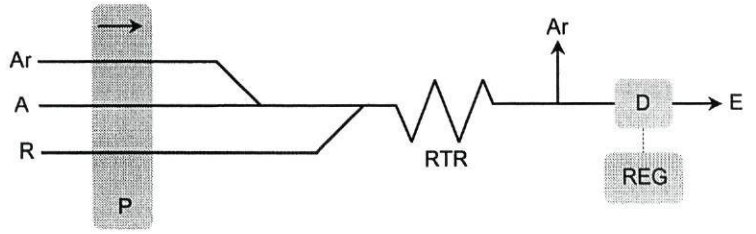


Figura 1.2 Representação esquemática de um sistema básico de Análise por Fluxo Segmentado (SFA). A – amostra; R – reagente; RTR – reactor de transporte/reacção; D – detector; REG – registador; E – esgoto.

O advento da técnica de Análise por Injecção em Fluxo[6], genericamente conhecida pela sigla FIA (do inglês, *Flow Injection Analysis*) constituiu um avanço importante nesta área. A introdução da técnica FIA revolucionou o conceito de automatização em análise química, ao propor a realização das medidas instrumentais em condições de ausência de equilíbrio físico e químico[6,7,8,9]. Do ponto de vista conceptual a técnica FIA é uma técnica de fluxo contínuo de micro-análise, que se baseia na intercalação rápida de pequenos volumes reprodutíveis de amostra num fluxo formado por uma solução transportadora líquida não segmentada por ar (Figura 1.3). A amostra desloca-se por transporte laminar ao longo da tubagem em direcção ao detector, dispersando-se fisicamente de forma reprodutível e produzindo uma zona muito bem definida detectada sob a forma de um sinal transiente. Em certos casos, no decurso do processo de transporte o segmento de amostra pode reagir com um ou mais constituintes do fluido transportador originando espécies detectáveis com um detector apropriado igualmente sob a forma de sinais transientes.

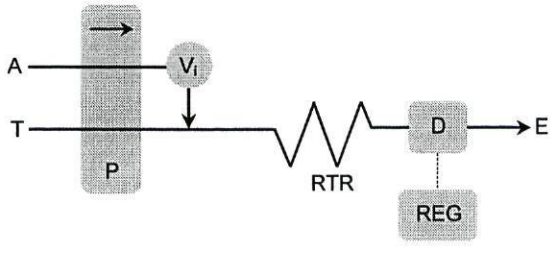


Figura 1.3 Representação esquemática de um sistema básico de Análise por Injecção em Fluxo (FIA). A – amostra; T – solução transportadora; P – dispositivo de propulsão; V_i – dispositivo de intercalação da amostra; RTR – reactor de transporte/reacção; D – detector; REG – registador; E – esgoto.

Inicialmente a técnica FIA serviu para automatizar a introdução de soluções de calibração e amostras nos dispositivos de detecção, bem como viabilizar reacções químicas de formação de um produto monitorizável, utilizando como parâmetro de medida o máximo do sinal transiente obtido. Actualmente, a técnica FIA é vista como uma técnica de impulso-resposta, à semelhança da Cromatografia e a Electroforese Capilar[10]. Segundo esta nova visão, a técnica FIA surge como uma metodologia cinética de tempo fixo que se baseia na utilização da informação inerente ao gradiente de concentração que se gera por dispersão física do segmento de amostra no fluido transportador não segmentado e por reacção química do analito com um ou mais constituintes do fluido transportador, se for caso disso. O instrumento de medida detecta a espécie formada, gerando um sinal transiente que reflecte os dois fenómenos anteriores e cuja forma e magnitude fornece informação quer acerca da concentração do analito na amostra intercalada, quer sobre a cinética das reacções químicas que decorrem em fluxo[11]. Estas características possibilitaram conjugar a automatização de metodologias correntes incluindo algumas das etapas preliminares à etapa da medição instrumental com tempos de determinação significativamente mais reduzidos (Tabela 1.1), estudar e explorar o conhecimento das aspectos mecanísticos e cinéticos envolvidos no sentido de melhorar a selectividade das determinações[12,13] e desenvolver novos procedimentos químicos, enzimáticos e imunológicos em fase sólida reactiva.

Apesar das potencialidades em termos de flexibilidade, reprodutibilidade, fiabilidade e facilidade de utilização, pode-se contudo apontar-lhe algumas desvantagens importantes quando se considera a sua utilização em laboratórios de controlo e de rotina. A impulsão contínua das soluções implica um consumo elevado de soluções. Por outro lado, a presença de um canal para cada solução pode, dependendo da determinação em causa, complicar as montagens. A técnica preserva baixa autonomia relativamente ao operador, uma vez que necessita de reconfiguração física para cada determinação. Os sistemas são por norma sistemas com carácter monoparamétrico, onde por vezes é notória a dificuldade de adaptação quando a variação da composição da matriz e da concentração das espécies monitorizadas ao longo de um processo é considerável. O tempo de reacção é normalmente estabelecido a partir

do caudal e do tamanho do reactor, aspectos que condicionam a automatização de reacções químicas de cinética lenta. Nestes casos foi proposto o conceito de Análise por Fluxo Contínuo Mono-segmentado (MCFA, do inglês *Monosegmented Contínuous Flow Analysis*), cujo o objectivo é incrementar o tempo de residência do segmento de amostra no interior do sistema sem aumentar proporcionalmente o seu grau de dispersão[14]. A remoção das bolhas de ar pode ser conseguida mediante o aprisionamento do segmento de ar com uma válvula rotativa de seis portas, ou através da deslocação da célula de fluxo para outro canal. Este modo de operação, denominado de re-colocação do detector[15], permite adicionalmente aproveitar as diferenças cinéticas de algumas reacções colorimétricas permitindo a realização de determinações biparamétricas[16].

Tabela 1.1 Automatização de operações preliminares à etapa da medição instrumental em sistemas FIA.

Adição de reagentes[7]
Diálise[17]
Digestão[17]
Difusão de gás[18]
Diluição[7]
Extracção líquido-líquido[19]
Extracção sólido-líquido[20]
Precipitação[21]

De modo a resolver as desvantagens apontadas à técnica FIA no que concerne ao consumo de amostras e reagentes, desenvolveram-se outras técnicas de fluxo contínuo embora de utilização menos divulgada. A Análise por Dispersão Controlada (CDA, do inglês *Controled Dispersion Analysis*) baseia-se na utilização de uma bomba peristáltica com funcionamento intermitente equipada com um só tubo de impulsão e uma ponta móvel que mergulha de modo alternado na solução de amostra, na solução de limpeza e na solução transportadora[22] (Figura 1.4). O volume de amostra é determinado pelo binómio tempo/caudal e para garantir a sua reprodutibilidade a aspiração é sempre conduzida com a bomba peristáltica a partir da mesma posição.

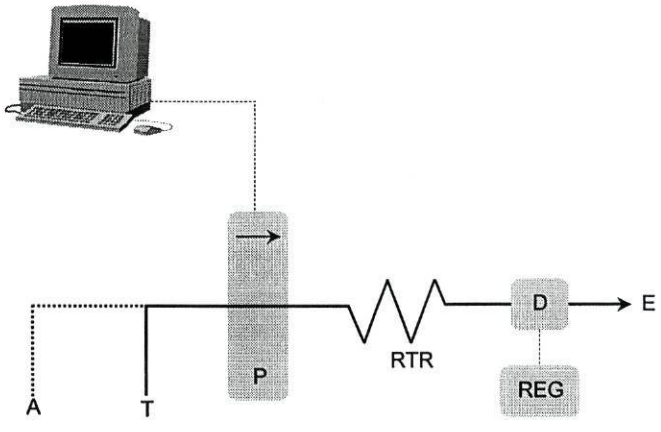


Figura 1.4 Representação esquemática de um sistema básico de Análise por Dispersão Controlada (CDA). A – amostra; T – solução transportadora; P – dispositivo de propulsão; RTR – reactor de transporte/reacção; D – detector; REG – registador; E – esgoto.

Esta técnica permite eliminar os problemas de desperdício de amostra devido aos sistemas de injecção. Adicionalmente, permite a alteração programada da dispersão sem necessidade de reconfiguração física do sistema[23] e por conseguinte a realização de

calibrações com um só padrão. Contudo, o seu modo de funcionamento requer obrigatoriamente a presença de uma bomba peristáltica como dispositivo de propulsão. Neste caso surgem dois problemas; a passagem das amostras através do tubo de impulsão da bomba peristáltica induz dispersão obrigando por isso à utilização de tubos de reduzido calibre, os quais limitam os caudais máximos que se podem utilizar.

A Análise por Fluxo Descontínuo (DFA, do inglês *Discontinous Flow Analysis*), também conhecida pelo nome de Análise por Fluxo Diferencial, foi proposta principalmente com o objectivo de automatizar procedimentos de titulação[24]. Esta técnica tem como princípio de funcionamento a utilização de uma bomba de eixo excêntrico o qual está ligado ao êmbolo de duas seringas, as quais por sua vez estão ligadas entre si por intermédio de duas válvulas solenóides de três vias. Quando a bomba é accionada, simultaneamente uma das seringas (S_1) enche-se de titulante através da activação da respectiva válvula solenóide (V_{S1}), enquanto a outra (S_2) esvazia-se igualmente por activação da respectiva válvula solenóide (V_{S2}). Na etapa seguinte, o funcionamento da bomba é invertido permitindo a adição do titulante à amostra directamente à entrada da célula de fluxo (Figura 1.5).

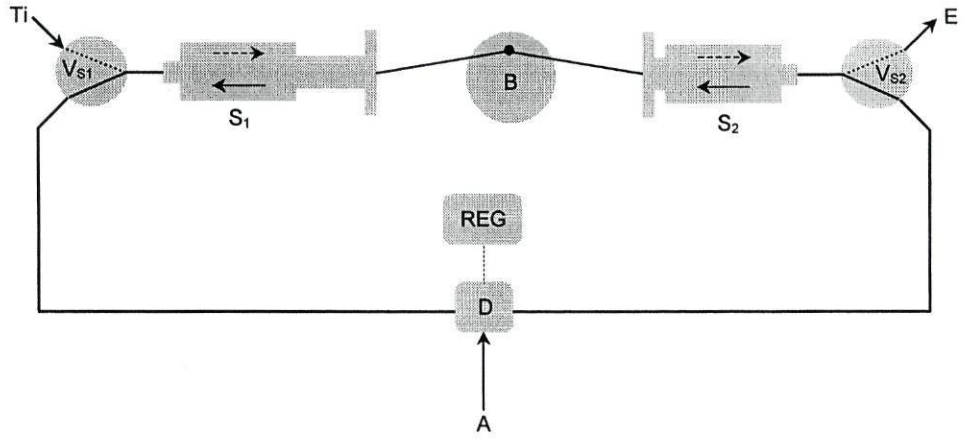


Figura 1.5 Representação esquemática de um sistema básico de Análise por Fluxo Descontínuo (DFA). A – amostra; Ti – titulante; B – bomba de eixo excêntrico; S_1 e S_2 – seringas; V_{S1}, V_{S2} – válvulas solenóides de três vias; dispositivo de propulsão; D – detector; REG – registador; E – esgoto.

No início da década de noventa foi proposta a técnica de Multicomutação (MC) por Amostragem Binária[25,26,27]. O principio de Amostragem Binária nos sistemas de Multicomutação decorre da utilização em série ou em paralelo de unidades de intercalação binária, *i.e.*, válvulas de três vias com actuação solenóide e controlo por computador, que funcionando como comutadores individuais permitem a inserção alternada no sistema de pequenas porções de amostra e reagentes (Figura 1.6). A utilização de tubagens com calibre inferior a 1 mm, caudais de cerca de 1 ml/min e consumos de amostra e reagentes inferiores a 50 μl, permitiram definir a Multicomutação como uma tecnologia típica de microanálise. A alteração da finalidade das montagens ou das condições de operação para uma determinada aplicação, é obtida por reconfiguração física do módulo analítico e por optimização dos ciclos de actuação de cada válvula.

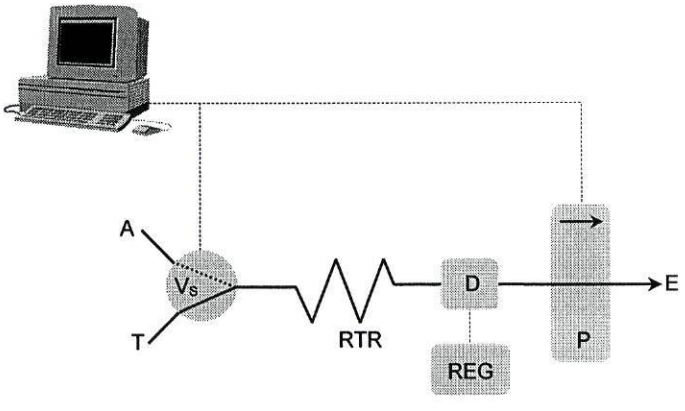


Figura 1.6 Representação esquemática de um sistema básico de Multicomutação (MC). A – amostra; T –solução de transporte/reacção; V_s – válvula solenóide de três vias; RTR – reactor de transporte/reacção; D – detector; REG – registador; P – dispositivo de propulsão; E – esgoto.

Para responder às necessidades de robustez, simplicidade e versatilidade foi igualmente proposta a técnica de Análise por Injecção Sequencial, genericamente conhecida pela sigla SIA (do inglês, *Sequential Injection Analysis*)[28], cuja análise detalhada é efectuada no ponto seguinte. O princípio de operação baseia-se no controlo temporizado, por intermédio de computador, de uma válvula selectora de fluidos e de um dispositivo que possibilita o movimento bidireccional de cada um dos fluidos que acede ao reactor de armazenamento através da válvula (Figura 1.7).

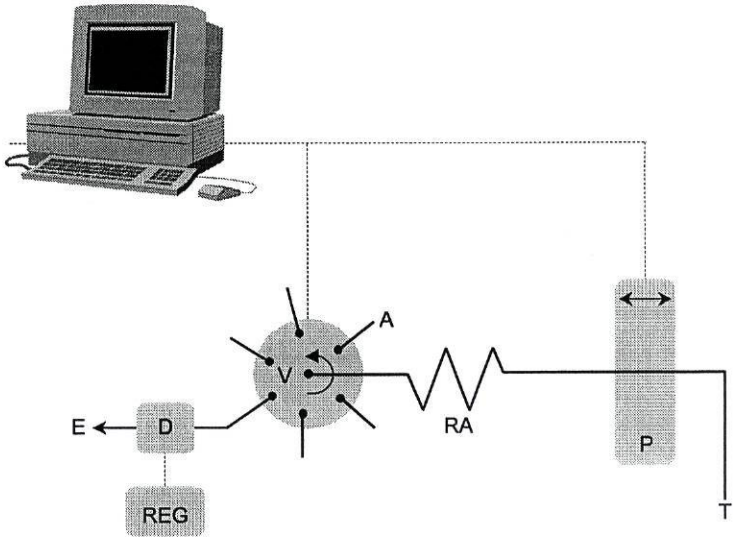


Figura 1.7 Representação esquemática de um sistema básico de Análise por Injecção Sequencial (SIA). T – solução transportadora; P – dispositivo de propulsão bidireccional; RA – reactor de armazenamento; A – amostra; V – válvula multiposição selectora de fluidos; D – detector; REG – registador; E – esgoto.

Finalmente, à semelhança do sucedido na industria, a robótica foi também aplicada às análises químicas, principalmente a partir da década de oitenta com os sistemas propostos pela firma *Zymark Corporation* nos Estados Unidos da América[5]. Os sistemas baseiam-se na utilização de um microprocessador que controla um braço articulado que mimetiza a acção humana no procedimento analítico (Figura 1.8). Este braço movimenta a amostra e os reagentes entre diversas unidades de tratamento, incluindo o instrumento de medida, dispostas na sua periferia. Inicialmente foram propostos com um certo grau de excitação no seio da comunidade cientifica, contudo cedo se revelaram aquém das expectativas, dado que as vantagens que proporcionavam não eram comportadas nem pelos custos de aquisição e manutenção do equipamento, nem pelo elevado grau de especialização requerido para os operadores. Contudo, comparados às outras técnicas, os métodos robotizados são mais vantajosos em algumas operações, nomeadamente nas pesagens e na manipulação de materiais perigosos.

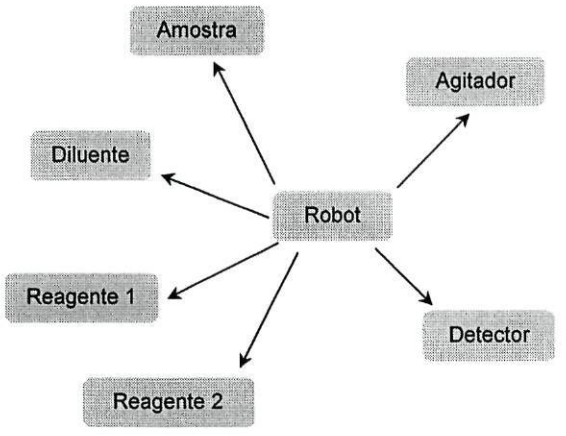


Figura 1.8 Representação esquemática de um sistema robotizado.

Apesar das vantagens e desvantagens de cada técnica mencionada, todas elas de uma ou de outra forma permitiram simplificar os procedimentos analíticos, contornando problemas comuns como sejam: o reduzido volume de amostra disponível em certos casos; a complexidade das amostras; a elevada ou reduzida concentração das amostras na espécie a quantificar; a presença de interferentes; a intensa manipulação através da adição de vários reagentes, alguns deles por vezes tóxicos, perigosos ou instáveis; e ainda aspectos técnicos da determinação propriamente dita que requerem um controlo rigoroso do tempo, como por exemplo, as determinações por quimioluminiscência. A par de todas estas vantagens acresce o facto dos resultados serem menos dependentes da qualificação técnica da pessoa que executa a determinação. Actualmente a tendência é para uma mútua cooperação entre as diversas técnicas no sentido de obter sistemas mais eficientes[29].

1.2 Análise por Injecção Sequencial

Conforme foi referido no item anterior, a Análise por Injecção Sequencial (SIA) constitui uma das técnicas mais recentes de fluxo contínuo não segmentado. Trata-se de uma técnica monocanal com escoamento intermitente, onde o volume das soluções é definido à partir do tempo e do caudal. O seu modo de funcionamento baseia-se para além dos princípios da dispersão controlada e manipulação reprodutível das amostras, também no conceito de fluxo programado, permitindo tal como na técnica FIA a obtenção de sinais transientes de magnitude proporcional à concentração da espécie monitorizada.

1.2.1 Comparação com as técnicas de automatização discreta

Sendo uma técnica de fluxo contínuo não segmentada cujo modo de funcionamento assenta nos pressupostos anteriormente referidos, permite em relação às técnicas de automatização discreta a utilização de menores volumes de amostra e reagentes, a realização de medidas em condições de ausência de equilíbrio físico e químico[30] e consequentemente a obtenção de maiores ritmos de determinação.

1.2.2 Comparação com as outras técnicas de fluxo contínuo

Relativamente a este aspecto, justifica-se fundamentalmente a comparação com a técnica FIA dado que esta é a que apresenta maior expressão dentro do grupo das técnicas de fluxo contínuo.

A Análise por Injecção Sequencial emergiu da técnica FIA e como tal aparenta algumas semelhanças, contudo insignificantes para classifica-la como simples modo operativo FIA. Desde logo não necessita de um fluxo permanente, razão pela qual o consumo de soluções é naturalmente menor, embora com uma redução ligeira dos ritmos de determinação. Para além disso, a técnica SIA requer como consequência da forma como são definidos os volumes que se movimentam nos sistemas, um conhecimento e um controlo mais rigoroso dos factores que afectam a precisão desses volumes. Relativamente a este aspecto, importa considerar o conhecimento do perfil dos caudais, a selecção criteriosa do binómio tempo/caudal, as características físicas da amostra, principalmente a viscosidade, e as dimensões da tubagem, designadamente comprimento e diâmetro interno.

Numa perspectiva mecânica os sistemas SIA são mais simples e por isso robustos, não requerendo grandes modificações de fundo sempre que se altera a determinação analítica ou as condições em que se a realiza.

1.2.3 Comparação com os métodos robotizados

Os sistemas SIA embora não sendo classificados como sistemas robotizados, assemelham-se pela sua arquitectura e modo de funcionamento a um sistema robotizado. Esta semelhança resulta fundamentalmente da válvula selectora, onde a cada porta de acesso poderá estar associado uma operação analítica diversa[31].

A técnica SIA possui ainda as vantagens de permitir acoplar favoravelmente as características de economia inerentes às técnicas de fluxo contínuo, principalmente a técnica FIA, e de apresentar custos de aquisição e manutenção bastante menores. Como limitação comparativa cita-se a maior dificuldade de processamento de amostras sólidas.

1.2.4 Componentes fundamentais de um sistema SIA

Os sistemas SIA são genericamente constituídos por um dispositivo de propulsão bidireccional, uma válvula multiposição selectora de fluidos e um reactor de armazenamento que estabelece a ligação entre os dois componentes iniciais.

1.2.4.1 Dispositivos de propulsão

Entre todos os componentes, o dispositivo de propulsão é talvez aquele que mais condiciona o bom desempenho de um sistema SIA, sobretudo na perspectiva da reprodutibilidade dos volumes utilizados no sistema. No primeiro trabalho versando o tema, Ruzicka e Marshall[32] introduziram a seringa de pistão como um dispositivo mecanicamente

resistente capaz de produzir um fluxo reprodutível. Contudo, é notória a perda de ritmo analítico que se verifica nos sistemas com este tipo de dispositivo[33].

Para além deste, os sistemas SIA também podem operar com seringas de veio excêntrico[34], buretas automáticas[35,36], bombas eletro-osmóticas[37] e bombas peristálticas[38]. A seringa de veio excêntrico e a bureta automática apresentam características similares às da seringa de pistão quanto à reprodutibilidade do caudal e à resistência mecânica. As bombas electro-osmóticas são atractivas para caudais reduzidos uma vez que garantem uma elevada precisão. No caso das bombas peristálticas o factor mais relevante envolve a pulsação do fluxo, a qual influencia marcadamente a reprodutibilidade dos volumes, sobretudo quando são pequenos[33]. Apesar deste aspecto, as bombas peristálticas permitem ciclos de análise relativamente mais rápidos que os outros dispositivos de propulsão referidos, quer pelos caudais proporcionados, quer pela ausência de uma etapa de enchimento ou escoamento do dispositivo com solução transportadora.

Nos últimos tempos tem-se considerado a hipótese de recurso às bombas centrífugas como dispositivos de propulsão em sistemas SIA. Tratam-se de dispositivos mecânicos munidos de um compartimento com um orifício de entrada e outro de saída, e no interior do qual existe um conjunto de pás que por rotação permitem a propulsão de fluidos de modo pulsado. Actualmente, apesar de haver algum interesse na utilização deste tipo de bombas, não existe ainda nenhum trabalho científico que documente a sua utilização em sistemas SIA.

1.2.4.2 Válvulas multiposição selectoras de fluidos

As válvulas multiposição selectoras de fluidos que normalmente equipam os sistemas SIA dividem-se em dois grandes grupos:

- as do tipo rotativo, constituídas por um rotor móvel uni ou bidireccional na superfície do qual está talhado um canal que estabelece sequencialmente o contacto entre o orifício central e as portas periféricas.
- e as de actuação solenóide, constituídas por um bloco no qual existem dispostos radialmente tantos canais como portas periféricas. A comunicação entre estas e o orifício central é efectuado por abertura de uma pequena válvula com actuação por solenóide disposta junto de cada uma das portas periféricas (Figura 1.9).

O segundo tipo de válvulas tem a vantagem do acesso a cada uma das portas periféricas ser praticamente instantâneo e aleatório, enquanto nas do primeiro tipo é sequencial, sendo necessário considerar o tempo para a rotação da cabeça da válvula.

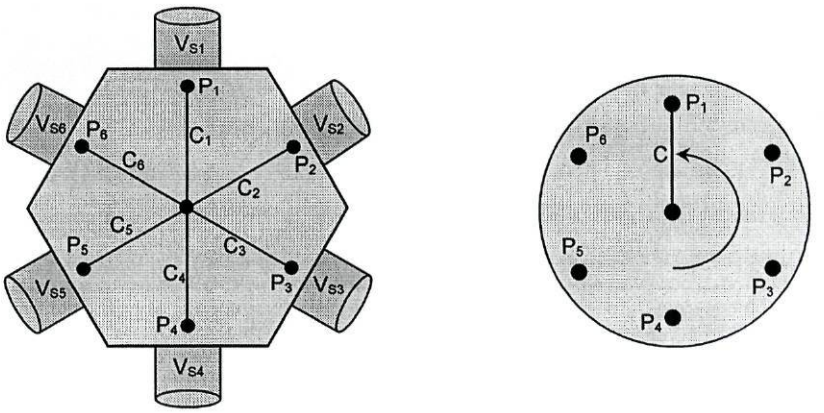


Figura 1.9 Representação esquemática da cabeça dos dois tipos de válvulas multiposição selectoras de fluido que se podem utilizar em sistemas SIA. Do lado esquerdo a válvula com actuação solenóide e do lado direito a válvula rotativa. P_1 a P_6 – portas de acesso; C_1 a C_6 – canais internos fixos; V_{S1} a V_{S6} – válvulas solenóides; C – canal interno móvel.

1.2.4.3 Reactor de armazenamento

A disposição espacial e as dimensões são os aspectos mais importantes relacionados com o reactor de armazenamento e porventura aqueles que mais podem afectar a qualidade dos resultados. Assim, a utilização de um reactor de armazenamento disposto linearmente permite maximizar a dispersão axial e por conseguinte a interpenetração entre segmentos contíguos, quer durante a aspiração das soluções, quer no seu processamento posterior.

A importância que a dispersão axial assume nos sistemas SIA permitiu que se considerasse, pelo menos nos primeiros tempos da técnica SIA, a ideia de que a mistura poderia ser obtida invertendo por diversas vezes o sentido do fluxo dentro do reactor de armazenamento, em lugar dos longos reactores típicos da técnica FIA[30]. Contudo, depressa se constatou que tal desiderato era difícil de alcançar, sobretudo quando o número de soluções a utilizar era superior a três, sendo preferível neste caso o recurso a uma câmara de mistura apoiada numa das portas da válvula selectora de fluidos[31].

Em relação às dimensões do reactor de armazenamento, Marshall e Van Staden[38] chegaram à conclusão que a redução do calibre da tubagem determina quando em modo de aspiração um aumento do risco de desgaseificação das soluções e da imprecisão com o aumento do caudal. As dimensões do reactor devem ser suficientes para acomodar as diferentes soluções empregues no procedimento analítico.

1.2.5 Configurações dos sistemas SIA

Quanto à natureza da configuração, os sistemas SIA podem ser classificados em três grandes grupos:

- aqueles que sugerem a colocação do detector entre o dispositivo de propulsão e a válvula selectora[28];

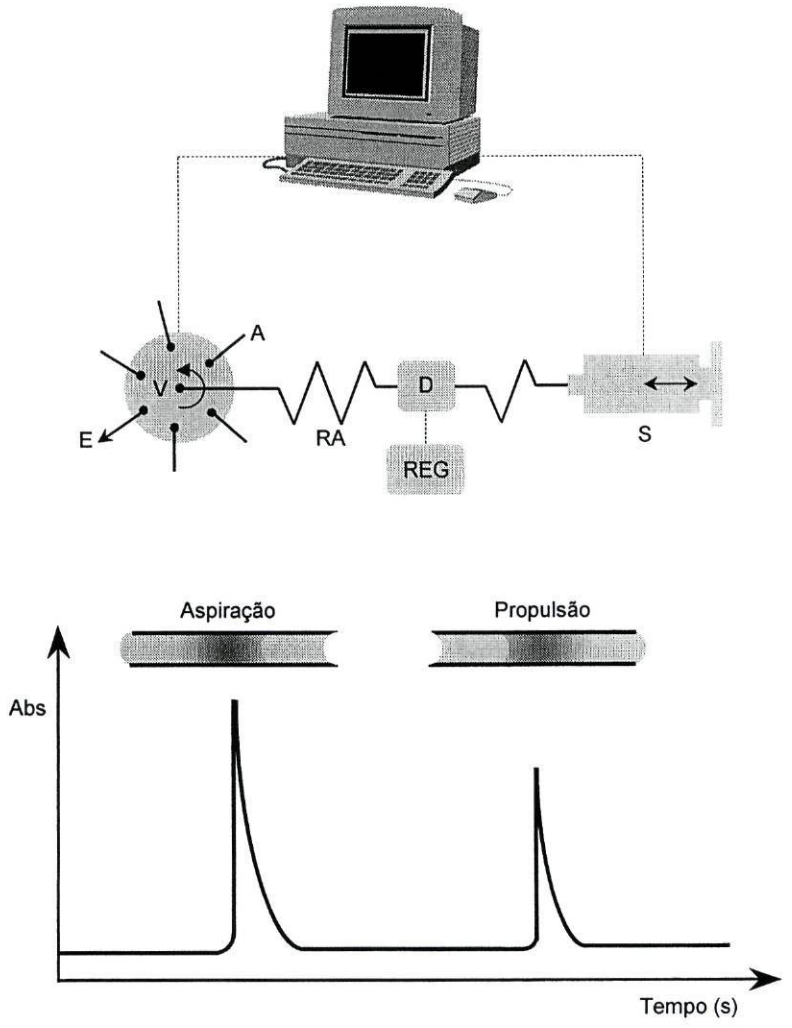


Figura 1.10 Representação esquemática da configuração dos sistemas SIA que propõem a colocação do detector entre o dispositivo de propulsão e a válvula selectora. T – solução transportadora; S – seringa de pistão; RA – reactor de armazenamento; A – amostra; V – válvula multiposição selectora de fluidos; D – detector; REG – registador; E – esgoto. Em baixo representação dos sinais obtidos por colorimetria com um segmento de uma solução corante em modo de aspiração e de propulsão.

- aqueles que propõem a colocação do detector na porta de acesso por activação de uma válvula solenóide de três vias, posicionada entre o dispositivo de propulsão e a válvula selectora[39];
- aqueles que propõem a colocação do dispositivo de detecção numa das portas laterais da válvula selectora.

Em relação à primeira configuração, curiosamente proposta para operar com seringas de pistão (Figura 1.10), importa salientar que a posição do detector na montagem determina a obtenção de dois sinais, o primeiro de maior amplitude, em condições de aspiração do segmento de amostra, e o segundo de menor intensidade, devido à dispersão sofrida em condições de propulsão para o esgoto. Com esta configuração os ciclos analíticos são relativamente mais demorados, uma vez que para além das soluções envolvidas na reacção, é necessário aspirar inicialmente a solução transportadora que assegura a limpeza da tubagem durante a etapa de rejeição do segmento de amostra para o esgoto. Adicionalmente, a configuração não é adaptável a detectores de fim de linha como é o caso de algumas das técnicas de espectroscopia atómica.

Quanto à segunda configuração, o seu desempenho é relativamente melhor, sobretudo na perspectiva de acoplamento aos detectores fundamentados na espectroscopia atómica.

A colocação do detector numa das portas da válvula selectora representa na actualidade a opção mais vantajosa, na medida em que para além dos ciclos analíticos serem menos demorados é possível associar simultaneamente ao sistema SIA vários detectores incluindo detectores de fim de linha (Figura 1.7).

1.2.6 Modos de operação em sistemas SIA

À semelhança do que aconteceu com as outras técnicas de fluxo contínuo também para a técnica SIA foram sugeridos alguns modos de operação.

1.2.6.1 Procedimentos de diluição

Frequentemente o teor da espécie a dosear é superior ao permitido pelo intervalo de resposta linear do sistema de detecção. Neste caso torna-se necessário submeter a amostra a uma etapa de diluição cuja extensão depende do teor do analito na amostra e do intervalo de resposta linear instrumental. Um dos procedimentos sugerido baseia-se na intercalação de água entre os segmentos de amostra e reagente[40,41]. Apesar de simples, este procedimento apenas é adequado aos casos onde a detecção pressupõe a formação de um produto monitorizável. O envio da amostra e do reagente para um reactor de diluição, colocado numa das portas da válvula selectora, seguido da aspiração de uma pequena porção da solução resultante para o reactor de armazenamento e envio para o detector, representa outro dos procedimentos que se pode implementar, embora novamente limitado aos casos onde há formação de um produto monitorizável[40]. Para os casos onde o analito é quantificado directamente sem reacção, por exemplo, por Espectrofotometria de Absorção Atómica com atomização por chama, a rejeição para uma das portas da válvula selectora de uma parte do segmento de amostra aspirado para o reactor de armazenamento constitui melhor opção[42].

1.2.6.2 Procedimentos de calibração

As potencialidades da técnica SIA foram também exploradas no sentido do desenvolvimento de novos procedimentos de calibração recorrendo apenas a uma única solução padrão. Um dos procedimentos propostos consiste na utilização de um segundo reactor de armazenamento, apoiado sobre uma das portas da válvula selectora, no qual é armazenado um gradiente de concentrações devido a um só padrão e partir do qual é possível aspirar pequenas alíquotas do gradiente e assim produzir uma curva de calibração[43].

A implementação do método da adição padrão foi também objecto de estudo através da intercalação de um pequeno volume de diferentes soluções padrões entre segmentos de amostra e reagente de cor[44]. Durante o transporte para o detector os três segmentos dispersavam-se mutuamente gerando uma zona do fluxo onde o reagente, a amostra e a solução padrão coexistiam.

O recurso a técnicas instrumentais de varrimento tipo Espectrofotometria de Ultra-violeta/Visível (UV/Vis)[45], matriz de díodos (Dyode Array)[46,47] ou Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier (FTIR)[48,49] tem servido para desenvolver procedimentos de calibração multivariada para quantificação simultânea de vários analitos na mesma amostra.

1.2.6.3 Procedimentos de transferência de massa através de uma interface

A técnica SIA foi também aplicada no desenvolvimento de procedimentos de transferência de massa através de interfaces do tipo gás-líquido, líquido-líquido e sólido-líquido.

Relativamente à interface do tipo gás-líquido, concretizada em diversos trabalhos de determinação do amónio com detecção condutimétrica[50], colorimétrica[51,52] ou potenciométrica[53], permite tal como amplamente demonstrado em FIA, o uso de unidades de difusão gasosa.

Quanto à interface do tipo líquido-líquido, há a considerar quer o recurso a unidades de diálise[54,55] quer a implementação em linha de extracções líquido-líquido[56,57,58,59].

Em relação à interface do tipo sólido-líquido, os procedimentos desenvolvidos baseiam-se no recurso a colunas empacotadas com resinas com o objectivo de melhorar a sensibilidade e/ou selectividade[60,61,62], ou servir como técnica preparativa de purificação para a Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)[63].

1.2.7 Detecção em SIA

A multifuncionalidade da técnica SIA permite a sua associação a diversas técnicas instrumentais incluindo algumas das mais recentes, como é o caso do DCP-AES[64] e do ICP-MS[65]. No que concerne à espectrofotometria com fibras ópticas contribuiu para o desenvolvimento de três novos tipos de células de fluxo:

- a *Universal Sandwich Membrane Cell*, consistindo num módulo que incorpora uma membrana que separa dois canais, um dador e outro aceitador e um cabo de fibras ópticas bifurcado que permite a realização das medidas analíticas por refletância a partir da superfície da membrana do lado dador, com a possibilidade de realização simultânea de procedimentos separativos do tipo diálise ou difusão de gás[66]. Alternativamente, a célula também pode ser utilizada para efectuar medidas por quimiluminiscência[67], bastando para tal uma só fibra óptica;
- a *Célula de Fluxo Microvolumétrica*; consistindo numa pequena câmara de mistura com agitação magnética, que simultaneamente funciona como câmara de mistura e como detector devido à existência num dos lados da câmara de um cabo de fibra óptica para a emissão de luz e no lado oposto o sistema de recolha do sinal[68];
- a *Fountain Flow Cell* ou também denominada *Jet-Ring Cell*[69], concebida para utilização em espectroscopia e microscopia. Consiste numa câmara com uma entrada central rodeada por um anel com um dreno em posição excêntrica e a região superior da câmara coberta com vidro. A amostra entra por baixo por acção do sistema SIA através do orifício central e distribui-se de forma radial dentro da câmara. Esta câmara foi concebida como uma câmara para estudos de perfusão de células vivas utilizando a Microscopia de Fluorescência como técnica de detecção[70,71]. Neste caso a objectiva do microscópio é posicionada sobre o vidro da parte superior da câmara. Esta célula de fluxo pode também ser utilizada para receber micropartículas revestidas com determinados reagentes específicos, que permitem a retenção do analito no percurso óptico de um cabo de fibras ópticas, colocado sobre o vidro da região superior da célula de fluxo em lugar da objectiva

do microscópio, enquanto a amostra flui através delas para esgoto[71]. Nestas condições a espécie a quantificar é capturada no campo de observação de detector e transformada por reacção química com o reagente imobilizado nas micropartículas numa espécie detectável[72]. As medidas são efectuadas por refletância, contudo é possível usar esta célula no caso das reacções de quimiluminiscência[73]. A utilidade desta célula pode ser transposta para a realização de estudos de ligações antigénio-anticorpo[69].

1.2.8 Aplicações em análise química

A versatilidade da técnica SIA permitiu que no espaço de dez anos tenha sido possível automatizar os mais variados procedimentos. A aplicabilidade da técnica SIA estende-se por várias áreas, nomeadamente a nível académico com estudos de cinética química[74]; a farmacêutica com particular relevo para os estudos das cinéticas de dissolução de fármacos[75,76]; a metalúrgica[77]; a alimentar[78,79]; a análise radioquímica[80,81,82], entre outras.

Pela sua robustez, revelou-se igualmente adequada no controlo em linha de processos de produção[83,84], onde a obtenção de informação química é fundamental para efectuar correcções ao processo produtivo se for caso disso, em tempo real.

A monitorização de processos industriais de depuração de águas ou de distribuição de água à população por telegestão perspectiva-se como uma das áreas onde a intervenção da técnica SIA se fará sentir ao longo dos próximos anos. Para o efeito contribui a possibilidade de realização de determinações multiparamétricas através da utilização de um só detector e colocando o segmento de amostra entre dois segmentos de reagente distintos de tal forma que cada uma das interfaces adquira interesse analítico (*técnica de Sandwich*)[85,86], ou recorrendo a mais do que um detector disposto em série[87]. A inclusão na montagem de dois detectores apoiadas em portas distintas da válvula selectora, para além de permitir a quantificação de

diferentes espécies, pode, no caso da mesma determinação, servir para o controlo recíproco da exactidão dos dois procedimentos[88].

Como afirma Jaromir Ruzicka, para construir um sistema SIA é preciso equipamento, conhecimento e mais do que tudo imaginação[10]. Os desenvolvimentos recentes permitem prevêr que parte da pesquisa em SIA evoluirá no sentido da construção de sistemas com capacidade de auto-configuração[3,89], e na miniaturização através da utilização de capilares e bombas electrosmóticas[37], com vantagens na realização de determinações *in situ*, no consumo de soluções, na manutenção e nos custos. Contudo, as fortes limitações impostas por alguns dos sistemas de detecção mais comuns[90] contínuam a condicionar os desenvolvimentos nesta área, residindo a esperança no desenvolvimento dos sensores ópticos[28] e eletroquímicos[91].

1.3 Espectrofotometria de Absorção Atómica

A Espectrofotometria de Absorção Atómica (AAS) nas suas diferentes variantes constitui uma das técnicas mais selectivas para efectuar a determinação de espécies elementares. As suas vantagens revelam-se não só a este nível, bem como a nível da sua fiabilidade, rapidez e sensibilidade, fazendo dela uma das técnicas de eleição para a quantificação daquele género de espécies nas mais diversas matrizes.

Do ponto de vista teórico, a Espectrofotometria de Absorção Atómica baseia-se na absorção de radiação electromagnética de uma gama estreita de comprimentos de onda por átomos no estado fundamental de um determinado elemento. Em termos práticos, um espectrofotómetro de absorção atómica é normalmente constituído por uma fonte de luz que emite o espectro do elemento a determinar, uma célula de absorção que tanto pode ser uma chama, como um forno de grafite, um filamento metálico ou uma célula de quartzo, um monocromador, um fotomultiplicador e por fim um dispositivo que apresenta os resultados das medidas instrumentais.

Um dos componentes mais importantes num espectrofotómetro de absorção atómica é o atomizador. Na atomização por chama (FAAS), a amostra é introduzida na câmara de nebulização do instrumento por aspiração através de um capilar de reduzidas dimensões, denominado nebulizador. A força de sucção resulta da redução de pressão que se estabelece na extremidade do capilar posicionada no interior da câmara de nebulização devido à entrada do comburente sobre-pressão. A amostra depois de aspirada é nebulizada por impacto e enviada para o queimador onde a chama a converte em vapor atómico, estando a maioria dos átomos no estado fundamental. Estes átomos posicionando-se no percurso do feixe de luz podem interagir com ela absorvendo radiação de uma determinada gama de comprimentos de onda. A produção de átomos resulta assim da acção combinada do nebulizador e do queimador, cujo conjunto é normalmente denominado atomizador, e requer que a amostra seja introduzida na forma líquida.

A eficiência de nebulização da amostra depende entre outros factores do desenho da câmara de nebulização, da presença de dispositivos de impacto e do caudal de aspiração da amostra, este por sua vez dependente da pressão do comburente, do grau de abertura da saída do nebulizador e do comprimento e calibre do tubo de aspiração da amostra. Na essência, um aumento da eficiência de utilização da amostra passa pela obtenção de gotas de menores dimensões que geralmente pode ser conseguido pela redução do caudal de aspiração da amostra. Alternativamente, é possível melhorar a eficiência de nebulização empregando solventes orgânicos. Neste caso, a menor tensão superficial e a maior pressão de vapor aumentam o caudal de aspiração da amostra e favorecem a formação de gotas de pequenas dimensões em maior quantidade. Contudo, o maior risco de extinção da chama obriga a um ajuste da relação de caudais entre o comburente e o combustível, através da redução do caudal de combustível tornando a chama mais oxidante que o habitual. Segundo alguns autores é possível alcançar 100% de eficiência de nebulização através da acção conjugada de baixos caudais (1 ml/min) com solventes orgânicos (metanol, etanol, e benzeno), comparativamente com os 32% conseguidos com água[92].

Embora a atomização por chama seja hoje o processo de produção de átomos mais comum, são igualmente utilizadas devido à sua maior sensibilidade, a atomização electrotérmica (ETAAS) e a atomização por geração de hidretos (HGAAS), cuja variante da geração de vapor frio para a determinação de mercúrio é sem margem para dúvidas a mais conhecida.

Apesar da grande selectividade que a FAAS apresenta, existe um conjunto de interferências largamente dependentes da natureza da matriz da amostra que podem comprometer seriamente a qualidade dos resultados. Uma dessas interferências, genericamente conhecida por absorção de fundo ou não específica (*Background*), e correspondendo a absorções moleculares e dispersão da luz por partículas interpostas no percurso do feixe de luz, pode ser minimizada através da utilização de um corrector de fundo (*corrector de Background*). Para além desta, a FAAS pode ser afectada por outras interferências igualmente relacionadas com a matriz da amostra, nomeadamente a elevada concentração salina e as características físicas, das quais há a salientar a viscosidade, a tensão superficial e a pressão de vapor. Quanto ao conteúdo salino, a deposição de sais no queimador pode provocar desde simples desvios da linha de base até perda de sensibilidade e aumento do tempo de resposta do instrumento, sendo por vezes necessário o recurso a atomizadores específicos[93,94]. No caso das características físicas das amostras, a sua influência faz-se sentir fundamentalmente ao nível do caudal de aspiração e por conseguinte sobre a eficiência de nebulização[95].

Outro aspecto importante da análise por AAS envolve a reduzida amplitude do intervalo de resposta linear instrumental, que obriga muitas vezes a procedimentos prévios de diluição das amostras.

1.3.1 Acoplamento da técnica SFA à FAAS

A Análise por Fluxo Segmentado foi talvez a primeira técnica a ser utilizada para melhorar o desempenho da FAAS[96], bem patente na melhoria dos ritmos de determinação, na redução do consumo das soluções e na relativa facilidade de realização de procedimentos de diluição e adição de reagentes, por exemplo, supressor de interferências químicas (Figura 1.11). Apesar destas vantagens, a associação da SFA à FAAS não foi tão frutuosa quanto seria de esperar em relação às interferências provocadas pela matriz da amostra. A realização das medidas em condições estacionárias não permite obviar de forma significativa a influência das características físicas das amostras anteriormente citadas sobre o desempenho do instrumento. Também a segmentação com ar provoca um aumento da pulsação do fluxo e por conseguinte do ruído, dificultando a realização de procedimentos envolvendo transferência de massa através de interfaces do tipo gás-líquido, líquido-líquido ou sólido-líquido.

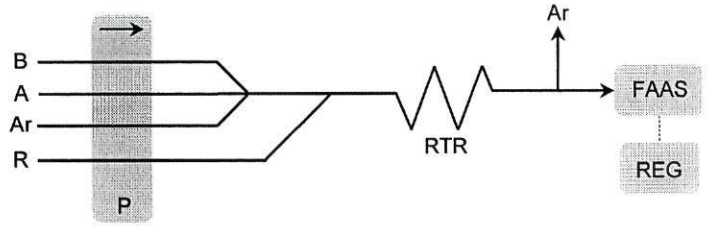


Figura 1.11 Representação esquemática de um sistema de Análise por Fluxo Segmentado (SFA) acoplado à FAAS. P – dispositivo de propulsão; RTR – reactor de transporte/reacção; A – amostra; B – solução diluente; R – solução reactiva (por exemplo, supressor de interferências químicas); FAAS – espectrofotómetro de absorção atómica com atomização por chama; REG – registador.

1.3.2 Acoplamento da técnica FIA à FAAS

Com o acoplamento da técnica SFA, percebeu-se que muitos dos problemas da FAAS poderiam ser minimizados através da nebulização de volumes discretos de amostra em lugar dos grandes volumes normalmente utilizados na obtenção dos sinais estacionários[97]. Todavia, é com a introdução da técnica FIA que a FAAS vê as suas capacidades excedidas relativamente ao seu desempenho em condições convencionais. Inicialmente a técnica FIA foi acoplada à FAAS com o objectivo de servir unicamente como sistema de amostragem e melhorar o rendimento do sistema de nebulização[98,99]. A utilização de volumes reduzidos, geralmente inferiores a 100 μl, e a propulsão contínua de um fluido transportador para o detector, permite reduzir o tempo de contacto das amostras com o queimador do FAAS, bem como assegura a limpeza contínua do atomizador. Nestas condições, é possível aumentar a tolerância da FAAS ao conteúdo salino das amostras, nomeadamente a teores da ordem de 25% (m/v) em cloreto de magnésio[100], 40% (m/v) em ureia ou dihidrogenofosfato de potássio[101], 34% (m/v) em cloreto de sódio[102], 2% (m/v) em borato de lítio[102] e 100% (m/v) em hidrogenofosfato de di-potássio[102]. Estes aspectos evidenciam a possibilidade da análise de soluções com elevado teor salino nas quais as espécies a dosear encontram-se em quantidades que não permitem a realização de grandes diluições. Demonstrou-se igualmente a possibilidade de introdução de soluções mais viscosas[103] incluindo emulsões[104] e suspensões[105], e evitando assim o ajuste da viscosidade das soluções padrão às amostras ou a utilização da área do sinal analítico em lugar da sua intensidade máxima[106]. A utilização de volumes reduzidos de amostra além de contribuir para a melhoria do desempenho da FAAS, viabiliza também a realização das análises nos casos em que o volume de amostra disponível é escasso. Para além da influência que o volume de amostra produz sobre o desempenho da FAAS, a obtenção das vantagens anteriormente referidas resultam em larga medida da utilização de um dispositivo de propulsão independente da força de sucção do FAAS.

1.3.2.1 Transporte e introdução das amostras

A sensibilidade em FAAS depende em larga medida do caudal de aspiração do espectrofotómetro. Com efeito, a redução do caudal de aspiração do espectrofotómetro provoca um aumento da eficiência de nebulização que se reflecte por um lado num aumento da sensibilidade em termos de área do sinal produzido e uma redução relativamente à intensidade máxima, e por outro numa redução da incidência de interferências químicas. Em termos práticos, a FAAS é optimizada para o caudal que produz a máxima intensidade do sinal analítico, o que corresponde a uma solução de compromisso entre a eficiência de nebulização e o aporte de solução ao espectrofotómetro por unidade de tempo. Quando se considera o acoplamento da FAAS a um sistema de fluxo contínuo baseado na técnica FIA, constata-se que estas condições são obtidas por utilização de caudais de propulsão ligeiramente superiores ao caudal de aspiração do FAAS[107,108]. As determinações apesar de perderem ligeiramente na sensibilidade, tornam-se contudo mais precisas devido quer à minimização das características físicas da matriz quer ao menor risco de desgaseificação das soluções[109] e entrada de ar através dos pontos de união da tubagem[110,111]. Para caudais relativamente acima do caudal de aspiração do FAAS, a intensidade do sinal analítico diminui por redução da eficiência de nebulização, podendo servir como processo de diluição aparente[112]. Contudo, nestes casos verifica-se um aumento da incidência de interferências químicas[113] devido à formação de gotas de maiores dimensões em maior percentagem[114,115].

Nos casos em que a montagem de fluxo serve para automatizar processos de extracção líquido-líquido, nem sempre é possível a utilização de caudais de propulsão superiores ao caudal de aspiração do FAAS. Nestas circunstâncias, recorre-se à utilização de um canal passivo perto do espectrofotómetro que compensa as diferenças entre o caudal de propulsão do dispositivo de impulsão do sistema automático e o caudal de aspiração do FAAS[116,117].

1.3.2.2 Automatização das várias etapas da análise química

A utilidade dos sistemas de fluxo contínuo não se limita unicamente à introdução e transporte das soluções padrão e amostras até ao detector. Na verdade, os sistemas de fluxo contínuo têm também servido para automatizar outras etapas da análise química de espécies elementares, nomeadamente a calibração, a diluição, a adição de reagentes, a digestão e a pré-concentração.

1.3.2.2.1 Procedimentos de calibração

O método da curva de calibração é normalmente o mais utilizado para obter a concentração das espécies nas amostras. A sua realização pressupõe contudo a utilização de um conjunto de soluções padrão que abarquem o intervalo de linearidade instrumental e cuja preparação requer algum tempo. Por essa razão, tem-se procurado desenvolver procedimentos de calibração mais simples que utilizem apenas uma única solução padrão. Uma das primeiras ideias propostas, consistiu em submeter o segmento de solução padrão a diferentes graus de diluição fazendo-o percorrer tubagens com diferentes comprimentos[118], ou utilizando volumes diferentes[119]. A amostragem por zonas (*Zone Sampling*), consistindo genericamente na intercalação num segundo fluxo transportador, após selecção criteriosa de uma parte do segmento de solução padrão que sofreu dispersão noutro transportador, representa um dos procedimentos mais eficientes para obter uma curva de calibração com uma só solução padrão[120]. A injecção sequencial de segmentos de amostra no mesmo fluxo transportador permite, por sobreposição parcial daqueles, obter um registo em função do tempo com máximos e mínimos com os quais se pode construir uma curva de calibração[121]. A utilização de uma câmara de mistura permite gerar um perfil de concentrações exponencial, ao qual corresponde uma função sinal versus tempo e na qual se podem obter por interpolação as

concentrações das amostras determinadas por via convencional[122,123]. Outro procedimento sugerido, denominado de calibração por gradiente[124], baseia-se no estabelecimento de uma correspondência entre a amplitude do sinal ao longo do ramo descendente do sinal transiente, obtido com o segmento de uma só solução padrão, e a concentração que produz cada um desses valores do ramo descendente do sinal transiente em condições convencionais.

O método da adição padrão representa outro método de calibração amplamente utilizado em AAS, mas cuja execução é mais morosa que a do método da curva de calibração. O método da adição padrão interpolativo, consistindo genericamente na injecção das soluções padrão no fluxo constituído pela solução de amostra foi um dos primeiros a ser sugerido[125,126]. Apesar de simples, este procedimento não é exequível quando o volume de amostra disponível é escasso. Apresentando algumas semelhanças com este procedimento, foi sugerida a intercalação do segmento de amostra entre segmentos de água e solução padrão. Nas extremidades do segmento de amostra formavam-se duas interfaces com utilidade analítica desde que não contactassem entre si[127]. A confluência sincronizada dos segmentos de amostra e soluções padrão constitui também um dos procedimentos mais elementares para implementar o método da adição do padrão[128]. Relativamente a este último, foi sugerida a utilização do modo de amostragem de zonas para gerar as soluções padrão antes da confluência com a amostra[129].

1.3.2.2.2 Procedimentos de diluição

Em FAAS é comum a necessidade de adequação da concentração das amostras ao intervalo de resposta linear instrumental. Esta operação compromete o tempo de análise e pode constituir uma significativa fonte de erros. Para contornar estes problemas foram propostos diversos procedimentos de diluição automática. A forma mais simples consiste numa selecção criteriosa do volume de amostra a utilizar[23,130]. A utilização na montagem de reactores

com diferentes dimensões representa também uma forma simples de diluir a amostra embora de modo pouco significativo[131]. A confluência assimétrica de dois segmentos de amostra, permite que haja sobreposição parcial dos segmentos gerando-se uma função do sinal em ordem ao tempo com máximos e mínimos[121,132]. A amplitude do sinal junto dos mínimos, largamente dependente do grau de sobreposição dos segmentos, pode ser utilizada para a análise de amostras cuja concentração se situe fora do intervalo de resposta linear instrumental. Aplicação deste modo de operação é contudo limitada pela salinidade da amostra no caso do detector ser um FAAS. O recurso à diálise passiva representa uma alternativa vantajosa na medida em que possibilita por um lado, a obtenção de factores de diluição variáveis de acordo com as dimensões da membrana de diálise e por outro, a realização de determinações biparamétricas através da utilização da porção de amostra que permanece no compartimento dador da unidade de diálise[133]. A principal desvantagem prende-se com a necessidade de substituição periódica das membranas. A divisão parcial do fluxo, que inclui a amostra (*Split Zone*), dentro da montagem constitui uma opção que fornece praticamente as mesmas vantagens da diálise passiva, embora em certos casos possa complicar as montagens devido ao considerável número de linhas de fluxo[133,134]. O uso de câmaras de mistura possibilita igualmente a obtenção de diluições elevadas da amostra embora com um aumento considerável do tempo de análise, não sendo por isso recomendável a sua utilização como dispositivo de diluição[135]. A inclusão na montagem de vários pontos de confluência e divisão do fluxo constitui outro dos procedimentos utilizados para promover diluições (*Cascat Dilution*)[136]. A injecção parcial do conteúdo do tubo de amostragem de uma válvula de injecção rotativa de seis portas, com sincronização da posição dos rolos da bomba peristáltica, constitui um dos processos mais eficazes de obter grandes diluições sem necessidade de reconfiguração física do sistema[137,138,139]. A amostragem por zonas permite também efectuar grandes diluições com a vantagem de não necessitar igualmente de reconfiguração física da montagem[140,141]. Adicionalmente, é possível efectuar determinações biparamétricas através da utilização da porção de amostra que é rejeitada para esgoto. A medida da largura do sinal transiente em alternativa à sua intensidade máxima constitui um procedimento que pode ser empregue para

estender o intervalo de linearidade entre a concentração e a resposta do detector sem necessidade de diluição, uma vez que a largura do sinal transiente é proporcional ao logaritmo da concentração[142]. O recurso a algoritmos que permitem a utilização de toda a informação do sinal transiente, sobretudo no ramo descendente, representa outro dos procedimentos empregues para ampliar o intervalo de linearidade analítico sem diluição[143].

1.3.2.2.3 Procedimentos de adição de reagentes

Embora por norma a diluição seja uma das operações mais comuns em FAAS, em determinados casos é fundamental proceder à adição de reagentes às amostras. Neste caso, assume particular importância o recurso ao modo das zonas confluentes[144] pela capacidade de proporcionar uma economia de reagentes, como por exemplo, de lantânio na determinação de cálcio e magnésio, e a redução da deposição de sais no queimador do FAAS devido à utilização de fluidos transportadores simples constituídos quase exclusivamente por água[98].

1.3.2.2.4 Procedimentos de digestão

Por vezes a realização da determinação analítica pressupõe que a amostra seja submetida uma etapa de digestão, a qual pode ser bastante demorada, dependendo quer da composição da amostra quer da técnica de digestão empregue. O desenvolvimento das técnicas de fluxo contínuo, principalmente a técnica FIA, trouxe algumas vantagens importantes nesta área. Com base na técnica FIA foram propostos sistemas de digestão em linha por microondas sobretudo para suspensões[145], amostras biológicas[146], ou para conversão da totalidade do elemento ao mesmo estado de oxidação na determinação por geração de

hidretos[147] ou por vapor frio no caso do mercúrio[148,149]; e por recurso às radiações ultra-violeta[150] no caso do desenvolvimento de procedimentos separativos de espécies metálicas em água. No caso dos procedimentos de digestão por microondas em sistemas FIA, a estratégia consistia na utilização de um longo reactor de digestão colocado dentro do forno de microondas e num reactor de arrefecimento colocado à saída deste. Com a técnica SIA a digestão por microondas tornou-se consideravelmente mais simples uma vez que basta enviar o segmento de amostra para um reactor de digestão colocado dentro do forno de microondas e mante-lo aí durante o tempo necessário[151]. Infelizmente não está ainda documentada a aplicação da digestão por microondas à técnica SIA com detecção por FAAS.

1.3.2.2.5 Procedimentos de transferência de massa através de uma interface

Em diversas situações analíticas a sensibilidade que a FAAS apresenta não é suficiente para permitir a determinação das espécies com interesse. Para contornar este problema, bem como o da selectividade, foram propostos diversos procedimentos de transferência de massa através de interfaces do tipo gás-líquido, líquido-líquido ou sólido-líquido recorrendo às técnicas de fluxo contínuo, sobretudo à técnica FIA.

No caso da interface do tipo gás-líquido, as soluções propostas no âmbito da técnica FIA[17] e mais recentemente para a técnica SIA[152,153] revelaram-se mais vantajosas na melhoria do desempenho da HGAAS. As vantagens manifestaram-se através de uma redução da incidência de interferências, da quantidade de agente redutor e no aumento da eficiência de utilização da amostra mediante uma transferência mais eficiente dos hidretos para a célula de leitura[17].

Relativamente aos procedimentos que se baseiam na transferência de massa através de uma interface do tipo líquido-líquido, nos quais se incluem as diálises e as extracções líquido-líquido, a sua utilização teve propósitos diferentes. Assim, quanto à diálise há a

considerar a diálise passiva[154] cuja utilidade conforme foi referido passa pela diluição da amostra com o objectivo de adequar a concentração da amostra ao intervalo de resposta linear instrumental ou melhorar a selectividade da determinação; e a activa, por vezes conhecida por Diálise de Donnan[154,155] e cujo emprego envolve a melhoria de sensibilidade. Em relação às extracções líquido-líquido, o seu emprego divide-se entre as aplicações que procuram uma melhoria de selectividade[156] e as que anseiam por melhoria de sensibilidade[157].

Quanto à interface do tipo sólido-líquido, evidenciam-se as precipitações e as extracções em fase sólida. No caso dos procedimentos de precipitação, o objectivo da melhoria de sensibilidade[158] é também acompanhado pelo da realização de determinações indirectas de espécies aniónicas quer de origem inorgânica como é o caso de alguns halogenetos[159], quer de origem orgânica como acontece com alguns compostos com interesse farmacêutico[160]. Em relação aos procedimentos de extracção em fase sólida, a sua utilização em FAAS apresenta como principal objectivo o da melhoria da sensibilidade. A forma mais simples de o fazer consiste em realizar a etapa de pré-concentração enviando a amostra directamente para o FAAS[161]. Este género de procedimentos apresenta contudo inconvenientes quando o conteúdo salino das amostras é elevado. Por esta razão, é preferível realizar a etapa separativa com envio da amostra directamente para esgoto. Para além deste aspecto, alguns autores defendem a ideia de que as colunas devam possuir uma forma cónica e a eluição deva ser efectuada em contra-corrente de modo a maximizar a sensibilidade e reduzir o grau de compactação do material de enchimento das colunas. Verifica-se, contudo, que não há consenso no seio da comunidade científica quanto a estes dois aspectos. Relativamente ao processo de amostragem, pelo contrário, é consensual que o volume de amostra deva ser definido a partir do binómio tempo/caudal (amostragem por tempo fixo) em vez da utilização de um dispositivo com volume fixo (amostragem por volume fixo), sobretudo quando o volume de amostra é relativamente grande, *i.e.*, superior a 2 ml[162]. No sentido de melhorar ainda mais o desempenho dos sistemas de fluxo contínuo, foram propostos sistemas que recorrem a duas colunas dispostas paralelamente[163], ou alternadamente[163]. Muitos dos trabalhos propondo novos procedimentos de pré-concentração em fase sólida, apresentaram a técnica FIA como

uma poderosa ferramenta de avaliação das propriedades de novos materiais para a extracção em fase sólida de espécies metálicas[164,165], ou para a geração de resinas modificadas por imobilização *in situ* de reagentes selectivos em suportes sólidos adequados. Nestas circunstâncias é possível resolver problemas de estabilidade, reduzir o consumo de reagentes, simplificar o meio de reacção tornando os procedimentos mais convenientes[166], purificar o reagente e diminuir os sinais do branco[167], ou ainda permitir a especiação de um ou mais estados de oxidação das espécies metálicas em análise. Infelizmente o número de reagentes selectivos não é tão grande que permita o desenvolvimento de novas resinas.

1.3.3 Acoplamento da técnica FIA à HGAAS e à ETAAS

Apesar da FAAS ser dentro da AAS aquela que mais tem sido utilizada na etapa de detecção, também se desenvolveram sistemas de fluxo contínuo para a HGAAS e ETAAS. Relativamente à HGAAS, os sistemas desenvolvidos apresentam como base de funcionamento a transferência de massa através de uma interface do tipo gás-líquido, conforme foi referido anteriormente. Quanto à ETAAS, trata-se de uma técnica que apesar de proporcionar sensibilidade consideravelmente superior às mais comuns, utilizar volumes de amostra reduzidos e permitir a realização de pré-tratamentos *in situ*, é em muitas situações bastante susceptível às interferências de matriz, por exemplo, água do mar. Por essa razão, a análise directa de amostras complexas, mesmo dispondo do conceito de STPF (*Stabilized Temperature Platform Furnace*), o qual se baseia na utilização de câmaras de grafite revestidas com grafite pirolítica e com plataforma de *L´vov* integrada, aquecimento rápido e preciso, paragem do fluxo de gás de protecção durante a etapa de atomização, utilização de modificadores de matriz e recurso a correctores de fundo, não fornece resultados confiáveis. Nestas condições, um tratamento prévio da amostra empregando processos separativos em linha constitui uma alternativa eficaz para simultaneamente concentrar a espécies a determinar

e/ou remover interferentes da amostra, uma vez que na ETAAS a relação interferente/analito é por norma superior ao que ocorre noutras técnicas, como por exemplo, a FAAS. Assim, à semelhança do que aconteceu para a FAAS também neste caso se desenvolveram sistemas separativos por extracção líquido-líquido[168], extracção em fase sólida[169,170,171], recurso à geração de hidretos com retenção do hidreto no forno[172] e à co-precipitação[173].

1.3.4 Desvantagens da associação das metodologias de fluxo contínuo à AAS

As vantagens resultantes da associação das técnicas de fluxo contínuo, sobretudo a técnica FIA, à AAS foram tão significativas que motivaram a elaboração de quatro monografias dedicadas exclusivamente à descrição daquela associação[17,95,161,174], e o desenvolvimento de sistemas comerciais, o primeiro lançado no ano de 1989 pela firma *Perkin Elmer*, com particular ênfase para a técnica de geração de hidretos e do vapor frio de mercúrio[175].

Os sistemas FIA tornaram-se assim bastante populares pela economia de reagentes, rapidez, segurança e precisão das determinações analíticas que permitiam realizar. Apesar de tudo, apresentam algumas desvantagens sobretudo quando se considera a sua utilização em laboratórios de rotina, que derivam genericamente de um conjunto de situações que se podem resumir da seguinte forma:

- amostras que apresentam um intervalo de concentrações muito variável, requerendo conforme o caso, diluição ou pré-concentração e por conseguinte reconfiguração física das montagens tornando-as pouco adequadas para a análise de rotina;
- análise de vários parâmetros na mesma amostra que, salvo raros casos, requer igualmente a reconfiguração física das montagens, tornando-as pouco versáteis para análises de rotina.

Os sistemas poderão assim tornar-se, dependendo da natureza das determinações pretendidas, bastante complexos, obrigando por vezes a uma especialização apreciável do operador.

1.4 Enquadramento e Objectivos Gerais do Trabalho

A técnica SIA pela sua arquitectura e modo de funcionamento poderá compatibilizar as vantagens inerentes ao acoplamento FIA/AAS e minorar as desvantagens anteriormente referidas. Os sistemas SIA inicialmente desenvolvidos e descritos na literatura, utilizando componentes comuns ao FIA, foram propostos principalmente para automatizar procedimentos analíticos com detecção por colorimetria e posteriormente com outras técnicas instrumentais. Contudo, até à data de início dos trabalhos que constam desta dissertação não existia nenhum estudo de avaliação das potencialidades de acoplamento da técnica SIA à AAS. Neste contexto, foi nosso objectivo desenvolver um conjunto de montagens baseadas na técnica de Análise por Injecção Sequencial para a Espectrofotometria de Absorção Atómica que viabilizassem o referido estudo. Assim, procurou-se avaliar os benefícios mútuos do acoplamento da técnica SIA à AAS na variante com atomização por chama (FAAS) e atomização electrotérmica em forno de grafite (ETAAS), com um particular interesse no alcance das vantagens que tinham sido apontadas à associação FIA/AAS, embora com maior robustez, simplicidade e economia de soluções.

Foi também objectivo a alcançar, o desenvolvimento de um conjunto de sistemas em que cada um permitisse a análise automática de diferentes parâmetros, com as metodologias mais diversas sem necessidade de reconfiguração física, e que constituísse alternativa atractiva relativamente aos sistemas FIA actualmente comercializados. Relativamente a este ponto procurou-se propor a automatização de procedimentos de análise simples de espécies catiónicas em amostras de origem alimentar que necessitam unicamente de diluição e adição

de agente supressor de interferências como etapas prévias de tratamento. Procurou-se igualmente a automatização de procedimentos analíticos de pré-concentração em fase sólida por quelatação ou troca iónica para amostras com reduzido conteúdo na espécie a determinar. O desenvolvimento de processos extractivos em linha que permitissem a especiação química foi também um dos objectivos a alcançar.

Em todos os casos procurou-se avaliar de forma sistemática quer as vantagens quer as limitações dos procedimentos desenvolvidos quanto à versatilidade, robustez e qualidade dos resultados obtidos.

Referências Bibliográficas

1 M. Valcárcel e M.D. Luque de Castro, Automatic Methods of Analysis, 1988, Elsevier, Amsterdam

2 L.T. Skeegs, *Amer. J. Clin. Pathol.*, **28**, 1957, 311

3 A. Rius, M.P. Callao e F.X. Rius, *Anal. Chim. Acta*, **316**, 1995, 27

4 J.K. Taylor, *Anal. Chem.*, **55**, 1983, 600A

5 W.J. Hurst, Automation in the Laboratory, 1995, VCH Publishers, Amesterdam

6 J. Ruzicka e E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, **78**, 1975, 145

7 J. Ruzicka e E.H. Hansen, Flow Injection Analysis, 2nd Edition, 1988, John Wiley & Sons, New York

8 M. Valcárcel e M.D. Luque de castro, Flow Injection Analysis. Principles and Applications, 1987, Ellis horwood, Chichester

9 B. Karlberg e G.W. Pacey, Flow Injection Analysis. A Practical Guide, 1989, Elsevier, Amsterdam

10 J. Ruzicka, *Anal. Chim. Acta*, **261**, 1992, 31

11 J. Ruzicka, *Analyst*, **119**, 1994, 1925

12 F. Lázaro, M.D. Luque de Castro e M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, **165**, 1984, 177

13 F. Lázaro, M.D. Luque de Castro e M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, **59**, 1987, 950

14 C. Pasquini e W.A. Oliveira, *Anal. Chem.*, **57**, 1985, 2575

15 E.A.G. Zagatto, H. Bergamin Fº, S.M.B. Brienza, M.A.Z. Arruda, A.R.A. Nogueira e J.L.F.C. Lima., *Anal. Chim. Acta*, **261**, 1992, 59

16 A.R.A. Nogueira, S.M.B. Brienza, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima e A.N. Araújo, *J. Agriculture and Food Chem.*, **44**, 1996, 165

17 A. Sanz-Medel, Flow Analysis Atomic Spectrometric Detection, 1997, Elsevier, Amsterdam

18 V. Kuban, *Anal. Chim. Acta*, **259**, 1992, 45

19 V. Kuban e F. Ingman, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **22**, 1991, 37

20 B.F. Reis, C.E.S. Miranda e N. Baccan, *Química Nova*, **19**, 1996, 623

21 V. Kuban, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **346**, 1993, 873

22 C. Rilley, L.H. Aslett, B.F. Rocks, R.A. Sherwood, J.D.M. Watson e J. Morgon, *Clin. Chem.*, **29**, 1983, 332

23 R.A. Sherwood, B.F. Rocks e C. Riley, *Analyst*, **110**, 1985, 493

24 D.P. Arnold, R.M. Peachey, J.D. Petty e D.R. Sweatman, *Anal. Chem.*, **61**, 1989, 2109

25 B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima e R.A.S. Lapa, *Anal. Chim. Acta*, **293**, 1994, 129

26 A.N. Araújo, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis e E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, **310**, 1995, 555

27 M.M. Silva, M.A.Z. Arruda, F.J. Krug, P.V. Oliveira, Z.F. Queiroz, M. Gallego e M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, **368**, 1998, 255

28 J. Ruzicka e G.D. Marshall, *Anal. Chim. Acta*, **237**, 1990, 329

29 J.A. García-Mesa, M.D. Luque de Castro e M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, **65**, 1993, 3540

30 J. Ruzicka e T. Gubelli, *Anal. Chem.*, **63**, 1991, 1680

31 M. Guzman e B.J. Compton, *Talanta*, **40**, 1993, 1943

32 J. Ruzicka, G.D. Marshall e G.D. Christian, *Anal. Chem.*, **62**, 1990, 1861

33 A. Ivaska e J. Ruzicka, *Analyst*, **118**, 1993, 885

34 I. Ruisánchez, A. Rius, M.S. Larrechi, M.P. Callao e F.X. Rius, *Chemom. Intell. Lab. System*, **24**, 1994, 55

35 E. Goméz, C. Tomás, A. Cladera, J.M. Estela e V. Cerdá, *Analyst*, **120**, 1995, 1181

36 A. Cladera, C. Tomás, E. Goméz, J.M. Estela e V. Cerdá, *Anal. Chim. Acta*, **302**, 1995, 297

37 S. Liu e P.K. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta*, **308**, 1995, 281

38 G.D. Marshall e J.F. Van Staden, *Process Control and Quality*, **3**, 1992, 251

39 M. Hedenfalk e B. Mattiasson, *Anal. Lett.*, **29**, 1996, 1109

40 T. Gubeli, G.D. Christian e J. Ruzicka, *Anal. Chem.*, **63**, 1991, 2407

41 J.F. Van Staden e R.E. Taljaard, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **357**, 1997, 577

42 A.N. Araújo, R.C.C. Costa, J.L.F.C. Lima e B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, **358**, 1998, 111

43 A. Baron, M. Guzman, J. Ruzicka e G.D. Christian, *Analyst*, **117**, 1992, 1839

44 F. Mas, A. Cladera, J.M. Estela e V. Cerdà, *Analyst*, **123**, 1997, 1541

45 X.Z. Liu, S.S. Liu, J.F. Wu e Z.L. Fang, *Anal. Chim. Acta*, **392**, 1999, 273

46 F. Sales, M.P. Callao e F.X. Rius, *Chemom. Intell. Lab. System*, **38**, 1997, 63

47 A. Rius, M.P. Callao e F.X. Rius, *Analyst*, **122**, 1997, 737

48 R. Schindler, M. Watkins, R. Vonach, B. Lendl, R. Kellner e R. Sara, *Anal. Chem.*, **70**, 1998, 226

49 R. Schindler e B. Lendl, *Anal. Chim. Acta*, **391**, 1999, 191

50 M.T. Oms, A. Cerdà e V. Cerdà, *Electroanalysis*, **8**, 1996, 387

51 M.T. Oms, A. Cerdá, A. Cladera, V. Cerdá e R. Forteza, *Anal. chim. Acta*, **318**, 1996, 251

52 I. Lukkari, J. Ruzicka e G.D. Christian, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **346**, 1993, 113

53 F.V. Silva, A.R.A. Nogueira, G.B. Souza e G.M. Cruz, *Anal. Sci.*, **16**, 2000, 361

54 J.F. Van Staden, H. du Plessis e R.E. Taljaard, *Anal. Chim. Acta*, **357**, 1997, 141

55 A.N. Araújo, J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva e E.A.G. Zagatto, *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**, 1997, 428

56 Y. Luo, R. Al-Othman, J. Ruzicka e G.D. Christian, *Analyst*, **121**, 1996, 601

57 S. Nakano, Y. Luo, D.A. Holman, J. Ruzicka e G.D. Christian, *J. Flow Injection Anal.*, **13**, 1996, 148

58 S. Nakano, Y. Luo, D. Holman, J. Ruzicka e G.D. Christian, *Microchem. J.*, **55**, 1997, 392

59 K.L. Peterson, B.K. Logan, G.D. Christian e J. Ruzicka, *Anal. Chim. Acta*, **337**, 1997, 99

60 A.N. Araújo, R.C.C. Costa e J.L.F.C. Lima, *Anal. Sci.*, **15**, 1999, 991

61 F. Rubí, R. Forteza e V. Cerdà, *Lab. Robot. Autom.*, **8**, 1996, 149

62 E. Rubí, M.S. Jiménez, F. Bauza de Mirabó, R. Forteza e V. Cerdà, *Talanta*, **14**, 1997, 553

63 I. Lukkari, K. Irgum, P. Lindgren e J. Lidén, *Process Control and Quality*, **7**, 1995, 185

64 P. Ek, S. Huldén e A. Ivaska, *J. Anal. At. Spectrom.*, **10**, 1995, 121

65 H.M. Al-Swaidan, *Talanta*, **43**, 1996, 1313

66 P.J. Baxter, J. Ruzicka, G.d. Christian e D.C. Olson, Talanta, 41, 1993, 347

67 J.L.P. Pavón, E.R. Gonzalo, G.D. Christian e J. Ruzicka, *Anal. Chem.*, **64**, 1992, 923

68 P.J. Baxter, G.D. Christian e J. Ruzicka, *Analyst*, **119**, 1994, 1807

69 K. Scudder, C.H. Pollema e J. Ruzicka, *Anal. Chem.*, **64**, 1992, 1992

70 P.J. Baxter, L. Hallgren, C.H. Pollema, M. Trnka e J. Ruzicka, *Anal. Chem.*, **67**, 1995, 1486

71 J. Ruzicka, C. Pollema e K.M. Scudder, *Anal. Chem.*, **65**, 1993, 3566

72 G.D. Christian, *Analyst*, **119**, 1994, 2309

73 D.J. Tucker, B. Toivola, C.H. Pollema, J. Ruzicka e G.D. Christian, *Analyst*, **119**, 1994, 975

74 S.M. Sultan e F.E.O. Suliman, *Analyst*, **121**, 1996, 617

75 S.M. Sultan e N.I. Desai, *Analyst*, **122**, 1997, 911

76 X.Z. Liu e Z.L. Fang, *Anal. Chim. Acta*, **358**, 1998, 103

77 M.J.C. Taylor, D.E. Barnes, G.D. Marshall, D.R. Groot e S.L.S. Williams, *Process Control and Quality*, **3**, 1992, 173

78 A.N. Araújo, J. Garcia, J.L.F.C. Lima, M. Poch e M.L.M.F.S. Saraiva, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **357**, 1997, 1153

79 G.C. Luca, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, M.C.B.S.M. Montenegro, A.N. Araújo e J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, **366**, 1998, 193

80 J.W. Grate, R. Strebin, J. Janata, O. Egorov e J. Ruzicka, *Anal. Chem.*, **68**, 1996, 333

81 J.W. Grate e O.B. Egorov, *Anal. Chem.*, **70**, 1998, 779A

82 O. Egorov, M.J. O'Hara, J. Ruzicka e J.W. Grate, *Anal. Chem.*, **70**, 1998, 977

83 S.C.Chung, G.D. Christian e J. Ruzicka, *Process Control and Quality*, **3**, 1992, 115

84 P.J. Baxter, G.D. Christian e J. Ruzicka, *Chem. Anal.*, **40**, 1995, 455

85 J.M. Estela, A. Cladera, A. Munoz e V. Cerdà, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **64**, 1996, 205

86 F.M. Torres, A. Munoz, J.M Estela e V. Cerdá, *Analyst*, **122**, 1997, 1033

87 J. Alpizar, A. Crespi, A. Cladera, R. Forteza e V. Cerdà, *Electroanalysis*, **8**, 1996, 1051

88 E.A.G. Zagatto, S. Vicente, C.C. Oliveira, R.P. Sartini e J.L.F.C. Lima, *J. Flow Injection Anal.*, **15**, 1998, 226

89 I. Ruisánchez, J. Lozano, M.S. Larrechi, F.X. Rius e J. Zupan, *Anal. Chim. Acta*, **348**, 1997, 113

90 W.E. Van der Linden, *Trends Anal. Chem.*, **6**, 1987, 37

91 H.L. Lancaster, I. Lukkari, G.D. Christian e J. Ruzicka, *J. Flow. Injection Anal.*, **9**, 1992, 20

92 D.R. Jonas, H.C. Tung e S.E. Manahan, *Anal. Chem.*, **48**, 1976, 7

93 B.D. Mindel e B. Karlberg, *Lab. Pract.*, **30**, 1981, 719

94 R.F. Browner e A.W. Boorn, *Anal. Chem.*, **56**, 1984, 786A

95 J.F. Tyson *Spectrochim. Acta Rev.*, **14**, 1991 169

96 M.J. Fishman e D.F. Erdmann, *Atom. Abs. Newslett.*, **9**, 1970, 88

97 E. Sebastian, K. Ohls e G. Riemer, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **264**, 1973, 105

98 E.A.G. Zagatto, F.J. Krug, H. Bergamin Fº, S.S. Jorgensen e B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, **104**, 1979, 279

99 W.W. Wolf e K.K. Stewart, *Anal. Chem.*, **51**, 1979, 1201

100 B.D. Mindel e B. Karlberg, *Lab. Pract.*, **30**, 1981, 719

101 Z. Fang, S. Xu e X. Wang, *Anal. Chim. Acta*, **179**, 1986, 325

102 Z. Fang, B. Welz e G. Schlemmer, *J. Anal. At. Spectrom.*, **4**, 1989, 91

103 J.F. Tyson, C.E. Adeeyinwo, J.M.H. Appleton, S.R. Bysouth, A.B. Idris e L.L. Sarkissian, *Analyst*, **110**, 1985, 487

104 M. de la Guardia e A. Salvador, *Analusis Magazine*, **19**, 1991, M52

105 I.L. Garcia, F.O. Sobejano e M.H. Cordoba, *Analyst*, **116**, 1991, 517

106 J.R. Dean, L. Ebdon, h.M. Crews e R.C. Massey, *J. Anal. At. Spectrom.*, **3**, 1988, 349

107 M.W. Brown e J. Ruzicka, *Analyst*, **109**, 1984, 1091

108 S. Olsen, L.C.R. Pessenda, J. Ruzicka e E.H. Hansen, *Analyst*, **108**, 1983, 905

109 B.F. Rocks, R.A. Sherwood e C. Riley, *Clin. Chem.*, **29**, 1983, 568

110 J.F.Tyson, *Analyst*, **110**, 1985,419

111 O.F. Kamson e A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, **155**, 1983, 252

112 J.L.F.C. Lima e A.O.S.S. Rangel, *Food Chem.*, **7**, 1991, 146

113 J.F. Tyson, C.E. Adeeyinwo e S.R. Bysouth, *J. Anal. At. Spectrom.*, **4**, 1989, 191

114 J. Stapar e J.B. Dawson, *Appl. Opt.*, **7**, 1968, 1351

115 R.F. Browner e A.W. Borrn, *Anal. Chem.*, **56**, 1984, 780

116 N. Yoza, Y. Aoyogi, S. Ohashi e T. Tateda, *Anal. Chim. Acta*, **111**, 1979, 163

117 Z.Fang e B. Welz, *J. Anal. At. Spectrom.*, **4**, 1989, 83

118 J.F. Tyson, J.R. Mariara e J.M.H. Appleton, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1**, 1986, 273

119 R.A. Sherwood, B.F. Rocks e C. Riley, *Analyst*, **110**, 1985, 493

120 M.F. Giné, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, F.J. Krug e A.O. Jacintho, *Anal. Chim. Acta*, **155**, 1983, 131

121 E.A.G. Zagatto, M.F. Giné, E.A.N. Fernandez, B.F. Reis e F.J. Krug, *Anal. Chim. Acta*, **173**, 1985, 289

122 J.F. Tyson, *Anal. Proc.*, **18**, 1981, 542

123 J.F. Tyson, *Trends Anal. Chem.*, **4**, 1985, 124

124 J. Ruzicka, *Anal. Chem.*, **55**, 1983, 1040A

125 J.F. Tyson, J.M.H. Appleton e A.B. Idris, *Anal. Chim. Acta*, **145**, 1983, 159

126 J.F. Tyson e A.B. Idris, *Analyst*, **109**, 1984, 23

127 Z. Fang, J.M. Harris, J. Ruzicka e E.H. Hansen, *Anal. Chem.*, **57**, 1985, 1457

128 B.E.H. Saxberg e B.R. Kowalski, *Anal. Chem.*, **51**, 1979, 1031

129 M.C.V. Araújo, C. Pasquini, R.E. Bruns e E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, **171**, 1985, 337

130 J.F. Tyson, J.M.H. Appleton e A.B. Idris, *Analyst*, **108**, 1983, 153

131 J.F. Tyson, J.R. Mariana e J.M.H. Appleton, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1**, 1986, 273

132 J.F. Tyson e S.R. Bysouth, *J. Anal. At. Spectrom.*, **3**,1988, 211

133 J.L.F.C. Lima, C.D. Matos e M.C.V.F. Vaz, *At. Spectrosc.*, **17**, 1996, 196

134 G.D. Clark, J. Ruzicka e G.d. Christian, *Anal. Chem.*, **61**, 1989, 1773

135 V. Carbonell, A.Sanz, A. Salvador e M. de la Guardia, *J. Anal. At. Spectrom.*, **6**, 1991, 233

136 D.A. Whitman e G.D. Christian, *Talanta*, **36**, 1989, 205

137 I.L. Garcia, P. Vinas e M.H. Córdoba, *J. Anal. At. Spectrom.*, **9**, 1994, 1167

138 I.L. Garcia, P. Vinas, N. Campillo e M.H. Córdoba, *Anal. Chim. Acta*, **308**, 1995, 85

139 Z. Fang, B. Welz e M. Sperling, *Anal. Chem.*, **65**, 1993, 1682

140 B.F. Reis, A.O. Jacintho, J. Mortatti, F.J. Krug, E.A.G. Zagatrto, H. Bergamin Fº e L.C.R. Pessenda, *Anal. Chim. Acta*, **123**, 1981, 221

141 R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima e J.L.M. Santos, *Food Chem.*, **55**, 1996, 397

142 J.F. Tyson, *Analyst*, **109**, 1984, 319

143 M. Sperling, Z. Fang e B. Welz, *Anal. Chem.*, **63**, 1991, 151

144 H. Bergamin Fº, E.A.G. Zagatto, F. Krug e B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, **101**, 1978, 17

145 S.J. Haswell e D. Barclay, *Analyst*, **117**, 1992, 117

146 J.L. Burguera, M. Burguera e M.R. Brunetto, *At. Spectrosc.*, **14**, 1993, 90

147 B. Welz, Y. He e M. Sperling, *Talanta*, **40**, 1993, 1917

148 C.P. Hanna e S.A. MsInosh, *At. Spectrosc.*, **16**, 1995, 106

149 C.P. Hanna e J.F. Tyson, *Anal. Chem.*, **65**, 1993, 653

150 M.H.I. Comber, G.J. Eales e P.J.D. Nicholson, *J. Aut. Chem.*, **14**, 1992, 5

151 C.C. Oliveira, E.A.G. Zagatto, A.N. Araújo e J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, **371**, 1998, 57

152 F.M.B. Mirabó, A.C. Thomas, E. Rubi, R. Forteza e V. Cerdá, *Anal. Chim. Acta*, **355**, 1997, 203

153 H.B. Ma e Z.L. Fang, *Talanta*, **49**, 1999, 125

154 K. Pyrzynska, *Talanta*, **3**, 1994, 381

155 L.G. Galante e G.M. Hieftje, *Anal. Chem.*, **59**, 1987, 2293

156 J.A. Sweileh e F.F. Cantwell, *Anal. Chem.*, **57**, 1985, 420

157 L. Nord e B. Karlberg, *Anal. Chim. Acta*, **145**, 1983, 151

158 P.M. Jiménez, M. Gallego e M. Valcárcel, *Analyst*, **112**, 1987, 1233

159 P.M. Jiménez, m. Gallego e M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, **193**, 1987, 127

160 R. Monter, M. Gallego e M. Valcárcel, *J. Anal. At. Spectrom.*, **3**, 1988, 725

161 Z. Fang, Flow injection Atomic Absorption Spectrometry, 1995, John Wiley & Sons, New York

162 Z. Fang, S. Xu e S. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, **200**, 1987, 35

163 Z. Fang, S. Xu e S. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, **164**, 1984, 41

164 S. Devi, K.A.J. Habib e A. Townshend, *Química Analítica*, **8**, 1989, 159

165 M. Gallego, Y.P. Peña e M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, **66**, 1994, 4047

166 S. Tesfalidet e K. Irgum, *Anal. Chem.*, **61**, 1989, 2079

167 P.E. Carrero e J.F. Tyson, *Analyst*, **122**, 1997, 915

168 K. Backstrom e L. Danielsson, *Anal. Chem.*, **60**, 1988, 1354

169 E. Beinrohr, M. Cakrt, M. Rapta e P. Tarapci, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **335**, 1989, 1005

170 Z. Fang, M. Sperling e B. Welz, *J. Anal. At. Spectrom.*, **5**, 1990, 639

171 Z. Liu e S. Huang, *Anal. Chim. Acta*, **281**, 1993, 185

172 E. Dietmar e K. Cammann, *Analyst*, **120**, 1989, 543

173 S. Sella, R.E. Sturgeon, S.N. Willie e R.C. Campos, *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**, 1997, 1281

174 J.L. Burguera, Flow Injection Atomic Spectroscopy, 1989, Marcel Dekker, New York

175 FIAS-200 Data Sheet, Bodenseewerk Perkin Elmer & Co., Gmbh, 1989, Uberlingen

CAPÍTULO II

ACOPLAMENTO DA TÉCNICA SIA À AAS

"A natureza inventou o orgulho para evitarmos
a dor de reconhecer as nossas imperfeições."
La Rochefoucauld

2.1 Introdução

O presente capítulo serve fundamentalmente para descrever com detalhe a montagem SIA que serviu de base a todas as outras que constam desta dissertação, bem como o método de optimização seguido e os processos de avaliação da qualidade dos resultados obtidos com as diversas montagens.

2.2 Componentes do sistema

Os sistemas SIA apresentados ao longo desta dissertação foram desenvolvidos a partir da montagem base que se esquematiza na Figura 2.1. Esta montagem era constituída por:

- uma bomba peristáltica de quatro canais (P_1), da marca Gilson, modelo *Minipuls 3*, equipada com um tubo flexível de poli(cloreto de vinilo) (PVC) também da marca *Gilson*. Este tubo apresentava um diâmetro interno aproximado de 1,65 mm e foi lubrificado externamente com óleo de silicone para reduzir o desgaste[1]. No caso concreto do trabalho descrito no Capítulo V, este tubo foi substituído por um com 1,14 mm de diâmetro interno aproximadamente, de modo a possibilitar a utilização de caudais da ordem de 0,2 ml/min;
- uma válvula solenóide de três vias (S_1), da marca *NResearch®*, modelo *161 T031*;

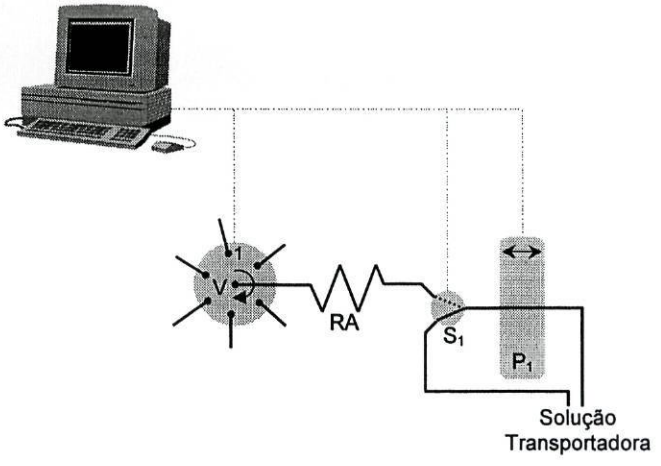


Figura 2.1 Representação esquemática da configuração básica dos sistemas SIA apresentados ao longo desta dissertação. P_1 – bomba peristáltica; S_1 – válvula solenóide de três vias; RA – reactor de armazenamento; V – válvula multiposição selectora de fluidos.

- uma válvula multiposição selectora de fluidos com seis portas e rotação unidireccional (V), da marca *Valco Instruments*, modelo *Cheminert™ C25-3186E*, cujo rotor é representado de forma esquemática na Figura 2.2. Esta válvula foi utilizada apenas no primeiro trabalho descrito no Capítulo III, tendo sido substituída nos restantes trabalhos experimentais por uma de oito portas, da mesma marca, modelo *Cheminert™ C15-3118E*, cujo rotor é igualmente representado esquematicamente na Figura 2.2. As portas de acesso à válvula selectora de fluídos foram munidas de tubo de poli(tetrafluoretileno) (PTFE), da marca *Omnifit*, com 0,8 mm de diâmetro interno e 12 cm de comprimento aproximadamente;

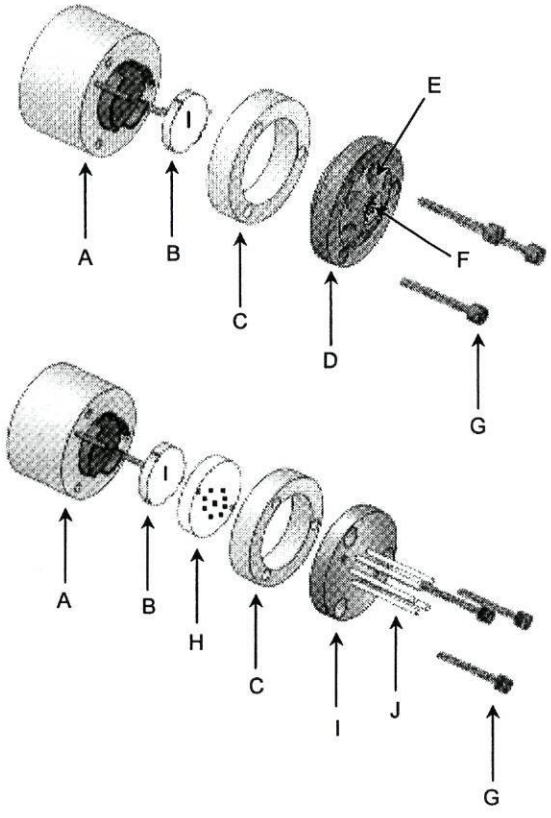


Figura 2.2 Representação esquemática da cabeça de duas válvulas multiposição selectoras de fluidos respectivamente com seis e oito portas. A – anel exterior; B – rotor com um canal talhado na sua superfície e que permite por rotação unidireccional estabelecer sequencialmente a ligação entre a porta central e as periféricas; C – aro de plástico inerte; D – placa de fixação

dos tubos de acesso às portas periféricas e central; E – orifício com rosca maquinada onde se adaptam os tubos de acesso às portas periféricas por intermédio de terminais também roscados; F – orifício onde se adapta o reactor de armazenamento; G – parafusos de fixação; H – disco intermédio de plástico; I – placa metálica de fixação dos tubos de acesso a cada uma das portas periféricas e central; J – tubos de acesso às portas periféricas e central.

- um reactor de armazenamento (RA) construído igualmente a partir de tubo de PTFE, da marca *Omnifit*, com 0,8 mm de diâmetro interno e comprimento que oscilou, conforme os trabalhos, entre 200 e 600 cm, e que estabelecia a ligação entre a válvula solenóide de três vias (S_1) e a válvula selectora (V), por intermédio de terminais e ligadores da marca *Gilson*;

Os diferentes componentes eléctricos do sistema SIA estavam ligados a um micro-computador *IBM* compatível *286*, por uma interface electrónica do tipo *PC-LabCard* (*Advantech®* PCL 711S), cujas características se indicam na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 Características da interface electrónica.

8 entradas analógicas
1 saída analógica
16 entradas digitais
16 saídas digitais
Resolução de 12-bit na conversão analógica/digital e digital/analógica
Intervalo de entrada analógico/digital programável

Para o controlo da válvula selectora de fluidos utilizaram-se cinco saídas digitais a uma tensão de aproximadamente 5 V (sinais TTL). Por desactivação das quatro primeiras segundo o esquema da Tabela 2.2 permitia-se a identificação da porta pretendida da válvula selectora, enquanto a desactivação da quinta saída digital possibilitava a rotação da válvula selectora de fluidos para a porta seleccionada.

Tabela 2.2 Sequência de desactivação das saídas digitais da interface electrónica para identificação das portas de acesso à válvula multiposição selectora de fluidos e rotação da cabeça da válvula para cada uma dessas portas.

Porta	Saída digital desactivada	Rotação da válvula
1	1	1 + 5
2	2	2 + 5
3	1 + 2	1 + 2 + 5
4	3	3 + 5
5	1 + 3	1 + 3 + 5
6	2 + 3	2 + 3 + 5
7	1 + 2 + 3	1 + 2 + 3 + 5
8	4	4 + 5

Para a activação e controlo do sentido de rotação da bomba peristáltica utilizaram-se igualmente duas saídas digitais, em que cada uma quando activada permitia a circulação de corrente eléctrica entre o emissor e o colector de um transístor, no circuito de interface esquematizado na Figura 2.3. Estabelecia-se então o contacto eléctrico entre os dois terminais

que a bomba possui respectivamente para a activação e sentido de rotação, um deles a uma tensão de cerca de 5 V e o outro a 0 V. Em relação ao controlo da velocidade de rotação da bomba peristáltica utilizou-se uma saída analógica da interface electrónica, sendo a correspondência entre o sinal digital e o analógico assegurada através da equação:

$$\text{Tensão} = \text{INT}\left(\frac{\text{Vel} * 4095}{48}\right) \qquad (2.1)$$

onde Tensão, INT e Vel representam respectivamente a tensão aplicada à bomba peristáltica, o operador matemático de número inteiro e a velocidade de rotação da bomba peristáltica previamente definida; 4095 relaciona-se com a resolução da interface de controlo e 48 é a velocidade de rotação máxima que a bomba peristáltica pode assumir.

Para cada uma das válvulas solenóides de três vias utilizadas, dado que o seu funcionamento requer uma tensão de 12 V, utilizou-se um circuito idêntico ao representado na Figura 2.3[2], o qual era accionado por intermédio da activação de uma saída digital da interface electrónica.

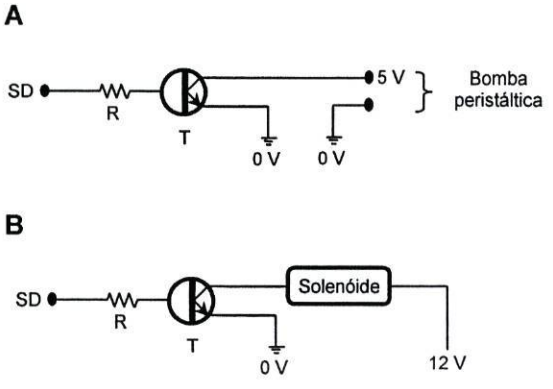


Figura 2.3 Representação esquemática dos circuitos utilizados no controlo da activação e sentido de rotação da bomba peristáltica (A), e de cada uma das válvulas solenóides (B). SD – saída digital (5 V) da interface electrónica; R – resistência (1 kΩ); T – transístor (BC548).

Como dispositivo de detecção, não indicado na Figura 2.1, utilizou-se no caso dos trabalhos descritos nos Capítulos III e IV um espectrofotómetro de absorção atómica com atomização por chama (FAAS), da marca *Pye Unicam*, modelo *SP9*, enquanto o sistema proposto no Capítulo V apresentava como instrumento de detecção, igualmente um espectrofotómetro de absorção atómica, mas com atomização eletrotérmica (ETAAS) em forno de grafite com aquecimento transversal (*THGA – transverse heated grafite atomizer*) e correcção de fundo (*Background*) por efeito de *Zeeman* longitudinal, da marca *Perkin Elmer*, modelo *4100 ZL*, equipado com um dispositivo de amostragem com a referência *AS-70*.

Na detecção por ETAAS, utilizaram-se tubos de grafite revestidos com grafite pirolítica e plataforma de *L'vov* integrada, e extremidades parcialmente obstruídas por aros de grafite (extremidades tipo *end-capped*) (Figura 2.4).

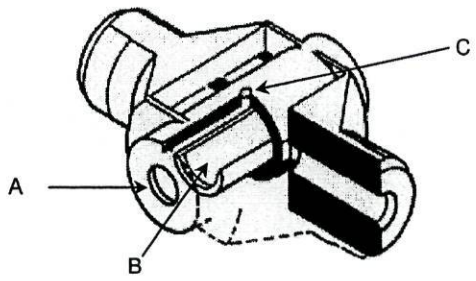


Figura 2.4 Representação esquemática de um tubo de grafite com extremidades do tipo "end-capped" utilizado para efectuar as determinações por ETAAS. A – aro de grafite (extremidade do tipo *end-capped*); B – plataforma de *L'vov*; C – orifício de deposição da amostra.

Como fontes de radiação utilizaram-se em todos os trabalhos lâmpadas de cátodo oco: da marca *Varian* no caso das determinações de Zn, Mn e Fe, *Instrumentation Laboratory* nas de Mg e Cu, *S & J Juniper* na de Ca, *Photron* na de Pb e *Perkin Elmer* na determinação de Pd.

Os instrumentos foram operados, salvo indicação em contrário, ao comprimento de onda de máxima sensibilidade e ruído mínimo.

Embora a interface utilizada permitisse a aquisição e processamento do sinal analítico, optou-se, dado tratarem-se de propostas de novos módulos analíticos, pelo registo dos sinais analíticos uma vez que possibilitavam uma visão mais simples do conjunto daqueles à saída do detector e dos efeitos das alterações das condições de funcionamento das montagens. Assim, utilizou-se em todos os trabalhos um registador da marca *Kipp & Zonen*, modelo *BD 11*, excepto no trabalho descrito no Capítulo V, no qual a aquisição dos sinais foi assegurada pelo programa de controlo do próprio espectrofotómetro.

Na Figura 2.5 representam-se os cinco módulos desenvolvidos para acoplar ao sistema base que se esquematiza na Figura 2.1. A tubagem utilizada na construção destes módulos era em PTFE. As bombas peristálticas que compunham os módulos 2, 3 e 4 eram da marca *Ismatec*, modelo *SA Mini-S 840* (P_2), enquanto no módulo 5 se recorreu a uma *Gilson Minipuls 3* (P_2). Os tubos de impulsão eram em PVC da marca *Gilson* e apresentavam um diâmetro interno variável consoante o procedimento analítico. As confluências eram em acrílico, salvo as posicionadas antes do dispositivo de extracção nos módulos 2, 4 e 5 que eram em PTFE. As colunas utilizadas para acondicionar as fases sólidas eram, de acordo com o procedimento analítico, em acrílico ou PTFE (C). As válvulas solenóides de três vias utilizadas eram da marca *NResearch*, modelo *161 T031* (S_2, S_3). A válvula de seis portas (Vr) utilizada na construção do módulo 3 era da marca *Reodyne,* modelo *5020*. A ampola de extracção (A) do módulo 4 era em vidro, dividida por uma placa de cerâmica porosa e apresentava uma capacidade de cerca de 750 µl. Na construção do módulo 5 empregou-se um amostrador automático da marca *Gilson*, modelo *221* (AS). Remete-se a descrição detalhada do modo de funcionamento de cada um dos módulos para o respectivo capítulo.

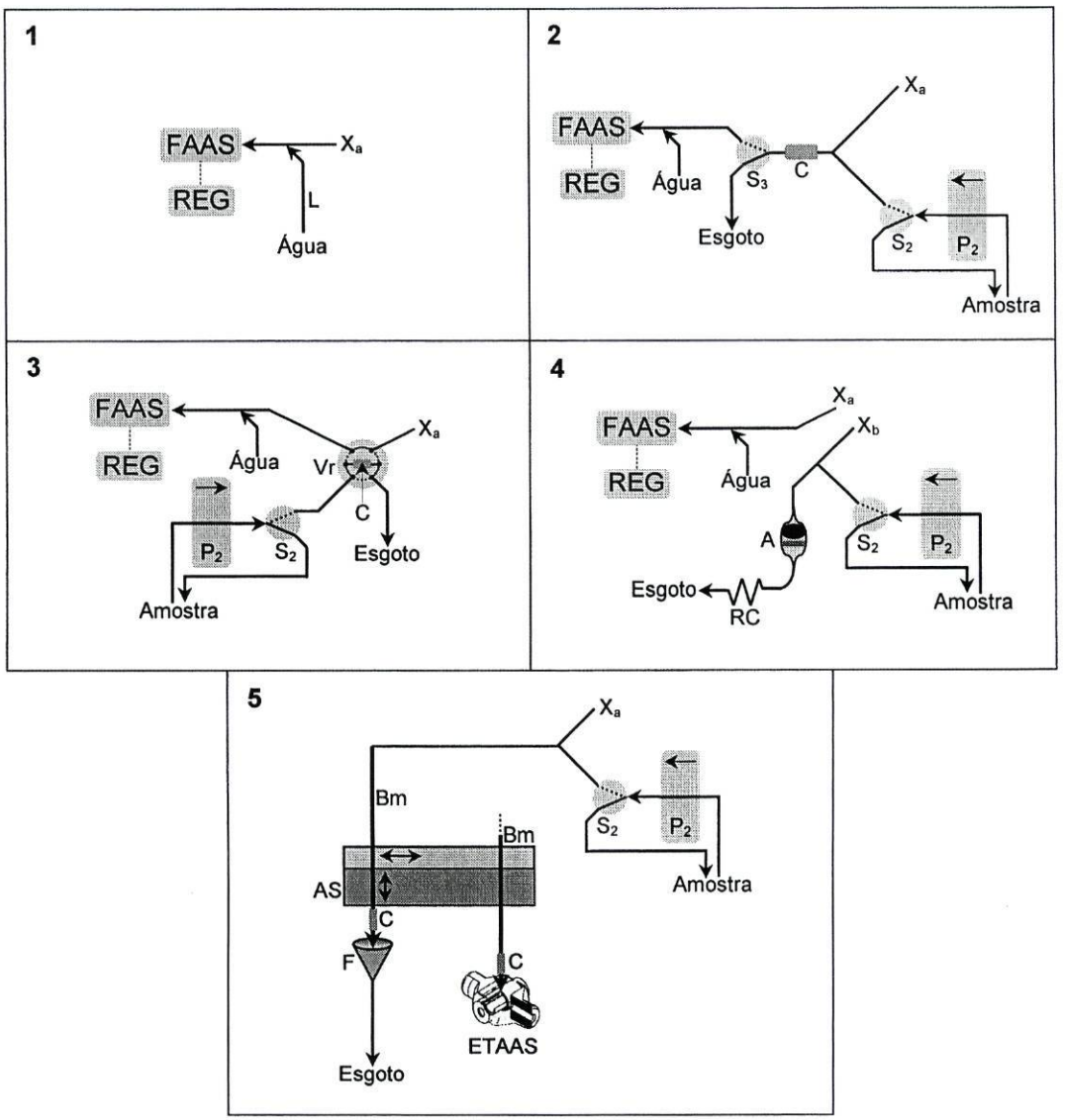


Figura 2.5 Representação esquemática dos módulos desenvolvidos para acoplar ao sistema SIA base. 1 – acoplamento da FAAS; 2 – módulo para pré-concentração em fase sólida e detecção por FAAS; 3 – módulo idêntico ao anterior, mas com possibilidade de inversão da posição da coluna com a fase sólida; 4 – módulo de extracção líquido-líquido e detecção por FAAS; 5 – módulo de pré-concentração em fase sólida e detecção por ETAAS. X_a, X_b – pontos de ligação a uma ou mais portas da válvula multiposição selectora de fluidos da configuração base; P_2 – bomba peristáltica; S_2, S_3 – válvulas solenóides de três vias; C – coluna de extracção por fase sólida; A – ampola de extracção líquido-líquido; RC – reactor; Vr – válvula rotativa de baixa pressão com seis portas; FAAS – espectrofotómetro de absorção

atómica com atomização por chama; REG – registador; AS – amostrador; BM – capilar metálico móvel; F – funil (dreno); ETAAS – espectrofotómetro de absorção atómica com atomização electrotérmica.

2.3 Acoplamento à FAAS

O sistema de detecção foi acoplado a uma das portas da válvula multiposição selectora de fluidos por intermédio de uma confluência em acrílico de construção do próprio laboratório (Figura 2.5, módulo 1). Escolheu-se o menor comprimento da tubagem que permitia estabelecer a ligação entre a válvula multiposição e o detector. A opção por esta configuração possibilitava a alimentação contínua do espectrofotómetro com água bidesionizada, através do canal lateral (L) que dá acesso à confluência, na ausência de escoamento a partir da válvula multiposição em direcção ao detector. O canal de compensação L foi construído com tubo de PTFE com 100 cm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro interno.

Com a configuração seleccionada tornou-se necessário avaliar o caudal de propulsão das soluções para o detector que proporcionava máxima sensibilidade e mínima contaminação do canal de compensação L. Assim, utilizando as condições instrumentais indicadas na Tabela 2.3, procedeu-se à aspiração de 180 μl de uma solução com 2,00 mg/l em Ca preparada em solução de La a 10 mmol/l e utilizando uma solução de La na mesma concentração como fluido transportador. Pode-se observar, conforme mostra a Figura 2.6, que para caudais inferiores a 4,4 ml/min se obtinha uma diminuição progressiva da intensidade do sinal analítico. Nesta situação, o caudal de aspiração do espectrofotómetro era superior ao de propulsão da solução padrão. A diferença de caudais era compensada pela entrada de água através do canal lateral da confluência (canal de compensação L) o que determinava a diluição do troço de solução padrão à entrada do nebulizador, efeito mais evidente quando se reduziu o comprimento do tubo L ou se aumentou o seu diâmetro interno de 0,5 para 0,8 mm. Para caudais de propulsão

da solução padrão superiores a 6 ml/min ocorria uma diminuição gradual da intensidade do sinal analítico e o aparecimento de um segundo sinal de menor intensidade quando cessava o fluxo de amostra em direcção ao detector. Concluiu-se que esta redução da intensidade do sinal analítico decorria do efeito combinado da diminuição do rendimento de nebulização e da divisão do fluxo entre o detector e o canal de compensação. A utilização de um canal de compensação com 0,5 mm de diâmetro interno e 100 cm de comprimento possibilitava a obtenção de um intervalo entre 4,4 e 6 ml/min em que a intensidade do sinal era máxima e a contaminação do canal de compensação mínima.

Tabela 2.3 Condições instrumentais empregues no estudo do acoplamento da técnica SIA à FAAS.

Elemento	Ca
λ	422,7 nm
Largura de fenda	0,5 nm
Intensidade da lâmpada	7 mA
Correcção de fundo	---
Tipo de chama	Ar/acetileno (Oxidante)
Medida de sinal	Altura de pico
Caudal de aspiração[1]	5,7 ml/min
Alinhamento do queimador[2]	Total

[1] Caudal de máxima sensibilidade determinado mergulhando em água o tubo que estabelece a ligação entre o FAAS e a válvula multiposição selectora de fluidos do sistema SIA.

[2] Queimador totalmente alinhado segundo o eixo do feixe de radiação incidente.

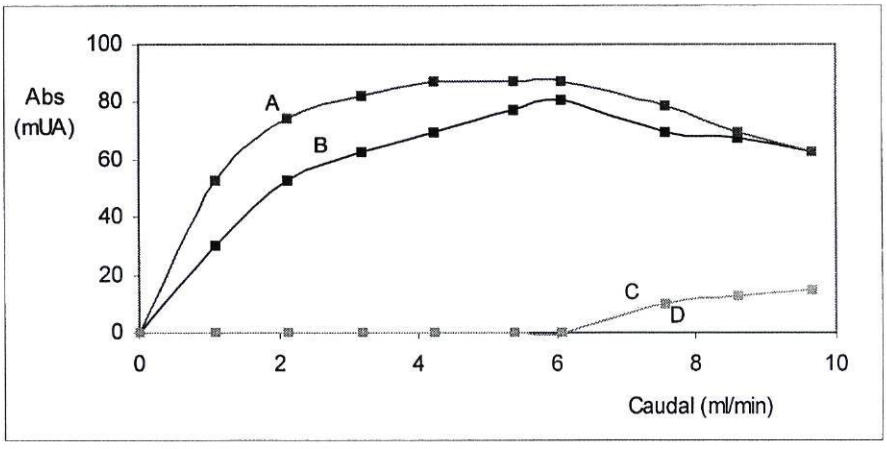


Figura 2.6 Influência do caudal de propulsão para o detector de uma solução com 2,00 mg/l em Ca sobre a amplitude do sinal analítico. A, B – sinais analíticos obtidos com um canal de compensação com 100 cm de comprimento e diâmetro interno de 0,5 e 0,8 mm respectivamente; C, D – sinal de contaminação do canal de compensação com 100 cm de comprimento e 0,5 e 0,8 mm de diâmetro interno respectivamente.

2.4 Acoplamento à ETAAS

Para acoplar a ETAAS ao sistema SIA base recorreu-se a um amostrador (AS) da marca *Gilson* que era controlado por uma unidade externa utilizando para o efeito quatro saídas digitais da interface electrónica. Na unidade externa do amostrador construiu-se um pequeno programa de controlo (Tabela 2.4), cuja execução era accionado por intermédio do programa principal.

O amostrador possuía um braço móvel (BM) o qual permitia, segundo o procedimento em desenvolvimento (Tabela 2.4), posicionar o capilar metálico a ele fixo sobre um funil servindo como esgoto (Tube 1/6), descer o capilar parcialmente (Height), subir o capilar (Wait /5/1), enviá-lo para uma posição sobre o forno de grafite (Tube 8/4), descer o capilar totalmente

(Height 1) depositando uma pequena alíquota de solução na câmara de grafite e retorno à posição de partida (Home).

Tabela 2.4 Programa desenvolvido para o controlo do amostrador através da unidade externa.

Instrução	Comentário
1 Rack code 20	Início do programa de controlo
2 Tube 1/6	Envio do capilar para a posição de esgoto
3 Height	Baixar o capilar parcialmente
4 Wait /5/1	Subir o capilar
5 Tube 8/4	Envio do capilar para a posição sobre o forno de grafite
6 Height 1	Baixar o capilar totalmente
7 Home	Retorno para a posição de partida

2.5 Influência da inércia e da pulsação do escoamento

A bomba peristáltica representa um dos dispositivos mais utilizados para promover a impulsão das soluções em sistemas SIA. O fluxo que se obtêm com este género de dispositivos resulta de um conjunto de rolos dispostos sobre uma cabeça rotativa que, por rotação desta comprime contra uma superfície rígida um tubo flexível no interior do qual se encontra um fluido[3]. Dos ciclos de compressão/descompressão resulta o deslocamento pulsado do fluido através do sistema com um caudal que é determinado pelo grau de aperto do tubo de impulsão e calibre deste último, e ainda da velocidade de rotação da bomba. Trata-se de um escoamento em que o caudal instantâneo é função do tempo e da posição inicial da

cabeça da bomba e para o qual se pode estabelecer um período[4]. Como em SIA o volume é definido a partir do binómio tempo/caudal, quando o tempo de amostragem é reduzido, o volume que é movimentado no sistema torna-se dependente da posição dos rolos da bomba em cada etapa definida previamente pelo operador, à semelhança do que já foi documentado para os sistemas FIA e de Multicomutação que preconizam a utilização de volumes reduzidos de amostra[1,4,5,6,7].

Para minimizar este inconveniente, dotou-se o sistema SIA base em estudo, de um mecanismo constituído por um dispositivo de controlo da posição de partida da bomba peristáltica e uma válvula solenóide três vias (S_1) instalada entre o tubo de impulsão da bomba peristáltica (P_1) e o reactor de armazenamento (RA) (Figura 2.7). O dispositivo de controlo da posição de partida da bomba peristáltica consistia numa barra de cobre rígida com 10 cm de comprimento e 2 mm de diâmetro, fixa por intermédio de uma goma sobre o eixo de rotação da cabeça da bomba peristáltica e dois terminais eléctricos dispostos em posição fixa e diametralmente oposta, um deles a uma tensão de 0 V e outro ligado a uma entrada digital da interface electrónica a qual estava a uma tensão de cerca de 5 V.

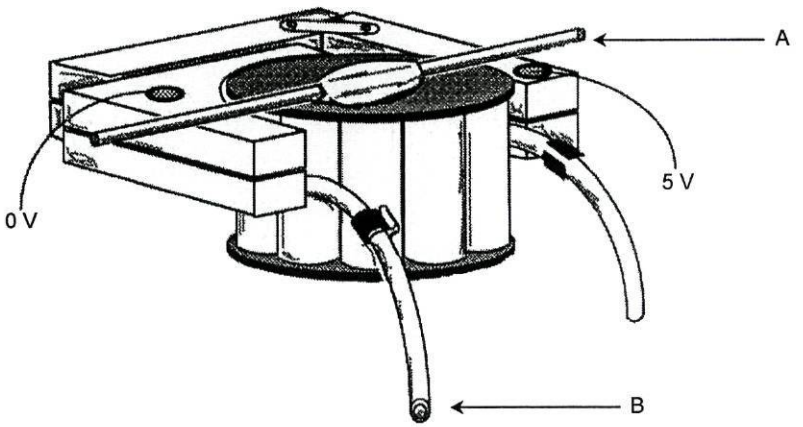


Figura 2.7 Dispositivo eléctrico de controlo da posição de partida dos rolos da cabeça da bomba peristáltica em cada etapa do ciclo analítico. A – barra de cobre; B – tubo de impulsão da solução transportadora.

A porta comum da válvula solenóide (S_1) estava ligada ao tubo de impulsão enquanto as outras duas portas estavam ligadas respectivamente ao reactor de armazenamento e a um canal secundário mergulhado no recipiente contendo o fluído transportador. Em situação de repouso, a porta comum da válvula solenóide comunicava com o canal secundário.

Quando se iniciava um ensaio constituído por várias etapas previamente definidas pelo operador, a válvula multiposição começava por assumir a posição correspondente à primeira etapa e a bomba peristáltica era colocada em movimento com a válvula solenóide na posição que comunica com o canal secundário. Durante este período o fluido transportador no interior do tubo de impulsão era colocado em movimento cíclico provindo do recipiente onde estava armazenado e retornando a este através da válvula solenóide, ou vice versa, conforme estava a ser propulsionado ou aspirado. Quando a barra de metal fixa à cabeça da bomba estabelecia o contacto entre os dois terminais eléctricos fixos, meia revolução após o inicio do movimento, a válvula solenóide comutava para a posição que comunicava com o reactor de armazenamento permitindo a execução da primeira etapa. Após a realização desta etapa, antes da válvula multiposição assumir a posição seguinte e a bomba parar, a válvula solenóide comutava para a posição inicial interrompendo o fluxo através do reactor de armazenamento. Nesta altura a bomba peristáltica parava e a válvula multiposição assumia a posição correspondente à etapa seguinte. No fim do ciclo analítico, após a válvula solenóide ter comutado para a posição original, a bomba peristáltica abrandava acabando por parar quando a barra metálica estabelecia novamente contacto com os terminais eléctricos fixos. Nesse momento, a válvula multiposição retornava à posição de partida, a posição Nº1. Nas condições atrás referidas, dado que cada etapa apenas é executada quando a barra metálica estabelecia contacto eléctrico com os dois terminais em posição fixa, a aspiração ou propulsão das soluções era sempre realizada com a bomba peristáltica na mesma posição.

Para avaliar a eficiência deste dispositivo procedeu-se à determinação do desvio padrão relativo (RSD) segundo a equação 2.2, dos volumes movimentados com e sem dispositivo, a partir da intensidade dos sinais analíticos obtidos com uma solução padrão de Mg com 0,50 mg/l preparada em solução de La a 10 mmol/l e propulsionada a um caudal idêntico

ao caudal de aspiração do FAAS operado em condições convencionais e utilizando a solução de La a 10 mmol/l como solução transportadora.

$$RSD = \frac{s}{x} * 100 \qquad (2.2)$$

Os parâmetros x e s representam respectivamente a média e o desvio padrão da intensidade de dez sinais analíticos obtidos com e sem controlador de posição da cabeça da bomba peristáltica. Observou-se que na ausência do dispositivo apenas era possível utilizar reprodutivelmente volumes superiores a 25 μl, enquanto que com o dispositivo esse valor passou para 8 μl (Figura 2.8). Para volumes inferiores a 8 μl, verificou-se que a reprodutibilidade era limitada pela velocidade do microprocessador que controlava o sistema, pela flexibilidade e calibre do tubo de impulsão e pela resistência inicial ao fluxo dos líquidos contidos no reactor de armazenamento.

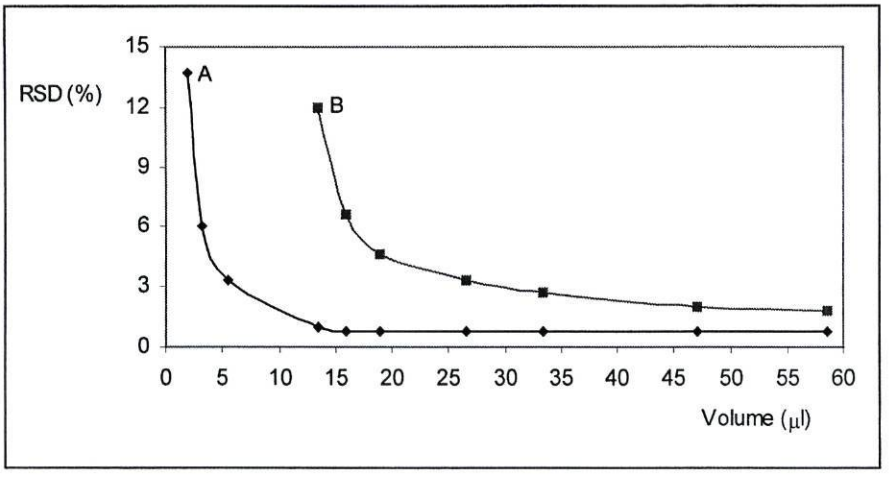


Figura 2.8 Reprodutibilidade dos volumes aspirados com (A) e sem (B) dispositivo de controlo de posição de partida dos rolos da cabeça da bomba peristáltica.

Ao permitir colocar previamente em movimento a bomba peristáltica e por conseguinte também a coluna de líquido contida no tubo de impulsão da bomba, bem como interrompendo de imediato o fluxo através do reactor de armazenamento após a execução de cada etapa, o mecanismo proposto minimiza a inércia que decorre da natureza bidireccional do fluxo em sistemas SIA. Contudo, de modo a garantir a reprodutibilidade dos caudais, os tubos de impulsão eram substituídos sempre que denotavam desgaste excessivo visível através quer da perda de elasticidade quer pela redução considerável dos caudais, verificada no início de cada dia de trabalho mediante a colocação da bomba em modo de propulsão durante 60 s e verificando a massa de líquido colhida num goblé disposto numa das portas da válvula destinada a esgoto.

2.6 Programa de controlo do sistema SIA

Para controlo do sistema SIA desenvolveu-se um programa, escrito em linguagem *Microsoft QBasic® 4.5*, cujo organigrama é indicado na Figura 2.9. Quanto à apresentação no écran, o programa disponibilizava uma matriz de cinco colunas dispostas da esquerda para a direita, com a seguinte identificação: Porta (P), Solenóide (Sol), Tempo (T), Velocidade de rotação (V) e Sentido (S). Os dados introduzidos em cada linha correspondiam a uma etapa. A primeira coluna servia para introduzir o número da porta que a válvula multiposição deveria assumir; a segunda coluna era utilizada para promover a activação de válvulas solenóides ou do amostrador dos módulos extractivos acoplados ao sistema SIA base; na terceira coluna era introduzido o tempo necessário à execução da respectiva etapa; na coluna seguinte era introduzida a velocidade de rotação da bomba peristáltica (0 - 48 rpm); na última coluna era inserido o sentido de rotação da bomba peristáltica. Por fim introduzia-se o número de vezes que a sequência previamente definida era executada.

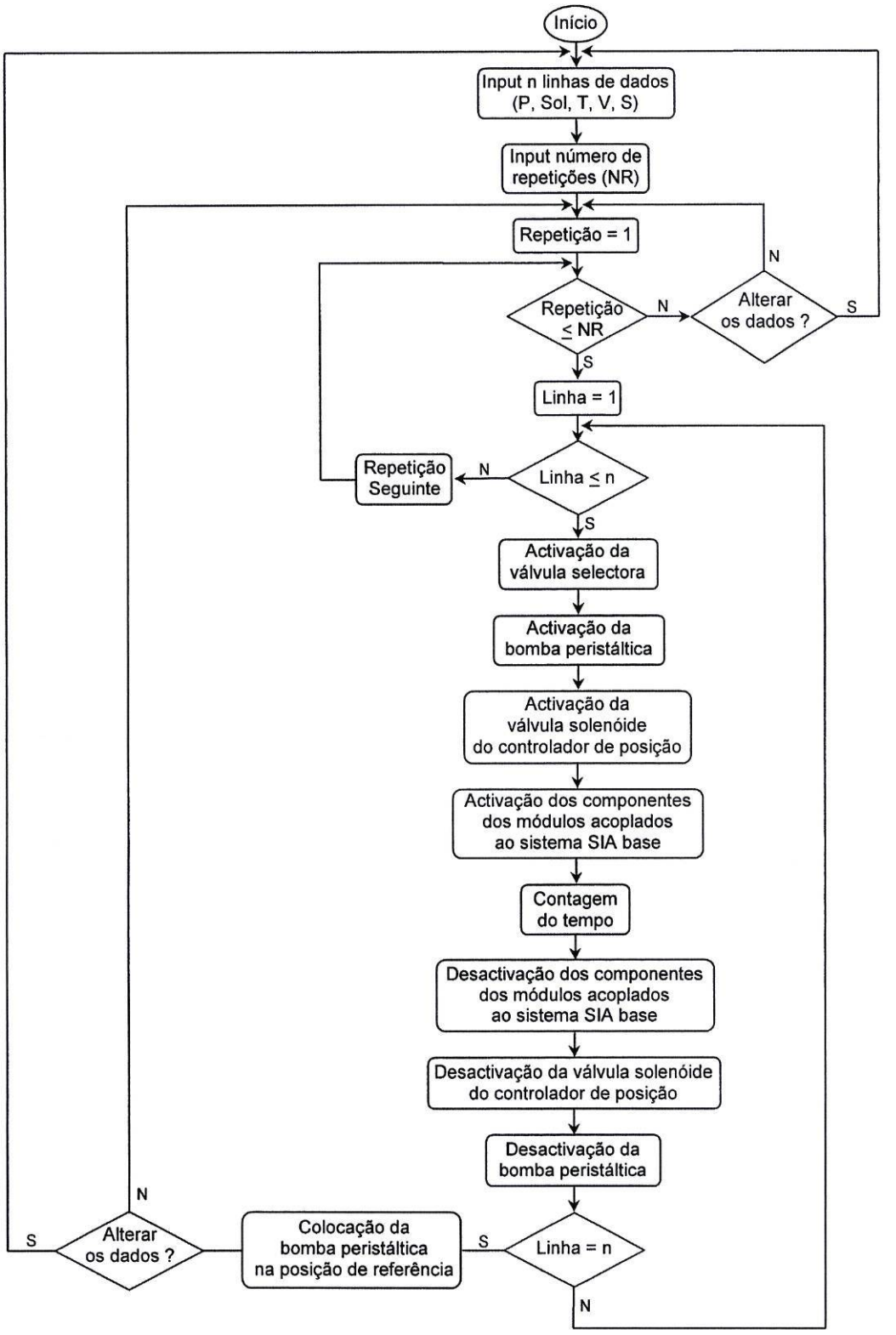


Figura 2.9 Organigrama do programa de computador utilizado para controlo dos diversos sistemas SIA apresentados ao longo desta dissertação.

Quanto à organização, o programa desenvolvido era constituído por uma rotina principal e cinco sub-rotinas: introdução dos dados; activação da válvula multiposição selectora de fluidos, activação da bomba peristáltica; activação/desactivação da válvula solenóide do controlador de posição da cabeça da bomba peristáltica e activação dos componentes de cada módulo acoplado ao sistema SIA base; e redução da velocidade da bomba peristáltica na última etapa do ciclo analítico com paragem na posição de partida.

2.6.1 Precisão do processo de cronometragem

O tempo atribuído a cada etapa do ciclo analítico era, segundo o programa desenvolvido, controlado através do estabelecimento de uma instrução de contagem de tempo que utilizava o comando *Timer* da referida linguagem de programação. Essa contagem era realizada pelo processador do computador, estando a sua precisão dependente da velocidade daquele. Efectivamente, quanto maior for a velocidade do microprocessador, naturalmente maior será a precisão do processo de contagem do tempo.

No caso concreto do microprocessador usado para controlar o sistema SIA básico desenvolvido, um *286* da *Intel*, concebeu-se um pequeno programa também em *Microsoft QBasic® 4.5*, com o qual era possível efectuar para cada período de tempo previamente definido, vinte contagens e posteriormente determinar o RSD através da equação 2.2. Aplicou-se o programa para períodos de tempo compreendidos entre 0,25 e 10 s, tendo-se obtido os resultados da Figura 2.10. De acordo com a mesma, concluiu-se que para períodos de tempo inferiores a 1,5 s a precisão decresce exponencialmente.

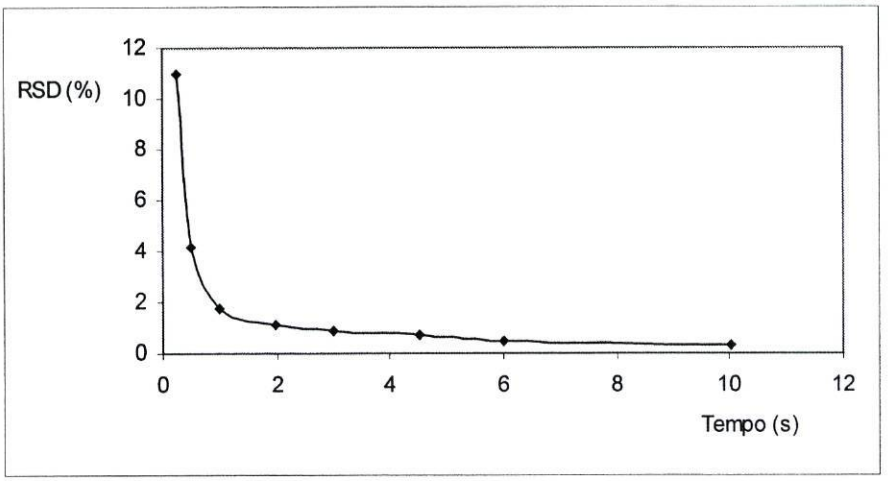


Figura 2.10 Precisão do processo de contagem do tempo.

2.7 Optimização das montagens

Atendendo à natureza transiente dos sinais analíticos obtidos com o tipo de metodologias em questão, utilizou-se como parâmetro de medida a altura do sinal registado (proporcional à intensidade máxima do sinal transiente fornecido pelo detector) no caso dos trabalhos correspondentes aos Capítulos III e IV, e a área de sinal para o procedimento descrito no Capitulo V.

Relativamente à optimização de cada sistema, procedeu-se numa fase inicial a uma triagem do efeito produzido sobre a intensidade ou área do sinal analítico, conforme o caso, por variação de cada parâmetro do sistema, procurando encontrar para cada variável valores próximos dos óptimos. Numa segunda fase procedeu-se à optimização rigorosa de cada uma das variáveis em questão pelo método univariado, segundo o qual cada variável é optimizada mantendo todas as outras constantes. Este processo de optimização foi repetido para cada variável fixando-se os valores óptimos para as restantes, até estabelecer a melhor relação

entre os diversos parâmetros a optimizar, tendo sempre em consideração a gama de concentrações a analisar, o intervalo de resposta linear permitido pelo detector, o menor consumo de soluções e o maior ritmo de amostragem.

Nos diversos procedimentos propostos, a determinação do teor da espécie a quantificar presente nas amostras em estudo foi efectuado por interpolação em curvas obtidas pelo método da curva de calibração e utilizando como método de regressão entre os valores de absorvência e de concentração o dos mínimos quadrados dos desvios.

2.8 Procedimentos gerais de avaliação da qualidade dos resultados obtidos

2.8.1 Avaliação do desempenho dos procedimentos automáticos

O desempenho dos procedimentos desenvolvidos, resumido em tabela em cada um dos capítulos, envolveu a determinação do limite de detecção, o de quantificação, a sensibilidade, o factor de enriquecimento e eficiência de concentração no caso dos procedimentos de pré-concentração, o intervalo de linearidade, o volume de amostra e o ritmo de determinação.

O limite de detecção (LOD), definido como a concentração que para um nível de confiança de 99,7% produz um sinal analítico que se distingue do branco, foi calculado como três vezes o desvio padrão de vinte determinações consecutivas do branco sobre a sensibilidade do procedimento (declive da recta de calibração)[11]. O limite de quantificação (LOQ), correspondendo à concentração mais baixa que pode ser determinada com um nível de precisão adequado (10%), foi determinado a partir da relação anterior substituindo o valor três por dez[11].

A sensibilidade ou concentração característica, definida como a concentração que produz 1% de absorção, foi determinada como a concentração que produzia um sinal com 0,0044 de absorvência. No caso do procedimento descrito no Capítulo V, a sensibilidade foi expressa sob a forma de massa característica, sendo esta igual à massa de elemento que é responsável também por 1% de absorção.

No caso dos procedimentos de pré-concentração, o factor de enriquecimento (FE), parâmetro que traduz o aumento de sensibilidade, foi determinado a partir da razão dos declives das rectas de calibração obtidas com e sem pré-concentração[8]. Além deste parâmetro, determinou-se também a eficiência de concentração (EC) como o produto do factor de enriquecimento pelo ritmo de amostragem expresso em número de amostras/min, de modo a ter uma visão mais representativa das metodologias de pré-concentração em termos de tempo de análise e volume de amostra consumido.

O intervalo de linearidade foi seleccionado de acordo com a gama de concentrações habitualmente encontradas no tipo de amostras em causa e o intervalo de resposta linear permitido pelo detector. A linearidade dentro dos intervalos escolhidos foi assegurada tendo como critério de aceitação coeficientes de correlação para as curvas de calibração próximos da unidade.

Os caudais de aspiração bem como os volumes aspirados das diferentes soluções incluindo as próprias amostras, foram aferidos gravimetricamente a partir da sua densidade e do decréscimo da massa do fluido em questão rigorosamente conhecida para dez ensaios consecutivos. Em relação aos caudais de propulsão e volumes propulsionados, a sua aferição, também para dez ensaios consecutivos, baseou-se na quantificação das massas debitadas para um goblé previamente tarado e considerando igualmente a densidade dos líquidos em questão.

O ritmo de determinação, expresso em termos de número de sinais analíticos por hora, foi determinado a partir do número de sinais registados em papel num determinado período de tempo.

2.8.2 Avaliação da exactidão

A validação das metodologias desenvolvidas, em termos de exactidão, foi efectuada por análise de amostras reais e comparação dos resultados com os obtidos com métodos independentes, sempre que possível os de referência e na ausência destes, métodos de uso generalizado. Relativamente à comparação, os resultados obtidos com os dois tipos de procedimentos foram tratados segundo três modos distintos, considerando sempre como verdadeiros os resultados fornecidos pelo método de comparação. O mais simples envolveu a determinação do erro relativo em percentagem (ER%) a partir da equação:

$$ER(\%) = \frac{(C_f - C_o)}{C_o} * 100 \qquad (2.3)$$

onde C_f e C_o correspondem aos valores de concentração obtidos respectivamente pelo procedimento automático e pelo procedimento de comparação[9]. Para além disso, procedeu-se também ao traçado da recta de regressão linear do tipo $C_f = A + S*C_o$ entre os pares de valores obtidos pelos dois métodos, considerando haver uma concordância aceitável quando o coeficiente de correlação (R) entre as duas variáveis estava próximo de um[10] e os intervalos de confiança da ordenada na origem (A) e do declive (S) incluíam respectivamente o zero e a unidade[11,12]. O terceiro processo de tratamento envolveu a aplicação do *test de t-student* emparelhado para um nível de confiança de 95%, admitindo que as médias obtidas pelos dois métodos eram sobreponíveis para o nível de confiança considerado, desde que o valor de t calculado (t_{cal}) fosse inferior ao valor tabelado (t_{tab})[9,13].

No caso do procedimento descrito para a determinação de Pd em amostras de urina humana, dado que não existem, nem materiais de referência certificados, nem um método cuja validade em termos de precisão e exactidão esteja reconhecidamente aceite, adoptou-se como procedimento de validação da exactidão da metodologia proposta a realização de ensaios de recuperação. Segundo estes, a cada amostra adicionou-se uma quantidade conhecida de Pd

sob a forma de um pequeno volume de modo a não diluir a amostra e mediu-se o acréscimo de sinal. A partir dos resultados obtidos com e sem adição de Pd às amostras determinou-se o Índice de Recuperação em percentagem (IR) a partir da seguinte equação:

$$IR(\%) = \frac{(C_2 - C_1)}{C_3} * 100 \qquad (2.4)$$

onde C_1, C_2 e C_3 representam respectivamente as concentrações da amostra inicialmente e depois de adicionada de Pd, e a que foi adicionada à amostra. Considera-se neste caso que o método é exacto, pelo menos na determinação de Pd, quando o Índice de Recuperação está próximo de 100%.

2.5.1 Avaliação da repetibilidade

A repetibilidade dos procedimentos desenvolvidos, em termos percentuais, foi avaliada realizando dez determinações consecutivas de uma ou mais amostras cujo nível de concentração se situava sensivelmente a meio ou abarcava a totalidade do intervalo de concentrações onde havia linearidade de resposta instrumental e determinando o RSD a partir da relação 2.1.

Por fim, refira-se que todos os cálculos, incluindo os de natureza estatística, foram efectuados com o programa *Microsoft® Excel 97*, enquanto que como tabelas de comparação estatística utilizaram-se as da referência 14.

Referências Bibliográficas

1 Z. Fang, B. Welz e M. Sperling, *Anal. Chem.*, **65**, 1993, 1682

2 A.N. Araújo, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis e E.A.G.Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, **310**, 1995, 447

3 J. Ruzicka e E.H. Hansen, Flow Injection Analysis, 2nd Edition, 1988, John Wiley & Sons, New York

4 I.L. García, P. Vinas, N. Campillo e M.H. Córdoba, *Anal. Chim. Acta*, **308**, 1995, 85

5 S.R. Bysouth e J.F. Tyson, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2**, 1987, 217

6 I.L. García, P. Vinas e M.H. Córdoba, *J. Anal. At. Spectrom.*, **9**, 1994, 1167

7 R.A. Sherwood, B.F. Rocks e C. Riley, *Analyst*, **110**,1985, 493

8 Z. Fang, Flow Injection and Preconcentration, 1993, VCH Publishers, New York

9 D. McCormick e A. Roach, Measurement, Statistics and Computation, 1987, John Wiley & Sons, Chichester

10 Analytical Methods Committee, *Analyst*, **113**, 1987, 1469

11 J.N. Miller, *Analyst*, **116**, 1991, 3

12 B.D. Ripley e M. Thompson, *Analyst*, **112**, 1987, 377

13 L.A. Kaplan e A.J. Pesce, Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation, 3th Edition, 1996, Mosby-Year Book, St. Louis

14 J.E. Freund e R.M. Smith, Statistics, A First Course, 4th Edition, 1986, Prentice-Hall, New Jersey

CAPÍTULO III

DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES ELEMENTARES EM ÁGUA

"O maior erro que se pode cometer
é estar sempre com medo de errar."
Thomas Dewar

3.1

CARACTERIZAÇÃO HIDRODINÂMICA DA TÉCNICA SIA E DO ACOPLAMENTO À FAAS. DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS DE DILUIÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE Ca E Mg EM ÁGUAS MINERAIS.

SEQUENTIAL INJECTION SYSTEM IN FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY FOR THE DETERMINATION OF CALCIUM AND MAGNESIUM IN MINERAL WATERS

ANALYTICA CHIMICA ACTA: 358 (1998), 111-119

ELSEVIER

Analytica Chimica Acta 358 (1998) 111–119

ANALYTICA CHIMICA ACTA

Sequential injection system in flame atomic absorption spectrometry for the determination of calcium and magnesium in mineral waters

Alberto N. Araújo[a,*], Rui C.C. Costa[a], José L.F.C. Lima[a], Boaventura F. Reis[b]

[a] *CEQUP/Dep. Química-Física, Faculdade de Farmácia U.P., Rua Aníbal Cunha, 164, 4050 Porto, Portugal*
[b] *Centro de Energia Nuclear na Agricultura U.S.P., Box 96, Piracicaba, SP 13418-260, Brazil*

Received 13 May 1997; received in revised form 8 October 1997; accepted 12 October 1997

Abstract

A flow set-up based on sequential injection analysis (SIA) is proposed to increase the versatility and robustness of routine flame atomic absorption analytical methods. Four procedures were selected to allow the determinations of calcium within the ranges of 0.03–10.00 and 0.58–200.00 mg l^{-1}, and magnesium within 0.03–1.5 and 0.80–50.0 mg l^{-1}, in mineral waters. The sample aliquots inserted were 70.8 and 12 μl for calcium and 13 and 12 μl for magnesium. Moreover the system developed enabled to restrict the consumption of the releasing agent to respectively 142 and 97 μl in the determinations of calcium and to 26 and 12 μl in the determinations of magnesium. The results obtained in the analysis of 15 mineral waters were compared with those obtained by the corresponding conventional procedures yielding the equations: $[Ca\ mg\ l^{-1}]_{SIA}=1.008(\pm0.004)^{*}[Ca\ mg\ l^{-1}]_{conv.}-0.3\ (\pm0.3)$ and $[Mg\ mg\ l^{-1}]_{SIA}=0.992(\pm0.006)^{*}[Mg\ mg\ l^{-1}]_{conv.}+0.0\ (\pm0.1)$. In all cases the sampling rates achieved were higher than 110 h^{-1}, and reproducibility being better than 3%. © 1998 Elsevier Science B.V.

Keywords: SIA; Flame atomic absorption spectrometry; Ca and Mg in mineral waters

1. Introduction

The influence of the physical characteristics of the sample on the atomisation efficiency, the high salt content of samples and the limited linear response range are common difficulties found when flame atomic absorption spectrometry (FAAS) is used. The coupling of continuous flow-systems, particularly based on flow injection analysis (FIA), was proposed to allow a more efficient performance of sample pretreatment and to avoid the intensive use of glass equipment [1,2]. Procedures like sample dilution [3,4], extraction or on-line pre-concentration [5,6] were simplified with little time consumption. The standard additions method [7] as well as the study of the interferences [8] were also more easily performed. Albeit this, the use of continuous flow methodologies in large scale analysis is impaired several times by the necessity of reconfiguring the manifolds physically when different sample matrices are analysed or when the concentration range of the species is too high for the detection device used, what usually occurs with environmental and food samples. Procedures such as prior dilution of batches, changing the flow system (e.g. modifying the volume of the injection loop), diminishing the optical path in the burner, selecting a wavelength of low sensitivity or even

*Corresponding author. Fax. +351 (2) 200 4427.

0003-2670/98/$19.00 © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
PII S0003-2670(97)00583-7

decreasing the nebulisation efficiency by diminishing the aspiration flow of the instrument [9] are the easiest procedures used to re-evaluate the samples with too high analyte concentration relatively to the analytical range of the flow setup in use. As an alternative, other systems characterised by being more versatile but very complex regarding flow diagrams and/or their operation mode, like zone sampling [10], trial measurements [11], dialysis [12], confluence and stream splitting [12,13], controlled dispersion analysis [14] and reactor commutation [9], were proposed. However these operation modes presuppose significant sample dilution.

In order to fulfil the requirements of robustness, simplicity, autonomy and versatility required for automatic routine equipment, a new approach denominated sequential injection analysis (SIA) has been recently proposed [15]. This single-channel system is based on a fluid selecting valve and a liquid propulsion device which enables the bidirectional flow of each fluid that reaches the tubular reactor through the valve. The analytical determinations are performed under controlled dispersion as in the continuous flow systems previously described.

In this work, the development of a SIA system coupled with FAAS is described and its potentialities studied by using it in the determination of calcium and magnesium in mineral waters. The flow set-up proposed is first analysed regarding its general working characteristics. The versatility of the system is demonstrated by the development of four procedures achieved with the timing control of different devices used. The procedures were optimised to perform determinations with and without sample dilution. Additionally, the minimisation of consumption of the interferences suppressor agent is discussed.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All solutions were prepared with doubly deionised water (conductivity <0.1 mS/cm) and analytical grade reagents.

Lanthanum was used as a releasing agent in the flame. A solution of 100 mmol l^{-1} La was prepared by weighing 16.29 g lanthanum oxide, added on HCl until complete dissolution and adjusted to 1000 ml with water, in volumetric flask.

Aluminium was used as chemical interferent. Therefore, a stock solution of 1000 mg l^{-1} Al was prepared by diluting a Titrisol (Merck, ref. 9967) vial to 1 l with water.

Calcium (BDH, ref. 14136-4j) and magnesium nitrate (BDH, ref. 14047) commercial solutions with concentrations of 1000±2 mg l^{-1} in both metals were used to prepare the calibrating solutions, obtained after dilution with water.

The studies on the suppression of interferences were carried out after having prepared solutions with 50 mg l^{-1} Ca and 15 mg l^{-1} Mg, respectively, in 50 mg l^{-1} Al solution and 10 mmol l^{-1} La solution. With the same purpose solutions with concentrations of 200 mg l^{-1} Ca and 50 mg l^{-1} Mg were also prepared by carefully diluting the appropriate volumes of both stock solutions with 100 mmol l^{-1} La solution or 500 mg l^{-1} Al solution. Mineral water samples which contain gas were sonicated for 30 min before analysis.

2.2. Apparatus

The SI-system (Fig. 1) comprised a VICI C25-3186E 6-position valve (Valco Instruments, Houston, TX), a NResearch 161 T031 3-way solenoid valve (Stow, MA) and a Gilson Minipuls 3 peristaltic pump (Villiers-le-Bel, France) equipped with a Gilson N0369G PVC pumping tube, 1.6 mm i.d. The holding coil (HC) was constructed using PTFE tubes with 0.8 mm i.d. and 200 cm length, coiled on a rod with 1.5 cm external diameter. The aspiration/ discard of the solutions was carried out through a tubing similar to that used in the holding coil with 12 cm length connected to the ports of the multiposition valve. A Pye Unicam SP9 flame atomic absorption spectrophotometer (Cambridge, UK) used as a detector device was connected to one of the ports of the multiposition valve through a confluence device made of polyacryl. Therefore, a continuous inlet of water in the nebuliser occurred through the lateral channel that led to the confluence point (L2) during the non discard period through the 6-position valve towards the detector. A Kipp and Zonen recorder was used to collect the analytical signals provided by the detection unit.

The developed setup was controlled by a 286 microcomputer using a QuickBasic 4.5 programme

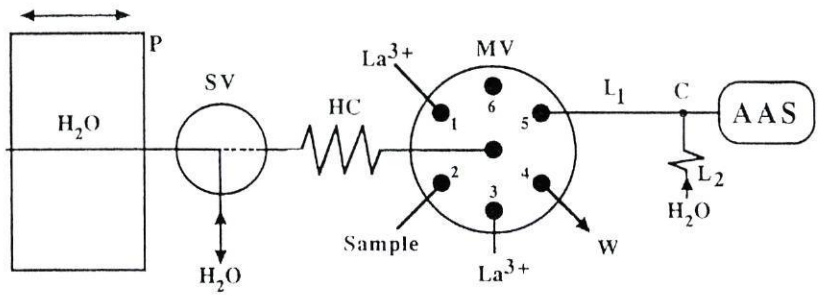


Fig. 1. Sequential injection manifold used. P- bidirectional peristaltic pump; SV solenoid valve; HC- holding coil (200 cm length, 0.8 mm i.d.); MV- multiposition valve; C confluence point; L1- FAAS inlet tube (25 cm, 0.8 mm i.d.); L2- tubular coil (100 cm, 0.5 i.d.); W- waste; AAS- flame atomic absorption spectrophotometer.

to control the timing, speed and direction of the peristaltic pump rotation, activation timing of the solenoid valve and the position of the fluid selecting valve. The different devices operated by means of an Advantech PCL 711S interface card. A power activating buffer described previously [16] was used for the operation of the solenoid valve.

A rigid straight copper wire with 10 cm length and 2 mm diameter was connected to the axis of rotation over the rotative head of the peristaltic pump. The motion of the wire with peristaltic pump rotative head established electrical contact at each half revolution between two diametrically opposed electrical contacts which corresponded to a digital-in port of the interface card and the ground. The signal detected by the microcomputer set the beginning of each step of the analytical cycle from a fixed position of the peristaltic pump. The solenoid valve was activated at each step of the determination cycle, one half revolution after the beginning of the pump rotation, when a new electrical contact was established. This enabled the solutions to flow through the holding coil. At the end of each cycle, the same device allowed the pump rotation to be interrupted in its original position.

2.3. Methods

Determination of calcium and magnesium in the samples was carried out in six steps (Table 1). The first two steps, aspiration of 180 μl of the sample through port 2 followed by discarding the content of the holding coil content to port 4 (waste), allowed to fill the sampling line with a new sample. To perform evaluations of low concentrated calcium and magnesium samples, the sample aliquot was aspirated into the holding coil between two aliquots of the lanthanum solution. For the determination of high concentrations of these species, releasing agent and the sample were sequentially aspirated and afterwards diluted by discarding part of the sample volume to waste.

Volumes of the different solutions inserted into the holding coil were assessed by measuring the weight decrease of a volume previously defined for each solution and repeating each step ten times. The volumes discarded through port 4 and the flow of the sample carried to the detector were evaluated by determining the mass collected in the time intervals established.

The optimisation of each step to eliminate chemical interferences was performed using aluminium as interferent. In fact, preliminary tests in which different amounts of aluminium, lithium, sodium and potassium were added to the calibration solutions as phosphate, sulphate, carbonate, nitrate and hydroxide revealed a significant reduction of the analytical signals registered whenever aluminium was present, even at low concentrations.

The determination of calcium and magnesium by the conventional method was carried out using the same spectrophotometer as used for the SIA manifold, employing an acetylene/air stoichiometric flame at the wavelength of 422.7 and 285.2 nm, respectively. Magnesium determinations were carried out under deuterium arc background correction. The samples were previously diluted in a lanthanum solution to provide

Table 1
Sequential events for the calcium and magnesium determinations; A: without dilution step and B with dilution step

Event	Port	Pump direction	Time (s)		Flow rate (ml ml^{-1})		Volume (µl)	
			A	B	A	B	A	B
Calcium								
Sample	2	Aspiration	2		5.4		180	
Waste	4	Propulsion	20		6.0		2000	
Lanthanum	1	Aspiration	2.5	3	1.70	1.94	70.8	97
Sample	2	Propulsion	2.5	3	1.70	0.24	70.8	12
Lanthanum	3	Aspiration	2.5	–	1.70	–	70.8	–
Waste	4	Propulsion	–	3	–	0.16	–	8
Detection	5	Propulsion	18	18	5.50	5.50	1650	1650
Magnesium								
Sample	2	Aspiration	2		5.4		180	
Waste	4	Propulsion	20		6.0		2000	
Lanthanum	1	Aspiration	1.5	3	0.52	0.24	13	12
Sample	2	Aspiration	1.5	3	0.52	0.24	13	12
Lanthanum	3	Aspiration	1.5	–	0.52	–	13	–
Waste	4	Propulsion	–	3.5	–	0.44	–	25.7
Detection	5	Propulsion	18	18	5.50	5.50	1650	1650

analytical signals within the linear response interval of the spectrophotometer (up to 2 mg l^{-1} Ca and 0.5 mg l^{-1} Mg).

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of the hydrodynamic characteristics of the flow set-up

In the developed SI-system the different solutions were inserted by the aspiration into the holding coil placed between the selecting valve and the peristaltic pump (Fig. 1). Therefore, the volume inserted depended on the holding coil dimensions, the time/rotation speed of the peristaltic pump and the physical characteristics of the aspirated solution, particularly viscosity. It was verified that the water volumes aspirated were similar to the propelled ones for the same time period/rotation speed of the pump, up to 8 ml min^{-1} and 5 ml min^{-1} flow-rates when holding coils of length 100 and 200 cm (0.8 mm i.d.), respectively, were used. The volume of the aspirated fluid decreased when glycerol solutions with concentrations up to 30% (v/v) were aspirated, what was more evident for flow rates higher than 4 ml min^{-1}. The 200 cm holding coil with 0.8 mm i.d. was finally selected to enable the sampling of high volumes of the solutions without reaching the pumping tube.

The intensity of the analytical signal obtained with FAAS as detection device in continuous flow systems depended on the design of the nebulising chamber and the solutions flow rate allowed [8]. The flow rate of the sample propelled to the detector was optimised to provide a maximum of atomisation efficiency. Therefore 180 µl of a solution of 2.00 mg l^{-1} Ca in 10 mmol l^{-1} La were aspirated using a lanthanum solution in the same concentration as carrier. It was found (Fig. 2) that for flow rates lower than 4.4 ml min^{-1} there was a gradual decrease in the signal intensity. Under these conditions, the spectrophotometer aspiration flow rate was higher than the flow rate of the sample propulsion (the spectrophotometer aspiration flow rate was 5.7 ml min^{-1} when tube L1 was immersed in water). The difference between the flow-rates was counterbalanced by the input of water through the lateral channel of the confluence (compensating channel L2) causing dilution of the sample at the entrance of the nebuliser. This effect was more evident when the length of L2 was diminished or its internal diameter widened to 0.8 mm. Propulsion of the sample at flow rates higher than 6.0 ml min^{-1} produced a gradual decrease in the analytical signal and the occurrence of a second signal

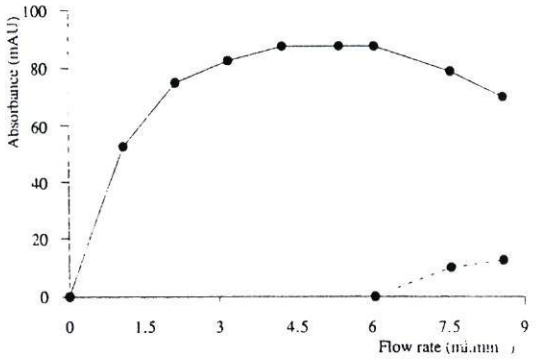


Fig. 2. Influence of the propulsion flow rate towards the detector on the analytical signal obtained by the intercalation of 180 µl of 2 mg l^{-1} Ca prepared on 10 mmol l^{-1} La solution. Dotted line corresponds to the second signal caused by the contamination of the compensating channel.

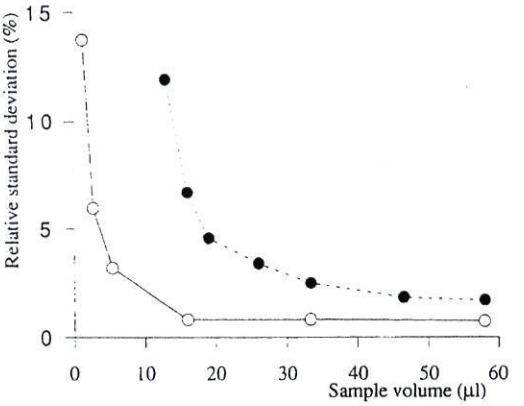


Fig. 3. Influence of the aspirated sample volume on the precision of the analytical signals obtained by the intercalation of a 0.5 mg l^{-1} Mg prepared in 10 mmol l^{-1} lanthanum solution. (●) Without head control position of the peristaltic pump; (○) with position control.

of lower intensity when the sample flow to the detector was ended. Furthermore, it was found that the decrease of intensity was caused by the diminishing of the nebulisation efficiency as well as the split of the flow between the detector and the compensating channel. Using a compensating channel with 0.5 mm i.d. allowed an interval between 4.4 and 6.0 ml min^{-1} in which there was a maximum intensity of the signal and the compensating channel was not significantly contaminated.

The use of a single aspiration/propulsion channel and the need for a high flow rate at the inlet of the nebuliser conditioned the minimum volume of the solutions aspirated through the ports of the fluid selecting valve. It was found that volumes lower than 25 µl of a standard solution with 0.5 mg l^{-1} Mg, prepared in 10 mmol l^{-1} La solution, caused analytical signals whose reproducibility varied inversely to the volume (Fig. 3).

Several factors were identified as probable causes of this behaviour. The activation of the peristaltic pump at a rotation speed set before each step and the flow rate produced occurred within a brief yet important interval when compared with that needed to aspirate low volumes. The solution volumes aspirated to the holding coil also depended on the position of the pump rollers at the beginning of each determination, as shown by other authors [17–20]. To minimise the effect of the factors above mentioned a solenoid valve (Fig. 1) and a synchroniser of the peristaltic pump rollers position were introduced in the flow setup. Under these conditions, in each step of determination the pump started from the same position, hence assuring the reproducibility of the volumes of the aspirated or propelled solutions. The solutions flow through the holding coil occurred only when the solenoid valve was activated after one half revolution of the pump head when a new electrical contact with the position synchroniser was established, thus minimising the effect of the hydrodynamic inertia of the system at the beginning of the pump rotation. The length of each step was determined by the period of time in which the solenoid valve was active. The selection of the above referred conditions allowed to reduce the minimum volume that could be aspirated reproducibly from 25 µl to about 8 µl (Fig. 4) and considerably improved the general reproducibility. For volumes lower than 8 µl, it was found that the reproducibility was restricted by the speed of processing of the system control unit and by the initial resistance of the liquids to flow through the holding coil.

3.2. *Optimization of the system parameters for the determination of Ca and Mg without dilution step*

Aiming at the manifold optimisation for the determination of both species with maximum sensitivity, consecutive calibration curves were obtained by increasing the inserted volumes of lanthanum standard

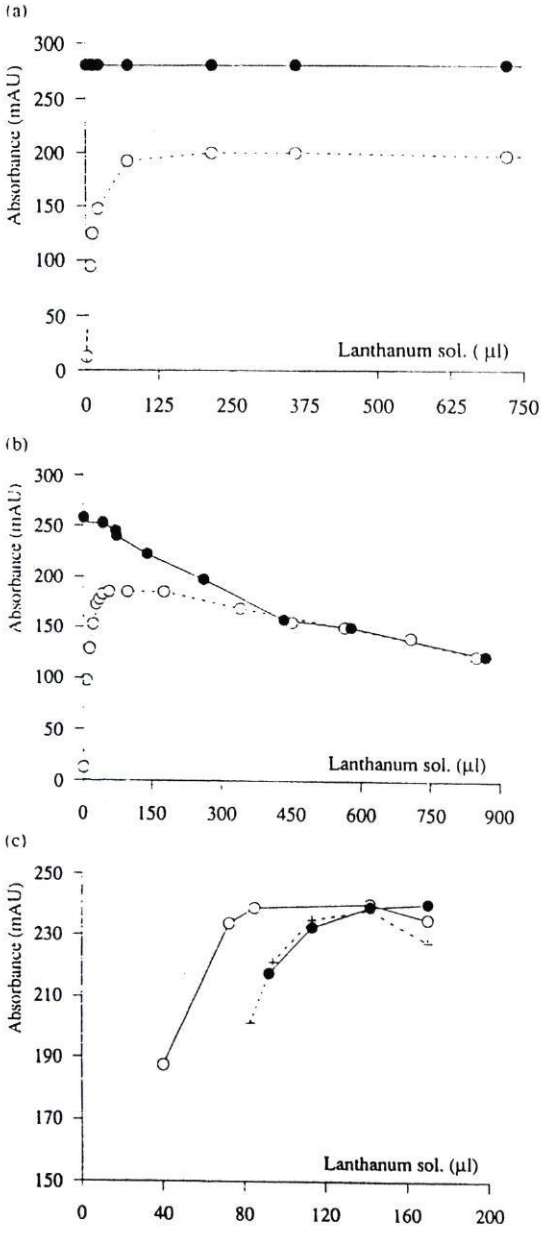


Fig. 4. Influence of the aspiration order and volume of a 10 mmol l^{-1} lanthanum solution on the analytical signals obtained by the intercalation of a 15 mg l^{-1} of Ca solution prepared in interferent solution (○) and in lanthanum solution (●). (A) lanthanum solution intercalated prior to the sample aspiration; (B) after sample aspiration; (C) sample intercalated between two consecutive aspirations of lanthanum solution ((○) equal volumes of lanthanum sol.; a fixed 71 µl lanthanum solution is aspirated before (+) and after sample intercalation (●).

solutions in the concentrations of 5.00, 10.0, 15.0, 30.0 and 50 mg l^{-1} Ca and 1.50, 2.50, 5.00, 10.0 and 15.0 mg l^{-1} Mg. A solution of 10.0 mmol l^{-1} La was used as a carrier. To the volume increase from 9.4 to 175 µl for the determination of Ca and from 15 to 67 µl for the determination of Mg corresponded the proportional decrease of the characteristic concentration from 1.47 to 0.13 mg l^{-1} and 0.26 to 0.07 mg l^{-1} in the determinations of calcium and magnesium, respectively. The analytical interval range of the ratio between absorbance and concentration diminished too. Linear calibrations up to 50 mg l^{-1} Ca for the sample volume of 9.4 µl and to 15 mg l^{-1} for the highest volume were obtained. For the determination of magnesium, linear calibrations up to 3 mg l^{-1} were obtained for the lowest volume and 1.5 mg l^{-1} when a solution volume of 67 µl was inserted. This set of tests demonstrated how easy it was to adapt the sensitivity and the analytical interval of applicability when the determination in samples, which do not require any considerable dilution before the measurement procedure is attempted.

The elimination of chemical interferences by means of inserting small volumes of lanthanum solution as an alternative to its use as carrier was also studied. Volumes of 70.8 and 13 µl were selected for the determination of calcium (15 mg l^{-1}) and magnesium (3 mg l^{-1}), respectively, in the presence of the interferent ion (aluminium, 50 mg l^{-1}). The tests in which the lanthanum solution was aspirated before the sample showed a rapid increase in the analytical signal intensity when the volume of the lanthanum solution was increased, followed by a stabilisation of the signal (Fig. 4(A)). However, it was concluded that the elimination of interferences was not complete since the dimensions of L1 reactor and the flow selected did not promote an effective dispersion of the sample and lanthanum solutions during transport towards the detector. When the calibration solution was aspirated before the releasing agent solution, there was a complete elimination of the interferent when the volume of the lanthanum solution was higher than 450 µl (Fig. 4(B)). As a matter of fact, it was found that there was an additional dispersion of the sample on the lanthanum solution over the aspiration of the latter. When the tests were repeated with the analyte solution prepared in 10 mmol l^{-1} La solution, the analytical signal decreased due to the increase of the volume of

Table 2
Analytical performance of the developed SIA: A without dilution step and B with dilution step

Element	Sample volume	Sensitivity ($mg\ l^{-1}$)	Detection limit ($mg\ l^{-1}$)	Linear range of response ($mg\ l^{-1}$)	Sampling rate (h^{-1})
Calcium A	70.8	0.22	0.03	10	122
Calcium B	12	4.22	0.58	200	116
Magnesium A	13	0.16	0.03	2.5	135
Magnesium B	12	2.64	0.80	50	114

the lanthanum solution corroborating the last conclusion. Finally, the system was evaluated regarding the insertion procedure: lanthanum solution/sample/lanthanum solution. Under these conditions, the sample aliquot was inserted into the holding coil between two lanthanum aliquots, thus enabling the mutual dispersion on both contact interfaces. There was a complete elimination of the interference (Fig. 4(C)), even when the volume of the releasing agent was reduced to 142 μl, without causing a significant increase of the sample dilution. Similar studies were carried out for the determination of magnesium, and a similar behaviour to that described above for calcium was observed, thus allowing the conclusion that the insertion of the sample between two aliquots of 13 μl of the releasing agent solution minimised the aluminium interference. Table 2 plots the performance of the analysis method for the determination of calcium and magnesium in low concentrations (Table 1), stressing the high sampling rates obtained.

3.3. *Optimization of the system parameters for the determination of Ca and Mg with dilution step*

The optimisation of the system for the determination of calcium and magnesium in high concentrations (up to 200 $mg\ l^{-1}$ Ca and 50 $mg\ l^{-1}$ Mg) could not be done by simply decreasing the inserted sample volume. Even when volumes of 8 μl were aspirated, the corresponding analytical signal was out of the linear response zone of the detector. Considering that the sample dilution in the carrier stream throughout its insertion into the holding coil was not enough, the concentration gradient produced at the interface between the aliquot of the sample solution and the carrier solution was explored. Therefore, after the sampling step, the direction of the pump rotation was reversed and part of the sample was discarded through port 4 of the fluid selecting valve. An aspiration volume of 12 μl was selected for both cases. In the determination of calcium, when volumes from 0 to about 14 μl were discarded, proportional analytical signals up to 150.00 $mg\ l^{-1}$, without discarding, and 200.00 $mg\ l^{-1}$ after discarding 14 μl of the solution were obtained. There was also a proportional increase of the characteristic concentration from 1.40 $mg\ l^{-1}$ to 5.97 $mg\ l^{-1}$. A similar study was carried out for the determination of magnesium and it showed an increase of the characteristic concentration from 0.19 $mg\ l^{-1}$ to 1.27 $mg\ l^{-1}$ when the volume discarded was varied from 0 to 21 μl, for which 5.00 to 50.0 $mg\ l^{-1}$ linear limits were obtained, respectively.

The use of small volumes of the eliminating agent was also studied. The aspiration of 12 μl of two calibration solutions with a concentration of 200 $mg\ l^{-1}$ Ca and 50 $mg\ l^{-1}$ Mg, prepared in 100 $mmol\ l^{-1}$ La solution and 500 $mg\ l^{-1}$ Al solution respectively, allowed to conclude that the aspiration of the lanthanum solution, 97 μl for calcium and 12 μl for magnesium, before the calibration solution assured the complete elimination of the aluminium interferent. After discarding the sample, only a small portion of this remained in the holding coil diluted in the lanthanum solution. Table 2 shows the performance of the manifold for the conditions referred (Table 1), a slight decrease of the sampling rate being stressed which was caused by the sample insertion at a lower flow rate and dilution.

3.4. *Application of the developed procedures to the determination of calcium and magnesium in mineral water samples*

The procedures referred in Table 1 were used for the determination of calcium and magnesium in com-

Table 3
Results (mg l^{-1}) obtained in the determinations of calcium and magnesium in mineral waters

Sample	Calcium			Magnesium		
	SIA	Conventional procedure	Relative error	SIA	Conventional procedure	Relative error
1	0.85±0.01	0.83±0.01	+2.4	0.32±0.01	0.32±0.01	0
2	3.98±0.03	3.92±0.04	+1.5	25.1±0.3	25.9±0.2	−3.1
3	1.25±0.04	1.24±0.02	+0.8	0.48±0.01	0.49±0.01	−2.0
4	158±2	155±1	+1.9	18.8±0.3	18.7±0.1	+0.5
5	0.73±0.01	0.74±0.01	−1.4	1.56±0.02	1.57±0.01	−0.6
6	43.7±0.4	44.2±0.7	+1.2	13.3±0.4	13.8±0.1	−3.6
7	83.3±1.2	83.3±0.6	0	29.5±0.5	29±0.3	0
8	101±2	102±1	−1.0	10.3±0.2	10.2±0.1	+1.0
9	28.4±0.4	29.0±0.2	−2.1	4.4±0.1	4.4±0.1	0
10	6.14±0.04	6.30±0.05	−2.5	0.67±0.01	0.66±0.01	+1.5
11	91±2	92±1	−1.1	30.7±0.7	31.0±0.2	−1.0
12	17.1±0.4	17.2±0.4	−0.6	13.7±0.2	13.6±0.1	+0.7
13	73±1	72±1	+1.4	26.3±0.9	26.3±0.2	0
14	2.43±0.03	2.52±0.04	−3.6	0.82±0.02	0.81±0.01	+1.2
15	54±1	54.0±0.2	0	17.4±0.3	17.2±0.1	+1.2

mercial mineral water samples, providing the results shown in Table 3. These results were compared with those obtained by the conventional method. As observed, there were no relative errors higher than 3.6%. The regression of the given results both by the proposed and conventional method enabled to obtain the equation: $[Ca\ mg\ l^{-1}]_{SIA} = 1.008\ (\pm 0.004)^{*}[Ca\ mg\ l^{-1}]_{conv.} - 0.3\ (\pm 0.3)$ in the determination of calcium, and $[Mg\ mg\ l^{-1}]_{SIA} = 0.992\ (\pm 0.006)^{*}[Mg\ mg\ l^{-1}]_{conv.} - 0.0\ (\pm 0.1)$ in the determination of magnesium.

The precision of the results provided by the proposed methodology was evaluated by performing ten replicate determinations on each of the four samples with concentrations from 1 mg l^{-1} to 157 mg l^{-1} in calcium and from 0.5 mg l^{-1} to 30 mg l^{-1} in magnesium, relative standard deviations less than 3% being obtained in all cases.

4. Conclusions

The coupling of the analysis unit based on SIA to FAAS allowed different procedures selected through the menu of the control software, without any physical change of the analytical setup. Alternatively, the complete automatisation of the system may easily allow the adequate treatment of the sample according to the corresponding concentration. As in the coupling of other methodologies based on continuous flow, a simple manifold allows the drastic reduction on the consumption of interferences suppressor agent without prejudice of the sampling rate, and reducing costs and time in large scale analysis. The low linear response range, typical of the FAAS technique, requires a careful control of the flow hydrodynamic conditions when a peristaltic pump is used as propelling device. This work proposes the control of the pump stop position and the use of a solenoid valve to minimise the errors of the aspirated volumes caused by the pump pulse. Replacing the confluence by a 3-way solenoid valve may allow to operate the analysis unit at different flow rates of the sample propulsion, and some noise of the compensating channel used in the proposed system is eliminated.

Acknowledgements

The authors acknowledge Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica for its financial support through PBIC/C/QUI/2162/95 grant, and JNICT/CAPES project. One of us (R.C.C.C.) wishes to thank the BJI 2524 granted.

References

[1] J.L. Burguera (Ed.), Flow Injection Atomic Spectroscopy, Marcel Dekker, New York, 1989.
[2] J.F. Tyson, Spectrochim. Acta Rev. 14 (1991) 169.
[3] J.F. Tyson, J.M.H. Appleton, Talanta 31 (1984) 9.
[4] M. Sperling, Z. Fang, B. Welz, Anal. Chem. 63 (1991) 151.
[5] M. Gallego, M. Silva, M. Valcárcel, Anal. Chem. 58 (1986) 2265.
[6] L. Ebon, A.S. Fisher, S.J. Hill, P.J. Worsfold, J. Autom. Chem. 13 (1991) 281.
[7] J.F. Tyson, A. Idris, Analyst 109 (1984) 23.
[8] J.F. Tyson, C.E. Adeeyinwo, J.M.H. Appleton, S.R. Bysouth, A.B. Idris, L.L. Sarkissian, Analyst 110 (1985) 169.
[9] J.F. Tyson, J.R. Mariana, J.M.H. Appleton, J. Anal. At. Spetrom. 1 (1986) 273.
[10] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, J.L.M. Santos, Food Chem. 55 (1996) 397.
[11] B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, P.B. Martelli, S.M.B. Brienza, Analyst 118 (1993) 719.
[12] J.L.F.C. Lima, C.D. Matos, M.C.V.F. Vaz, At. Spectrosc. 17 (1996) 196.
[13] J.F. Tyson, S.R. Bysouth, J. Anal. At. Spetrom. 3 (1988) 211.
[14] R.A. Sherwood, B.F. Rocks, C. Riley, Analyst 110 (1985) 493.
[15] J. Ruzicka, G.D. Marshall, Anal. Chim. Acta 237 (1990) 329.
[16] A.N. Araújo, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 310 (1995) 447.
[17] I.L. Garcia, P. Viñas, M.H Córdoba, J. Anal. At. Spetrom. 9 (1994) 1167.
[18] I.L. Garcia, P. Viñas, N. Campillo, M.H. Córdoba, Anal. Chim. Acta 308 (1995) 85.
[19] B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, Anal. Chim. Acta 293 (1994) 129.
[20] A. Ivaska, J. Ruzicka, Analyst 118 (1993) 885.

3.2

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA A DETERMINAÇÃO DE Pb, Cu E Mn EM ÁGUAS NATURAIS.

APPLICATION OF SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS TO THE ASSAY OF LEAD RETENTION CHARACTERISTICS BY POLY(VINYLPYRROLIDONE): TRACE ANALYSIS OF LEAD IN WATERS

ANALYTICAL SCIENCES: 15 (1999), 991-994

ANALYTICAL SCIENCES OCTOBER 1999, VOL. 15

1999 © The Japan Society for Analytical Chemistry

Application of Sequential Injection Analysis to the Assay of Lead Retention Characteristics by Poly(vinylpyrrolidone): Trace Analysis of Lead in Waters

Alberto N. Araújo†, Rui Cerdeira C. Costa and José L. F. C. Lima

CEQUP/Serv. Química-Física, Faculdade de Farmácia (U.P.), Rua Anibal Cunha, 164, 4050 Porto, Portugal

This paper presents the use of poly(vinylpyrrolidone) (PVP), which is a low-cost polymer for lead preconcentration in natural-water samples. The weak granular structure of this polymer imposed the use of a stainless-steel filter holder for its conditioning in a thin filtering layer. This unit was inserted into a sequential injection analysis system coupled to a flame atomic absorption spectrophotometer (SIA/FAAS). The developed system allows sampling rates of 16 samples/h with a 60-fold enrichment factor and a detection limit of less than 5 μg/l for a 13 ml sample volume. The performance of the present system was also assessed by carrying out recovery trials, which provided results of between 96% and 101%. The precision of the methodology developed has never been over 3% regarding RSD and 5% for the deviations to the conventional procedure.

Keywords Preconcentration, poly(vinylpyrrolidone), sequential injection analysis/flame atomic absorption spectrophotometry, lead

Because heavy metals are usually present in water at trace levels, their determination can only be performed by highly sensitive analytical methodologies, namely electrothermal atomic absorption spectrophotometry (ETAAS)[1], which is the most widely used. This technique is very expensive, though, as far as its purchase and daily use are concerned. Flame atomic absorption spectrophotometry (FAAS) is much cheaper and less complex in terms of handling, but its sensitivity is too low for this type of determination. Therefore, a preconcentration procedure is required both for minimizing the matrix interferences and improving the detection limit. The preconcentration of heavy metals in natural water has been performed by means of evaporation, solvent extraction[2,3], ion-exchange and chelating resins[4–7] as well as coprecipitation.[8] When automating these procedures in continuous-flow units, faster determinations and a better quality of results are attained.

Automatization by preconcentration in a homogeneous medium, called liquid-phase polymer-based retention (LPR)[9–12], is also proposed. It consists of using soluble polymers, such as poly(vinylpyrrolidone), that perform selective complexation of the ion that is being concentrated according to the solution pH. The addition of a soluble polymer to the sample enables a more effective retention of the species intended by means of sample ultrafiltration. Although this automatization procedure is much more expensive than continuous-flow techniques, the polymers used are rather cheap when compared to the resins similarly employed in continuous flows.

The present work reports on the behavior of poly(vinylpyrrolidone) when used for the preconcentration of lead in the heterogeneous stage and continuous-flow conditions. Hence, the coupling of an analytical unit to a simple sequential injection analysis system has been studied and is being proposed. It is common knowledge that sequential injection analysis is a third-generation flow technique[13] characterized by being more robust and versatile regarding the variation of the analytical conditions. Therefore, a preconcentration procedure based on easily implemented analytical columns may be very advantageous, because the feeble optimization of the columns can be overcome by the hydrodynamic conditions featured by the SIA systems.

Experimental

Reagents and solutions

All solutions were prepared with bideionized water (conductivity <0.1 μS/cm) and analytical-grade reagents without any further treatments.

Lead calibrating solutions were prepared by dilution with water from a stock solution of 1 g/l lead previously prepared with $Pb(NO_3)_2$. The pH of the calibrating solutions was set to the average level attained from the samples (pH=3) by adding 2 mol/l HNO_3.

For the interference assays, lead calibrating solutions with different concentrations of the interferent were prepared from stock solutions of 1 g/l previously attained by weighing and diluting the following substances: $Li_2SO_4 \cdot H_2O$, KH_2PO_4, $NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, $Ba(NO_3)_2$, $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$, $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ and $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$.

† To whom correspondence should be addressed.

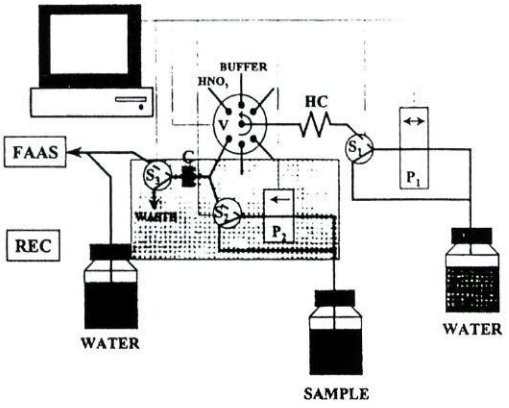


Fig. 1 Sequential injection manifold used. P_1, P_2=peristaltic pumps; S_1, S_2, S_3=solenoid valves; V=multiposition valve; HC=holding coil; C=filter holder for PVP; FAAS=flame atomic absorption spectrophotometer; REC=recorder.

Two buffer solutions of 0.05 and 0.5 mol/l KH_2PO_4 were prepared and the pH set to 7 with a 1 mol/l KOH solution that had been prepared from the corresponding solid. Lead preconcentration was carried out in polymerized poly(vinylpyrrolidone) (Sigma, ref. P-6755).

Apparatus

The SIA manifold developed is plotted in Fig. 1. This manifold comprises the SIA/FAAS system with a configuration already known[13] that was particularly fitted with a Cheminert™ NAW0023 8-way valve (Valco Instruments, Houston). In order to achieve maximum reproducibility of fluid drive in the manifold, a solenoid valve (S_1) was placed between the peristaltic pump and the holding coil. This valve was activated by establishing electric contact on an electronic switch placed in a defined position of the rotating head of the peristaltic pump.

The passage towards the detector was coupled with a preconcentration device (bold) comprising an Ismatec SA Mini-S 840 peristaltic pump equipped with a PVC Gilson propulsion tube (2.0 mm i.d.) and two NResearch 161 T031 3-way solenoid valves (Stow, MA).

The polymer column was constructed by conditioning the PVP between two filter paper discs and a PTFE ring on a stainless-steel filter holder with 11 mm of inner diameter (Schleicher & Schuell, Ref. FM 013/0). The detector was equipped with a lead super lamp (Photron, P828S) and the measurements were made at 283.3 nm.

The reference procedure was carried on an electrothermal atomic absorption spectrophotometer, from Perkin Elmer Model 4100ZL, with a Zeeman-effect background correction.

Working conditions of the system presented

The preconcentration unit coupled to the SIA/FAAS system comprises a peristaltic pump (P_2) that assures sample flow. The S_2 solenoid valve allows either sample flow through the polymer C column while it is actuated, or just flow back to the flask. Preconcentration occurs throughout this step when the sample is discarded to the waste through the S_3 valve. Confluence X promotes the addition of reagents to the sample flow and for the cleaning of the path comprising the polymer column or for the discharge of an eluent. At this last stage, the S_3 valve actuation enables the flow of the eluted to the detector.

Placing the preconcentration device straight into the detector channel with the support of two 3-way solenoid valves allows the preconcentration and elution steps to occur by propulsion of the solutions through the column.

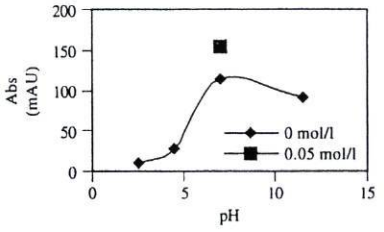


Fig. 2 Influence of the pH on the absorbance. The point above the curve represents the absorbance of a 5.00 mg/l Pb(II) calibrating solution prepared in a 0.05 mol/l KH_2PO_4 buffer solution with a pH of 7 units.

Results and Discussion

Due to the low granulometry of the present polymer and its swelling when hydrated, some trials were required and, therefore, the polymer was conditioned between two filter paper discs in a stainless-steel filter holder. The polymer mass used was controlled by the diameter and thickness of a PTFE ring placed between the discs. The inner diameter of the ring was formerly set to 10 mm and its thickness to 1.5 mm, allowing the conditioning of about 12 mg PVP. Under these conditions, the hydrodynamic and chemical conditions enabling the maximum preconcentration of lead on the polymer, were assessed and optimized. The pH effect was first evaluated, since this is rather important for lead retention.[12] Lead solutions with a volume of about 1.8 ml and a 5.00 mg/l concentration were used at a 2.0 ml/min flow rate and with the pH adjusted from 2.5 to 11.5 by the addition of a 0.1 mol/l NaOH solution. Elution was accomplished with 1 ml of a 2 mol/l HNO_3 solution that flowed at a rate of 5.5 ml/min. It was found that lead retention increased proportionally to the pH, the maximum being achieved at pH 7 (Fig. 2), as already shown by some other authors when a soluble polymer was used.[12] Resort to a phosphate buffer solution with a concentration of 0.05 mol/l enabled more strict control of the pH, and hence a 30% increase of

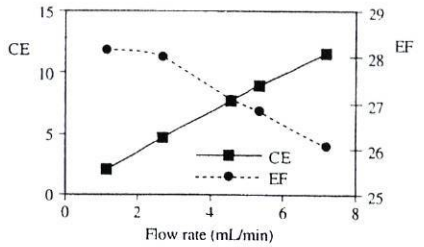


Fig. 3 Effect of the preconcentration flow rate. The dark line plots the concentration efficiency (CE), whereas the outline represents the enrichment factor (EF).

the analytical signal intensity was observed.

The flow rate of the sample stream through the polymer filter was also studied, and it was found that flow rates of between 1 and 8 ml/min caused a proportional decrease of lead retention (Fig. 3). This derived from the briefer contact of the lead sample with the PVP. This decrease was more significant at flow rates higher than 3 ml/min, which advised using flow channels through the polymer. As the concentration efficiency, defined as the product of the sampling rate (in min) and the enrichment factor[14], increased in a proportional manner within the same time interval, the flow rate was set to about 5.2 ml/min for the next trials.

The versatility of the SIA system was then explored by setting the solution pH to 7 inside the system without compromising the established flow rate. Therefore, the array of the analytical cycle was changed, two new steps being thus inserted. The first promoted the aspiration of the buffer solution through port 1 towards holding coil. The next step consisted in pumping the content of the holding coil through port 8 so that it merged at confluence X with the sample intended for preconcentration. Shorter times were accomplished for the preconcentration step by increasing the buffer solution concentration and diminishing its flow rate when being added to the sample. The selection of a 0.5 mol/l KH_2PO_4 buffer solution propelled at a 0.52 ml/min flow rate enabled water samples acidified to pH 3 with HNO_3 and propelled at 5.2 ml/min flow rates to be adjusted to neutral pH.

After optimizing the lead retention, the chemical and hydrodynamic characteristics of the elution step were also evaluated by lowering the pH of the liquid phase in contact with the polymer. Therefore, a 5.00 mg/l lead calibrating solution was used for the assessment of the optimal HNO_3 volume and concentration to attain a full elution. HNO_3 concentrations of less than 0.1 mol/l caused a higher elution in a very short time, though it was still not complete. The highest elution was achieved using a 0.1 mol/l HNO_3 solution with a volume higher than 100 µl when propelled through the filter. The lowest volume was reduced to 50 µl after increasing the acid concentration to 2 mol/l.

The final evaluation was related to the effect of the polymer amount immobilized on the filter. It was found that using a 5 ml solution presenting 5.00 mg/l lead and an amount of PVP between 1 and 25 mg produced a decrease of the analytical signal. This feature imposed the use of a higher volume for the eluted that was required for the complete removal of the lead retained. An amount of 12 mg PVP was thus chosen and conditioned as previously described in a 11 mm i.d. filter holder. With such an amount of PVP, about 500 determinations were possible without any decrease in its retention characteristics. The polymer capacity, defined as the lead mass retained per resin mass unit, was assessed by passing a fixed volume of a 5 mg/l lead-calibrating solution through a fixed mass of PVP. The absorbance of the lead non-retained solution was measured by flame atomic absorption and the amount of lead in the solution determined in a conventional calibration curve. The polymer capacity for lead retention was 135 mg/g PVP.

Lead determination in natural waters

The implementation of the system developed for the analysis of lead in natural waters was based on the former evaluation of this methodology regarding the influence of other species present in waters. Hence, 13 ml of 0.50 mg/l lead solutions presenting the probable interferents were preconcentrated. The metals usually present in natural waters in larger amounts are Ca and Mg, and are thus the strongest interferents. For studying the Ca effect, 0.5 mol/l of KH_2PO_4 buffer was added at a flow rate of 0.52 ml/min, which produced a solution presenting a compromise between precipitation and calcium complexation by the action of HPO_4^{2-}. Therefore, occlusion of the tubing and polymer saturation with $CaHPO_4$ were both minimized. Tolerance of the present methodology to 200 mg/l Ca solutions was thus accomplished. The study of Mg interference was much more complex, since it wasn't precipitated by the HPO_4^{2-}, and consequently caused a sudden saturation of the polymer. The tolerance achieved was about 50 mg/l in Mg. This evaluation was also carried out for Ba, Li, Na and K, and better tolerances were found, namely 5 mg/l in Ba, 10 mg/l in Li, 1 g/l in Na and 1 g/l in K.

The tolerances attained for the transition metals were 5 mg/l in Mn, 3 mg/l in Ni, 2 mg/l in Co, 1 mg/l in Cd, 1 mg/l in Cu, 1 mg/l in Zn, 2 mg/l in Fe(II) and Fe(III) and 0.5 mg/l in Al. It was found that some of these levels could be increased by using masking agents, such as thiourea for Cu and Zn and fluoride for Fe.

The conditions presented in Table 1 were used for the determination of the lead content in 16 natural water samples. The attained results (Table 2) were compared to those given by the conventional procedure; thus, the relationship $[SIA]_{\mu g/l}=1.00(\pm0.02)\times[REF]_{\mu g/l}-0.3(\pm4.2)$ ($r^2=0.998$) was obtained with relative deviations less than 5%. The recovery rates (Table 3) attained after trials on 4 samples were between 96 and 101%. Table 4 presents the properties of the system proposed with special attention to the detection limit and high sensi-

Table 1 Selected conditions for the determination of lead in natural waters

Port	Stage		Direction	Time/s	Flow rate/ml min^{-1}	Volume/ml
1	buffer		aspiration	26	3.0	1.30
8	preconcentration	buffer	propulsion	150	0.52	1.30
		sample			5.2	13
8	H_2O		propulsion	15	3.0	0.75
2	HNO_3		aspiration	5	1.0	0.083
8	elution		propulsion	30	5.5	2.75

Table 2 Results (μg/l) obtained in the determination of lead in natural waters

Sample	ETAAS	SIA/FAAS	Relative error, %
1	63.0±0.1	60±2	−4.8
2	35.4±0.1	36.8±1.4	4.0
3	16.4±0.1	17.0±1.5	3.6
4	50.5±0.6	48.2±1.5	−4.6
5	49.7±0.3	50.4±0.9	1.4
6	18.5±0.1	18.3±0.7	−1.1
7	367±2	368±3	0.3
8	184.0±0.5	186±2	1.1
9	198±1	201±3	1.5
10	215.0±0.1	206±1	−4.2
11	349±1	346±4	−0.9
12	323±3	329±3	1.8
13	256±1	251±3	−2.0
14	285±2	282±4	−1.1
15	272±1	280±3	2.9
16	140±2	144±3	2.9

The standard deviation obtained from three consecutive determinations.

Table 3 Recovery results

Sample	Added/μg	Found/μg	Relative error, %
A	70.0	70.1	100.2
B	100.0	99.8	99.8
C	50.0	50.8	101.5
D	70.0	67.7	96.7

Table 4 Analytical performance of the developed SIA system

Element	Lead
Volume/ml	13
Sensitivity/μg l^{-1}	16.4
Detection limit[a]/μg l^{-1}	4.9
Quantification limit/μg l^{-1}	11.8
Upper limit/μg l^{-1}	400
Enrichment factor	60
Sample rate/h^{-1}	16

a. Defined as 3σ of the blank divided by the slope of the calibration curve.

tivity.

The precision of the methodology developed was assessed by running ten replicate determinations in four samples presenting concentrations between 50 and 400 μg/l, thus providing a relative standard deviation of less than 3%.

Because PVP is an inexpensive polymer that promotes a good retention of lead, it represents a good alternative to the commercially available resins. Being conditioned in a thin filtering layer contributes to easily widening the range of applicability of the analytical methods based on SIA to the lead preconcentration. ETAAS levels can be accomplished at much lower costs depending on the sample preconcentrated volume.

The authors wish to thank Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) for its financial support under the project PBIC/C/QUI/2162/95, and the Ph. D. grant (Praxis XXI/BD/9544/96) conceded to Rui C. C. Costa.

References

1. L. Ebdon, A. S. Fisher, S. J. Hill, and P. J. Worsfold, *J. Autom. Chem.*, **13**, 281 (1991).
2. A. A. Ramirez, D. Gázquez, I. M. Rosa and F. Moreno, *Anal. Lett.*, **27**, 1595 (1994).
3. I. Facchin and C. Pasquini, *Anal. Chim. Acta*, **308**, 231 (1995).
4. R. Purohit and S. Devi, *Anal. Chim. Acta*, **259**, 53 (1992).
5. J. Ruzicka and A. Arndal, *Anal. Chim. Acta*, **216**, 243 (1989).
6. M. Torre and M. L. Marina, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **24**, 327 (1994).
7. S. Olsen, L. C. R. Pessenda, J. Ruzicka and E. H. Hansen, *Analyst*[London], **108**, 905 (1983).
8. P. Martínez-Jiménez, M. Gallego and M. Valcárcel, *Analyst*[London], **112**, 1233 (1987).
9. K. Geckeler, E. Bayer, B. Ya. Spivakov, V. M. Shkinev and G. A. Vorob'eva, *Anal. Chim. Acta*, **189**, 285 (1986).
10. K. Geckeler, G. Lange, H. Eberhardt and E. Bayer, *Pure Appl. Chem.*, **52**, 1883 (1980).
11. V. M. Shkinev, V. N. Gomolitskii, B. Ya. Spivakov, K. E. Geckeler and E. Bayer, *Talanta*, **36**, 861 (1989).
12. K. Geckeler, E. Bayer, V. M. Shkinev and B. Ya. Spivakov, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **333**, 763 (1989).
13. A. N. Araújo, R. C. C. Costa, J. L. F. C. Lima and B. F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, **358**, 111 (1998).
14. Z. Fang, "*Flow injection and preconcentration*", VCH Publishers, New York, 1989.

(Received April 16, 1999)
(Accepted July 1, 1999)

DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES VESTIGIÁRIAS DE COBRE EM ÁGUAS NATURAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA EM CHAMA USANDO UM SISTEMA SIA COM UMA COLUNA DE POLI(ETILENIMINA)

QUÍMICA NOVA: ACEITE PARA PUBLICAÇÃO

DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES VESTIGIÁRIAS DE COBRE EM ÁGUAS NATURAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA EM CHAMA USANDO UM SISTEMA SIA COM UMA COLUNA DE POLI(ETILENIMINA)

Rui Cerdeira de Campos Costa e Alberto da Nova Araújo*

CEQUP/Dep. Química-Física, Faculdade de Farmácia U.P., Rua Aníbal Cunha, 164, 4050 Porto, Portugal

Resumo

Neste artigo propõe-se a determinação de baixos teores de cobre em amostras de água natural para consumo doméstico utilizando um sistema SIA com detecção por Espectrofotometria de Absorção Atómica em chama. A determinação baseia-se na retenção de cobre numa coluna com 29 mm de comprimento e 1,6 mm de diâmetro interno, empacotada com partículas de sílica gel revestidas com poli(etilenimina). Utilizando cerca de 3,85 ml de amostra era possível alcançar o limite de detecção de 0,27 μg/l e o ritmo de amostragem aproximado de 24 amostras/h. A comparação com a espectrofotometria de absorção atómica com atomização eletrotérmica conduziu à relação $[SIA]_{\mu g/l}$ = 1,00 (± 0,04) * $[ETAAS]_{\mu g/l}$ – 0,16 (± 3,31), após análise de 12 amostras. A repetibilidade do sistema foi igualmente avaliada tendo-se obtido o desvio padrão relativo de 1,3% após efectuar dez determinações consecutivas sobre a mesma amostra contendo 71 ± 1 μg/l em cobre.

Palavras Chave: SIA/FAAS, Cobre, Poli(etilenimina)

* Autor para correspondência; Tel.: +351-2-2087132; Fax: +351-2-2003977; e-mail: anaraujo@mail.ff.up.pt

Introdução

A Espectrofotometria de Absorção Atómica com atomização por chama (FAAS) é uma técnica instrumental relativamente dispendiosa embora apresente boa selectividade e robustez na análise elementar. É por isso mesmo uma das técnicas mais utilizadas na determinação de espécies metálicas na generalidade das matrizes.

A tendência actual para baixar os teores máximos admitidos por lei para certas espécies em matrizes para consumo humano, tem reduzido o número de situações em que se recorre à FAAS, pois frequentemente os valores estão abaixo dos limites de detecção possíveis com a atomização por chama. O cobre presente em amostras de água natural para consumo doméstico é precisamente um dos metais que se enquadra nesta descrição. O desenvolvimento de procedimentos extractivos sejam eles em fase líquida ou sólida tem constituído uma alternativa eficaz para solucionar esta dificuldade. Não obstante, é sabido que a execução manual de tais procedimentos pode ocasionar contaminação das soluções e a obtenção de resultados erróneos ou pouco reprodutíveis. No sentido de tornar mais simples a implementação destas metodologias, tem-se recorrido aos sistemas de fluxo contínuo, principalmente os baseados na técnica de Análise por Injecção em Fluxo (FIA)[1,2,3]. Dos diversos procedimentos extractivos conhecidos, a maioria dos autores tem mostrado maior preferência pelos procedimentos de extracção em fase sólida, fundamentalmente pela simplicidade com que as resinas são acondicionadas em coluna, pela maior simplicidade dos sistemas e pelo carácter menos poluente dos procedimentos[1]. Embora se tenham experimentado diversos tipos de resinas[1], as resinas quelantes[4,5] e as de troca iónica[6,7] têm sido as mais utilizadas, pois contribuem para o aumento da selectividade da determinação.

Atendendo à selectividade da FAAS pode-se alternativamente recorrer ao emprego de materiais mais económicos na retenção das espécies a determinar. Dando sequência a um trabalho que se vêm efectuando no sentido de rentabilizar o emprego de materiais poliméricos de baixo custo na retenção de metais pesados[8], apresenta-se neste trabalho o estudo do desempenho da poli(etilenimina) imobilizada em partículas de sílica gel na pré-concentração de

cobre. Com base nos resultados obtidos, desenvolveu-se um procedimento analítico automático visando o controlo daquele metal em águas naturais para consumo doméstico. Para o efeito, propõe-se um sistema baseado na técnica de Análise por Injecção Sequencial (SIA)[9] com detecção por FAAS (SIA/FAAS), devido à simplicidade com que a técnica SIA permite condicionar a amostra para a etapa de retenção, bem como o conhecimento exacto dos volumes que estão envolvidos nas diferentes fases do procedimento analítico.

EXPERIMENTAL

Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água bidesionizada (condutividade < 0,1 µS/cm) e reagentes *pro analysi*.

As soluções de calibração contendo cobre foram preparadas a partir de uma solução *stock* comercial com 1000 ± 2 mg/l em Cu (*BDH*, *Spectrosol* ref.14139) por diluição rigorosa com água bidesionizada.

Para a pré-concentração de cobre utilizaram-se colunas de acrílico com comprimento entre 13 e 33 mm e diâmetro interno de 1,6 e 2,9 mm, sendo o seu leito preenchido com uma suspensão aquosa de partículas de gel de sílica com dimensões entre 40 e 200 mesh, revestidas com poli(etilenimina) (PEI) (*Aldrich*, ref. 00920KZ). Para evitar a perda de partículas de resina para o sistema colocou-se nas extremidades das colunas filtro de polietileno com 35 µm de diâmetro de poro (*Mobitec*).

Para ajustar o pH das amostras ao valor de 7 unidades no interior do sistema, utilizou-se uma solução tampão de KH_2PO_4 na concentração 0,5 mol/l preparada a partir do sólido correspondente, cujo pH foi acertado a 7 com uma solução 2 mol/l de KOH.

Como eluente utilizou-se uma solução de HNO_3 na concentração de 2 mol/l.

Equipamento

O sistema SIA utilizado é representado na Figura 1. Nele se pode visualizar a configuração básica já descrita em 10 e que consta de uma bomba peristáltica *Gilson Minipuls 3* (P_1), um reactor de armazenamento (RA) constituído por tubo de PTFE com 600 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno, uma válvula multiposição selectora de fluidos (V) com oito portas da *Valco Instruments* (Houston, USA), modelo *Cheminert™ C15-3118E*, um espectrofotómetro de absorção atómica com atomização por chama (FAAS) *Pye Unicam SP9* e um registador *Kipp & Zonen* (REG).

Colocou-se entre ao reactor de armazenamento (RA) e a bomba peristáltica (P_1) uma válvula solenóide de três vias para reduzir a inércia dos fluidos no interior do sistema. Um dispositivo eléctrico disposto sob a cabeça rotativa da bomba, e consistindo numa barra de cobre com 10 cm de comprimento e dois pontos fixos ligados à terra e a uma entrada digital de interface electrónica *Advantech PCL 711S* permitia a activação da válvula meia revolução após o início de cada etapa.

O módulo de pré-concentração foi instalado na linha de transmissão do detector (FAAS), e consistia de uma bomba peristáltica (P_2) da *Ismatec*, modelo *SA Mini-S 840* equipada com um tubo de impulsão em PVC da *Gilson* com 1,14 mm de diâmetro interno e duas válvulas solenóides de três vias (S_1, S_2) *NResearch*, modelo *161 T031*.

Para a realização do procedimento de comparação recorreu-se a um espectrofotómetro de absorção atómica, com atomização electrotérmica em forno de grafite, da marca *Perkin Elmer*, modelo *ZL 4100*.

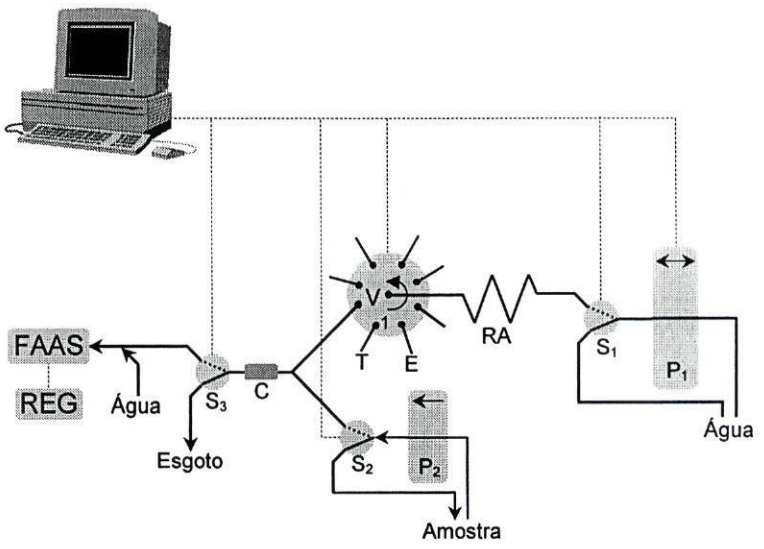


Figura 1 Representação esquemática do sistema SIA desenvolvido. P_1, P_2 – bombas peristálticas; V – válvula multiposição selectora de fluidos; T – solução tampão; E – solução de HNO_3; C – coluna contendo a PEI; RA – reactor de armazenamento; S_1, S_2, S_3 – válvulas solenóides de três vias; FAAS – espectrofotómetro de absorção atómica em chama; REG – registador.

Métodos

Na Tabela 1 indicam-se as condições seleccionadas para a determinação de cobre em amostras de água natural para consumo doméstico. Antes de se iniciar a realização das determinações, a coluna contendo a resina era lavada com cerca de 1 ml de solução 2 mol/l em HNO_3, aspirado a partir da porta 4 e cerca de 2 ml de água bidesionizada utilizada como fluido transportador no sistema.

Para efectuar a determinação de Cu em amostras de água natural, procedia-se inicialmente à aspiração a partir da porta 1, da solução tampão de fosfato para o reactor de armazenamento. Seguidamente, o sentido do escoamento no interior deste era invertido e a

válvula S_2 activada de modo a possibilitar a convergência da solução da amostra propulsionada pela bomba P_2 com a solução tampão antes da entrada na coluna contendo a resina. Após a etapa de pré-concentração, a válvula S_2 era desactivada permitindo novamente a recirculação da amostra para o recipiente que a continha, enquanto a bomba P_1 assegurava a propulsão de água através da coluna para o dreno com o objectivo de a limpar. Na etapa seguinte, o eluente era aspirado a partir da porta 4 para o reactor de armazenamento e enviado de seguida, por activação da válvula S_3, através da coluna para o detector.

Tabela 1 Condições seleccionadas para a determinação de Cu em águas naturais.

Porta	Etapa	Direcção	Tempo (s)	Caudal (ml/min)	Volume (µl)
1	Tampão	Aspiração	23	3.0	1150
	Tampão			1.0	1000
8	Pré-concentração	Propulsão	60		
	Amostra			3.85	3850
8	H_2O	Propulsão	20	3.0	1000
2	HNO_3	Aspiração	5	3.0	250
8	Eluição	Propulsão	40	4,0	2667

A avaliação comparativa da qualidade dos resultados obtidos com o sistema SIA foi efectuada recorrendo-se à Espectrofotometria de Absorção Atómica com atomização electrotérmica (ETAAS). As amostras eram previamente sujeitas a uma etapa de diluição com HNO_3 a 0,2% (m/v) de modo a que o seu teor se encontrasse dentro do intervalo de resposta

linear da instrumentação usada (<40 μg/l)[11]. O ciclo analítico consistia numa etapa de secagem dividida em duas partes, a primeira a 110 ºC durante 21 s e a segunda a 130 ºC durante 35 s. As etapas seguintes correspondiam, respectivamente à pirólise efectuada a 1200 ºC durante 30 s e à atomização, efectuada a 1900 ºC durante 5 s. Finalmente o tubo de grafite era condicionado para receber uma nova amostra à temperatura a 2400 ºC durante 3 s.

Resultados e Discussão

Conforme referido na literatura, a poli(etilenimina) em fase homogénea é capaz de reter o Cu(II) por um mecanismo de quelatação com uma eficiência superior a 90% se o pH do meio for próximo da neutralidade[12]. Assim, para estudar as condições de pH que garantiam as melhores condições de retenção de Cu na poli(etilenimina) agora em fase sólida e operando em condições de fluxo, fez-se passar ao caudal aproximado de 1,18 ml/min cerca de 1 ml de diferentes soluções padrão com 0,50 mg/l em Cu através de uma coluna com 13 mm de comprimento e 1,6 mm de diâmetro interno, empacotada com 15,7 mg de PEI. Os valores de pH das soluções de cobre variaram entre 2 e 13 unidades por adição de volumes apropriados de solução de HNO_3 ou KOH 0,1 mol/l. O cobre retido era eluido com cerca de 1,66 ml de HNO_3 2 mol/l, fluindo para o detector através da coluna ao caudal aproximado de 4 ml/min. Os resultados obtidos, conforme mostra o gráfico da Figura 2, demonstraram que a retenção de Cu aumentava com o aumento do pH exibindo um máximo de retenção a pH 7, seguidamente decrescia para aumentar novamente a partir de pH 9 atingindo novamente um máximo para valores de pH superiores a 12 unidades, neste último caso provavelmente devido à retenção do precipitado de $Cu(OH)_2$. A realização deste ensaio com uma solução de calibração cujo pH tinha sido ajustado a 7 unidades com uma solução tampão de KH_2PO_4 a pH 7 na concentração de 0,05 mol/l, permitiu duplicar a eficiência do processo de retenção de cobre na resina.

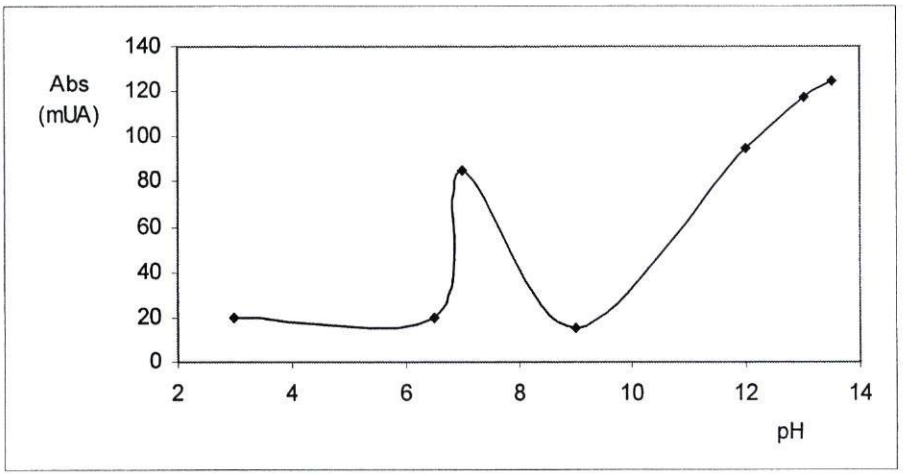


Figura 2 Influência do pH sobre a eficiência de retenção de uma solução padrão com 0,50 mg/l em cobre.

Seguidamente procedeu-se ao estudo da influência do caudal sobre a eficiência de pré-concentração de cobre na resina no intervalo entre 1,18 e 5,22 ml/min. Observou-se, conforme se pode constatar pela Figura 3, uma redução progressiva da intensidade do sinal analítico com o aumento do caudal de pré-concentração, enquanto a eficiência de concentração, definida como o produto do factor de enriquecimento pelo ritmo de amostragem[1], aumentava no mesmo intervalo. Fixou-se o caudal 3,85 ml/min como o melhor compromisso entre sensibilidade e ritmo de amostragem.

De modo a rentabilizar a versatilidade que normalmente é permitida com as montagens baseadas na técnica SIA, procedeu-se à avaliação das condições de ajuste de pH no interior do sistema, por adição de uma solução tampão, mais adequadas a uma máxima retenção de cobre na resina, tendo sempre presente o não comprometimento da eficiência de retenção por aumento do caudal através da coluna durante a etapa de pré-concentração. Nesse sentido, preparou-se uma solução de hidrogenofosfato 0,5 mol/l a pH 7 e pré-concentrou-se cerca de

3,85 ml de uma solução padrão com 0,1 mg/l em cobre ao caudal de 3,85 ml/min aos quais era adicionada a solução tampão a caudais variando entre 0,1 e 2 ml/min. Deste ensaio constatou-se que apenas com a adopção de um caudal próximo de 1 ml/min era possível a obtenção de sinais analíticos com amplitude idêntica à obtida com as soluções de cobre, preparadas em solução de hidrogenofosfato 0,05 mol/l a pH 7.

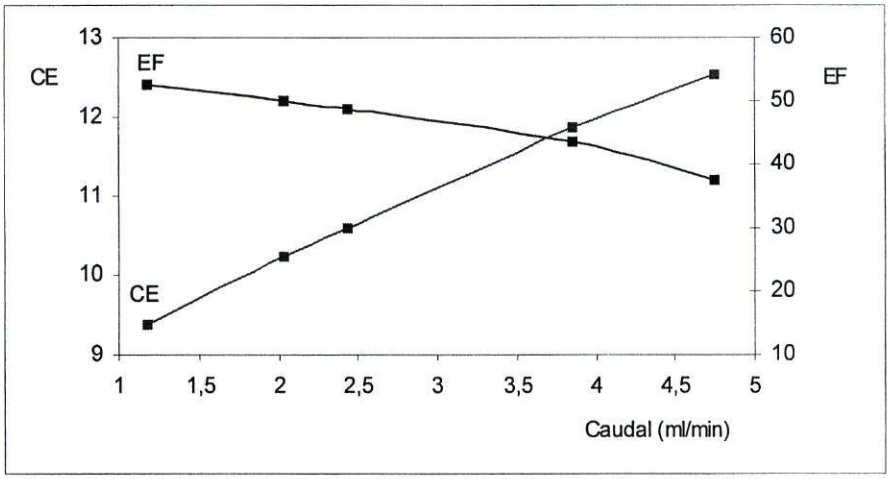


Figura 3 Influência do caudal de pré-concentração de uma solução padrão com 0,50 mg/l em cobre sobre o factor de enriquecimento (EF) e a eficiência de concentração (CE).

Outro dos aspectos estudado foi a quantidade de resina usada nos ensaios. Experimentaram-se, com as condições seleccionadas nos estudos anteriores, colunas com um diâmetro interno de 1,6 mm e comprimento de 13 (15,7 mg de PEI), 23 (27,7 mg) e 29 mm (34,98 mg), e colunas com 2,9 mm de diâmetro interno e comprimento de 20 (79,26 mg), 26 (103 mg) e 33 mm (130,8 mg). Observou-se para os dois calibres em estudo que a amplitude de sinal analítico aumentava com o comprimento das colunas. No caso das colunas de maior

calibre, o sinal atingia um máximo para a de comprimento intermédio, sendo o seu valor idêntico ao obtido com a coluna mais comprida dentro do grupo das de menor calibre. Com base nestes resultados seleccionou-se a coluna que necessitava de uma menor quantidade de resina, isto é, a de 29 mm de comprimento e 1,6 mm de diâmetro interno.

Relativamente à concentração do eluente, constatou-se que, para o caudal de eluição compatível com as condições de máxima sensibilidade da FAAS, 4 ml/min no presente caso, a máxima amplitude de sinal analítico apenas ocorria quando se utilizavam soluções de HNO_3 com concentração superior a 2 mol/l e um volume mínimo de aproximadamente 170 μl. Por uma questão de segurança usou-se um volume de cerca de 250 μl.

Tal como acontece com qualquer resina quelante, a PEI apesar de apresentar grande afinidade para o cobre também consegue reter outros metais que habitualmente estão presentes em amostras de água natural para consumo doméstico. Assim sendo, procedeu-se à avaliação da tolerância da resina a outras espécies metálicas através da pré-concentração de cerca de 4 ml de soluções padrão com 0,1 mg/l em cobre e interferente em diferente concentração. Após a realização de diversos estudos, verificou-se que a amplitude de sinal analítico não sofria redução para concentrações da ordem de 200 mg/l em Ca, 50 mg/l em Mg e concentrações superiores a 2 mg/l em Zn, Mn, Co, Ni, Al, Cd, Pb, Cr, Fe(II) e Fe(III).

A capacidade de ruptura do polímero, definida como a quantidade máxima da espécie a determinar retida por unidade de massa do polímero[13], foi determinada quer em modo discreto quer em fluxo, tendo-se obtido respectivamente os valores de 43,4 e 10,4 mg/g de resina. Finalmente, apresentam-se na Tabela 2, algumas das características da montagem desenvolvida, onde se pode constatar que um volume de cerca de 4 ml de amostra permite obter uma sensibilidade suficiente para analisar amostras com uma gama de concentrações inferior a 150 μg/l.

Tabela 2 Desempenho analítico do sistema SIA desenvolvido.

Elemento	Cu
Volume	3850 µl
Limite de detecção	0.27 µg/l
Limite de quantificação	0.90 µg/l
Concentração característica	4,1 µg/l
Intervalo de linearidade	0,90 -- 150 µg/l
Factor de enriquecimento	19,5
Ritmo de amostragem	24 amostras/h

Aplicação à análise de amostras de água natural

Para avaliar a qualidade dos resultados fornecidos com a montagem proposta, procedeu-se com as condições indicadas na Tabela 1, à análise de 12 amostras de água natural de bebida (Tabela 3), cujas concentrações foram igualmente determinadas por ETAAS. Os pares de resultados obtidos com as duas metodologias permitiu estabelecer a relação $[SIA]_{\mu g/l} = 1,00\ (\pm\ 0,04)*[ETAAS]_{\mu g/l} - 0,16\ (\pm\ 3,31)$, com desvios relativos inferiores a 5% (Tabela 3). Após a aplicação do teste de t-student emparelhado para um nível de confiança de 95%, constatou-se igualmente não existirem diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos com as duas metodologias.

Tabela 3 Resultados (μg/l) obtidos na determinação de Cu em águas naturais pelos procedimentos automático (SIA/FAAS) e de referência (ETAAS), e o respectivo erro relativo em percentagem (ER).

Amostra	ETAAS	SIA/FAAS	ER(%)
1	66 ± 2	66 ± 1	0
2	24,3 ± 0,7	23,2 ± 0,3	-4,5
3	74 ± 2	74,5 ± 0,4	0,7
4	133,4 ± 0,2	131 ± 1	-1,8
5	122 ± 1	126 ± 1	3,3
6	29,7 ± 0,3	28,6 ± 0,1	-3,7
7	12,6 ± 0,3	12,7 ± 0,2	0,8
8	59,9 ± 0,2	61 ± 1	1,8
9	98 ± 2	94 ± 2	-4,1
10	99,0 ± 0,2	102 ± 1	3,0
11	146 ± 1	143 ± 2	-2,0
12	46,4 ± 1,2	47 ± 1	1,3

Desvio padrão obtido a partir de três determinações consecutivas.

A repetibilidade da metodologia proposta foi avaliada realizando-se dez determinações consecutivas sobre uma amostra cujo teor em cobre rondava os 71 ± 1 μg/l, tendo-se obtido um desvio padrão relativo de 1,3 %.

A grande afinidade da PEI para o cobre aliado à grande sensibilidade que a FAAS apresenta comparativamente a outros elementos metálicos, constitui uma combinação que se traduz em ganhos económicos e de ritmo de amostragem comparativamente com a ETAAS na determinação de teores de Cu em amostras de água natural para consumo doméstico.

Agradecimentos: à *Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)* pelo apoio financeiro prestado através do contrato *PRAXIS/P/AGR/10184/1998*, e pela Bolsa de Doutoramento *(PRAXIS XXI/BD/9544/96)* concedida a um de nós (Rui C.C. Costa).

Referências Bibliográficas

1 Z. Fang, Flow Injection Separation and Pre-concentration, 1993, VCH Publishers, New York

2 M. Valcárcel e M.D. Luque de Castro, Automatic Methods of Analysis; 1988, Elsevier; Amsterdam

3. J. Ruzicka e E.H. Hansen, Flow Injection Analysis, 2nd Edition; 1989, John Wiley & Sons; New York

4 S. Olsen, L.C.R. Pessenda, J. Ruzicka e E.H. Hansen, *Analyst*, **108**, 1983, 905

5 C.E.S. Miranda, B.F. Reis e N. Baccan, *Química Nova*, **19**, 1996, 623

6 J.L. Burguera, M. Burguera, P. Carrero, J. Marcano, C. Rivas e M.R. Brunetto, *J. Autom. Chem.*, **17**, 1995, 25

7 E.A.G. Zagatto, S.M.B. Brienza, A.Z. Arruda e A.O. Jacintho, *Química Nova*, **16**, 1993, 130

8 A.N. Araújo, R.C.C. Costa e J.L.F.C. Lima, *Anal. Sci.*, **15**, 1999, 991

9 J. Ruzicka e G.D. Marshall, *Anal. Chim. Acta*, **237**, 1990, 329

10 A.N. Araújo, R.C.C. Costa, J.F.F.C. Lima e B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, **358**, 1998, 111

11 A.D. Eaton, L.S. Clesceri e A.E. Greenberg, Standard Methods for the Examination of Water and Wastwater, 19th Edition, 1995, American Public Health Association; Maryland

12 K. Geckeler, E. Bayer, V.M. Shkinev, e B. Ya Spivakov, *Fresenius' Z Anal. Chem.*, **333**, 1989, 763

13 F. Helfferich, Ion Exchange, 1962, McGraw-Hill, New York

SOLID PHASE RETENTION WITH REVERSED ELUTION IN A SIA SYSTEM WITH DETECTION BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

IL FARMACO: ACEITE PARA PUBLICAÇÃO

SOLID PHASE RETENTION WITH REVERSED ELUITON IN A SIA SYSTEM WITH DETECTION BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

Rui Cerdeira de Campos Costa and Alberto Nova Araújo*

CEQUP/Dep. Química-Física, Faculdade de Farmácia U.P., Rua Aníbal Cunha, 164, 4050 Porto, Portugal

Abstract

The development of a preconcentration procedure based on Sequential Injection Analysis with Flame Atomic Absorption Spectrometry (SIA/FAAS) for the determination of Mn in water samples presenting a concentration between 4.50 and 200 μg/l is described. Mn is retained on-line on a strong cationic resin (AG 50W-X8) and eluted with a chelating solution. Accuracy of the results attained was assessed by comparison with electrothermal atomic absorption spectrometry providing the relationship $[SIA]_{\mu g/l}$ = 1.00 (±0.07)*$[ETAAS]_{\mu g/l}$ - 0.3 (± 7.6) after analysis of 10 samples.

Evaluation of repeatability give a relative standard deviation of 2.9% after ten replicate of a sample containing 108 μg/l Mn.

Key Words: SIA/FAAS, Water, Mn

* Corresponding author; Tel.: +351-2-2087132; Fax: +351-2-2003977; e-mail: anaraujo@mail.ff.up.pt

Introduction

Manganese is amongst the metals one of the most important to the metabolism of animals and plants. It acts as a redox catalyst in photosynthesis and as a Lewis acid in diverse enzymatic systems[1]. Nevertheless the exposure to excessive amounts of manganese may cause respiratory diseases and neuronal disorders[2]. As Mn is mainly assimilated through gastrointestinal tract, foods and beverages must be controlled for this metal periodically[3].

The enforcing law establishes a maximum content of 50 μg/l Mn for drinking waters and recommends the use of Atomic Absorption Spectrometry (AAS) as instrumental technique for its determination[3]. AAS based on the use of flame atomization (FAAS) enables to perform low cost determinations, although without the adequate sensitivity for the direct quantification of Mn at the before mentioned levels[4]. Therefore, resort to preconcentration procedures constitutes a versatile way to adjust the Mn concentrations in drinking waters to FAAS sensitivity[5].

In the past years, non-segmented continuous flow techniques, especially Flow Injection Analysis (FIA), have become more common concerning automation of extraction procedures[6]. For Mn evaluation several preconcentration procedures, namely those using chelating resins[7-9], ion-exchange resins[10,11], sorbent extraction[12], precipitation[13] and liquid-liquid extraction[14] have been proposed. Amongst these proposals, extraction with strong cationic resins is one of the most advantageous technique mainly due to the high retention capacity of metallic species[6,11,15]. Nevertheless, owing to the polymeric structure of the support to which the functional groups are linked, the resins tend to undergo volume variations depending on the characteristics of the solutions in contact with them, particularly acid or alkaline solutions, thus compromising the hydrodynamic performance of the systems. This fact imposes the use of very small columns. Moreover, it is well known that ion-exchange equilibrium is very slow mainly under flow conditions, due to diffusion of the ions through the reticular structure of the resin support[15]. The changes on the column size or on the flow conditions may be minimized either by performing reversed elution[6,16], or chemically by use of solutions of complex forming agents as eluents[11]. The increase of time contact between the eluent and the resin seems to be the better solution to

achieve good results in the optimization of the elution processes with slow ion-exchange equilibria. Unfortunately in the case of FIA technique it is difficult to achieve an accurate halt of the eluent on the column. On contrary Sequential Injection Analysis (SIA) technique is more versatile since it is based on the concept of programmed flow[17]. In this context, the resort to a SIA analytical set-up may provide a reliable way of integrating reversed flow extraction with the stopped flow aiming improvement of preconcentration procedures based on the use of ionic exchange resins.

EXPERIMENTAL

Reagents and Solutions

All solutions were prepared with bideionised water (conductivity less than 0.1 μS/cm) and analytical grade chemicals.

The standard solutions were prepared from a commercial stock solution presenting 1000 ± 2 mg/l Mn (*BDH Spectrosol*, ref.14144) by careful dilution in water.

For elution purposes, HNO_3 up to 8 mol/l solutions, ammonia up to 1 mol/l solutions, tri-ammonium citrate up to 0.4 mol/l solutions and, ammonium oxalate, di-ammonium tartrate, and EDTA up to 0.2 mol/l aqueous solutions were prepared.

The retention of Mn was accomplished by filling a 29x1.6mm id perspex column with particles of a strong cationic resin (*BioRAD AG 50W-X8*, ref.56082A) presenting a size between 50 and 100 mesh. At both endings of the column two discs of polyethylene filters of 35 μm were placed.

Apparatus

The manifold used (Figure 1) was based on the coupling of a heterogeneous phase extraction module to the SIA/FAAS manifold described before[13]. This consisted of a *Gilson Minipuls 3* peristaltic pump (P_1), a holding coil (HC) made of 600 cm x 0.8 mm id. PTFE tube, an 8-port multiposition fluid selecting valve (V) from *Valco Instruments* (Houston, USA), model *Cheminert™ C15-3118E*, and a *Pye Unicam SP9* flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS). The preconcentration device placed on-line with the detector was composed by an *Ismatec* peristaltic pump (P_2), model *SA Mini-S 840*, equipped with a 1.14 mm id PVC *Gilson* impulsion tube, a *NResearch* three way solenoid valve (S_2), model *161 T031*, and a *Reodyne* four way two positions valve (Vr), model *5020*, to which the resin column (C) was connected.

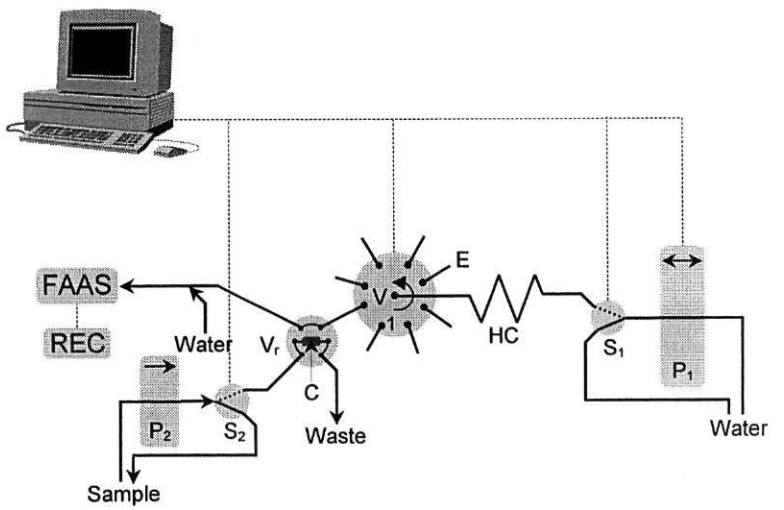


Figure 1 Schematic representation of the developed SIA system. P_1, P_2 – peristaltic pumps; V_1 – multiposition valve; E – eluent; Vr – four way rotatory valve; C – AG 50W-X8 column; HC – holding coil; S_1, S_2 – three way solenoid valves; FAAS – flame atomic absorption spectrophotometer; REC – recorder.

For comparison purposes, a *Perkin Elmer* model *ZL 4100* atomic absorption spectrophotometer with graphite furnace electrothermal atomization was used.

Methods

The developed procedure was carried out in 8 steps (Table 1), the total determination time being 222 s.

The resin column is first washed with about 1 ml of 0.4 mol/l tri-ammonium citrate solution aspirated from port 4 and with about 1 ml bideionized water used as carrier. At step 3, solenoid valve S_2 of the preconcentration device is actuated thus enabling the passage of the sample propelled by pump P_2 through the resin column. After this step, valve S_2 is switched off to the initial position to enable the flow of the sample back to its container, whilst pump P_1 propelled water through the column towards the waste aiming the washing of the same. At step 5, the two position valve is actuated and hence the direction of the solutions flow in the column is reversed directly to the detector, whereas the eluent is aspirated from port 4 towards the holding coil. The eluent is then propelled towards the column in which its flow is halted for 60 s to ensure a quantitative elution. Finally, the flow is reset and the eluate sent to the detection system.

Quality of the results attained by the proposed procedure was assessed by comparison with those given by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). The samples underwent a prior dilution step with 0.2% (w/v) HNO_3 to set their content within the linear response range of the instrumentation used (<20 $\mu g\ l^{-1}$)[4]. The analytical cycle consisted in a two-phase drying step, the first at 110 °C for 21 s and the second at 130 °C for 35 s. The following steps corresponded to pyrolysis at 1300 °C for 30 s and atomization at 2000 °C for 3 s, respectively. Finally, the graphite tube was conditioned at 2400 °C for 3 s.

Table 1 Selected conditions for the determination of Mn in natural waters.

Port	Step	Direction	Time (s)	Flow rate (ml/min)	Volume (µl)
4	Amonium Citrate	Aspiration	10	3.0	500
8	Waste	Propulsion	20	3.0	1000
8	Sample	Propulsion	80	4.0	5333
8	H_2O	Propulsion	7	3.0	350
4	Amonium Citrate	Aspiration	5	2.0	250
8	Elution	Propulsion	5	3.0	167
		Stop	60	0	0
		Propulsion	35	4.0	2333

RESULTS AND DISCUSSION

The present work started with the study of the adequate eluent. Therefore, a volume of 3.54 ml of a standard solution containing 250 µg/l Mn was propelled at a 3.54 ml/min flow rate through a 29x1.6 mm id column. After rinsing with 750 µl water, 2 ml of eluent was pumped through this column. Several chelating solutions were tried, namely ammonium oxalate, tri-ammonium citrate, di-ammonium tartrate, and EDTA solutions presenting a concentration of 0.2 mol/l, and the results compared with those attained with 8 mol/l nitric acid and 1 mol/l ammonia solutions. Under the selected conditions, it was found that none of the eluent solutions used promoted a complete elution, since with a second elution a second analytical signal was also produced. Apart from the EDTA solution, the remainder gave greater amplitude signals than those obtained with nitric acid or ammonia solutions. The oxalate solution enabled the attainment of signals with greater amplitude, although after a while it originated the obstruction

of the spectrophotometer nebulizer. The tri-ammonium citrate solution gave analytical signals with less 10% amplitude regarding those obtained with the oxalate solution, but without obstruction of the spectrophotometer nebulizer. By these reasons, this was selected as eluent in the following trials.

Knowing that complete elution was not accomplished in the former trials, the elution efficiency was optimised by halting the eluent in the column for interval times between 0 and 150 s. The signal increase proportional to the stop time within the 0 to 60 s time interval. No signal variation for times higher than 60 s were found. The elution efficiency increased also with the eluent concentration and volume just to 0.4 mol/l and about 170 μl. Considering this latter parameter, a volume of 250 μl was selected for security reasons, without compromising the sampling rate or the determination costs.

The optimisation of the Mn preconcentration conditions was also attempted by assessing the effect of the sample flow rate, pH and volume on the intensity of the analytical signal. The preconcentration flow rate is one of the most important parameters to be optimized in contínuous flow conditions. If, on one hand, an increased flow rate benefits the sampling rate, on the other, it worsens the retention process, as the contact between the analyte and the resin becomes shorter. For the assessment of the flow rate effect, 6 ml of a standard solution containing 250 μg/l Mn were propelled at flow rates ranging from 1.77 to 5.11 ml/min. As illustrated in Figure 2, the best compromise between analytical signal intensity and concentration efficiency defined as the product of the enrichment factor and the sampling rate expressed as number of samples per min[6], was found with a flow rate of about 4 ml/min.

As samples are usually acidified aiming their preservation, the pH effect on the extraction efficiency was evaluated under the optimized conditions referred before. After adjusting the pH of the solutions to the interval between 1 and 7 by adding adequate volumes of 0.1 mol/l HNO_3 or NaOH solutions, it was found that the signal amplitude was independent of the pH above 2.

Finally, taking into account that Mn contents in natural water samples could reach to 150 μg/l, the most adequate sample volume for the analysis of real samples was estimated.

Selecting a volume of 5.5 ml gave an enrichment factor of about 13 times and a detection limit of 1.35 μg/l (Table 2), that were adequate for the analyses of naturals waters.

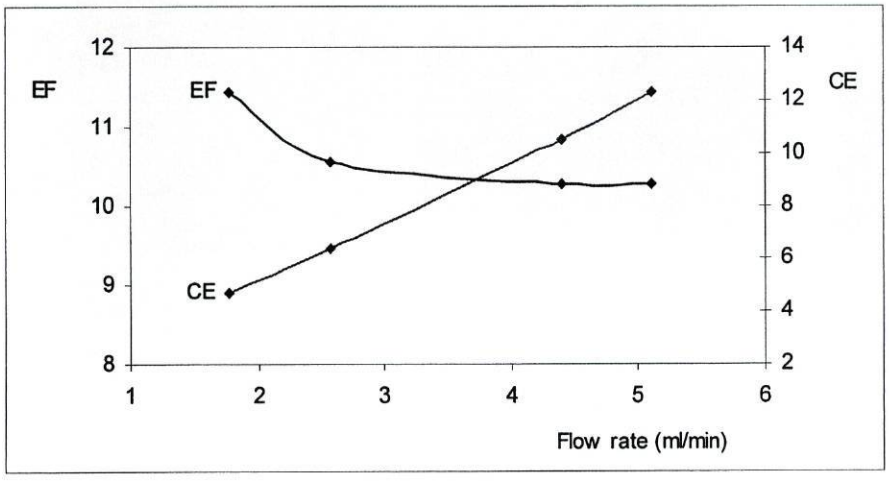


Figure 2 Effect of the pre-concentration flow rate of a 250 μg/l Mn standard solution on the enrichment factor (EF) and concentration efficiency (CE).

Table 2 Analytical performance of the developed SIA system.

Element	Mn
Volume	5500 μl
Detection limit	1.35 μg/l
Quantification limit	4.5 μg/l
Characteristic concentration	13.4 μg/l
Concentration range	4.5 – 200 μg/l
Enrichment factor	13,4
Sampling rate	16 samples/h

Application to the analysis of real samples

Accuracy of the results attained by the developed methodology was assessed, according to the conditions presented in Table 1, by analysis of 10 drinking water samples, whose concentrations were also determined by ETAAS. Using the results attained by both methodologies (Table 3), the relationship $[SIA]_{\mu g/l}$ = 1.00 (±0.07)*$[ETAAS]_{\mu g/l}$ - 0.3 (± 7.6) was established. Furthermore, the paired Student's t-test used for a confidence level of 95% ensured there were no significant statistic differences between the results provided by both methodologies. Repeatability of the proposed procedure was also assessed by performing ten successive determinations of a sample containing about 108 μg/l Mn for which a relative standard deviation of 2.9 % was obtained.

Tabela 3 Results (μg/l) obtained in the determination of Mn in naturals waters, using the SIA (SIA/FAAS) and reference (ETAAS) procedures, and the corresponding relative error (RE%).

Sample	ETAAS	SIA/FAAS	RE(%)
1	76 ± 3	74 ± 2	-2.6
2	125 ± 2	130 ± 2	4.0
3	118 ± 8	113 ± 3	-4.2
4	167 ± 9	166 ± 3	-0.6
5	70 ± 4	71 ± 2	1.4
6	63 ± 1	65 ± 2	3.2
7	94 ± 4	93 ± 2	-1.1
8	99 ± 1	103 ± 3	4.0
9	171 ± 2	173 ± 4	1.2
10	87 ± 5	84 ± 2	3.4

Standard deviation obtained from three consecutive determinations.

The proposed manifold enabled the advantageous combination of FAAS robustness and economy with the versatility and low consumption of solutions accomplished with SIA concept. The parameters analysed and the sampling rate achieved render it more economical than ETAAS in the determination of Mn in natural water samples. The reversed elution in addition to the use of chelating solutions enable to minimise the problems derived from chemical and hydrodynamic overpressure that usually occur when contínuous flow systems, e.g. FIA systems, are used, thus allowing the system to run for long time intervals in a reproducible manner.

Acknowledgements: to *Fundação para a Ciência e Tecnologia* (FCT) for its financial support under the project *PRAXIS/P/AGR/10184/1998*, and for the Ph.D Grant *(PRAXIS XXI/BD/9544/96)* conceded to one of us (Rui C.C.Costa).

References

1 D.A. Phipps, Metals and metabolism, 1976, Clarendon Press, Oxford

2 http://www.griteu.demon.co.uk/Manganes.html

3 EC Directive Relating to the Quality of Water Intended for Human Consumption, 80/778/EEC, J. Eur. Commun.

4 A.D. Eaton, L.S. Clesceri and A.E. Greenberg, Standard Methods for the Examination of Water and Wastwater, 19th Edition, 1995, American Public Health Association, Maryland

5 Z. Marczenko, Separation and Spectrophotometric Determination of Elements, 1985, John Wiley & Sons, New York

6 Z. Fang, Flow Injection Separation and Pre-concentration, 1993, VCH Publishers, New York

7 X.R. Wang, Z.X. Zuang, C.L. Yang and F. Zhyu, *Spectrochim. Acta Part B*, **53**, 1998, 1437

8 G.M. Greenway, S.M. Nelms, I.K. Skhosana and S.J.L. Dolman, *Spectrochim. Acta Part B*, **51**, 1996, 1909

9 S. Hirata, K. Honda and T. Kumamaru, *Anal. Chim. Acta*, **221**, 1989, 65

10 P. Hernandez, L. Hernandez, J. Vicente and M.T. Sevilla, *Anal. Quim.*, **81**, 1985, 117

11 Y. Liu and J.D. Ingle Jr., *Anal. Chem.*, **61**, 1989, 520

12 K.A. Tony, S. Kartikeyan, B. Vijayalashmy, T. Prasad-Rao and C.S.P. Iyer, *Analyst*, **124**, 1999, 191

13 C. Dittfurth, E. Ballesteros, M. Gallego and M. Valcárcel, *Spectrochim. Acta Part B*, **51**, 1996, 1935

14 X.Z. Chi and J. Zhou, *Guangpuxue. Yu. Guangpu. Fenxi.*, **14**, 1994, 91

15 A.I. Vogel, Vogel's Textbook of quantitative chemical analysis, 5th Edition, 1989, John Wiley & Sons, New York

16 D.M. Ye, H.Q. Zhang and Q.H. Jin, *Talanta*, **43**, 1996, 535

17 J. Ruzicka and G.D. Marshall, *Anal. Chim. Acta*, **237**, 1990, 329

CAPÍTULO IV

DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES ELEMENTARES EM VINHO

"O pecado nasce tão subtilmente
da vontade de querer e não poder."
Alain Creepier

4.1

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS DE DILUIÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE Zn, Mn, Fe E Cu, E DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA A DETERMINAÇÃO DE Cu.

METALS DETERMINATION IN WINES BY SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS WITH FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

AMERICAN JOURNAL OF ENOLOGY AND VITICULTURE: EM IMPRESSÃO

METALS DETERMINATION IN WINES BY SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS WITH FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

Rui Cerdeira C. Costa, M. Isabel Cardoso and Alberto N. Araújo*

CEQUP/Dep. Química-Física, Faculdade de Farmácia U.P., Rua Aníbal Cunha, 164, 4050 Porto, Portugal.

Abstract

This paper describes the application of Sequential Injection Analysis with Flame Atomic Absorption Spectrophotometric detection (SIA/FAAS) for the determination of Zn, Mn, Fe and Cu in Portuguese Verde, Maduro and Porto wines. The basic configuration of the system allowed the determination of Zn, Mn, Fe and Cu, the latter in concentrations higher than 0.20 mg/l. Selecting a sample volume of 333 µl allowed the determination of Zn and Mn up to 1.50 and 3.00 mg/l, respectively. The Fe determination was accomplished using 83, 125 and 333 µl sample volumes for Fe contents in the range of 1.50-15.00 mg/l, 0.50-10.00 mg/l and 0.25-5.00 mg/l, respectively. Wine samples with Cu contents in the 0.20-2.00 mg/l range were analyzed with a sample volume of 750 µl. The determination of Cu trace levels was carried out using an heterogeneous-phase preconcentration unit composed of a commercial cartridge packed with silica C18 coupled to the system. Cu was retained as diethylammonium-N,N-diethyldithiocarbamate chelate. Using about 2 ml of sample allowed determination of Cu between 0.05 and 0.50 mg/l. A comparison of the results obtained by the proposed methodologies and the reference procedures presented relative deviations less than 5%. Repeatability of determinations was always better than 3% (RSD).

Key Words: SIA/FAAS, Wine, Zn, Mn, Fe and Cu

* Corresponding author; Tel.: +351-2-2087132; Fax: +351-2-2003977; e-mail: anaraujo@mail.ff.up.pt

Introdution

The establishment of a wines cationic profile may indicate the region and conditions of cultivation of the grapes, as well the manufacturing techniques used, especially when detection of adulterations is intended[1,2]. On the other hand the excessive use of pesticides and fertilizers with the new manufacture and storage techniques of wines are two of the major causes for the content increase of certain metallic species[1,2]. Although, at the end of alcoholic fermentation there is a significant reduction of mineral content, it may not be enough to prevent some problems related to wine stability, namely precipitation and changes in wine organoleptic properties[1,2]. Therefore, the determination of some metallic species, such as Zn, Mn, Fe and Cu is important.

The determination of Zn, Mn, Fe and Cu by the reference procedures is generally time-consuming and in some cases, *i.e.*, Zn and Fe, more prone to errors due to laborious sample treatment[1,2,3]. To compensate for these drawbacks, some authors have proposed in the past few years the use of Flow Injection Analysis (FIA) combined with flame atomic absorption spectrophotometry (FAAS)[4]. Although, the features presented by the systems based on that combination are very advantageous, they are not flexible when multi-parametric analysis is concerned. For most of them physical reconfiguration is required in order to enable a new determination.

In the early 1990's, Sequential Injection Analysis (SIA) was proposed to fulfill the requirements of robustness, simplicity, autonomy and versatility required for automatic routine analysis[5]. The SIA systems being totally computer controlled, allowed the system conditions to be changed from the keyboard without physical reconfiguration of the same. Therefore, the automation of SIA may be an advantageous analytical control procedure for lowering analytical costs.

The present work exploits the SIA concept coupled to FAAS for the analysis of some metal species, namely Zn, Mn, Fe and Cu in Portuguese Verde, Maduro and Porto wines. This work is aimed at testing the versatility of a basic configuration for analyzing these four metals at

different concentration levels without physically reconfiguring the system. Moreover, the efficiency of the manifold is also evaluated regarding preconcentration on a solid phase by coupling a previously developed module to the transmission line of the detection system. Preconcentration of Cu as diethylammonium-N,N-diethyldithiocarbamate chelate in a commercial cartridge packed with silica C18, is evaluated.

Experimental

Reagents and Solutions

All solutions were prepared with bideionized water (conductivity <0.1µS/cm) and analytical grade reagents without further purification.

Standard solutions were prepared by dilution of Zn (*BDH*, ref. 14150) Fe (*Merck*, ref 19781), Mn (*BDH*, ref. 14144) and Cu nitrate (*BDH*, ref. 14139) commercial stock solutions at concentrations of 1000 ± 2 mg/l in water. For Cu preconcentration, the standard solutions were prepared in the same way but include an ethanol content similar to that of the samples, *i.e.*, 10% (w/v) concerning the analysis of Verde and Maduro wine samples, and 20% (w/v) for Porto wine samples. The pH of these solutions was adjusted to about 3 with a 10% HNO_3 solution.
For the preconcentration experiments, a commercial cartridge packed with silica C18 (*Waters Millipore, SEP-PAK*) was used as the solid phase. Cu Chelating agent diethylammonium-N,N-diethyldithiocarbamate (DDTC) (*Aldrich*, ref. 31811-6) prepared in water in concentrations between 0.05 and 0.25% (w/w) was used.

Absolute ethanol was selected as the C18 eluent.

Apparatus

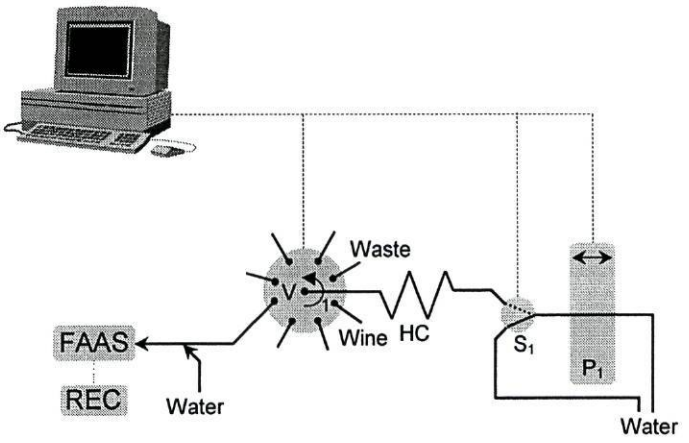
The SIA manifold used to perform the direct determination of Zn, Mn, Fe and Cu is depicted in Figure 1[6]. The solutions were propelled by means of a *Gilson Minipuls 3* peristaltic pump (P_1) equipped with a PVC pumping tube (1.6 mm id). A *Valco* model *Cheminert™ C15-3118E* 8-port valve (V) was used as a fluid selecting valve, with each of its ports connected to 12 cm of PTFE tubing (0.8 mm id). The holding coil (HC) was constructed by coiling 500 cm of PTFE tubing (0.8 mm id) on a rod with 1.5 cm external diameter.

A *Pye Unicam SP9* flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS) used as detection unit was connected to port 6 of the fluid selecting valve by a home-made acrylic connector. The other channel of the connector was fitted with 100 cm PTFE tubing (0.5 mm id) through which the spectrophotometer was fed water during the non discard period. A *Kipp & Zonnen* (REC) recorder was used to collect the analytical signals furnished by the spectrophotometer.

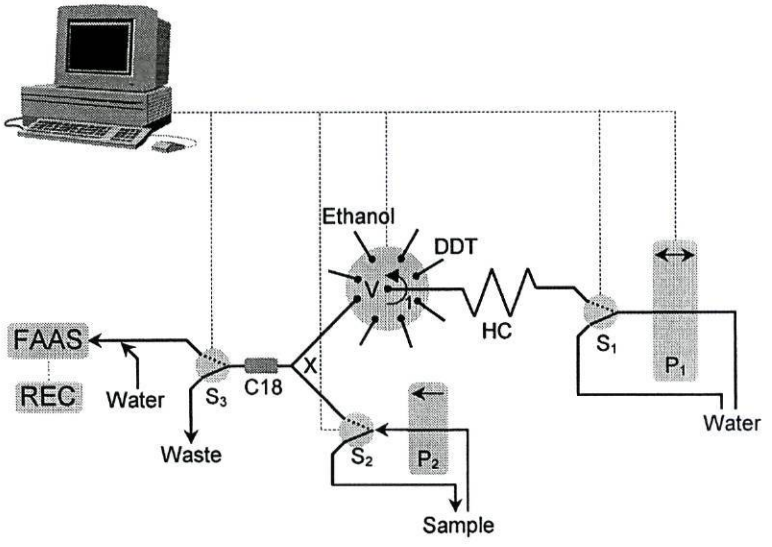
Reproducibility of the flow was assured by a *NResearch 161 T031* (Stow, Ma) three way solenoid valve (S_1) positioned after the peristaltic pump and a contact device on the pump head to control the pump starting point[6].

All electric devices of the manifold were connected to a *286* microcomputer by an *Advantech PCL 711S* interface card and controlled by software written in *Microsoft QBasic 4.5*.

Solid-phase extraction was carried out after fitting the former system with a preconcentration module set in-line with the fluid selecting valve channel that leads to the detection system. This preconcentration unit comprised an *Ismatec* peristaltic pump (P_2) of constant rotation speed, a PVC pumping tube (0.8 mm id) and two *NResearch 161 T031* (Stow, Ma) three way solenoid valves (S_2, S_3).



A



B

Figure 1 Sequential injection manifolds used: A – basic configuration; B – configuration for preconcentration. P_1, P_2 – peristaltic pumps; S_1, S_2, S_3 – three way solenoid valves; V – multiposition valve; X – PTFE connector; C – silica C18 cartridge; FAAS – flame atomic absorption spectrophotometer; REC – recorder.

Reference procedures

The determinations of Zn and Fe were carried out by the methods proposed by the OIV[2]. These methods propose the prior elimination of alcohol from wine samples followed by FAAS determination against aqueous standards in an air/acetylene oxidizing flame, with deuterium lamp background correction at 213.9 and 248.3 nm, respectively.

For the analysis of Mn, the method described by Ribereau-Gayon *et al.*[2] was followed. The determination was performed by FAAS at the wavelength of 279 nm, against water/alcohol standard solutions.

The official Portuguese standard addition method[1] was used for the determination of Cu by FAAS at 324,8 nm in an air/acetylene oxidizing flame.

Automatic procedure

The direct determinations of Zn, Mn, Fe and Cu, the latter being in concentrations higher than 0.20 mg/l, in Verde, Maduro and Porto wine samples were carried out in four steps (Table 1). In the first two steps, aspiration of 150 μl of sample through port 1 followed by discharge of the holding coil content to port 3 (waste), filled the sampling line with a new sample. Afterwards, the defined sample volume was aspirated into the holding coil according to the determination intended and sent towards the detector through port 6.

The preconcentration procedure developed for determination of low concentrations of Cu consisted of five steps. First, DDTC was aspirated into the holding coil through port 2. Then the flow was reversed and DDTC pumped through port 6 merging at the confluence X with the sample, which was propelled by the auxiliary pump and flowed through the C18 column to waste. After preconcentration, bideionized water was passed through port 6 and the silica C18

column to waste. The eluent was afterwards aspirated into the holding coil through port 4 and then pumped through port 6 and the silica C18 column to the detection system.

Table 1 Conditions selected for the determination of Zn, Mn, Fe and Cu in Portuguese wines.

Port	Stage	Direction	Time (s)	Flow rate (ml/min)	Volume (µl)
Zn and Mn					
1	Sample	Aspiration	3	3.0	150
3	Waste	Propulsion	5	6.0	500
1	Sample	Aspiration	10	2.0	333
6	Detector	Propulsion	20	5.5	1833
Fe					
1	Sample	Aspiration	3	3.0	150
3	Waste	Propulsion	5	6.0	500
			5	1.0	83
1	Sample	Aspiration	5	1.5	125
			10	2.0	333
6	Detector	Propulsion	20	5.5	1833
Cu > 0.2 mg/l					
1	Sample	Aspiration	3	3.0	150
3	Waste	Propulsion	5	6.0	500
1	Sample	Aspiration	15	3.0	750
6	Detector	Propulsion	25	5.5	2290

Cu < 0.2 mg/l					
2	DDTC	Aspiration	30	3.0	1500
	DDTC			1.5	1500
6	Preconcentration	Propulsion	60		
	Sample			2.0	2000
6	H_2O	Propulsion	15	3.0	750
4	Ethanol	Aspiration	17	3.0	1350
6	Detector	Propulsion	45	4.0	3000

Results and Discussion

Despite being a highly selective technique, FAAS is deeply affected by the physical properties of the sample matrix. Nevertheless, it was shown that coupling FAAS to a continuous flow system and operating with flow rates higher than normal, minimize physical interferences and improves the precision[7]. Therefore, each determination was carried out with a detector inlet flow (5.5 ml/min) higher than its normal aspirating flow rate (before being connected to the SIA system). A maximum inlet flow of about 4 ml/min was obtained when the complete set-up was fitted with the preconcentration unit. The lower flow rate was due to the resistance of the C18 cartridge.

Since the reproducibility of sample volumes aspirated within SIA systems depends on the viscosity of the sample, aspirating flow rates less than 3 ml/min were chosen[6].

Determination of Zn, Mn, Fe and Cu

Considering that in conventional FAAS the range of linear response for Zn and Mn goes to 1.00 and 2.00 mg/l, respectively, and that wines may contain up to 4 mg/l in Zn and 3 mg/l in Mn, the effect of sample volume was evaluated. The corresponding calibration curves were developed using standard solutions with Zn and Mn concentrations ranging from 0.25 to 5.00 mg/l. The results obtained gave linear regression lines of absorbance versus concentration, and these were used to determine both the linear response range and sensitivity expressed as the characteristic concentration. For Zn it was observed that the linear response range diminished from 5.00 to 1.00 mg/l and the corresponding characteristic concentration from 0.36 to 0.03 mg/l when the sample volume was increased from 25 to 1000 μl. For Mn the linear response zone decreased from 5.00 to 3.00 mg/l and sensitivity from 0.74 to 0.06 mg/l with the same tested volumes. Having found Zn and Mn levels up to about 1.5 and 3 mg/l, respectively, in all samples by the reference methods, a sample volume of 333 μl was chosen.

The optimization of Fe determination was similar to that worked out for Zn and Mn. After recording the calibration curves with sample volumes between 25 and 1000 μl, it was found that the FAAS linear response range diminished from 20.00 to 2.50 mg/l and the characteristic concentration from 1.95 to 0.18 mg/l. Knowing that the Fe content of wines may be over 15 mg/l and that the FAAS linear range goes to 5.00 mg/l, three linear response zones were established with three different volumes. A 333 μl volume enabled the analysis of wine samples with an Fe content varying from 0.25 and 5.00 mg/l. When Fe concentrations ranged from 0.50 to 10.00 mg/l, a sample volume of 125 μl was used. For concentrations between 1.50 and 15.00 mg/l a volume of 83 μl was selected.

In the case of Cu, the injection of standard solution volumes ranging from 25 to 1000 μl with a concentration between 0.50 and 4.00 mg/l produced a decrease in the characteristic concentration from 0.44 to 0.04 mg/l, but always kept a linear response in 4.00 mg/l. Therefore,

to achieve a compromise between sensitivity and sampling rate for samples presenting a Cu content higher than 0.20 mg/l a volume of 750 μl was set.

Determination of low concentrations of Cu by preconcentration on a solid-phase

It has already been shown that Cu can be collected on non-polar resins as a complex presenting non-polar characteristics, and afterwards eluted with an adequate organic solvent[8]. This procedure was exploited in the determination of the Cu content of wines using diethylammonium-N,N-diethyldithiocarbamate (DDTC) as a chelating agent. The complex formed was collected in a commercial cartridge packed with silica C18 and then eluted with ethanol. Methylisobutylketone (MIBK) was also tested but not used because it produces an intense blank signal.

The effect of the sample preconcentration flow rate on concentration efficiency, defined as the product of sampling rate (minutes) with the enrichment factor[9], was first evaluated. The enrichment factor was assessed from the ratio of the calibration curves slopes with and without preconcentration[9]. Therefore, flow rates varying from 1.1 to 8.4 ml/min were tried using a 3 ml standard solution of 0.50 mg/l Cu and a 0.025 % DDTC solution added through connector X at a flow rate of 1 ml/min. The complex retained was then eluted with an excess of absolute ethanol (about 1670 μl). The results attained show that only sample flow rates higher than 7.5 ml/min produced a decrease in the analytical signal amplitude. Running the same trial but on a Porto wine sample and using flow rates higher than 4 ml/min the resistance caused by the silica C18 cartridge was considerably higher and could induce breakdown at the tubing joints. After analysis of these results and considering the DDTC flow being added to the sample, a sample flow rate of 2 ml/min was chosen.

Since the formation of the complex between copper and DDTC is affected by the sample pH[10], its influence on the analytical signal amplitude was also assessed. It was found

that the signal obtained was fairly constant when the pH increased to about 4 units, and was slightly lower with higher pH values, probably due to Cu precipitation. As wine pH is usually lower than 4 units, accurate control of the pH was only required for standard solutions.

Knowing that changing the polarity of the solvent passing through the resin elutes the complex, the effect of ethanol in wine was also assessed in relation to the retention efficiency. Therefore, standard solutions of 0.50 mg/l Cu with an ethanol concentration ranging from 0 to 50% (w/v) were used. It was found that the analytical signal intensity diminished about 12% with an ethanol concentration of 50%. As a result, the ethanol content of the standard solutions used was set to that of the samples, *i.e.*, 10% for Verde and Maduro wine samples and 20% for Porto wine samples.

The concentration and volume of the DDTC solution added to the samples were then optimized. Chelating solutions presenting a DDTC concentration between 0.0025 and 0.25% (w/v) were added to 3 ml Porto wine samples at a flow rate ranging from 0.2 to 2.5 ml/min. The results demonstrated that whatever the chelating concentration used the analytical signal intensity increased with the flow rate up to 1.5 ml/min and then was constant. Using flow rates higher than 1.5 ml/min the analytical signal amplitude increased with the concentration reaching the maximum intensity for a concentration of 0.05%. For security reasons a solution of 0.1% DDTC pumped at a 1.5 ml/min flow rate was selected.

With the purpose of minimizing the eluent volume, elution volumes between 83.3 and 2000 μl were tested. It was found that volumes less than 1350 μl did not promote complete elution.

Finally, the optimum volume for the determination of low concentrations of Cu with an appropriate sensitivity was studied. Standard solution volumes ranging from 0.097 to 14.55 ml and prepared with a 0.50 mg/l Cu content were tried under the same conditions previously selected. It was found that using a 2 ml sample provided a threefold enrichment factor. This was enough to allow Cu contents in the range of 0.05 and 0.5 mg/l to be determined.

Wine Analysis

The procedures developed for the determination of the metals were carried out on 20 samples of Portuguese Verde, Maduro and Porto wines under the conditions presented in Table 1. Quality of the results attained by the proposed methodologies (Table 2) was assessed by comparison with those given by the reference procedures. The relative deviations for all comparisons were less than 5%. The regression line for results from both the proposed and reference methods enabled one to obtain the set of equations defined in table 3.

Table 2 Determination of Zn, Mn, Fe and Cu in Portuguese wines, using the SIA procedures (SIA/FAAS) and reference methods (FAAS), and the corresponding relative error (RE%).

Sample	Zn			Mn		
	FAAS	SIA/FAAS	RE(%)	FAAS	SIA/FAAS	RE(%)
1	0.52 ± 0.02	0.49 ± 0,01	-4.3	1.76 ± 0.01	1.70 ± 0.03	-3.4
2	0.60 ± 0.01	0.59 ± 0,01	-2.3	1.65 ± 0.02	1.59 ± 0.02	-3.6
3	0.46 ± 0.02	0.48 ± 0,01	3.5	1.32 ± 0.02	1.38 ± 0.02	4.5
4	0.59 ± 0.01	0.58 ± 0,02	-2.0	1.22 ± 0.02	1.16 ± 0.02	-4.9
5	0.62 ± 0.01	0.60 ± 0,01	-3.2	1.75 ± 0.02	1.81 ± 0.02	3.4
6	0.035 ± 0.002	0.034 ± 0,001	-3.8	0.79 ± 0.01	0.82 ± 0.02	3.8
7	0.54 ± 0.04	0.56 ± 0,02	3.3	0.64 ± 0.01	0.65 ± 0.02	1.6
8	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0,01	-2.3	1.29 ± 0.02	1.29 ± 0.02	0
9	0.53 ± 0.02	0.50 ± 0,01	-4.7	0.69 ± 0.01	0.67 ± 0.02	-2.9
10	0.032 ± 0.019	0.033 ± 0,001	4.1	0.82 ± 0.01	0.84 ± 0.02	2.4
11	0.44 ± 0.01	0.42 ± 0,01	-3.0	1.50 ± 0.02	1.84 ± 0.02	-1.3
12	0.80 ± 0.02	0.81 ± 0,02	1.8	1.71 ± 0.02	1.76 ± 0.04	2.9

13	0.71 ± 0.02	0.74 ± 0,02	3.8	2.57 ± 0.02	2.57 ± 0.02	0
14	0.65 ± 0.01	0.66 ± 0,02	1.4	2.43 ± 0.03	2.44 ± 0.03	0.4
15	0.39 ± 0.01	0.37 ± 0,01	-4.4	1.47 ± 0.02	1.46 ± 0.02	-0.7
16	1.37 ± 0.03	1.37 ± 0,04	0	1.87 ± 0.02	1.95 ± 0.06	3.7
17	0.76 ± 0.01	0.73 ± 0,01	-3.6	0.86 ± 0.01	0.90 ± 0.02	4.6
18	0.50 ± 0.01	0.52 ± 0,02	4.6	1.76 ± 0.02	1.74 ± 0.05	-1.1
19	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0,01	-1.7	1.73 ± 0.02	1.81 ± 0.05	4.6
20	0.86 ± 0.02	0.87 ± 0,02	0.3	1.83 ± 0.02	1.83 ± 0.05	0

Amostra	Fe			Cu		
	FAAS	SIA/FAAS	RE(%)	FAAS	SIA/FAAS	RE(%)
1	4.85 ± 0.30	4.73 ± 0.06	-2.5	0.193 ± 0.001	0.189 ± 0.005	-2.1
2	13.10 ± 0.68	13.24 ± 0.20	1.1	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.01	1.2
3	5.94 ± 0.21	5.71 ± 0.07	-4.0	0.48 ± 0.01	0.49 ± 0.01	3.6
4	4.94 ± 0.18	4.74 ± 0.12	-4.0	0.56 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0
5	5.11 ± 0.41	5.25 ± 0.14	2.7	0.28 ± 0.01	0.278 ± 0.004	-2.1
6	3.37 ± 0.10	3.28 ± 0.06	-2.7	0.128 ± 0.002	0.122 ± 0.002	-4.7
7	4.23 ± 0.14	4.02 ± 0.07	-4.9	0.172 ± 0.004	0.164 ± 0.004	-4.6
8	2.57 ± 0.08	2.59 ± 0.07	0.7	0.35 ± 0.01	0.345 ± 0.003	1.1
9	2.67 ± 0.11	2.72 ± 0.02	1.7	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.01	1.8
10	3.34 ± 0.11	3.26 ± 0.06	-2.7	0.098 ± 0.001	0.094 ± 0.002	-4.1
11	12.31 ± 0.62	12.52 ± 0.13	1.7	0.86 ± 0.03	0.84 ± 0.02	-2.4
12	5.33 ± 0.24	5.57 ± 0.16	4.5	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01	2.9
13	8.25 ± 0.54	8.58 ± 0.18	4.0	1.14 ± 0.07	1.16 ± 0.03	1.5
14	1.47 ± 0.09	1.41 ± 0.04	-4.1	0.43 ± 0.02	0.44 ± 0.01	2.3

15	2.85 ± 0.15	2.99 ± 0.03	4.9	0.84 ± 0.02	0.87 ± 0.01	3.3
16	3.31 ± 0.10	3.23 ± 0.03	-2.4	0.239 ± 0.003	0.246 ± 0.004	2.9
17	2.42 ± 0.14	2.35 ± 0.04	-2.9	0.110 ± 0.002	0.105 ± 0.003	-4.5
18	3.06 ± 0.18	3.14 ± 0.04	2.5	0.094 ± 0.004	0.091 ± 0.003	-3.2
19	3.29 ± 0.21	3.45 ± 0.07	4.7	0.284 ± 0.001	0.29 ± 0.01	2.5
20	3.85 ± 0.20	3.74 ± 0.07	-2.9	0.109 ± 0.002	0.107 ± 0.002	-1.8

1-5 Porto wine; 6-10 Maduro wine; 11-20 Verde wine.

Standard deviation obtained from three consecutive determinations.

Moreover, the results compared by the paired Student's t-test at the 95% confidence level, showed that there were no significant differences between the mean values of both methods (Table 3).

Table 3 Results obtained in the determination of Zn, Mn, Fe and Cu in Portuguese wines.

Elemento	C_o [a]	S [a]	R^2 [b]	$t_{0.05\,(tab)}$ [c]	$t_{0.05\,(cal)}$ [d]
Zn	-0.004 ± 0.017	1.003 ± 0.027	0.997	2.093	0.469
Mn	0.007 ± 0.062	1.001 ± 0.039	0.994	2.093	0.354
Fe	-0.09 ± 0.13	1.02 ± 0.02	0.998	2.093	0.752
Cu	-0.003 ± 0.008	1.01 ± 0.02	0.998	2.093	0.161

[a] Parameters of the equation [SIA] = C_o + S*[FAAS]

[b] Correlation coefficient

[c] Calculated values for a two-tail t-test

[d] Tabulated values for a two-tail t-test (95% confidence level)

Considering the determinations carried out with the basic system[6], the sampling rate was higher than 75 samples/h, while determinations using the preconcentration module were accomplished at a sampling rate of 20 samples/h. Repeatability, expressed as relative standard deviation (RSD), of ten consecutive determinations was never greater than 3%.

The general performance of the proposed procedures is presented in Table 4.

Table 4 Analytical performance of the developed SIA systems.

Element	Zn	Mn	Fe			Cu	
Volume (μl)	340	340	85	120	340	750	2000
Detection limit (mg/l)	0.002	0.002	0.14	0.06	0.03	0.001	0.0004
Quantification limit (mg/l)	0.005	0.0.7	0.47	0.20	0.10	0.005	0.001
Sensitivity (mg/l)	0.03	0.06	0.71	0.40	0.23	0.10	0.04
Upper limit (mg/l)	2.00	3.00	15.00	10.00	5.00	2.00	0.50
Enrichment factor	--	--	--	--	--	--	3.5
Sampling rate (h^{-1})	95	95	109	109	95	75	20

Conclusions

Versatility of the system proposed is evidenced by the possibility of not only easily adjusting the sample concentration to the linear response interval of the analytical technique but also performing multiparameter determinations without physical reconfiguration of the system. Therefore, the reference procedures can be made easier by avoiding, for example, the alcohol elimination step required for Zn and Fe determinations.

The implementation of an heterogeneous-phase preconcentration procedure for the determination of Cu proved to be very advantageous since mineralisation of the samples as required by the OIV method or even the standard addition method of the Portuguese procedure were avoided. Moreover, this preconcentration procedure enables the determination of other species when they are present in wines in very low concentrations.

This work was developed under the project *PRAXIS/P/AGR/10184/1998* from the Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT). One of us (Rui C.C. Costa) wishes to thank FCT for his Ph.D. grant (*PRAXIS XXI/BD/9544/96*).

References

1 A.S. Curvelo-Garcia, Controlo de qualidade dos vinhos, Química enológica, Métodos analíticos, 1988, Instituto da Vinha e do Vinho, Lisboa

2 J. Ribereau-Gayon, E. Peynaud, P. Sudraud, and P. Ribereau-Gayon. Traité d'Oenologie, Sciences et Techniques du Vin, Tome 1, Analyse et Contrôle des Vins, 1982, Dunod, Paris

3 Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des môuts, 1990, Office International de la Vigne et du Vin, Paris

4 J.L.F.C. Lima and A.O.S.S. Rangel, *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**, 1990, 284

5 J. Ruzicka and G.D. Marshall, *Anal. Chim. Acta*, **237**, 1990, 329

6 A.N. Araújo, R.C.C. Costa, J.L.F.C. Lima and B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, **358**, 1998, 111

7 J.F. Tyson, *Analyst*, **110**, 1985, 419

8 J. Ruzicka and A. Arndal, *Anal. Chim. Acta*, **216**, 1989, 243

9 Z. Fang, Flow Injection Separation and Preconcentration, 1993, VCH Publishers, New York

10 Z. Marczenko, Separation and Spectrophotometric Determination of Elements, 1985, John Wiley & Sons, New York

4.2

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCEDIMENTO DE EXTRACÇÃO LÍQUIDO/LÍQUIDO PARA A DETERMINAÇÃO DE Fe(III).

SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS OF FE(III) AND TOTAL IRON IN WINES BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

ANALYTICA CHIMICA ACTA: SUBMETIDO

SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS OF FE(III) AND TOTAL IRON IN WINES BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

Rui Cerdeira de Campos Costa and Alberto da Nova Araújo*

CEQUP/Dep. Química-Física, Faculdade de Farmácia U.P., Rua Aníbal Cunha, 164, 4050 Porto, Portugal

Abstract

The determinatin of Fe(III) and total iron in table wines by Sequential Injection Analysis (SIA) with Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) is described. The determination of Fe(III) is based on extraction of the complex formed between Fe(III) and thiocyanate with methylisobutylketone by using an on-line precipitation device previously described for FIA systems, as liquid-liquid extraction module for organic phases less dense than water. The determination of total iron is accomplished by sending a small sample aliquot directly to the detector. The use of about 1.8 ml of sample provided a detection limit of 0.05 mg/l in Fe(III), whilst selecting a sample volume of 83, 125 or 333 μl enabled the determination of total iron contents ranging between 1.50-15.00 mg/l, 0.50-10.00 mg/l or 0.25-5.00 mg/l, respectively, at a sampling rate of about 18 samples/h. The comparative evaluation of the results obtained with both methodologies and by the reference methods led to the following relationships: $[SIA]_{mg/l}$ = 0.05 (±0.31) + 0.98 (±0.10) * $[Comp]_{mg/l}$ for Fe(III) and $[SIA]_{mg/l}$ = -0.14 (±0.29) + 1.03 (±0.04) * $[FAAS]_{mg/l}$ for total Fe.

Key Words: SIA/FAAS; Fe(III); total iron; Wine

* Corresponding author; Tel.: +351-2-2087132; Fax: +351-2-2003977; e-mail: anaraujo@mail.ff.up.pt

Introdution

Fe content in wines is of major importance either because of the stability changes that it may cause or its effect on the oxidation and aging of the wine. When protected from air the wine matrix presents reducing features and the iron is solubilized in concentrations up to 20 mg/l mostly as Fe(II)[1]. The Fe(III) is present in much lower concentrations and usually as a complex, being able to promote precipitations depending on its concentration levels. Therefore, the quantification of Fe(III) contents in wines is very important for predicting their stability. The method used nowadays is based on the colorimetric determination of the complex formed between Fe(III) and thiocyanate after extraction to organic phase[2]. This method can also be used for the determination of total iron in wines after prior oxidation to Fe(III) of all the iron present in the sample. The carry-out of a liquid-liquid extraction step imparts sensitivity to the procedure, thus also enabling to overcome the problem of the samples colour. Nevertheless, it is well known that performing liquid-liquid extraction is somehow troublesome. Therefore, other procedures for Fe(III) assay in wines using instrumental techniques that do not require a liquid-liquid extraction step were proposed. Voltammetry[3] is one of those alternative techniques, despite its susceptibility to some interferences of the wine matrix, especially when applied to red wines[4]. Performing extraction with ionic exchange resins and integrated detection of the complex formed between thiocyanate and Fe(III) is another proposal, although its applicability is also confined to white wines[5]. The catalytic reaction proposed by Cladera *et al.*[6] and consisting in the catalytic effect of the complex formed between Fe(III) and EDTA on oxidation of the hydroxylamine by dissolved oxygen in alkaline media is another suggestion for Fe(III) determination in white wines.

The use of continuous flow techniques, namely Flow Injection Analysis (FIA)[7,8] and Sequential Injection Analysis (SIA)[9,10], allowed the liquid-liquid extraction procedures to be less polluting, more versatile and less prone to error due to contamination of the solutions. The efficiency of a continuous flow liquid-liquid extraction procedure depends upon the type of contact between the aqueous and organic phases and the separation of both before the

detection step. In order to ensure this efficiency, most of the systems proposed resort to segmentation of the aqueous phase with organic phase in a confluence or in a extraction chamber before reaching the detector[11]. The optical[12] or conductimetric[13] monitoring of the type of phase passing through the detection cell led to the elimination of the phases separation step prior to analysis, thus rendering the extraction procedures much easier. The use of a hydrophobic membrane or separation device based on the different density of both phases[11] can yet assure the passage of only one phase through the detector. The consecutive inversion of the flow of a segment of organic phase, placed in the detector flow-cell, is also another alternative which could minimize the consumption of organic phase and dilution of the analyte extracted[14]. The possibility to form organic layers over the inner walls of the PTFE tubing used in the continuous flow systems was exploited for the development of extraction procedures in which the organic layer formed was then perfused with the sample, thus avoiding the use of a phase segmentation or separation device and reducing the organic phase volume considerably[9]. The different linear speeds of both phases inside the PTFE tubing, particularly that of the organic phase being much slower due to hydrophobic interactions with the PTFE tubing wall, were also explored for the development of extraction procedures[10]. By stopping the flow, the solvent forming the organic layer over the PTFE tubing tends to coalesce resulting in new segments of organic phase[15].

Considering that the preconcentration level attained by the extraction procedure depends upon the ratio of both phases volume, systems allowing recirculation of the organic segment in a closed circuit whilst the sample flowed continuously[16] or extraction systems with a single drop also acting as colorimetric monitoring cell[17] were proposed to improve sensitivity of the determinations. Agudo *et al.*[18] proposed a methodology for solvents more dense than water consisting in placing a small organic phase volume in a UV/Vis spectrophotometer flow cell, through which the sample was propelled.

In the present work, a device described before for on-line precipitations[19], used as a liquid-liquid extraction device for organic phases less dense than water is proposed. The device in which extraction takes place consists of a glass vial with a porous ceramic plate inside, in the

middle, and a reactor on its lowest ending. This configuration allows solvents that are less dense than water to float in the higher region of the vial due to the joint effort of the different density of both phases and the resistance exerted by the porous plate. Knowing that the organic phase drop floats, the extraction procedure can be carried out in this organic drop by passing the sample downwards through it. Feasibility of this operating mode was proved by coupling this module to a SIA system with Flame Atomic Absorption Spectrometry detection (FAAS) already described[20] and the thiocyanate method was automated regarding assay of Fe(III) in table wines. The determination of total Fe was performed directly due to the versatility of the SIA concept.

Experimental

Reagents and Solutions

All solutions were prepared with bideionised water (conductivity < 0.1 µS/cm) and analytical grade chemicals.

The standard solutions used in the determination of Fe(III) and total Fe contents with the automatic system were prepared from a commercial stock solution containing 1000 ± 2 mg/l in Fe(III) (*BDH Spectrosol*, ref.14144) by dilution with a hydroalcoholic solution containing 10 % (w/v) alcohol and the pH adjusted to 3,5 units with a HCl 0.1 mol/l solution.

Ammonia thiocyanate solutions presenting concentrations between 25 and 400 g/l were prepared and afterwards purified by stirring with methylisobutylketone (MIBK), also used as organic phase in the automatic system. This organic phase was previously saturated with deionised water.

Bideionised water was used in the SIA system as carrier stream.

To perform the comparison procedure for the determination of Fe(III), a 200 g/l potassium thiocyanate solution and a HCl solution obtained from a 37 % (w/w) commercial solution after dilution with the same volume of bideionised water, were prepared. The standard solutions were prepared to have the same alcohol content as that of the samples, *i.e.*, 10% (w/v).

Apparatus

The manifold used is depicted in Figure 1 and comprises a *Gilson Minipuls 3* peristaltic pump (P_1), a holding coil (HC) made of 600 cm x 0.8 mm id of PTFE tube, a multiposition 8-port fluid selecting valve (V) from *Valco Instruments* (Houston, USA), model *Cheminert™ C15-3118E*, and a *Pye Unicam SP9* flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS). To minimize the inertia effect of the fluids and the discarding pulse on reproducibility of the volumes aspirated into the system, a *NResearch* model *161 T031* three way solenoid valve (S_1) was positioned between the holding coil (HC) and the peristaltic pump (P_1). This valve enabled to synchronize the flow of the fluids inside the holding coil with the peristaltic pump movement[20].

The extraction module consisted of an *Ismatec*, model *SA Mini-S 840*, peristaltic pump (P_2) equipped with a 1.14 mm id PVC impulsion tube from *Gilson*, a *NResearch* model *161 T031* three way solenoid valve (S_2), a 720 μl glass vial (A) comprising a G4 porous ceramic plate in the middle, usually used to perform flow gravimetries[19], and a reactor (C) in its outlet that was made of a 100 cm x 0.8 mm id of PTFE tube.

To perform the comparison procedure for the determination of Fe(III), a double beam UV/Vis spectrophotometer from *Hitachi* model U-2000 was used. The determination of total Fe by the comparison procedure was carried out with the flame atomic absorption spectrophotometer of the automatic system.

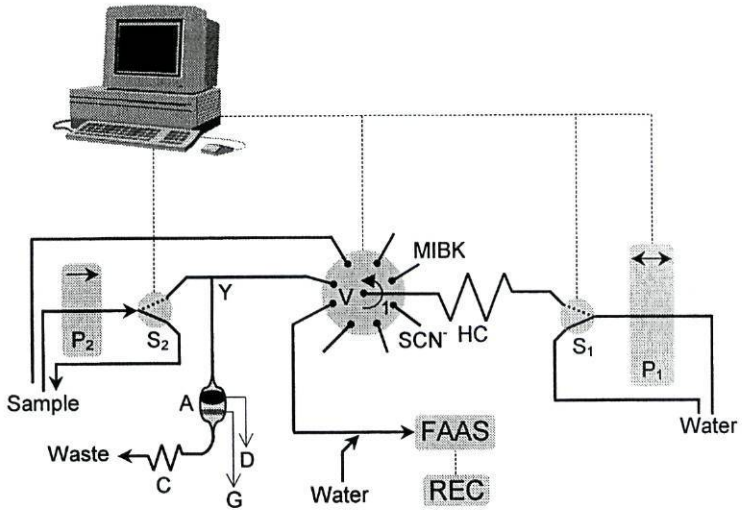


Figure 1 Schematic representation of the developed SIA system. P_1, P_2 – peristaltic pumps; V – multiposition valve; HC – holding coil; S_1, S_2 – three way solenoid valves; Y – PTFE connector; A – Glass vial; D – organic phase; G – porous ceramic plate, C – coil; FAAS – flame atomic absorption spectrophotometer; REC – recorder.

Methods

Table 1 lists the optimal conditions for the determination of Fe(III) and total Fe in table wine samples.

In order to start running the automatic system, the extraction vial must be filled with water. The first two steps of the developed procedure consisted in the sequential aspiration of the thiocyanate solution and the organic phase, MIBK, into the holding coil through ports 1 and 2 ,respectively. The flow direction inside the holding coil was reversed by propelling through port 5 a suitable volume (333 μl) enabling the MIBK segment to reach the extraction vial. After opening of the S_2 solenoid valve, the sample propelled by P_2 peristaltic pump merged at Y with the flow of the thiocyanate solution proceeding from the holding coil. Throughout this step, the

complex formed between Fe(III) and thiocyanate went through the glass vial and was extracted by the organic phase. The content of the glass vial was then washed with water propelled by the P_1 peristaltic pump. At step 6, the organic phase was aspirated into the holding coil and sent to the detection system through port 6, thus enabling the determination of Fe(III). Then, at the following step the selecting valve moved on to port 5 through which a small sample aliquot with a volume of 83, 125 or 333 μl, depending if the total Fe content was in the range of 1.50-15.00, 0.50-10.00 or 0.25-5.0 mg/l, respectively, was aspirated and sent to the detection system through port 6 at a 5.5 ml/min flow rate, thus enabling the determination of total iron.

Table 1 Selected conditions for the determination of Fe(III) and total iron in table wines.

Port	Stage	Direction	Time (s)	Flow rate (ml/min)	Volume (μl)
1	NH_4SCN	Aspiration	30	2.0	1000
2	MIBK	Aspiration	5	2.0	165
5	Glass vial	Propulsion	10	2.0	333
	NH_4SCN			1.0	833
5	Preconcentration	Propulsion	50		
	Sample			2.2	1833
5	H_2O	Propulsion	20	3.0	1000
5	Extract	Aspiration	20	2.0	667
6	Detector	Propulsion	30	5.5	2750
4	Sample	Aspiration	5	1.0	83
			5	1.5	125
			10	2.0	333
6	Detector	Propulsion	20	5.5	1833

The applicability of the proposed methodology to the determination of Fe(III) was demonstrated by the use of the thiocyanate method[2]. According to this method, Fe(III) when in HCl media reacts with thiocyanate thus forming a complex that after extraction by a suitable organic solvent is colorimetrically determined at 508 nm against standards containing the same alcohol content of the samples. Depending on the Fe(III) concentrations presented by the samples, this method consisted in adding 10.00 ml of sample to 1.00 ml concentrated HCl acid diluted to the half and 1.00 ml of 200 g/l thiocyanate, followed by stirring and extraction of the complex formed onto the MIBK and reading of absorbance while a blank trial was also being carried out.

The determination of total Fe was carried out according to the method proposed by Office International de la Vigne et du Vin (OIV). After prior removal of the alcohol content the wine samples were analysed by FAAS at 248.3 nm against aqueous standards in an air/acetylene oxidizing flame and continuous background correction[21].

Results and Discussion

Optimization of Fe(III) determination

As the instrumental measurement of Fe(III) was carried out on an organic extract, the combustible present in the flame was reduced thus rendering it much more oxidizing than usual. Under these conditions, the effect of the amount of organic phase sent to the detector on the analytical signal was studied up 333 μl. It was found that the intensity of the background signal increased with the MIBK volume, but only for volumes higher than 180 μl (Figure 2). This might be explained by the low inertia of the pneumatic nebulization to momentary variation of the solution type at the inlet of the detector[22]. Afterwards, actuating the S_2 solenoid valve for 60 s

allowed that 2.2 ml of 2.00 mg/l Fe(III) standard solution merged with 200 g/l thiocyanate solution that was pumped at a flow rate of about 2 ml/min. As shown by Figure 2, the amplitude of the analytical signal increased with the MIBK volume because of the extraction of the complex onto the organic phase and due to the effect of the organic phase volume on the background signal intensity. However, since there was no linear variation of the background signal with the organic phase volume sent to the detector, it was found that selecting an organic phase volume ranging from 80 to 170 μl enabled to maximize the signal/noise ratio.

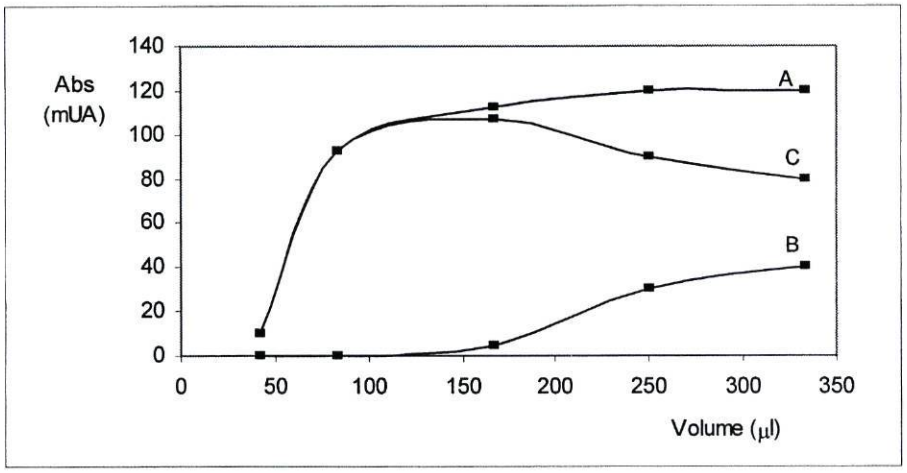


Figure 2 Effect of the MIBK volume throughout extraction. A – standard solution containing 2.00 mg/l Fe(III); B – MIBK; C – difference between curve A and B.

Knowing that the extraction procedure involved the passage of the complex through the aqueous/organic phase interface and that the efficiency of this procedure depended not only upon the interface area but also of the time of contact, the effect of the sample propulsion flow was assessed within the range of 1.14 and 3.6 ml/min. Figure 3 illustrates the decrease of the

analytical signal intensity over this range as it happened with the extractions procedures in solid phase[23]. The compromise between the analytical signal intensity and the time required for the preconcentration step was found by using a flow rate of about 2.2 ml/min.

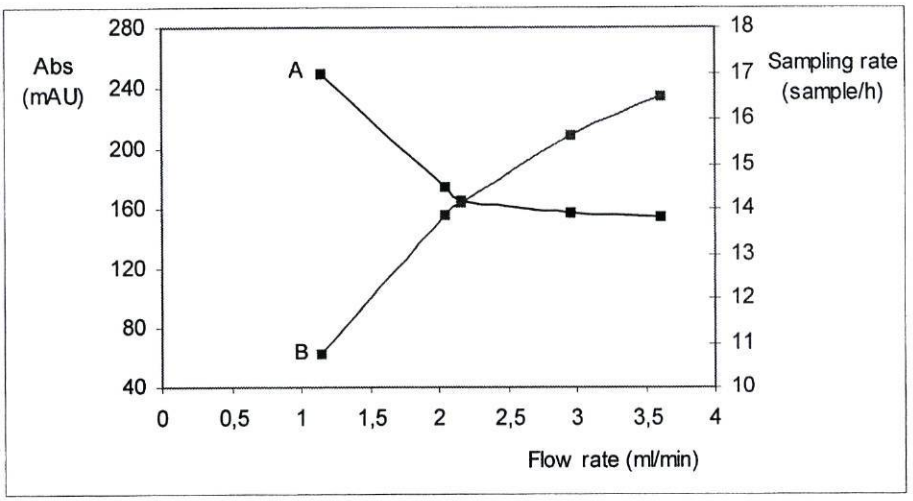


Figure 3 Effect of the preconcentration flow rate of a standard solution containing 2.00 mg/l Fe(III) on the amplitude of the analytical signal (A) and on the sampling rate (B).

From a chemical point of view, the effectiveness of the extraction procedure depends upon the formation and nature of the iron thiocyanate complexes[23]. To enable the formation of the complex, a standard solution of 2.00 mg/l Fe(III) was merged with the thiocyanate solution for 60 s at a 2.2 ml/min flow rate. Then, upon evaluation of the concentration and the addition flow rate of the thiocyanate solution it was found that within a concentration range of 25 and 400 g/l the analytical signal increased from 0.057 to 0.190. Nevertheless, as only a 20% increment of the signal was found when the concentration was changed from 200 to 400 g/l, what was rather insignificant comparing to the concentration increase, the solution containing 200 g/l of thiocyanate was selected. Additionally, considering that the reaction between Fe(III) and

thiocyanate is also dependant on the solution pH, its effect in HCl media was assessed within the 10^{-3} to 2 mol/l concentration range. It was found that the analytical signal amplitude increased with the HCl concentration up to a maximum concentration of 1 mol/l, beyond which it decreased slightly probably due to the polymerisation effect of the thyocianate[24]. To avoid the samples pH differing from that of the standard solutions, a 0.1 mol/l HCl was added to the latter so that the same pH of the samples, *i.e.*, about 3.5 was attained. The suitable flow rate of the thiocyanate solution when being added to the standard solution was also evaluated aiming reduction of its consumption per trial. After testing flow rates varying between 0.2 and 2 ml/min it was found that the analytical signal intensity increased with the flow rate until 0.5 ml/min, beyond which it was stable. For security reasons a flow rate of 1 ml/min was selected. The effect of ethanol content of wines on the analytical signal was equally evaluated by testing standard solutions with an ethanol content ranging from 0 to 20 % (w/v). It was found that between 0 and 10% the analytical signal increment was very weak comparing to the one observed within the 10 to 20 % range, that was ascribed to the higher solubility of the complex in the MIBK caused by ethanol. Nevertheless, in order to guarantee similarity between the samples and the standard solutions, the ethanol content of the latter was set to that of the samples, *i.e.*, 10 % (w/v).

To carry out the determination of Fe(III) the whole sample had to be removed from the aqueous phase around the organic bubble because it contained Fe(II). The propulsion of the carrier through the extraction device proved that the analytical signal diminished continuously as the volume used to wash the vial was increased, what might be due to the transfer of the complex extracted to the aqueous phase. The loss of sensitivity caused by this effect was minimized by estimating the moment when the aqueous phase contained no sample. Therefore, the step of organic phase aspiration and propulsion to the vial was skipped and the vial filled with a standard solution of 15.00 mg/l Fe(III) that formerly converged with the thiocyanate solution. The subsequent quantification of the analytical signals obtained with the same volumes of the aqueous phase as those of the organic phase and increasing the wash time showed that only volumes over 1000 μl originated no longer measurable analytical signals.

The enrichment factor is generally determined to characterize the performance of the methodology under development. This is usually attained by comparison of the slopes of the standard curves obtained with and without preconcentration step[25]. In this case, as the solutions used for the determinations were organic extracts, the sensitivity had to be assessed in organic media. For that, aqueous standards with Fe(III) contents ranging from 0.25 to 2.00 mg/l and complexed with 200 g/l of thiocyanate followed by extraction onto the accurate volume of MIBK were prepared. Upon analysis of the aqueous phase of each standard, the Fe(III) content was found at unmeasurable trace levels, *i.e.*, the total transfer of the complexes was practically accomplished. The organic extracts were then analyzed in an oxidizing flame which gave a sensitivity increase of about 2.9 times when compared with the standard curve attained under usual conditions with the aqueous standards. Additionally, the capacity of the organic phase to hold the complex formed between thiocyanate and Fe(III) was assessed. To that effect, 10.00 ml of a standard solution containing 20 mg/l of Fe(III) were mixed with 10.00 ml of 200 g/l thiocyanate solution and the complexes formed were extracted onto 1 ml of MIBK. The absorbance of the aqueous phase was measured against standard solutions in aqueous media presenting concentrations up to 10.00 mg/l, thus obtaining a capacity of 14.8 % (w/v) in Fe(III).

After preconcentrating volumes of a standard solution containing 2.00 mg/l Fe(III) within the 0 to 4.3 ml interval, it was found that the suitable volume of wine samples presenting a Fe(III) content less than 6 mg/l corresponded to about 1.8 ml. Table 2 gives the other performance characteristics of the proposed system.

Optimization of total Fe determination

To yield the best performance of the manifold developed, the flow conditions for the determination of total Fe were also optimized and, thus, the same standard solutions as those used for the determination of Fe(III) were used. Since the selection of different sample volumes

is very easily accomplished by simply changing the aspiration time or flow rate, as already described before[20], sample volumes varying from 50 to 500 μl were tried. It was found that sample volumes of 83, 125 or 333 μl enabled the attainment of linear response zones within the concentration ranges of 1.50-15.00 mg/l, 0.50-10.00 mg/l, and 0.25-5.00 mg/l, respectively.

Table 2 Analytical performance of the developed SIA system.

Element	Fe(III)	Total Fe		
Volume	1833 μl	85μl	125 μl	333 μl
Detection limit (3s)	0.03 mg/l	0.14 mg/l	0.06 mg/l	0.03 mg/l
Quantification limit (10s)	0.10 mg/l	0.47 mg/l	0.20 mg/l	0.10 mg/l
Characteristic concentration	0.08 mg/l	0.71 mg/l	0.40 mg/l	0.23 mg/l
Upper limit	6.00 mg/l	15.00 mg/l	10.00 mg/l	5.00 mg/l
Enrichment factor*	0.5		---	
Sampling rate		18.5 samples/h		

* Compared with the calibration in organic medium.

Application to the analysis of wine samples

The conditions presented in Table 1 were used for the determination of Fe(III) and total Fe in 10 red and white table wine samples. The results attained in the determination of Fe(III) and total Fe (Table 3) were compared with those given by the reference methods and, thus, the following two relationships were established respectively: $[SIA]_{mg/l}$ = 0.05 (±0.31) + 0.98 (±0.10)

* $[Comp]_{mg/l}$ e $[SIA]_{mg/l}$ = -0.14 (±0.29) + 1.03 (±0.04) * $[FAAS]_{mg/l}$, with relative deviations less than 10 % for the determination of Fe(III) and 5% for total Fe (Table 3). Furthermore, carrying out the paired t-student test with a confidence level of 95% gave results under the tabled ones, thus confirming the absence of important statistic differences between both methods.

Table 3 Results (mg/l) obtained in the determination of Fe(III) and total iron in table wines using the automatic (SIA/FAAS) and reference procedures, and the corresponding relative error (RE%).

Amostra	Fe(III)			Total Fe		
	COMP	SIA/FAAS	RE(%)	FAAS	SIA/FAAS	RE(%)
1	5.04 ± 0.14	4.88 ± 0.10	-3,1	13.5 ± 0.5	13.6 ± 0.2	0.7
2	3.46 ± 0.09	3.29 ± 0.10	-5,0	8.2 ± 0.5	8.6 ± 0.2	4.9
3	1.42 ± 0.04	1.30 ± 0.04	-8,5	5.3 ± 0.2	5.6 ± 0.2	3.7
4	2.88 ± 0.10	2.81 ± 0.05	-2,3	4.2 ± 0.1	4.0 ± 0.1	-4.8
5	2.98 ± 0.01	3.09 ± 0.10	3,8	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1	-2.9
6	1.92 ± 0.01	1.81 ± 0.03	-5,5	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.1	-3.0
7	4.12 ± 0.12	4.27 ± 0.10	3,7	9.2 ± 0.2	9.3 ± 0.1	1.1
8	2.36 ± 0.04	2.42 ± 0.05	2,7	5.9 ± 0.2	5.7 ± 0.1	-3.4
9	2.80 ± 0.09	2.93 ± 0.07	4,6	3.8 ± 0.2	3.7 ± 0.1	-2.6
10	1.77 ± 0.09	1.95 ± 0.06	9,9	2.4 ± 0.1	2.4 ± 0.1	0

Standard deviation from three consecutive determinations.

Repeatability expressed as the RSD of 10 replicate determinations of three samples containing Fe(III) concentrations of about 1.3, 3.3 and 4.9 mg/l was 4.9, 3.0 and 1.9 %, respectively. The same trial when carried out in three samples containing total Fe concentrations of 3.7, 8.9 and 12.6 mg/l provided RSD values of 1.9, 0.7 e 1.0 %, respectively.

The proposed procedure demonstrated the possibility to perform simultaneous determinations of Fe(III) and total Fe by the use of a liquid-liquid extraction SIA system and enrichment of the organic phase on one of the analyte oxidation states. The system is further advantageous regarding extraction with solvents that are less dense than water.

Acknowledgements: to *Fundação para a Ciência e Tecnologia* (FCT) for its financial support under the project *PRAXIS/P/AGR/10184/1998*, and the Ph. D. grant (*PRAXIS XXI/BD/9544/96*) conceded to Rui C.C. Costa.

References

1 A.S. Curvelo-Garcia, Controlo de Qualidade dos Vinhos, 1988, Instituto da Vinha e do Vinho, Lisboa

2 J. Ribéreau-Gayon, E. Peynaud, P. Sudraud and P. Ribéreau-Gayon, Sciences et Techniques du Vin, Tome 1 – Analyses et Contrôle des Vins, 1982, Dunod, Paris

3 J. Wang and S. Mannino, *Analyst*, **114**, 1989, 643

4 S. Pehkonen, *Analyst*, **120**, 1995, 2655

5 F. Lazaro, M.D. Luque de Castro and M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, **219**, 1989, 231

6 A Cladera, E. Gómez, J.M. Estela and V. Cerdá, *Analyst*, **116**, 1991, 913

7 B. Karlberg and S. Thelander, *Anal. Chim. Acta*, **98**, 1978, 1

8 F. H. Bergamin, J.X. Madeiros, B.F. Reis and E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, **101**, 1978, 9

9 Y. Luo, R.A. Othman, J. Ruzicka and G.D. Christian, *Analyst*, **121**, 1996, 601

10 K.L. Peterson, B.K. Logan, G.D. Christian and J. Ruzicka, *Anal. Chim. Acta*, **337**, 1997, 99

11 V. Kuban, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **22**, 1991, 477

12 H. Liu and P.K. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta*, **288**, 1994, 237

13 H. Liu and P.K. Dasgupta, *Process Control Qual.*, **7**, 1995, 195

14 F. Canete, A. Rios, M.D. Luque de Castro and M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, **60**, 1988, 2354

15 L. Nord and B. Karlberg, *Anal. Chim. Acta*, **164**, 1984, 233

16 R.H. Atalhah, J. Ruzicka and G.D. Christian, *Anal. Chem.*, **59**, 1987, 2909

17 H. Liu and P.K. Dasgupta, *Anal. Chem.*, **68**, 1996, 1817

18 M. Agudo, A. Rios and M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, **65**, 1993, 2941

19 A.O. Jacintho, M.A.Z. Arruda, E.A.G. Zagatto and B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, **258**, 1992, 129

20 A.N. Araújo, R. C. C. Costa J.L.F.C. Lima and B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, **358**, 1998, 111

21 Recueil des Méthodes Internationales d'analyse des Vins et des Môuts, 1990, Office International de la Vigne et du Vin, Paris

22 J.F. Tyson, C.E. Adeeyinwo, J.M.H. Appleton, S.R. Bysouth, A.B. Idris and L.L. Sarkissian, *Analyst*, **110**, 1985, 487

23 A.N. Araújo, R. C. C. Costa and J.L.F.C. Lima, *Anal. Sci.*, **15**, 1999, 991

24 Z. Marczenko, Separation and Spectrophotometric Determination of Elements, 1985, John Wiley & Sons, New York

25 Z. Fang, Flow Injection Separation and Preconcentration, 1993, VCH Publishers, New York

CAPÍTULO V

DETERMINAÇÃO DE PALÁDIO EM URINA HUMANA

"Os vícios quando estão na moda passam por virtudes."
Moliére

DEVELOPMENT OF A PRECONCENTRATION PROCEDURE FOR THE DETERMINATION OF Pd IN HUMAN URINE BY SIA/ETAAS

ATOMIC SPECTROSCOPY: SUBMETIDO

DEVELOPMENT OF A PRECONCENTRATION PROCEDURE FOR THE SIA/ETAAS DETERMINATION OF Pd IN HUMAN URINE

Rui C.C. Costa[1], Agostinho A. Almeida[1], Alberto N. Araújo[1*] and Valdinete L. Silva[2]

[1]CEQUP/Dep. Química-Física, Faculdadde de Farmácia U.P., Rua Aníbal Cunha, 164 4050 Porto, Portugal

[2]Dep. Engenharia Química UFPE, Rua Teresa Emellia, S/N, 50740-510, Cidade Universitária, Recif, Pernambuco, Brasil

Abstract

A Sequential Injection Analysis system for the determination of palladium in human urine by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry is described. The system runs fully independent from the autosampler of the equipment. The procedure is based on the retention of the complex formed between palladium and diethyldithiocarbamate on a column of silica C18 and elution with about 43 µl of ethanol directly into the graphite furnace. Using about 8 ml of sample allowed the attainment of a detection limit of 9 ng/l and a sampling rate of about 10 samples/h. Accuracy of the proposed methodology by recovery trials ranged between 91% and 100%. Repeatability assessed as RSD in three samples with 26, 46 and 61 ng/l in palladium concentration yielded 11.3, 5.8 and 4.8% respectively.

Key Words: Pd, SIA/ETAAS, urine

* corresponding author; Tel.: +351-2-2087132; Fax: +351-2-2003977; e-mail: anaraujo@mail.ff.up.pt

Introdution

The noble metals, such as palladium, have been for a long time considered to be harmless due to their chemical inertness. This has determined its use in large scale either as alloys in medical devices and jewellery manufacture, or even as industrial catalyst in chemical processes[1]. In the mid-seventies, palladium starts to be used as a component in catalytic converters of motor vehicles to reduce the emission of carbon monoxide, hydrocarbons and nitrogen oxides to the atmosphere[2,3]. Therefore, palladium emission to the atmosphere has increased considerably over the last years[4]. The environmental impact of the increased palladium levels in the atmosphere is not well established yet as well the relationship between these levels and their effect on human body. Nevertheless, it is well-known that palladium and its compounds are powerful sensitizing agents that may cause allergic reactions such as contact dermatitis, rhinitis, conjunctivitis, asthma and urticaria[5].

The analysis of biologic fluids and tissues is from a biological point of view one of the most appropriate forms of evaluating environmental and occupational exposure to pollutants. Palladium is present in biologic fluids, namely urine, at ultra-trace levels, *i.e.*, generally less than 150 ng/l[6]. Direct determination of Pd is carried out by very sensitive techniques, such as magnetic sector field ICP-MS[7] and double focusing magnetic sector-field ICP-MS[8]. These techniques are however not easily acquired because of their expensive price and maintenance when large scale analysis is intended. As alternative, palladium determination can be accomplished by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) after a sample preconcentration step. One of the procedures proposed[9] is based on digestion of the samples with HNO_3 and $HClO_4$, followed by reduction of the volume and removal of the $KClO_4$ precipitate prior to ETAAS analysis. As alternative liquid-liquid extraction with MIBK of the complex formed between palladium and APDC after digestion of the samples was proposed[10]. This procedure enables the attainment of a detection limit of about 20 ng/l, despite being very hardly achieved due to the low volume of organic phase obtained at the end of the procedure for ETAAS analysis.

Resort to on-line extraction presents some advantages over the conventional off-line procedures, namely regarding precision, accuracy, safety and economy[11]. To increase the sensitivity of ETAAS determinations in general, some strategies were proposed. Extraction of low polar complexes in fulerene[12] or silica C18 columns[13-16], at the inner wall of the tubing after its coating with the complex forming reagent[17], single adsorption by the inner wall of the tubing[18], ionic exchange[19,20], co-precipitation[21-24] and liquid-liquid extraction[25,26] are the most referred procedures. In spite of this, reported works on Pd determination are very scant and only limited to water samples[27-29]. Lee *et al.*[27] suggested a segmented continuous flow system for the preconcentration of palladium as a low polar complex in a resin XAD-4 column and detection by ETAAS or ICP-AES, after elution with NH_4OH 5 or 0.5 mol/l respectively. Schuster and Schwarzer[28,29] developed two systems also based on retention of a low polar palladium complex in a silica C18 column and elution with ethanol. This procedure could also be carried out with ICP-MS detection[29].

The coupling of continuous flow preconcentration systems to ETAAS presents some drawbacks derived from the discreet way of introduction of samples into the graphite furnace and the low sample volume allowed by the furnace. Several strategies were explored to overcome these difficulties. The easiest procedure consists in the automatic extraction and manual transfer of the solution into the cups of the equipment autosampler[13,30,31]. Nevertheless, contamination risk is very high and in cases of organic solutions the high vapour pressure results in a concentration increase due to solvent evaporation. To minimize these problems, several systems enabling direct deposition of an eluate fraction in the graphite furnace were further proposed[14,32]. Deposition with a thermospray[15], or in a preheated tube[33], or performing multiple injections into the graphite furnace with sequential drying[34] enabled to accommodate high solution volumes. Systems generating low eluate volumes enabled its total deposition in the graphite furnace[18,35]. In general, the microcolumn is located at the end of the mobile bracket of the spectrophotometer autosampler. The eluent goes through the microcolumn with air propelled by a peristaltic pump and the eluate is deposited in the graphite furnace after manual displacement of the mobile bracket capillary of the autosampler[36]. As alternative, the eluent is

aspirated from the cup of the spectrophotometer autosampler and automatically deposited in the graphite furnace[27,37-39]. However, these combinations are not very versatile since the performance of the continuous flow system depends on the autosampler of the equipment, thus restraining its use under discrete conditions in other analytical applications. Therefore, it would be more advantageous to have a continuous flow system not dependent of the autosampler of the equipment and thus it could be coupled to different types of ETAAS spectrophotometers. Sequential Injection Analysis (SIA)[40] based on the discrete and controlled flow of the solutions is an alternative technique to be used with preconcentration systems developed to assure the volume required for ETAAS. This paper reports the development of a procedure for the determination of palladium in human urine by ETAAS involving an automatic system based on the SIA technique that is physically independent of the autosampler of the equipment. The SIA system presents a *Gilson* autosampler with a steel capillary holding a column of silica C18 at its ending, where palladium is retained as a diethyldithiocarbamate complex and then eluted with absolute ethanol directly into the graphite furnace by means of the autosampler of the SIA system.

EXPERIMENTAL

Reagents and Solutions

All solutions were prepared with water obtained with a *Milli-Q* system from *Millipore* (resistivity >18 MΩ.cm) and analytical grade reagents. Nitric acid and ammonia solutions were prepared with *Suprapur* grade chemicals from *Merck* in concentrations of 65 and 25% (w/w), respectively.

The standard solutions were daily prepared from a 1000 ± 2 mg/l Pd(II) commercial stock solution (*Fluka*, ref. 76035) by dilution with *Milli-Q* water and presenting a pH adjusted to 3 units with 0.1 mol/l HNO_3.

Milli-Q water was used in the SIA system as carrier flow.

A 0.2% (w/v) sodium diethyldithiocarbamate aqueous solution (DDC) (*Fluka*, ref.71480) was used as complex forming agent and absolute ethanol as eluent.

Urine samples collected in a clinical chemistry laboratory were acidified with 65% (w/w) HNO_3 until a 3 unit pH was attained, and kept in a refrigerator before use. Prior to analysis, the samples were filtered by a vacuum system equipped with a G4 ceramic filter.

The solid phase was composed of particles of silica C18 (*Waters Millipore*, *SEP-PAK*) packed in a 6 mm length and 1.14 mm id column. This was constructed with PVC impulsion tube fitted with a polyethylene filter in its endings.

All the glass and plastic used to store the solutions were kept in 30% (w/w) HNO_3 solution for at least 12 hours and then rinsed several times with *Milli-Q* water.

Apparatus

The developed SIA manifold is depicted in Figure 1 and consisted of a *Gilson Minipuls 3* peristaltic pump (P_1) equipped with a 1.14 mm id PVC impulsion tube, a 600 cm length and 0.8 mm id PTFE holding coil (HC) and an 8-port multiposition fluid selecting valve (V) from *Valco Instruments* (Houston, USA) model *Cheminert™ C15-3118E*. In order to minimize the effect of the fluids inertia inside the system on the reproducibility of the volumes aspirated and pumped, a three way solenoid valve (S_1) was placed between the holding coil (HC) and the peristaltic pump (P_1)[41]. A *Perkin Elmer* model 4100 ZL electrothermal atomic absorption spectrophotometer with longitudinal *Zeeman* effect background correction was used as

detection system. End-capped transverse heated graphite tubes with *L'vov* platform were used throughout.

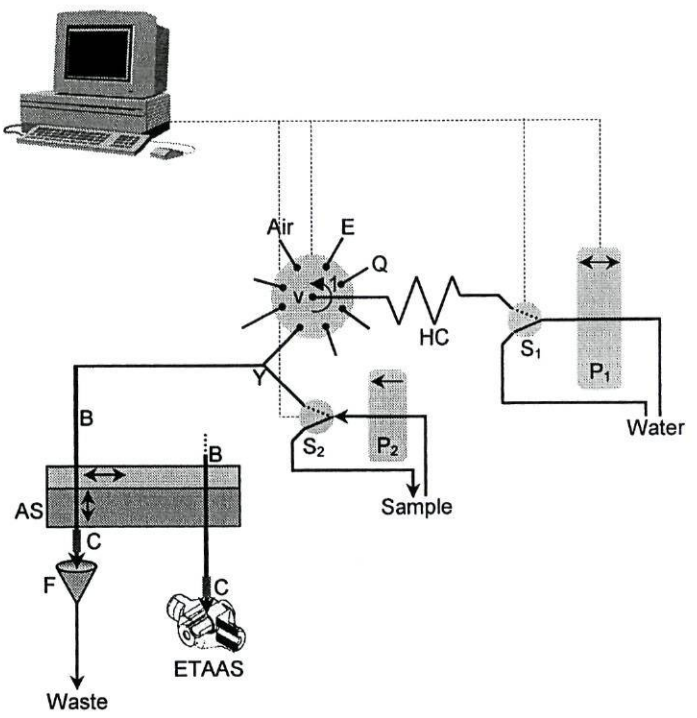


Figure 1 Schematic representation of the developed SIA system. P_1, P_2 – peristaltic pumps; V – multiposition valve; HC – holding coil; S_1, S_2 – three way solenoid valves; Q – DDC solution; E – ethanol; Y – PTFE connector; AS – *Gilson* autosampler; B – steel capillary; C – silica C18 column; F – funnel; ETAAS – Electrothermal atomic absorption spectrophotometer.

The extraction device was composed of a *Gilson Minipuls 3* peristaltic pump (P_2) equipped with a 1.65 mm id PVC impulsion tube, a *NResearch* model *161 T031* tree way solenoid valve (S_2), a *Gilson* model 221 autosampler (AS) presenting a 30 cm length and 1 mm id steel capillary tube (B) in which ending the silica C18 microcolumn (C) was placed. The

autosampler of the extraction device was configured to enable the discard of the solutions to the waste through a hanging funnel in its rest position (F) during preconcentration and column conditioning, and to promote deposition of a small eluate volume inside the graphite furnace before analysis.

In the trials using digested samples a *Milestone* model *MLS 1200 Mega* microwave oven was used.

Methods

Flow conditions used for the Pd determination in human urine samples, are presented in Table 1. Before starting the analytical cycles to accomplish the palladium determinations the SIA system is actuated being the steel capillary mounted on mobile bracket of the *Gilson* autosampler displaced onto a funnel that is connected to a vessel working as waste. Then the column containing silica C18 is conditioned by propelling through port 5 of the main stream selecting valve about 1 ml of ethanol (E) previously aspirated through port 2 (Fig. 1). The first step of the analytical procedure consisted in the aspiration of the complex forming agent, DDC (Q), through port 1, meanwhile a new sample is pumped through P_2 pump and S_2 valve into the sample container. Then, the S_2 valve is activated and the flow inside the holding coil reversed, thus merging with the sample through port 5. Throughout this step, the complex formed downstream between Pd and DDC flowed along the steel capillary until its retention in the column positioned in the ending of this capillary, whereas the remainder sample matrix is sent to the waste. At step 3, S_2 valve is turned off and the whole tubing connecting the multiposition valve to the column is rinsed with *Milli-Q* water used as carrier in the SIA system. The elution step is carried out first by sequential aspiration into the holding coil of 750 μl of ethanol from port 2 followed by a small air bubble from port 3, and then sending them to the steel capillary through port 5 until the air bubble reaches the column. At this moment, the capillary displaces

aiming its positioning over the graphite furnace and then it lowers until it enters in the graphite furnace through the upper opening. Finally an aliquot of about 43 µl of eluate is deposited. While the capillary is returning to its initial position above the funnel, thus ensuring the conditioning of the resin for the next trial, the ETAAS temperature program is started. The instrumental conditions selected for ETAAS determination of Pd in human urine with the proposed SIA system are shown in Table 2. The samples digestion was carried out in a microwave oven, with the time and power program indicated in Table 3.

Table 1 Flow conditions selected for the determination of Pd in human urine.

Port	Stage	Direction	Time (s)	Flow rate (ml/min)	Volume (µl)
1	DDC	Aspiration	25	3.0	1250
5	Waste	Propulsion	3	3.0	150
	DDC			0.25	1000
5	Preconcentration	Propulsion	240		
	Sample			2.0	8000
5	H_2O	Propulsion	20	2.0	667
2	Ethanol	Aspiration	15	3.0	750
3	Air	Propulsion	3	2.0	100
5	Elution	Propulsion	18.5	2.0	617
5	ETAAS	Propulsion	13	0.2	43.3
5	Conditioning	Propulsion	30	2.0	1000

Table 2 Instrumental conditions selected for the determination of Pd in human urine.

Wavelengt	247.6 nm
Slit width	0.7 nm
Background correction	Longitudinal Zeeman effect
Inert gas	Argon
Injection Temperature	20 °C
Sample volume	43 µl
Measurement mode	Peak area
Integration time	5 s

Furnace Program

Step	Ramp (s)	Hold (s)	Temperature (°C)	Argon flow (ml/min)
Dry 1	1	90	90	250
Dry 2	10	20	110	250
Ash	10	20	250	250
Atomize	0	5	2300	0
Clean	1	4	2400	250

Table 3 Microwave digestion program.

Step	Time (s)	Power (w)
1	5	250
2	5	400
3	5	500
4	1	600

Results and Discussion

Optimization of the temperature program for ETAAS determination

As the extraction procedure provided an ethanolic extract containing the complex formed between palladium and DDC, the adequate temperatures of the graphite furnace for the Pd determination were primarily studied. Therefore, a standard solution containing 50 µg/l of palladium and 0.2% (w/v) of DDC was prepared in absolute ethanol and the pyrolysis temperature studied between 100 and 1900 ºC considering a constant sample aliquot of about 50 µl. As shown in Figure 2, the signal diminished significantly when the temperature was increased between 100 and 500 ºC, mainly due to volatilisation of the complex formed between palladium and DDC[42]. In the temperature interval between 500 and 1500 ºC, the intensity of the signals remained stable, whereas within the range of 1500 to 1900 ºC it decreased again but due to the loss of palladium mainly by atomization. Considering the before mentioned results, the choice of an ashing temperature close to that of the drying step was tried since it enables better sensitivity. However, it was found that the tube presented some degradation after a few trials. Hence, aiming the accomplishment of a compromise between the tube lifetime and sensitivity, a temperature of 250 ºC was selected similarly to proposals from other authors[10]. The atomization temperature was also studied within the 1500 to 2400 ºC. The results obtained (Figure 2) shows that the lowest atomisation temperature that ensures a total atomisation was close to 2300 ºC. The drying step was established by visual control of the ethanolic extract behaviour throughout its drying process. Two steps were then set: one at 90 ºC to enable alcohol evaporation without spattering and the other at 110 ºC to assure the total drying of the sample aliquot. Table 2 presents the final graphite furnace time and temperature schedule selected for Pd determination.

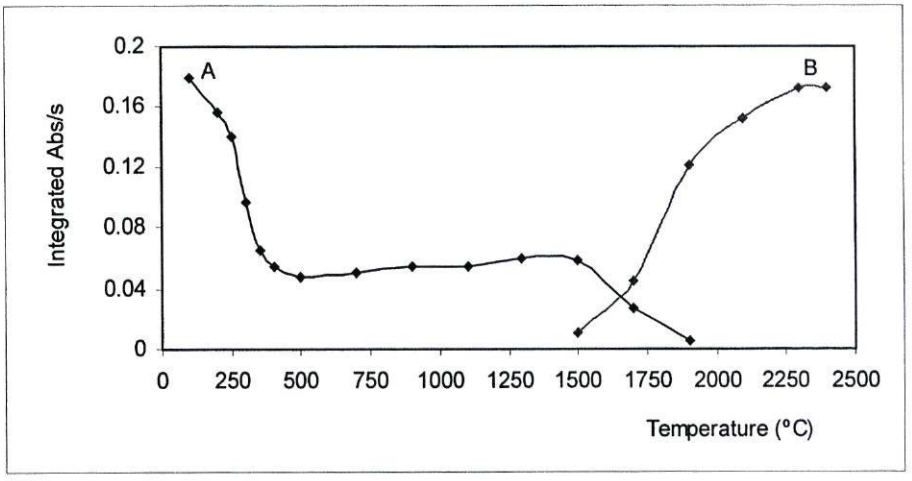


Figure 2 Effect of the ashing (A) and atomization (B) temperatures on the analytical signal amplitude of an alcohol standard solution with 50 µg/l in Pd.

SIA system optimization

Extraction of low polar metallic complexes with sorbents such as silica C18 is one of the most advantageous procedures for selective metals removal from aqueous solutions specially when complex matrices are involved[43]. The carbamates, and in this case the diethyldithiocarbamate (DDC), are the reagents most commonly used because of its ability to form selective complexes with the majority of the metallic elements[44]. Palladium next to mercury is the element presenting the best affinity for DDC[45]. For this reason, this reagent was selected to preconcentrate palladium in urine whilst silica C18 was chosen as sorbent.

The effect of the flow rate used for sample preconcentration was studied within the 0.5-5 ml/min range. Therefore, about 2.5 ml standard solution containing 0.5 µg/l in Pd were preconcentrated by merging with the 0.2 % (w/v) DDC solution at a 0.5 ml/min flow rate. The results obtained (Figure 3) showed that in the range studied the enrichment factor[11], defined as the ratio of the calibrating curves with and without preconcentration, decreased with the flow

rate increase due to the reduction of time contact between the complexes and the sorbent phase. On the other hand, there was a considerable increase of the concentration efficiency[11], seen as the enrichment factor per minute, up to 2 ml/min. Hence, in order to attain a compromise between the enrichment factor and the concentration efficiency the flow rate of 2 ml/min was kept in the remaining studies. The effect of the concentration of the DDC on the analytical signal amplitude was also assessed up to 0.5% (w/v). It was found a proportional increase in the analytical signal amplitude until 0.1% (w/v) of DDC solution. The signals become constant when more concentrated solutions were tried. In order to guarantee robustness of the procedure, a 0.2% (w/v) DDC solution was selected. The effect of this solution flow rate to be added to the sample solution within the 0.05 and 2 ml/min range evidenced maximum analytical signal amplitude between 0.2 and 1 ml/min. Tacking into account these results the optimal flow rate was set at 0.25 ml/min, which allows lower reagent consumption with sensitivity loss.

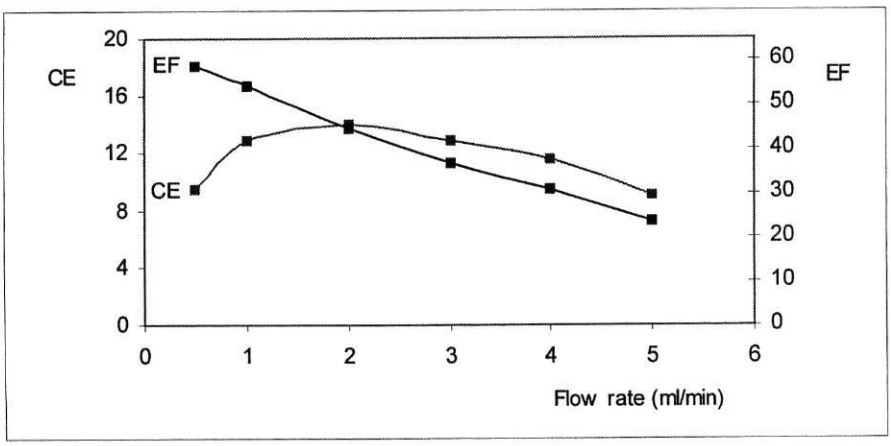


Figure 3 Effect of the preconcentration flow rate of a 0.50 µg/l Pd standard solution on the enrichment factor (EF) and concentration efficiency (EC).

The complex forming reaction of palladium with DDC depends on the solution pH[45]. To consider this the influence of the sample pH was assessed under the conditions selected before. Standard solutions with pH ranging between 0.5 and 10.5, after addition of the appropriate volumes of HNO_3 or ammonia 0.1 mol/l, were used as samples. The results obtained (Figure 4) showed that for pH lower than 1 or higher than 4 the analytical signals decrease, whilst within the 1 - 4 range the analytical signal was constant. To minimize its influence on the developed procedure, the standard solutions and samples pH was adjusted to around 3.

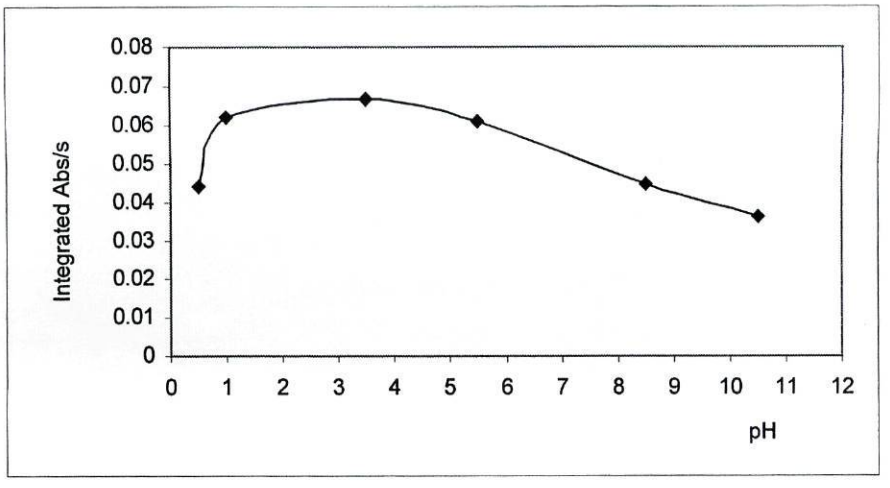


Figure 4 Effect of the pH of a standard solution containing 0.50 µg/l of Pd on the analytical signal amplitude.

The elution step and mainly the eluent volume used is one of the critical parameters in the definition of the preconcentration efficiency value. Hence optimization usually consists in getting the lowest volume that ensures the elution of the highest amount of palladium retained in

the column, without disregard for the maximum capacity of the graphite furnace. The results depicted in Figure 5 show that ethanol volumes around 40 μl enabled a nearly complete elution that was compatible with the graphite furnace capacity (50 μl).

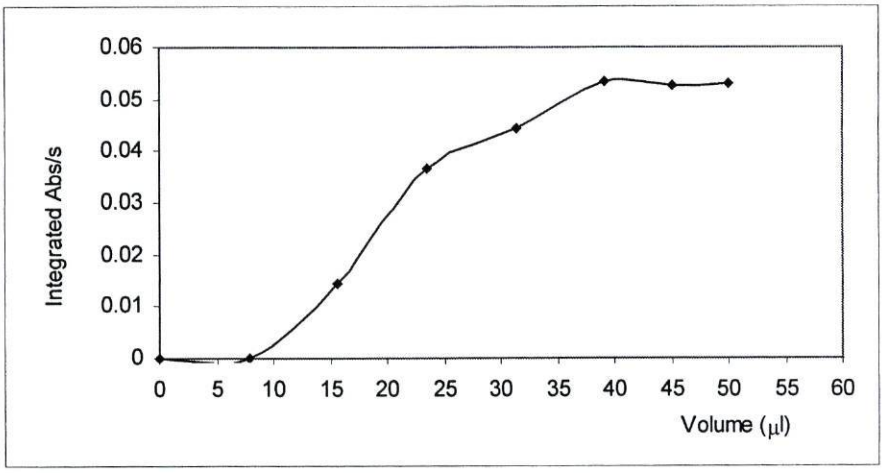


Figure 5 Effect of the eluate volume deposited into the graphite furnace on the analytical signal amplitude of a 0.5 μg/l Pd standard solution.

Application to the analysis of urine samples

Since the procedures recommended for direct determination of Pd in urine[7,8] impose the samples digestion before the instrumental measurements, an evaluation of the necessity of this sample pretreatment with the proposed procedure was evaluated. For that, several samples were submitted to a digestion procedure in a microwave oven after adding 65% (w/w) HNO_3 and using the program indicated in Table 3. Before analysis samples were further submitted to a single filtration under vacuum and using a ceramic filter. The analytical signals obtained in the absence and by performing samples digestion were identical, thus proving that a single sample

filtration was enough. This result is somehow expected since palladium forms strong complexes with chloride[44] whose concentration is very high in urine matrix[46] and probably it is present in urine completely solubilized as chlorocomplexes. Afterwards, the sample volume required for the adjustment of this procedure to palladium concentrations in the samples was also evaluated. Sample volumes ranging from 2 to 12 ml were tried showing that a volume of about 8 ml allowed a detection limit of about 9 ng/l that was enough to determine urine palladium contents less than 150 ng/l[6]. By setting these conditions other performances of the proposed system are presented in Table 4.

Table 4 Analytical performance of the developed SIA system.

Element	Pd
Volume	8 ml
Detection limit (3s)	9 ng/l
Quantification limit (10s)	30 ng/l
Characteristic mass	0.43 pg
Concentration range	30 – 200 ng/l
Enrichment factor	140
Sampling rate	10 samples/h

Using the conditions indicated in Table 1, 12 human urine samples were processed using the developed set-up, being the corresponding results summarized in Table 5. Accuracy of the proposed methodology was assessed by adding known amounts of palladium to the samples. Recoveries between 91 and 100%, stressing the suitability of the developed

procedure for palladium determinations in urine. Repeatability expressed as the RSD of 10 replicate determinations in three samples containing 26, 46 and 61 ng/l of palladium was found to be 11.3, 5.8 and 4.8 respectively.

Table 5 Recovery rates obtained in the determination of Pd in human urine.

Sample	ETAAS		
	Without addition	Added (ng/l)	Recovery (%)
1	59.3 ± 3.3	250.00	97.7 ± 1.8
2	30.5 ± 4.3	100.00	96.2 ± 1.6
3	29.0 ± 1.2	100.00	100.1 ± 2.6
4	46.3 ± 5.0	250.00	98.0 ± 1.8
5	49.2 ± 3.3	250.00	94.7 ± 2.6
6	60.0 ± 5.4	300.00	99.3 ± 2.1
7	16.8 ± 3.3	200.00	91.5 ± 2.5
8	< LOD	200.00	96.6 ± 1.6
9	15.3 ± 2.2	200.00	95.4 ± 1.0
10	48.5 ± 3.3	200.00	95.5 ± 1.8
11	41.3 ± 2.2	200.00	97.1 ± 1.4
12	32.6 ± 2.2	200.00	93.6 ± 1.4

Standard deviation obtained from three consecutive determinations.

The use of an ETAAS preconcentration system which is totally independent from the autosampler of the equipment, in addition to the determination of an element whose

concentration can only be attained by high technology such as magnetic sector field ICP-MS or double focusing magnetic sector field ICP-MS are the main advantages of the developed procedure. The resort to sequential injection concept enables sufficient versatility in order to exploit the use of the proposed set-up for other determinations which required the same sample pretreatment without physical reconfiguration.

Acknowledgements: To *Fundação para a Ciência e Tecnologia* (FCT) for its financial support under the project *PRAXIS/P/AGR/10184/1998*, to binational project *Proc. 423 ICCTI/CAPES* and the Ph. D grant (*PRAXIS XXI/BD/9544/96*) conceded to Rui C.C. Costa.

References

1 J.C. Wataha and C.T. Hanks, *J. Oral. Rehabil.*, **23**, 1996, 309

2 H.P. Konig, R.F. Hertel and W. Koch, *Atmos. Environ.*, **26A**, 1992, 741

3 V.F. Hodge and M.O. Stallard, *Enviom. Sci. Technol.*, **20**, 1986, 1058

4 M. Balcerzak, *Analyst*, **122**, 1997, 67R

5 A.D. Dayan, Immunotoxicity of Metals and Immunotoxicology, 1990, Plenum Press, New York

6 C. Minoia, E. Sabbioni, P. Apostoli, R. Pietra, L. Pozzoli, M. Gallorini, G. Nicolaou, L. Alessio and E. Capodaglio, *Sci. Total. Environ.*, **95**, 1990, 89

7 M. Krachler, A. Alimonti, F. Petrucci, K.J. Irgolic, F. Forastiere and S. Caroli, *Anal. Chim. Acta*, **363**, 1998, 1

8 J. Begerow, M. Turfeld and L. Dunemann, *J. Anal. At Spectrom.*, **11**, 1996, 913

9 A.H. Jones, *Anal. Chem.*, **48**, 1976, 11

10 J. Begerow, M. Turfeld and L. Dunemann, *Anal. Chim. Acta*, **340**, 1997, 277

11 Z. Fang, Flow Injection Separation and Preconcentration, 1993, VCH Publishers, New York

12 K. Benkhedda, E. Ivanova and F. Adams, *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**, 1999, 957

13 R.L. Ma, W. Van Mol and F. Adams, *Anal. Chim. Acta*, **293**, 1994, 251

14 B. Welz, *Microchem. J.*, **45**, 1992, 163

15 P.C. Bank, M.T.C. Loos-Vollebregt and L. Galan, *Spectrochim. Acta Part B*, **44**, 1989, 571

16 H. Chen, S. Xu and Z. Fang, *J. Anal. At. Spectrom.*, **10**, 1995, 533

17 X.P. Yan and F. Adams, *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**, 1997, 459

18 V. Porta, O. Abollino, E. Mentasti and C. Sarzanini, *J. Anal. At. Spectrom.*, **6**, 1991, 119

19 M.M. Silva, M.A.Z. Arruda, F.J. Krug, P.V. Oliveira, Z.F. Queiroz, M. Gallego, and M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, **368**, 1998, 255

20 E. Beinrohr, M. Cakrt, M. Rapta and P. Tarapci, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **335**, 1989, 1005

21 Z.L. Fang and L.P. Dong, *J. Anal. At. Spectrom.*, **7**, 1992, 439

22 E. Ivanova, X.P. Yan, W. Van Mol and F. Adams, *Analyst*, **122**, 1997, 667

23 C.X.P. Yan, W. Van Moll and F. Adams, *Analyst*, **121**, 1996, 1061

24 Z.X. Huang, X.R. Wang, P.Y. Yang, C.L. Yang and B.L. Huang, *Can. J. Appl. Spectrosc.*, **39**, 1994, 101

25 K. Backstron and L.G. Danielsson, *Anal. Chem.*, **60**, 1988, 1354

26 G. Tao and Z. Fang, *Spectrochim. Acta Part B*, **50**, 1995, 174

27 M.L. Lee, G. Toelg, E. Beinrohr and P. Tschoepel, *Anal. Chim. Acta*, **272**,1993, 193

28 M. Schuster and M. Schwarzer, *Anal. Chim. Acta*, **328**, 1996, 1

29 M. Schuster and M. Schwarzer, *At. Spectrosc.*, **19**, 1998, 121

30 F. Malamas, M. Bengtsson and G. Johansson, *Anal. Chim. Acta*, **160**, 1984, 1

31 S. Nakashima, R.E. Sturgeon, S.N. Willie and S.S. Berman, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **330**, 1988, 592

32 Z. Fang, M. Sperling and B. Welz, *J. Anal. At. Spectrom.*, **5**, 1990, 639

33 B. Welz, M. Sperling and X.J. Sun, *Fresenius'J Anal. Chem.*, **346**, 1993, 550

34 Z. Grobenski, R. Lehmann, B. Radziuk and U. Voellkopf, *At. Spectrosc.*, **5**, 1984, 87

35 Z. Liu and S. Huang, *Anal. Chim. Acta*, **267**, 1992, 31

36 Z. Liu and S. Huang, *Anal. Chim. Acta*, **281**, 1993, 185

37 M. Sperling, X.F. Yin and B. Welz, *J. Anal. At. Spectrom.*, **6**, 1991, 295

38 F.M. Fernández, J.D. Stripeikis, M.B. Tudino and O.E. Troccoli, *Analyst*, **122**, 1997, 679

39 D. Yuan and I.L. Schuttler, *Anal. Chim. Acta*, **316**, 1995, 313

40 J. Ruzicka and G.D. Marshall, *Anal. Chim. Acta*, **237**, 1990, 329

41 A.N. Araújo, R.C.C. Costa, J.F.C. Lima and B.F. Reis, *Anal.Chim. Acta*, **358**, 1998, 111

42 K. Backstrom, L.G. Danielsson and L. Nord, *Analyst*, **109**, 1984, 323

43 J. Ruzicka and A. Arndal, *Anal. Chim. Acta*, **216**, 1989, 243

44 Z. Marczenko, Separation ans Spectrophotometric Determination of Elements, 1985, John Wiley & Sons, New York

45 J. Stary and K. Kratzer, *Anal. Chim. Acta*, **40**, 1968, 93

46 A.B. Gorina, A Clínica e o Laboratório, 12ª Edição, 1984, Guanabara Koogan, Rio Janeiro

CAPÍTULO VI

CONSIDERAÇÕES FINAIS

"Na ausência de certezas, só nos resta seguir o instinto."
Jonathan Cainer

Conforme é possível constatar, a técnica SIA evidencia grande versatilidade visível, quer na sua aplicação directa a determinações que envolvem processamento simples da amostra, quer na forma como os diversos módulos desenvolvidos, alguns deles com o propósito de efectuar a determinação de mais do que um parâmetro em diferentes tipos de matrizes, podem ser acoplados ao sistema SIA básico descrito no Capítulo II.

O acoplamento da técnica SIA à AAS com atomização por chama representa uma associação com benefícios mútuos, já que à redução da influência das características físicas das amostras, principalmente a caudais superiores ao de aspiração do espectrofotómetro, se associa a selectividade da FAAS na análise de espécies elementares.

A facilidade com que é possível alterar o volume em sistemas SIA permite que a diluição em diferente grau seja mais simples de executar comparativamente com as outras técnicas de fluxo contínuo. Esta particularidade reveste-se de especial utilidade quando o intervalo de concentração da espécie nas amostras é amplo, obrigando noutras técnicas de fluxo à reconfiguração física das montagens. Esta potencialidade da técnica SIA poderá ser ainda estendida através da inclusão no *software* de controlo de uma sub-rotina de aquisição dos sinais analíticos e outra de auto-adequação do procedimento a executar conforme os resultados obtidos. O estabelecimento do volume a partir do tempo e do caudal permite também reduzir o consumo das soluções, com particular importância no caso do agente supressor de interferências químicas. Adicionalmente, porque o sistema apresenta um modo de funcionamento intermitente, a produção de efluentes é consideravelmente menor relativamente às outras técnicas de fluxo contínuo, o que, apesar de pressupor uma ligeira redução dos ritmos de determinação constitui uma grande vantagem na perspectiva ambiental. Esta redução dos ritmos de determinação pode contudo ser minimizada através da utilização de uma bomba peristáltica como dispositivo de propulsão em lugar dos outros dispositivos referenciados ao longo da dissertação.

Nos casos onde a sensibilidade é manifestamente insuficiente para a concentração das amostras o sistema SIA pode ser dotado de módulos de pré-concentração por extracção em fase sólida ou líquida com um desempenho semelhante ao documentado para os procedimentos propostos para a associação FIA/FAAS.

No que diz respeito à associação SIA/ETAAS, a alternativa proposta, para além de possibilitar a aplicação a outras espécies, permite também estender de forma significativa a sensibilidade da ETAAS sem comprometer a utilização desta em determinações que não requeiram o sistema automático.

Do que foi estudado até ao presente momento, é possível afirmar que a técnica SIA constitui pela sua robustez e versatilidade uma alternativa vantajosa aos equipamentos similares que actualmente equipam os laboratórios de rotina e de controlo.