Paula Cristina de Azevedo Gomes Pinto

A ANÁLISE POR INJECÇÃO SEQUENCIAL COMO BASE DE SISTEMAS AUTOMÁTICOS EM FLUXO CONTÍNUO

Universidade do Porto
Faculdade de Farmácia
Porto, 2005

Paula Cristina de Azevedo Gomes Pinto

Licenciada em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Porto

A análise por injecção sequencial como base de sistemas automáticos em fluxo contínuo

Dissertação para Doutoramento apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Universidade do Porto

Faculdade de Farmácia

Porto, 2005

Trabalho realizado no serviço de Química-Física

da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Resumo

No âmbito desta dissertação foram desenvolvidos procedimentos analíticos, baseados na análise por injecção sequencial, que visavam avaliar as potencialidades e versatilidade deste tipo de metodologia bem como testar a sua associação a elementos típicos de outras técnicas de fluxo contínuo.

As montagens desenvolvidas permitiram a implementação de procedimentos analíticos para determinação de nitratos e nitritos em soro humano e águas, ácido aminocapróico e indometacina em formulações farmacêuticas, capacidade antioxidante de vinhos e ferro em óleos alimentares.

As vantagens da optimização de procedimentos enzimáticos, em sistemas baseados na análise por injecção sequencial, foram avaliadas na automatização da determinação de nitratos e nitritos em soro humano e águas. A metodologia desenvolvida permitiu ainda testar a utilização de uma câmara de mistura com o objectivo de criar as condições óptimas para o desenvolvimento das reacções enzimáticas envolvidas na determinação. Nesta montagem, foi ainda testada a versatilidade da metodologia, durante o desenvolvimento de um procedimento de diluição em linha, que visava o alargamento da zona de resposta linear aplicada à determinação de nitratos.

Na metodologia desenvolvida para a determinação de ácido aminocapróico recorreu-se a uma válvula solenóide para efectuar a mistura, em linha, dos reagentes envolvidos na determinação, por amostragem binária. Acoplou-se ainda, ao sistema, um aparelho de dissolução de forma a acompanhar a variação da concentração de princípio activo durante os ensaios de dissolução de comprimidos. Em ambos os casos foi avaliado o comportamento do sistema face aos elementos acoplados.

Foi implementado um sistema analítico para avaliação da capacidade antioxidante de vinhos recorrendo a uma determinação espectrofotométrica e uma fluorimétrica. A

montagem optimizada envolvia assim a utilização de dois detectores diferentes, obtendo-se em cada ciclo dois sinais analíticos.

Avaliou-se a utilização de duas microbombas solenóides como unidade de propulsão num sistema baseado na análise por injecção sequencial, tendo-se estudado a influência do fluxo pulsado obtido no grau de mistura de zonas aspiradas sequencialmente. A utilidade analítica da montagem foi testada por aplicação à determinação de indometacina em formulações farmacêuticas.

Foi desenvolvida uma metodologia analítica para determinação de ferro na forma de Fe(III), em óleos alimentares, que pretendia ser uma ferramenta genérica para a amostragem, deste tipo de amostra, em sistemas de fluxo. A estratégia desenvolvida permitiu avaliar as vantagens da incorporação de uma válvula de injecção e de uma câmara de mistura no sistema de fluxo.

A validação das metodologias desenvolvidas foi efectuada por comparação dos resultados obtidos com os fornecidos por metodologias de referência ou de comparação e, no caso da metodologia desenvolvida para análise de óleos alimentares, por análise de amostras de óleo certificadas.

Abstract

In this work several analytical methodologies based on sequential injection analysis were developed. The objective of the developed systems was to evaluate the potentialities and the versatility of the sequential injection analysis methodology as well as its association with devices of other flow techniques.

The developed flow systems allowed the implementation of analytical procedures for the determination of nitrites and nitrates in human serum and waters, aminocaproic acid and indomethacin in pharmaceutical formulations, antioxidant capacity of wines and iron in edible oils.

The advantages of the implementation of enzymatic procedures in flow systems were tested in the methodology developed for the determination of nitrates and nitrites in human serum and waters. In this work, it was possible to evaluate the incorporation of a mixing chamber, in the flow system, in order to create the optimum conditions for the development of the enzymatic reactions. The versatility of the sequential injection methodology was evaluated by the implementation of a dilution procedure that intended to extend the linear concentration range in the determination of nitrates.

The developed analytical system for the determination of aminocaproic acid allowed testing the incorporation of a solenoid valve, in the flow system, to perform the on-line addition of the reagents involved in the determination, by binary sampling. A dissolution apparatus was connected to the system in order to perform the evaluation of the concentration of aminocaproic acid during the dissolutions studies of tablets. The whole behaviour of the system was evaluated after the incorporation of both elements.

The evaluation of the antioxidant capacity of wines was performed in a flow system that performed spectrophotometric and fluorimetric measurements. The optimized manifold

incorporated two detectors and two analytical signals were obtained in each analytical cycle.

Two solenoid micropumps were used as propulsion device in a sequential injection analysis system. The effect of the created pulsed flow on the degree of penetration of the aspirated zones was evaluated. The developed system was evaluated in the determination of indomethacin in pharmaceutical formulations.

A analytical methodology for the determination of Fe(III) in edible oils was developed. The procedure intended to be a generic tool for the sampling of oil samples in flow systems. The advantages of the incorporation, in the flow system, of an injection valve and a mixing chamber were evaluated.

The validation of the developed methodologies was carried out by comparing the results with those furnished by reference or comparison procedures and in the methodology for the analysis of oil samples by the analysis of certified reference oil samples.

Résumé

Ce travail présente les méthodologies analytiques, basées sur l'analyse par injection séquentielle, développées pour évaluer les potentialités et la souplesse de ce type de méthodologie ainsi que pour tester l'accouplement avec d'autres éléments typiques des autres techniques de flux continu.

Les montages développés ont permis l'implémentation de procédés analytiques pour la détermination : i) de nitrates et nitrites dans le sérum humain et dans les eaux, ii) de l'acide aminocaproïque et de l'indométacine dans les formulations pharmaceutiques, iii) de la capacité antioxidante de vins et iv) du fer dans les huiles alimentaires.

Les avantages de l'optimisation de procédés enzymatiques dans les systèmes basés sur l'analyse par injection séquentielle ont été évalués dans le cadre de l'automatisation de la détermination des nitrates et nitrites dans le sérum humain et dans les eaux. La méthodologie développée a encore permis de tester l'utilisation d'une chambre de mélange avec l'objectif de créer les meilleures conditions pour le développement des réactions enzymatiques impliquées dans la détermination. Dans ce montage, la souplesse de la méthodologie a également été testée, pendant le développement d'un procédé de dilution en ligne, en vue d'amplifier la zone de réponse linéaire de la détermination des nitrates.

Dans la méthodologie développée pour la détermination de l'acide aminocaproïque, une valve solénoïde a été utilisée pour effectuer le mélange, en ligne, des réactifs impliqués dans la détermination par échantillonnage binaire. Un appareil de dissolution de comprimés a également été accouplé au système en vue d'accompagner la variation de la concentration du principe actif pendant les essais de dissolution de comprimés. Dans les deux cas, le comportement du système vis-à-vis des éléments accouplés a été évalué.

Un système analytique avec détection spectrophotométrique et fluorimétrique a été appliqué à l'évaluation de la capacité antioxidante de vins. Le montage optimisé nécessitait ainsi l'utilisation de deux détecteurs différents donnant deux signaux analytiques à chaque cycle.

L'utilisation de deux micro-pompes solénoïdes comme unités de propulsion a été évaluée dans un système basé sur l'analyse par injection séquentielle. L'influence du flux pulsé obtenu sur le degré de mélange des zones aspirées séquentiellement a été étudiée. L'utilité analytique du montage a été testée à la détermination de l'indométacine en formulations pharmaceutiques.

Une méthodologie analytique pour la détermination de fer, comme Fe(III), dans les huiles alimentaires a été développée. Celle-ci prétendait être un outil générique pour introduire l'échantillon dans le système de flux. La stratégie employée a permis d'évaluer les avantages de l'incorporation d'une valve d'injection et d'une chambre de mélange au système de flux.

La validation des méthodologies développées a été effectuée par comparaison des résultats obtenus avec ceux fournis par des méthodes de référence ou de comparaison et, dans le cas de la méthodologie développée pour l'analyse des huiles alimentaires, par l'analyse d'échantillons d'huiles certifiées.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima, pela sua supervisão e orientação durante a realização deste trabalho e também por todo o apoio, força, optimismo e incentivo com que me estimulou desde a minha chegada ao laboratório.

À Professora Doutora Lúcia Saraiva agradeço profundamente a sua orientação, apoio e disponibilidade incondicionais na realização deste trabalho. Agradeço também a sua amizade e presenças constantes durante estes anos e todos os ensinamentos (científicos e outros) que tão sinceramente me transmitiu.

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por me ter aceite como aluna de doutoramento.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, pela bolsa de doutoramento que me foi atribuída e outros apoios financeiros, sem os quais não teria sido possível realizar este trabalho.

A todos os Professores do Serviço de Química-Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, em especial à Professora Doutora Salette Reis e ao Professor Doutor João Luís Santos pelo seu apoio em alguns dos trabalhos desenvolvidos.

Ao Professor Doutor Elias Ayres Guidetti Zagatto por me ter proporcionado uma produtiva estadia no CENA, que me permitiu o contacto com outras realidades cientificas.

A todas as pessoas que me acolheram em Piracicaba, por me terem recebido como uma amiga, tendo-me proporcionado momentos inesquecíveis a todos os níveis.

À Simone por toda a amizade, carinho e atenção que me dispensou durante os dois meses que passei em Piracicaba e durante o tempo que ela própria passou cá. Por me ter aberto as portas de sua casa e por me fazer sentir verdadeiramente em casa.

A todos os meus colegas, sem excepção, do laboratório de Química-Física por todos os bons momentos que passamos juntos, pela companhia, pela troca de "sabedorias" várias e pelo apoio nas horas difíceis.

À minha amiga Cristina Lopes, por me ter mostrado tantas vezes que os amigos são mesmo para as ocasiões, sejam elas quais forem, e por ter estado sempre presente.

À Marieta Passos, por me ter proporcionado tantas horas de conversa e por toda a amizade e apoio demonstrado durante os meses que trabalhamos frente a frente.

A todas as pessoas que passaram pelo laboratório durante a minha estadia e que contribuir para de alguma forma enriquecer ainda mais a experiência.

A todos os meus amigos (eles sabem quem são) por todo o apoio, estímulo e tentativas de ajuda. Reconheço profundamente a sua amizade que tanta alegria traz à minha vida.

À minha amiga Filipa Tavares pela sua amizade de longa data e pelo seu estímulo em seguir por este caminho, sem o qual não estaria aqui hoje.

À minha amiga Paula Matos pela sua amizade incondicional e pelas leituras profissionais que fez deste trabalho.

À minha família pela ajudas várias com que contribuiu para o meu bem-estar físico e psíquico. Um agradecimento especial à minha sogra D. Olga por toda a sua ajuda.

À minha irmã, Dulce, apenas lhe agradeço por existir. E claro ao João que antes de cunhado é um grande amigo.

Aos meus pais por terem feito de mim quem sou hoje. Agradeço à minha mãe por toda a sua coragem, força, determinação e apoio incondicional que permitiram em várias etapas a realização dos meus objectivos.

Ao Nuno, a quem dedico este trabalho, por tudo. Pela paciência, pela compreensão, pela sua presença, pelo amor e pela Rita...que vem a caminho.

Índice

Capítulo 1 **1-1**

1. Introdução geral 1-2

1.1 Aspectos gerais da análise em fluxo contínuo não segmentado 1-2

1.2 Análise por injecção em fluxo (FIA) 1-5

1.3 Análise por injecção sequencial (SIA) 1-7

1.3.1 Componentes da montagem 1-9

1.3.2 Dispersão 1-12

1.3.3 Sobreposição de zonas 1-13

1.4 Multicomutação 1-16

1.5 Análise por injecção em fluxo baseada em multiseringa 1-18

1.6 Multibomba 1-20

1.7 Associação da análise por injecção sequencial (SIA) com outras técnicas de fluxo 1-22

1.7.1 Associação com a análise por injecção em fluxo 1-22

1.7.2 Associação com a multicomutação 1-26

1.7.3 Associação com a análise por multiseringa 1-29

1.7.4 Associação com a multibomba 1-30

1.8 Referências bibliográficas 1-32

Capítulo 2 **2-1**

2. Aspectos gerais da parte experimental 2-2

2.1 Introdução 2-2

2.2 Reagentes e soluções 2-3

2.3 Componentes dos sistemas de fluxo 2-4

2.3.1 Dispositivos de aspiração/propulsão 2-4

2.3.2 Dispositivos de selecção de fluidos 2-6

2.3.3 Tubagem e outros componentes das montagens 2-8

2.4 Instrumentação 2-10

2.5 Controlo informático dos sistemas 2-12

2.5.1 Controlo das válvulas e dispositivos de propulsão 2-12

2.5.2 Controlo dos sistemas de análise por injecção sequencial 2-12

2.6 Desenvolvimento e optimização dos sistemas de análise por injecção sequencial 2-15
2.7 Tratamento estatístico dos resultados 2-16
2.8 Referências bibliográficas 2-18

Capítulo 3 **3-1**

3. Determinação enzimática de nitratos e nitritos. Aplicação a soro humano e águas naturais 3-2
3.1 Introdução 3-2
3.2 Materiais e métodos 3-10
3.2.1 Reagentes e soluções 3-10
3.2.2 Aparelhagem 3-11
3.2.3 Preparação das amostras 3-12
3.2.4 Procedimento experimental 3-13
3.2.5 Metodologias de comparação e de referência 3-18
3.3 Resultados e Discussão 3-20
3.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos 3-20
3.3.2 Análise das amostras de soro 3-35
3.3.3 Análise das amostras de água 3-36
3.3.4 Validação dos resultados 3-38
3.4 Conclusões 3-41
3.5 Referências bibliográficas 3-43

Capítulo 4 **4-1**

4. Determinação de ácido aminocapróico e ensaios de dissolução de formulações farmacêuticas sólidas 4-2
4.1 Introdução 4-2
4.2 Materiais e métodos 4-7
4.2.1 Reagentes e soluções 4-7
4.2.2 Aparelhagem 4-7
4.2.3 Procedimento experimental 4-10
4.2.4 Metodologia de referência das formulações farmacêuticas 4-11

4.2.5 Ensaios de dissolução de comprimidos contendo ácido aminocapróico 4-12
4.3 Resultados e Discussão 4-14
4.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos 4-14
4.3.2 Estudo de interferências 4-19
4.3.3 Análise das formulações farmacêuticas 4-20
4.3.4 Optimização dos ensaios de dissolução de comprimidos no sistema de fluxo 4-22
4.4 Conclusões 4-28
4.5 Referências bibliográficas 4-30

Capítulo 5 **5-1**
5. Avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio do radical ABTS e da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio em vinhos 5-2
5.1 Introdução 5-2
5.2 Materiais e métodos 5-7
5.2.1 Reagentes e soluções 5-7
5.2.2 Aparelhagem 5-8
5.2.3 Procedimento experimental 5-9
5.3 Resultados e Discussão 5-13
5.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos 5-13
5.3.1.1 Determinação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio 5-13
5.3.1.2 Avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio do ABTS 5-18
5.3.2 Análise das amostras de vinho 5-23
5.4 Conclusões 5-26
5.5 Referências bibliográficas 5-29

Capítulo 6 **6-1**
6. Determinação de indometacina em formulações farmacêuticas 6-2
6.1 Introdução 6-2
6.2 Materiais e métodos 6-6
6.2.1 Reagentes e soluções 6-6
6.2.2 Aparelhagem 6-6

6.2.3 Procedimento experimental 6-8
6.2.4 Metodologia de referência 6-9
6.3 Resultados e Discussão 6-11
6.3.1 Avaliação do grau de penetração de zonas no sistema de fluxo pulsado 6-11
6.3.2 Optimização dos parâmetros físico-químicos 6-16
6.3.3 Estudo de interferências 6-22
6.3.4 Análise das formulações farmacêuticas 6-23
6.4 Conclusões 6-25
6.5 Referências bibliográficas 6-27

Capítulo 7 **7-1**

7. Estratégia de amostragem de óleos alimentares sem pré-tratamento 7-2
7.1 Introdução 7-2
7.2 Materiais e métodos 7-6
7.2.1 Reagentes e soluções 7-6
7.2.2 Aparelhagem 7-6
7.2.3 Procedimento experimental 7-8
7.3 Resultados e Discussão 7-10
7.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos 7-10
7.3.2 Análise das amostras 7-23
7.4 Conclusões 7-26
7.5 Referências bibliográficas 7-28

Capítulo 8 8-1

8. Conclusões Gerais 8-2

Anexos **A-1**

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1. Introdução geral

Actualmente, as exigências relativas ao controlo de qualidade de produtos finais e intermédios, em vários ramos de actividade, resultam no recurso crescente a técnicas de fluxo para automatização de procedimentos analíticos. O aumento da importância e da utilização deste tipo de métodos tem sido particularmente significativo nas áreas clínica, ambiental, farmacêutica e alimentar. Deste modo, tem sido visível o crescimento de um novo grupo de técnicas que permitiram atenuar ou eliminar muitos dos factores que limitam o desempenho dos procedimentos analíticos, originando metodologias mais seguras, com elevado ritmo de amostragem, intervenção reduzida do operador e elevada eficiência analítica.

As técnicas de fluxo baseiam-se, correntemente, na introdução de uma alíquota de amostra num fluxo transportador, ocorrendo depois o contacto com um ou mais reagentes. Origina-se assim uma zona reaccional, que será encaminhada para um sistema de detecção, onde é produzido um sinal analítico, cuja intensidade é correlacionada com uma propriedade física ou química da solução analisada. Muitas vezes, o sistema de fluxo pode não ser mais que um modo de transporte da amostra até ao detector.

1.1 Aspectos gerais da análise em fluxo contínuo não segmentado

As técnicas de fluxo contínuo não segmentado são as mais utilizadas na automatização de metodologias analíticas nas mais diversas áreas e caracterizam-se por um escoamento contínuo, no espaço e no tempo, das soluções. Este tipo de estratégia de

gestão de fluidos baseia-se na inserção de uma alíquota de amostra, no interior de tubagem de dimensões reduzidas, e transporte da mesma segundo um percurso predefinido até ao detector, originando-se um sinal analítico. Durante o percurso até ao detector, a amostra pode estar ou não sujeita a uma ou mais reacções químicas ou operações unitárias.

De um modo geral, as técnicas de fluxo contínuo caracterizam-se por uma elevada reprodutibilidade nos processos de amostragem e de detecção, não sendo normalmente necessário atingir condições de equilíbrio físico ou químico. Efectivamente, a configuração fechada dos sistemas de fluxo possibilita a reprodução das condições da análise, sendo a detecção baseada na aquisição de sinais transientes, o que resulta numa redução considerável do tempo de análise.

A principal vantagem exibida pelas metodologias de fluxo está relacionada com a sua elevada versatilidade. De facto, com o mesmo equipamento base é possível idealizar um número considerável de montagens, que se adaptam assim às necessidades de cada determinação, o que se traduz numa redução de custos.

Por todas as potencialidades evidenciadas, tem-se assistido desde a década de 70 ao aparecimento de várias técnicas de fluxo contínuo e a uma utilização crescente das mesmas nas mais diversas áreas.

O aparecimento da análise por injecção em fluxo (FIA, do inglês " Flow Injection Analysis") em 1975 [1] evidenciou as potencialidades deste tipo de técnica, ao permitir automatizar ensaios em série a custo reduzido. Nos anos 90, surgiu a análise por injecção sequencial (SIA, do inglês "Sequential Injection Analysis") [2], tornando possível a automatização de procedimentos mais complexos, que envolvem um maior número de reagentes. A multicomutação [3] e a multiseringa [4] são técnicas de fluxo mais recentes que se baseiam na utilização de válvulas solenóides para a criação de

redes de fluxo. Muito recentemente surgiu a técnica de multibomba [5], cujo funcionamento se baseia na utilização de microbombas solenóides responsáveis pela criação de um fluxo pulsado.

1.2 Análise por injecção em fluxo (FIA)

A técnica FIA, introduzida por Ruzicka *et al* em 1975 [1], baseia-se na injecção de uma alíquota de amostra num fluxo transportador, não segmentado, em movimento. À medida que a amostra injectada se movimenta no sistema, gera-se um gradiente de concentrações, por reacção química ou dispersão física, baseando-se a metodologia no controlo da dispersão do segmento de amostra, no fluxo transportador. O gradiente de concentrações é monitorizado num dispositivo detector sendo a forma do sinal obtido dependente, entre outros, do percurso entre o local da injecção e o sistema detector. O sinal analítico apresenta um valor constante e transiente na forma de uma curva gaussiana distorcida pela passagem da espécie detectável, devido à formação do referido gradiente de concentrações durante o transporte da amostra injectada até ao detector [6].

A Figura 1.1 representa esquematicamente uma montagem FIA. Como se pode observar, o sistema compreende habitualmente um dispositivo de propulsão (P), uma válvula injectora (VI) cuja alça define o volume de amostra a injectar, uma porção de tubo onde ocorre a formação do gradiente de concentrações (TR) e um dispositivo detector (D) que monitoriza a espécie a medir.

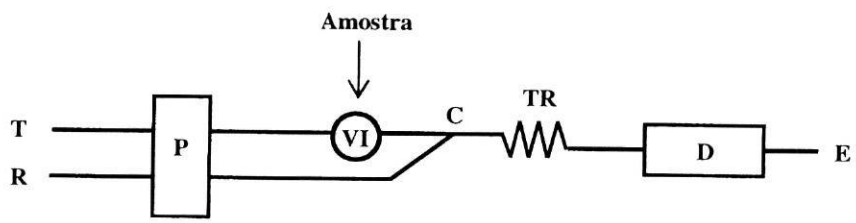


Figura 1.1 Representação esquemática de uma montagem FIA. P: dispositivo de propulsão (bomba peristáltica); VI: válvula de injecção; C: ponto de confluência; TR: tubo reactor; D: detector; E: esgoto; T: solução de transporte; R: solução de reagente.

Um registo FIA é constituído por um conjunto de sinais transientes correspondentes aos padrões da espécie a medir nas amostras, correspondendo a informação analítica obtida a partir da altura, largura ou área de cada sinal.

A técnica FIA envolve a utilização de montagens simples e de baixo custo, que exibem elevada versatilidade e flexibilidade, adaptando-se a determinações específicas. É de ressalvar que esta técnica não implica obrigatoriamente a informatização das montagens, facto que a distingue das restantes técnicas de fluxo contínuo não segmentado, que surgiram nas três décadas seguintes. Estas vantagens, associadas ao facto de a análise requerer pequenos volumes de amostra e permitir a detecção em condições de ausência de equilíbrio químico e físico, justificam a larga utilização da técnica FIA na automatização de procedimentos analíticos nas mais diversas áreas.

As principais desvantagens da técnica FIA consistem no elevado consumo de reagentes, ocasionado pela circulação contínua dos mesmos nas montagens, e na necessidade de reconfigurar os sistemas de forma a adaptá-los a diferentes determinações analíticas.

1.3 Análise por injecção sequencial (SIA)

A necessidade de reconfigurar fisicamente as montagens de modo a adaptá-las a diferentes determinações, inerente à técnica FIA, esteve na origem do aparecimento da análise por injecção sequencial (SIA), em 1990 [2]. Esta técnica surgiu como uma alternativa versátil e robusta à automatização de procedimentos analíticos complexos, envolvendo mais do que um reagente.

A análise por injecção sequencial baseia-se na aspiração sequencial de volumes precisos de amostra e reagente para um tubo de armazenamento (Figura 1.2 a).

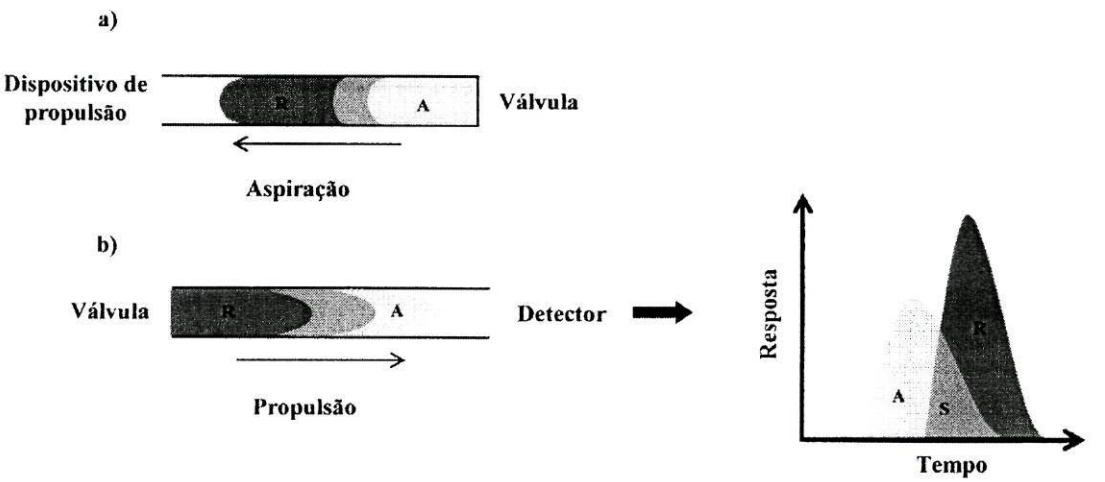


Figura 1.2 Representação esquemática da aspiração sequencial de zonas num sistema SIA e do registo da sobreposição das mesmas. a) Aspiração sequencial de amostra (A) e reagente (R) a partir da válvula selectora; b) Perfil de concentrações que atinge o detector; c) Registo da sobreposição (S) das zonas de amostra e reagente.

A aspiração das diferentes soluções é efectuada a partir de uma válvula selectora e por selecção do canal correspondente. Através da inversão do sentido do fluxo, e por comutação da válvula selectora, ocorre a sobreposição reprodutível das zonas de amostra e reagente. Origina-se assim uma zona composta resultante da penetração mútua das duas zonas, para a qual contribuem os processos de transporte conveccional e de difusão molecular (Figura 1.2 b).

Um sistema SIA típico, representado esquematicamente na Figura 1.3, compreende um dispositivo propulsor (P) e uma válvula selectora de fluidos (VS), conectados entre si por tubagem de diâmetro reduzido.

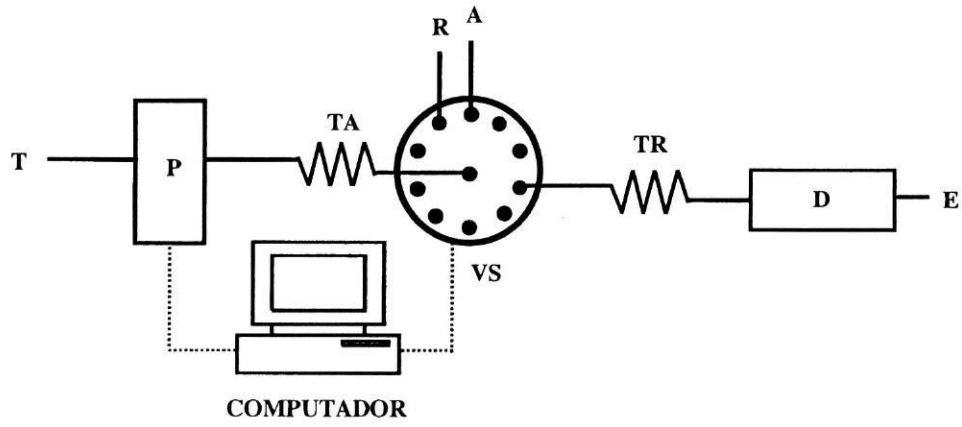


Figura 1.3 Esquema básico de uma montagem SIA. T: solução transportadora; P: dispositivo de propulsão; VS: válvula selectora; TA: tubo de armazenamento; TR: tubo reactor; D: detector; E: esgoto: A: amostra; R: solução de reagente.

O funcionamento da montagem é controlado por computador, de modo a que o dispositivo de propulsão e a válvula selectora funcionem de modo sincronizado, sendo

possível definir o volume e o sentido e velocidade de escoamento das diferentes soluções. Desta forma, as variáveis hidrodinâmicas são definidas por modificação no comando informático, o que torna possível a aplicação de uma mesma montagem a variadas condições e determinações, sem necessidade de reconfigurar fisicamente o sistema. De um modo geral, a elevada versatilidade deste tipo de montagem, associada à utilização eficiente das soluções, com reduzido consumo de amostra e reagentes e baixa produção de efluentes, constituem as principais vantagens da técnica SIA.

1.3.1 Componentes da montagem

A unidade principal de um sistema SIA é a válvula selectora de fluidos, que funciona como apoio dos restantes componentes da montagem (detectores, reactores, dispositivos adicionais) e das soluções envolvidas na determinação. A circulação de fluidos no sistema ocorre a partir do orifício central da válvula, que se encontra ligado ao tubo de armazenamento, podendo conectar-se também a cada um dos orifícios laterais. O funcionamento de um sistema SIA, baseado em inversões do sentido do fluxo, associado à versatilidade da válvula selectora de fluidos, possibilita que se operem em linha, não só reacções químicas complexas, mas todo o tipo de pré-tratamentos de amostra. O número de soluções e de operações, a efectuar num sistema SIA, encontra-se apenas limitado pelo número de orifícios laterais da válvula selectora, havendo no entanto a possibilidade de incorporar, num mesmo sistema, mais do que um dispositivo de selecção, o que permite a implementação de um maior número de operações de uma forma versátil.

Num sistema SIA, os volumes são definidos pelo caudal e tempo de aspiração ou propulsão, de modo que o dispositivo de propulsão deve proporcionar movimentos de

início, paragem e inversão do sentido do fluxo precisos, que garantam aspirações e propulsões reprodutíveis [7]. De um modo geral, são quatro os principais dispositivos propulsores utilizados em sistemas SIA. Numa fase inicial de desenvolvimento da tecnologia, foi usada, como dispositivo propulsor, uma bomba de pistão sinusoidal [2] que originava, tal como o nome indica, um fluxo sinusoidal. Embora o comportamento da bomba fosse, de um modo geral, satisfatório, o seu modo de actuação originava ritmos de amostragem relativamente baixos, uma vez que requeria reenchimentos constantes. Em 1993, Ivaska *et al* [8] testaram a utilização de uma bomba peristáltica numa montagem SIA, tendo concluído que esta apresentava vantagens nomeadamente ao nível do tempo de análise. No entanto, a tubagem deste tipo de dispositivo sofre um desgaste considerável quando utilizada por longos períodos de tempo. Como alternativa, mais recentemente, seringas automáticas começaram a ser usadas em sistemas SIA, como unidades de propulsão [9]. Apesar de necessitarem de reenchimentos frequentes, as seringas estão munidas de uma válvula de duas posições, que permite o direccionamento das soluções, facilitando o reenchimento, relativamente às bombas de pistão. Menos utilizada tem sido a bomba electrosmótica proposta por Liu e Dasgupta [10], que origina caudais reprodutíveis por longos períodos de tempo. A sua utilização limitada estará possivelmente relacionada com o facto de este tipo de dispositivo não se encontrar disponível comercialmente.

Diferentes tipos de detectores podem ser acoplados a um sistema SIA, viabilizando uma grande variedade de determinações. De um modo geral, desde que seja possível, em termos físicos, acoplar o detector ao sistema de fluxo e este efectue a detecção em condições de fluxo, provocando dispersão mínima da espécie a detectar, no momento da medida, considera-se que o detector é adequado. A posição do detector no sistema SIA pode ser variável dependendo da determinação ou do estudo a efectuar. Na primeira

montagem SIA, apresentada por Ruzicka e Marshall [2] em 1990, o detector encontrava-se posicionado entre o dispositivo propulsor e a válvula. Com esta configuração obtinham-se, em cada ciclo analítico, dois picos: um registado durante a aspiração da espécie a detectar, a partir da válvula selectora, e outro menor, influenciado por um maior grau de dispersão, obtido após a inversão do sentido do fluxo com o objectivo de encaminhar as zonas aspiradas para o esgoto. No entanto, com esta configuração, a passagem do produto através do detector ocorria em condições de pressão negativa, facto que favorece o aparecimento de bolhas [11]. Por outro lado, o ritmo de amostragem encontra-se comprometido já que ocorrem duas determinações, sendo a segunda desnecessária. Deste modo, na maioria dos trabalhos realizados posteriormente, o detector encontra-se ligado através de um canal tubular a uma das portas laterais da válvula selectora de fluidos, tal como se encontra esquematizado na Figura 1.3.

Numa montagem SIA, é essencial garantir que o comprimento do tubo de armazenamento, que liga a válvula selectora ao dispositivo de propulsão, seja suficiente para impedir a contaminação da solução transportadora com as soluções aspiradas. Considera-se que o tubo de armazenamento deverá ser capaz de albergar um volume duas vezes superior aos volumes aspirados [12]. Estudos relativos ao diâmetro interno da tubagem constituinte do tubo de armazenamento revelaram que tubos de diâmetro superior, ao mesmo tempo que estão menos sujeitos a bloqueios, permitem uma mistura mais eficiente das zonas aspiradas sequencialmente, uma vez que a dispersão se encontra aumentada. No entanto, o volume interno da tubagem, que liga os diferentes elementos da montagem, deve ser escolhido como um compromisso entre a dispersão e a sensibilidade, dependendo da determinação em questão.

1.3.2 Dispersão

Embora, de uma forma geral, a técnica SIA se baseie nos mesmos princípios que a técnica FIA, nomeadamente na introdução reprodutível de amostra, na dispersão controlada do segmento de amostra e na reprodutibilidade das condições de análise, as diferenças entre as duas são assinaláveis, especialmente no que diz respeito ao comportamento das soluções no interior da montagem.

A extensão da dispersão sofrida pelas zonas aspiradas e em última análise pela zona reaccional, num sistema SIA, depende dos parâmetros operacionais da própria montagem e afecta, em última análise, a extensão da mistura das diferentes zonas aspiradas sequencialmente e a sua diluição no interior do sistema de fluxo. Assim, parâmetros relativos às soluções envolvidas na determinação e ao próprio sistema devem ser estudados e optimizados, de modo a originarem o grau de dispersão ideal para a determinação em causa [13].

Num sistema SIA, a dispersão está relacionada, com os processos de transporte conveccional, que ocorre com o escoamento, e de difusão molecular nas interfaces de contacto de zonas adjacentes, que afectam a penetração mútua de duas zonas adjacentes. Considerando que o escoamento é predominantemente laminar, um segmento inserido no sistema vai estar inicialmente sujeito a um perfil parabólico de velocidades, sendo favorecidos os gradientes de concentração responsáveis pela difusão radial e axial (Figura 1.4). A inversão do sentido do escoamento ocasiona uma diminuição da dispersão axial do segmento, originando-se um perfil de concentrações relativamente simétrico, que leva à obtenção de um sinal analítico de forma aproximadamente gaussiana, por passagem pelo detector.

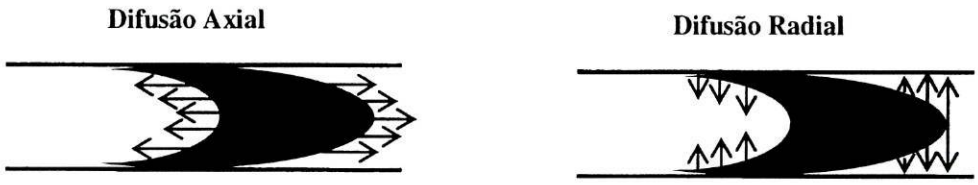


Figura 1.4 Representação esquemática dos fenómenos de difusão axial e radial num sistema de fluxo.

Ruzicka e Hansen [6] propuseram a quantificação do valor da dispersão por intermédio do conceito de coeficiente de dispersão (D) definido como a razão das concentrações da zona a intercalar antes (C^0) e depois (C) do processo de transporte ter ocorrido. Uma vez que a dispersão não é mais do que o grau de diluição da solução de amostra após a sua introdução no sistema de fluxo, o valor de D está directamente relacionado com a sensibilidade da determinação.

1.3.3 Sobreposição de zonas

Enquanto que num sistema FIA, tal como já foi referido, a amostra é inserida num fluxo de transportador, originando-se um gradiente de concentrações de analito, numa montagem SIA, mesmo depois da inversão do sentido do fluxo, a sobreposição das zonas de amostra e reagente adjacentes não deixa de ser apenas parcial (Figura 1.2). Este facto constitui uma das limitações deste tipo de técnica, já que apesar da possibilidade de se aspirar sequencialmente um maior número de reagentes, existe uma limitação quanto ao número de zonas que podem ser misturadas por inversão de fluxo,

num reactor tubular. No entanto, a técnica SIA, graças à sua enorme versatilidade e controlo por computador, apresenta características, que facilitam a implementação de procedimentos analíticos complexos sem reconfiguração física da montagem.

De qualquer modo, o estudo da sobreposição de zonas é essencial para garantir a implementação efectiva e rentabilização máxima de uma montagem SIA [14]. Surgiu assim a necessidade de definir um parâmetro que descreva o grau de penetração de zonas, de modo a estabelecer o intervalo de tempo em que é possível obter uma medida significativa baseada em altura ou área de pico. Deste modo, o grau de penetração foi definido por Gübeli et al [14] como:

$$P = 2\,Ls / (La + Lr)$$

em que Ls corresponde à largura da base do pico da zona sobreposta e La e Lr correspondem às larguras das bases dos picos da zona de amostra e reagente, respectivamente. O valor de P varia entre 0 e 1 e, tal como se pode depreender, uma sobreposição total de zonas de amostra e reagente corresponde a um valor de P = 1, enquanto que a ausência de sobreposição origina um valor de P = 0.

Num sistema SIA, o valor de P está directamente relacionado com a dispersão sofrida por cada uma das zonas aspiradas, no interior do sistema. A dispersão sofrida pela solução aspirada em primeiro lugar é superior à da segunda, dependendo, o modo e o grau de sobreposição, da ordem de aspiração e da relação de volumes das soluções, assim como do diâmetro e comprimento dos tubos usados e do caudal.

A optimização e padronização de sistemas SIA, com base em estudos de penetração de zonas e de dispersão, recorrem geralmente ao parâmetro $S_{1/2}$, como valor de volume de referência para o sistema em estudo. O conceito de $S_{1/2}$ não é exclusivo das montagens

SIA, tendo sido introduzido já em 1988 em considerações teóricas sobre FIA, por Ruzicka e Hansen [6]. $S_{1/2}$ é definido como o volume de solução que origina um sinal analítico com uma intensidade duas vezes menor que o obtido com a mesma solução, em condições de ausência de diluição. Este valor é considerado a melhor forma de medir a dispersão num sistema SIA, independentemente da sua simetria e tipo de fluxo, sendo específico de cada montagem. O valor de $S_{1/2}$ pode ser obtido por cálculo, após aspiração de volumes crescentes de uma solução corada, interpolando o volume correspondente a metade da intensidade da solução não diluída. É de ressalvar que os estudos efectuados por Gübeli *et al* [14] basearam-se apenas em fenómenos de dispersão física, não tendo entrado em linha de conta com a reacção química envolvida ou a sua cinética. Mais tarde, estudos efectuados por Cladera *et al* [15] avaliaram o efeito de parâmetros físicos do sistema, tais como caudal e dimensões dos tubos, sobre o valor de $S_{1/2}$, tendo concluído que este aumenta sempre que as alterações ocasionam um aumento do tempo de residência das soluções no sistema.

1.4 Multicomutação

A necessidade crescente de sistemas de fluxo caracterizados por uma flexibilidade acrescida, facilidade de operação e versatilidade conduziu ao aparecimento da multicomutação [3, 16, 17]. Os sistemas baseados neste conceito são constituídos por uma rede de válvulas electromecânicas activadas por um solenóide, com actuação independente (Figura 1.5).

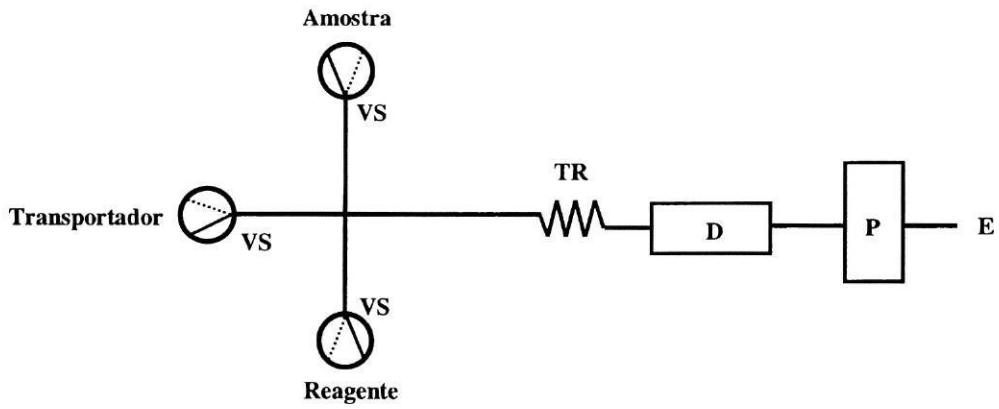


Figura 1.5 Representação esquemática de um sistema multicomutado típico. VS: válvula solenóide; TR: tubo reactor; D: detector; P: dispositivo de propulsão; E: esgoto.

As válvulas solenóides podem ser dispostas em topologias distintas, de modo a criar uma rede de fluxo com elevada versatilidade na manipulação da zona de amostra.

A utilização de válvulas solenóides, com elevada rapidez de comutação, permitiu a introdução de um novo conceito de gestão de fluidos denominado de amostragem binária, que consiste na intercalação de pequenas alíquotas de amostra, na ordem dos μl, com igualmente pequenas alíquotas de reagente, definidas em termos de tempo e

controladas informaticamente. Este novo conceito de inserção de amostra resulta numa mais rápida homogeneização da zona de amostra e, consequentemente, num desenvolvimento da reacção também mais rápido. Efectivamente, o facto de a mistura de soluções se iniciar logo na fase de amostragem constitui uma das maiores vantagens da multicomutação e traduz-se num aumento significativo do ritmo de amostragem.

Outra particularidade deste tipo de sistema consiste no facto de, na maior parte das montagens, a unidade de propulsão se encontrar posicionada após o detector, sendo as soluções aspiradas por um único canal. A colocação do dispositivo de propulsão, antes da rede de válvulas solenóides, aumenta a complexidade do sistema, uma vez que obriga a utilizar um canal por cada solução e implica a recirculação das soluções, de modo a reduzir o seu consumo. No entanto, esta configuração contribui para a redução do aparecimento de bolhas de ar no sistema.

Os sistemas multicomutados exibem como principal vantagem a sua extrema flexibilidade, uma vez que permitem a implementação de procedimentos diversos recorrendo apenas a válvulas solenóides, podendo reunir num só sistema conceitos explorados pelas diferentes técnicas de fluxo [18].

1.5 Análise por injecção em fluxo baseada em multiseringa

A análise por injecção em fluxo baseada em multiseringa (MSFIA, do inglês "Multisyringe Flow Injection Analysis") foi descrita me 1999, por Cerdà *et al* [4], e caracteriza-se pela utilização de bombas de pistão como dispositivo de propulsão. A técnica apresenta assim como elemento básico uma bureta multiseringa, que permite o movimento simultâneo de quatro seringas, que podem ter capacidades diferentes. As seringas encontram-se ligadas em bloco a um único motor de uma seringa automática convencional e possuem, numa das extremidades, um êmbolo responsável pelo seu enchimento e esvaziamento (Figura 1.6). À saída de cada seringa foi incorporada uma válvula solenóide de três vias, que permite ligar a seringa ao sistema (Figura 1.6, SF) ou ao reservatório da solução que contém (Figura 1.6, S), o que incrementa a flexibilidade do sistema e permite economizar reagentes.

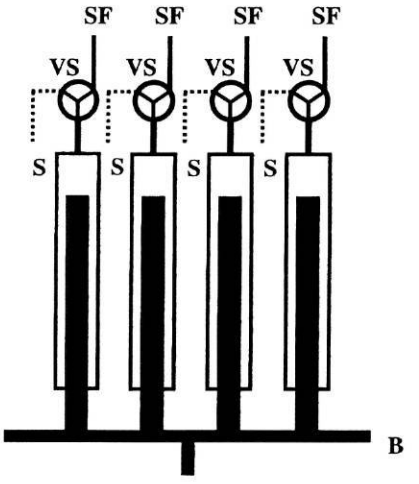


Figura 1.6 Representação esquemática de uma multiseringa. B: barra condutora dos pistões; S: reservatório de solução; SF: sistema de fluxo; VS: válvula solenóide.

A multiseringa abre assim novas possibilidades em termos de sistemas de fluxo, já que combina um modo de operação multicanal, com uma elevada precisão, associada à dispensa de volumes pelas seringas. Adicionalmente, a presença de uma válvula solenóide, na extremidade de cada seringa, traduz-se num acréscimo de flexibilidade dos sistemas e resulta numa redução considerável do consumo de reagentes. De facto, apesar do movimento das seringas ocorrer de forma sincronizada, cada uma delas encontra-se conectada, através da válvula solenóide, ao sistema e ao reservatório de solução que comporta, funcionando sem interferir com os outros canais, quando tal é necessário. No entanto, o funcionamento com base em seringas de pistão requer o seu reenchimento periódico, com as soluções respectivas entretanto consumidas, facto que compromete o ritmo de amostragem.

Neste tipo de sistema, não é habitual usar-se uma das seringas como reservatório de amostra, já que tal procedimento ocasionaria fenómenos de contaminação das amostras seguintes, implicando um procedimento de lavagem muito rigoroso e demorado, que comprometeria o ritmo de amostragem. Deste modo, a introdução da amostra no sistema faz-se recorrendo a dispositivos adicionais como válvulas de injecção, válvulas de selecção ou válvulas solenóides, podendo a quantidade de amostra ser definida quer em termos de tempo quer em termos de volume [19].

1.6 Multibomba

A análise recorrendo a sistemas multibomba é o desenvolvimento mais recente em termos de técnicas de fluxo, distinguindo-se das anteriores por ser baseada em fluxos pulsados não contínuos e por não requerer válvulas de injecção e dispositivo de comutação [5, 20]. De facto, o funcionamento dos sistemas multibomba baseia-se na utilização de bombas solenóides de dimensões reduzidas, que operam individualmente, para impulsão individual de amostra e reagentes, tornando desnecessária a utilização de dispositivos adicionais, nomeadamente dispositivos de introdução de amostra e de comutação. (Figura 1.7).

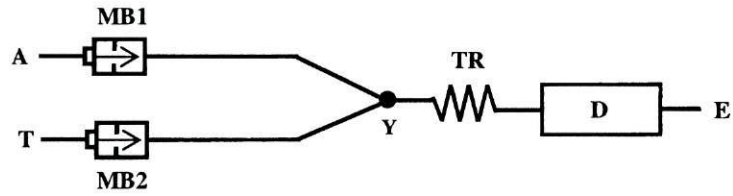


Figura 1.7 Representação esquemática de um sistema multibomba típico. MB1, MB2: microbomba solenóide; Y: ponto de confluência; TR: tubo reactor; D: detector; E: esgoto; T: transportador; A: amostra.

As microbombas caracterizam-se pelo seu funcionamento por pulsos de volume fixo, sendo possível controlar de forma efectiva o volume de amostra e reagente, em termos de frequência e número de pulsos.

Os sistemas multibomba, uma vez que incorporam dispositivos monocomutadores autopropulsores, são altamente versáteis e de fácil controlo, sendo possível recorrer a

estratégias de amostragem variadas tais como a amostragem binária, a segmentação por bolhas de ar ou a estratégia de zonas confluentes.

O fluxo pulsado, originado pelas microbombas, produz um movimento caótico das soluções em todas as direcções e um aumento da dispersão radial, que tornam a mistura de amostra e reagentes mais rápida e eficaz do que a obtida em condições de fluxo laminar. Deste modo, obtêm-se sinais analíticos de intensidade superior à dos obtidos em condições de fluxo laminar, com volumes de amostra idênticos, e o ritmo de amostragem pode ser significativamente superior, devido às condições de mistura melhoradas.

O facto de incorporarem apenas um tipo de dispositivo, torna os sistemas multibomba muito robustos, viabilizando a sua implementação na automatização de procedimentos analíticos. Adicionalmente, as reduzidas dimensões das microbombas solenóides facilitam a construção de sistemas portáteis, facilmente aplicados a variadas determinações analíticas *in situ*.

1.7 Associação da análise por injecção sequencial (SIA) com outras técnicas de fluxo

Os diversos modos de gestão de fluidos, referidos anteriormente, durante a sua fase de consolidação e aceitação na comunidade científica, têm sido apresentados como detendo todas as vantagens sobre os restantes. A generalização do seu uso, às mais diversas situações concretas, tem sugerido que podem ser retiradas vantagens da sua hifenização com outras estratégias.

Efectivamente, graças à sua elevada versatilidade, desde o seu aparecimento, a técnica SIA tem vindo a ser associada a diversos tipos de dispositivos, onde se incluem os dispositivos típicos de outras técnicas de fluxo. Este tipo de associação apresenta diferentes objectivos, mas, de um modo geral, contribui para uma melhoria das capacidades analíticas das montagens.

1.7.1 Associação com a análise por injecção em fluxo

A incorporação de válvulas de injecção, típicas das montagens FIA, em sistemas SIA tem sido efectuada em situações distintas, originando montagens mais versáteis e com potencial analítico acrescido.

Em 1995, Crespí *et al* propuseram uma metodologia SIA, para a determinação amperométrica de ortofosfatos em água, que envolvia a utilização de uma válvula, para injecção da zona reaccional no detector [21].

Um método para monitorização enzimática dos níveis de glucose e penicilina, em culturas de fungos *Penicillium chrysogenum*, evidenciou a versatilidade das montagens SIA ao incorporar duas válvulas selectoras, uma válvula de injecção e dois sistemas de detecção distintos [22]. Foram também incorporadas válvulas de injecção, em sistemas

SIA, como suporte de unidades de difusão gasosa [23] e de pré-concentração [24] para determinação de amónio. Sistemas semelhantes, envolvendo esquemas de pré-concentração dos analitos, foram desenvolvidos para determinação de manganês e chumbo em águas [25, 26].

Duas montagens SIA para a determinação de vanádio (IV e V) [27] e molibdénio [28], envolvendo uma extracção em membrana, incluíam uma válvula de injecção para introdução de ar, no sistema, para estabilização do filme formado em linha, ou de solvente orgânico, para eluição do filme. Um outro trabalho, do mesmo grupo de colaboradores, propôs um sistema semelhante, e baseado no mesmo princípio, para determinação de crómio (VI e III) em águas [29]. Neste caso, existia ainda uma segunda válvula de injecção, apoiada por uma bomba peristáltica, para introdução de uma mistura de amostra e reagente, no sistema.

Um outro sistema de fluxo, com este tipo de associação, foi proposto, por Thomas *et al*, para a monitorização da qualidade de águas residuais [30]. As diferentes determinações foram implementadas numa montagem composta por 2 válvulas selectoras, que suportavam os reagentes para as diferentes determinações, e uma válvula de injecção, usada na determinação de azoto, e que incorporava uma unidade de difusão hidrofóbica.

Oliveira et al propuseram duas metodologias, que envolviam a digestão da amostra em linha, em forno de microondas [31, 32]. Uma válvula de injecção era utilizada com o objectivo de fechar a bomba de digestão ou de conectá-la com um esgoto, de modo a eliminar os gases resultantes do processo de digestão.

Um sistema SIA, envolvendo duas válvulas de injecção de quatro portas, entre as quais se encontra uma coluna de separação, foi descrito por *Egorov et al* para extracção de radionuclídeos [33]. Uma válvula semelhante foi usada, num sistema desenvolvido para

estudos de hibridização de ADN, com a função de introduzir oligonucleótideos no sistema [34].

Uma metodologia, para separação e determinação de ^{90}Sr e de ^{90}Y em águas, envolvia a separação dos dois elementos por intermédio de um filtro impregnado com MnO_2, que se encontrava adstrito a uma válvula de injecção [35]. Um outro método para a determinação de ^{90}Sr em amostras ambientais, desta feita por extracção em membrana num sistema SIA, envolvia a utilização de uma válvula de injecção conectada à válvula selectora e que incorporava o tubo de extracção, permitindo a inversão do fluxo de amostra sem perturbar a extracção, ao mesmo tempo que tornava possível a extracção do ^{90}Sr por lavagem com um solvente orgânico [36].

Várias metodologias SIA, envolvendo esquemas de extracção ou pré-concentração de metais e posterior detecção destes por ICP-MS (do inglês "Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry") [37-42] ou ETAAS (do inglês "Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry) [43-48] incorporavam válvulas de injecção com o objectivo de recolher os elementos eluídos do sistema e injectá-los no detector. Função semelhante tinham as válvulas de injecção presentes nas metodologias propostas por Vogt *et al* para monitorização de hidrocarbonetos aromáticos em água [49] e por Elsholz *et al* para determinação de mercúrio em água de rio [50]. No caso particular da determinação de hidrocarbonetos, a válvula recolhia as amostras tratadas em linha, para posterior determinação espectrofotométrica [49]. Já no caso da determinação de mercúrio, a válvula de injecção recolhia as alíquotas de amostra e reagente, misturadas em linha, para análise por espectrometria de absorção atómica de vapor frio [50]. Uma outra metodologia para determinação de mercúrio, envolvendo a mesma técnica de detecção, recorreu a um separador gás-líquido, que funcionava em combinação com uma válvula

de injecção, que evitava a passagem da corrente de árgon pelo separador, havendo uma menor dispersão do analito [51].

Válvulas de injecção têm também sido incorporadas em sistemas SIA, que se encontram acoplados a sistemas cromatográficos, com o objectivo de recolher as amostras tratadas em linha e injectá-las no cromatógrafo [52-54].

Um sistema com detecção na região do infra-vermelho, proposto por Ayora-Cañada *et al* para determinação dos ácidos cítrico, málico e tartárico em bebidas, fez uso de uma válvula de injecção para gerir a passagem do fluxo pela célula do detector [55].

A incorporação de válvulas de injecção em sistemas SIA foi também já descrita com o objectivo de aumentar o ritmo de amostragem de duas metodologias. Guzman e Compton [56] posicionaram a válvula de injecção entre uma bomba peristáltica e uma seringa, de modo que o enchimento desta ocorria ao mesmo tempo que se procedia à lavagem do sistema por acção da bomba. As restantes operações, nomeadamente aspiração de amostra e reagentes, eram efectuadas a partir da válvula selectora. Uma válvula de injecção, que sustentava dois reactores enzimáticos foi incorporada num sistema para determinação de glicerol e etanol em vinhos, permitindo a detecção de etanol enquanto o reactor referente ao glicerol estava a ser carregado [57]. Também neste caso a aspiração e encaminhamento de soluções eram operadas a partir da válvula selectora.

O trabalho apresentado nesta dissertação focou também este tipo de associação, comprovando as suas vantagens no desenvolvimento de uma estratégia de amostragem de óleos alimentares num sistema SIA (Capítulo 7) [58].

1.7.2 Associação com a multicomutação

A incorporação de válvulas solenóides, típicas de sistemas multicomutados, em sistemas SIA, tem vindo a crescer nos últimos anos, tendo-se verificado que os sistemas resultantes evidenciam uma versatilidade acrescida, sendo possível implementar procedimentos diversos e controlar mais eficazmente as diversas operações no sistema. De um modo geral esta associação visa ultrapassar algumas dificuldades intrínsecas à técnica SIA, nomeadamente as relacionadas com a forma de sequenciação dos segmentos de soluções, impostas pelo seu modo de funcionamento particular.

De uma forma mais ou menos frequente, válvulas solenóides têm sido utilizadas em sistemas SIA incorporadas num mecanismo, que permite controlar a paragem da bomba peristáltica numa posição predefinida, de tal modo que no início de cada determinação a posição dos rodízios da bomba seja constante, reduzindo assim a inércia do sistema [25, 59-65]. Alguns dos trabalhos expostos nesta dissertação (Capítulos 3, 4 e 5) incorporavam também este tipo de mecanismo, como forma de garantir a reprodutibilidade nas aspirações de volumes pequenos de soluções [66-69]. O referido mecanismo será descrito em pormenor no Capítulo 2 desta dissertação.

Alguns dos sistemas referidos anteriormente incorporam válvulas solenóides adicionais, com funções mais específicas relacionadas com as determinações efectuadas. Deste modo, Araújo *et al* [60] utilizaram duas válvulas solenóides de forma que, no sistema desenvolvido para determinação de chumbo em águas, os processos de pré-concentração e eluição ocorressem por propulsão, sendo uma válvula responsável pela introdução da amostra na coluna e a outra pela eluição do elemento retido. Uma montagem semelhante, proposta pelo mesmo grupo, foi usada para determinação de baixas concentrações de cobre em águas [62]. Os mesmos autores propuseram ainda sistemas para determinação de ferro em vinhos e de paládio em urina que envolviam

procedimentos de extracção e pré-concentração, respectivamente, em que volumes consideráveis de amostra eram introduzidos no sistema, por intermédio de um válvula solenóide [63, 64]. No trabalho já referenciado para determinação de aspartame em comprimidos adoçantes foi utilizada uma segunda válvula solenóide para introdução do reagente cromogénico num ponto de confluência, de forma a garantir uma mistura mais eficaz das diferentes zonas envolvidas na reacção [65].

Em 1995, Shu *et al* propuseram um sistema SIA para determinação enzimática de ácido D-láctico durante processos de fermentação [70]. A enzima desidrogenase láctica encontrava-se imobilizada num suporte sólido e a reacção era controlada por três válvulas solenóides, que faziam a gestão dos fluidos entre a válvula selectora, o reactor enzimático e o detector espectrofotométrico.

As vantagens da utilização de válvulas solenóides em montagens SIA são bem evidentes no sistema proposto por Luo *et al* [71], para determinação de amoníaco gasoso, em amostras de ar. As duas válvulas de três vias utilizadas permitiam um controlo rigoroso do processo de amostragem a partir de um tubo permeável ao ar, o encaminhamento das amostras para o detector e posterior lavagem do sistema.

Hedenfalk e Mattiasson apresentaram um sistema SIA, para determinação de etanol, que exibia uma válvula solenóide no tubo de armazenamento, funcionando como elemento de comunicação entre a válvula selectora, o reactor enzimático e o detector [72].

Uma montagem, que englobava uma válvula selectora e quatro válvulas solenóides, foi proposta para implementação de um procedimento de digestão em linha de amostras, em forno de micro-ondas [73]. As válvulas solenóides tinham como função seleccionar os reagentes e amostra, permitindo estabelecer as condições da digestão e gerir o gás resultante do processo.

No final dos anos 90, foram propostos vários trabalhos envolvendo a determinação de elementos radioactivos através de processos de separação e extracção em colunas sólidas [74-79]. Os sistemas incorporavam, na generalidade, uma válvula selectora e uma ou mais válvulas de três posições, que controlavam a passagem das amostras pelas colunas, a posterior lavagem destas e a eluição dos elementos retidos para o detector.

Uma série de sistemas SIA, desenvolvidos para determinação de diversos elementos, apresentavam uma configuração semelhante, incorporando uma válvula solenóide com o objectivo de preparar em linha os padrões de diferentes concentrações, a partir de uma única solução mais concentrada [80-83].

A monitorização de processos biológicos através da determinação de produtos de elevado peso molecular foi já conseguida num sistema SIA, incorporando uma pequena coluna com concavalina A imobilizada, que reagia com a enzima peroxidase [84]. Uma válvula solenóide permitia efectuar a adição, com auxílio de uma bomba peristáltica, do substrato da enzima peroxidase, que se juntava assim no reactor às restantes soluções aspiradas através da válvula selectora. Função semelhante tinha também a válvula solenóide presente num sistema desenvolvido por Paseková *et al* [85], para determinação de ácido acetilsalicílico através de um eléctrodo tubular. A válvula, acoplada a uma das portas da válvula selectora, permitia adicionar tampão fosfato à zona reaccional e assim efectuar o ajuste do pH.

Noutra metodologia, proposta por Ogata *et al* [86], uma coluna com estreptavidina imobilizada permitiu monitorizar a presença de conjugados contendo biotina em culturas celulares. O sistema era constituído por uma válvula selectora e uma válvula solenóide, que geria a passagem da amostra pela coluna e a eluição dos elementos retidos para o detector.

Uma válvula solenóide fazia também parte de uma montagem SIA desenvolvida para a determinação do nível de endotoxinas, em água do mar [87]. O sistema exibia a particularidade de incorporar uma seringa, que continha apenas ar. A válvula solenóide, colocada antes da seringa, permitia a entrada de ar no sistema, garantindo o seu modo de funcionamento peculiar.

A associação de válvulas solenóides a sistemas SIA continua a fazer-se recentemente confirmando as vantagens já referidas. Um trabalho desenvolvido por Araújo *et al*, que permitia a determinação potenciométrica de cloreto e iodeto, fazia uso de uma válvula solenóide para introduzir amostra e titulante no sistema e para calcular o declive da relação entre o potencial e a variação da concentração de analito [88].

No trabalho desenvolvido e agora apresentado nesta dissertação, as vantagens desta associação foram também exploradas, de forma a aumentar a versatilidade e robustez de um sistema SIA desenvolvido para determinação de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas. A válvula solenóide encontrava-se adstrita a uma das portas da válvula selectora e, a partir dela, operava-se a mistura em linha dos reagentes utilizados na determinação (Capítulo 4) [68].

1.7.3 Associação com a análise por multiseringa

A associação, na mesma montagem de fluxo, de elementos típicos de sistemas SIA e do módulo multiseringa não tem sido muito frequente, tendo-se limitado a três situações em que a válvula selectora é usada meramente como dispositivo amostrador. Albertús *et al* propuseram, em 1990 [4], um sistema multiseringa para determinação da acidez e alcalinidade, por titulação, de soluções concentradas resultantes de processos industriais. Neste sistema, a válvula selectora encontrava-se conectada a uma válvula de

injecção e tinha como função introduzir no sistema os padrões, que seriam posteriormente diluídos em linha.

Uma outra montagem multiseringa, proposta pelos mesmos autores para determinação da acidez e da concentração de ferro, incorporava uma válvula selectora com a função de introduzir amostra e padrões no sistema [89]. Neste caso, a válvula encontrava-se ligada a uma válvula solenóide, que fazia depois a conexão com o sistema multiseringa propriamente dito.

Em 2001, foi proposto um sistema multiseringa para determinação de níquel e especiação de ferro, que também recorria a uma válvula selectora, para introdução de amostra e padrões no sistema, desta feita ligada directamente por confluência ao módulo multiseringa [90].

Este tipo de estratégia de amostragem torna os sistemas multiseringa mais flexíveis, uma vez que a introdução da amostra no sistema é efectuada com base na relação tempo vs caudal, sendo possível alterar as condições da análise sem reconfiguração física do sistema.

Nesta área, graças à escassez de propostas envolvendo a associação das técnicas SIA e multiseringa, permanecem em aberto inúmeras possibilidades para explorar, em conjunto, as potencialidades das duas técnicas.

1.7.4 Associação com a multibomba

Até ao momento, o único registo da associação de elementos típicos de montagens SIA e multibomba, numa mesma montagem, com objectivos analíticos, refere-se a um trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação (Capítulo 6). Neste trabalho, duas microbombas solenóides foram utilizadas como sistema de propulsão num sistema SIA,

com o objectivo de se criar um sistema de fluxo pulsado para determinação de indometacina em formulações farmacêuticas (Capítulo 6) [91].

1.8 Referências bibliográficas

[1] J. Ruzicka, E.H. Hansen, Anal. Chim. Acta 78 (1975) 145.

[2] J. Ruzicka, G.D. Marshall, Anal. Chim. Acta 237 (1990) 329.

[3] B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A. Lapa, Anal. Chim. Acta 293 (1994) 129.

[4] F. Albertús, B. Horstkotte, A. Cladera, V. Cerdà, Analyst 124 (1999) 1373.

[5] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 466 (2002) 125.

[6] J. Ruzicka, E.H. Hansen, Flow Injection Analysis, Jonh Wiley and Sons, Nova York, 2ª edição, 1988.

[7]G.D. Christian, J. Ruzicka, Anal. Chim. Acta 261 (1992) 11.

[8] A. Ivaska, J. Ruzicka, Analyst 118 (1993) 885.

[9] A. Cladera, C. Tomàs, E. Gómez, J.M. Estela, V. Cerdà, Anal. Chim. Acta 302 (1995) 297.

[10] S. Liu, P.K. Dasgupta, Talanta 41 (1994) 1903.

[11] G.D Marshall, J.F. van Staden, Proc. Contr. Qual. 3 (1992) 251.

[12] J. Ruzicka, T. Gübeli, Anal. Chem. 63 (1991) 1680.

[13] J.F. van Staden, A. Botha, S. Afr. J. Chem. 51 (1998) 100.

[14] T. Gübeli, G.D. Christian, J. Ruzicka, Anal. Chem. 63 (1991) 2407.

[15] A. Cladera, E. Gómez, J.M. Estela, V. Cerdà, Talanta 43 (1996) 1667.

[16] P.B. Martelli, B.F. Reis, E.A.M. Kronka, H.Bergamin Fº, M. Korn, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, A.N. Araújo, Anal. Chim. Acta 308 (1995) 397.

[17] A.N. Araújo, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 310 (1995) 447.

[18] E.A.G. Zagatto, B.F. Reis, C.C. Oliveira, R.P. Sartini, M.A.Z. Arruda, Anal. Chim. Acta 400 (1999) 249.

[19] M.A. Segundo, H.M. Oliveira, J.L.F.C. Lima, M.I.G.S. Almeida, A.O.S.S. Rangel, Anal. Chim. Acta 537 (2005) 207.

[20] J. L. F. C. Lima, J. L. M. Santos, A.C.B. Dias, M.F.T. Ribeiro, E. A. G. Zagatto, Talanta 64 (2004) 1091.

[21] A.R. Crespí, R. Forteza, V. Cerdà, Lab. Rob. Autom. 7 (1995) 245.

[22] R.W. Min, J. Nielsen, J. Villadsen, Anal. Chim. Acta 320 (1996) 199.

[23] M.T. Oms, A. Cerdà, V. Cerdà, Electroanalysis 8 (1996) 387.

[24] M.T. Oms, A. Cerdà, A. Cladera, V. Cerdà, Anal. Chim. Acta 318 (1996) 251.

[25] R.C.C. Costa, A.N. Araújo, M.C.B.S.S. Montenegro, M.F. Pimentel, V.L. Silva, Can. J. Anal. Sci. Spectr. 48 (2003) 157.

[26] N.Z. Aracama, A.N. Araújo, R. Perez-Olmos, Anal. Sci. 20 (2004) 679.

[27] S. Nakano, Y. Luo, D.A. Holman, J. Ruzicka, G.D. Christian, J. Flow Inj. Anal. 13 (1996) 148.

[28] S. Nakano, Y. Luo, D.A. Holman, J. Ruzicka, G.D. Christian, Microchem. J. 55 (1997) 392.

[29] Y. Luo, S. Nakano, D.A. Holman, J. Ruzicka, G.D. Christian, Talanta 44 (1997) 1563.

[30] O. Thomas, F. Théraulaz, V. Cerdà, D. Constant, P. Quevauviller, Trends Anal. Chem. 16 (1997) 419.

[31] C.C. Oliveira, E.A.G. Zagatto, A.N. Araújo, J.L.F.C. Lima, Anal. Chim. Acta 371 (1998) 57.

[32] C.C. Oliveira, R.P. Sartini, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 413 (2000) 41.

[33] O. Egorov, M.J. O'Hara, J.W. Grate, Anal. Chem. 71 (1999) 345.

[34] C.J. Bruckner-Lea, M.S. Stottlemyre, D.A. Holman, J.W. Grate, F.J. Brockman, D.P. Chandler, Anal. Chem. 72 (2000) 4135.

[35] J.J. Mateos, E. Gómez, F. Garcias, M. Casas, V. Cerdà, Applied Rad. Isot. 53 (2000) 144.

[36] M. Miro, E. Gómez, J.M. Estela, M. Casas, V. Cerdà, Anal. Chem. 74 (2002) 826.

[37] O. Egorov, M.J. O'Hara, O.T. Farmer III, J.W. Grate, Analyst 126 (2001) 1594.

[38] J. Wang, E.H. Hansen, J. Anal. At. Spectrom. 16 (2001) 1349.

[39] J. Wang, E.H. Hansen, J. Anal. At. Spectrom. 17 (2001) 1284.

[40] J. Wang, E.H. Hansen, J. Anal. At. Spectrom. 17 (2002) 1278.

[41] M.S. Jiménez, R. Velarte, J.R. Castillo, Spectr. Acta B 57 (2002) 391.

[42] J. Wang, E.H. Hansen, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 836.

[43] J. Wang, E.H. Hansen, Anal. Letters 33 (2000) 2747.

[44] S.C. Nielsen, E.H. Hansen, Anal. Chim. Acta 422 (2000) 47.

[45] J. Wang, E.H. Hansen, J. Anal. At. Spectrom. 17 (2002) 248.

[46] J. Wang, E.H. Hansen, Anal. Chim. Acta 456 (2002) 283.

[47] X. Long, R. Chomchoei, P. Gala, E.H. Hansen, Anal. Chim. Acta 523 (2004) 279.

[48] J. Wang, E.H. Hansen, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 1.

[49] F. Vogt, M. Tacke, M. Jakusch, B. Mizaikoff, Anal. Chim. Acta 422 (2000) 187.

[50] O. Elsholz, C. Frank, B. Matyschok, F. Steiner, O. Wurl, B. Stachel, H. Reincke, M. Schulze, R. Ebinghaus, M. Hempel, Fresen. J. Anal. Chem. 366 (2000) 196.

[51] A.N. Anthemidis, G.A. Zachariadis, J.A. Stratis, Talanta 64 (2004) 1053.

[52] G. Theodoridis, C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, D.G. Themelis, A. Economou, J. Chromat. A 1030 (2004) 69.

[53] C.K. Zacharis, G. Theodoridis, A.N. Voulgaropoulos, J. Chromat. B 808 (2004) 169.

[54] N. Lenghor, K. Grudpan, J. Jakmunee, B.A. Staggemeier, W.W.C. Quigley, B.J. Prazen, G.D. Christian, J. Ruzicka, R.E. Synovec, Talanta 59 (2003) 1153.

[55] M.J. Ayora-Cañada, B. Lendl, Anal. Chim. Acta 417 (2000) 41.

[56] M. Guzman, B.J. Compton, Talanta 40 (1993) 1943.

[57] M.A. Segundo, A.O.S.S. Rangel, Anal. Chim. Acta 458 (2002) 131.

[58] P.C.A.G. Pinto, M.L.M.F.S. Saraiva, J.L.F.C. Lima, Anal. Chim. Acta, in press.

[59] A.N. Araújo, R.C.C. Costa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, Anal. Chim. Acta 358 (1998) 111.

[60] A.N. Araújo, R.C.C. Costa, J.L.F.C. Lima, Anal. Sci. 15 (1999) 991.

[61] R.C.C. Costa, M.I. Cardoso, A.N. Araújo, Am. J. Enol. Vitic. 51 (2000) 131.

[62] R.C.C. Costa, A.N. Araújo, Quím. Nova 24 (2001) 588.

[63] R.C.C. Costa, A.N. Araújo, Anal. Chim. Acta 438 (2001) 227.

[64] R.C.C. Costa, A.A. Almeida, A.N. Araújo, V.L. Silva, Atom. Spectros. 23 (2002) 17.

[65] R.M. Peña, J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva, Anal. Chim. Acta 514 (2004) 37.

[66] P.C.A.G. Pinto, J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva, Clin. Chim. Acta 337 (2003) 69.

[67] P.C.A.G. Pinto, J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva, Intern. J. Environ. Anal. Chem. 85 (2005) 29.

[68] P.C.A.G. Pinto, M.L.M.F.S. Saraiva, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, Talanta, in press.

[69] P.C.A.G. Pinto, M.L.M.F.S. Saraiva, S. Reis, J.L.F.C. Lima, Anal. Chim. Acta 531 (2005) 25.

[70] H.C. Shu, H. Hakanson, B. Mattiasson, Anal. Chim. Acta 300 (1995) 277.

[71] Y. Luo, R. Al-Othman, G.D. Christian, J. Ruzicka, Talanta 42 (1995) 1545.

[72] M. Hedenfalk, B. Mattiasson, Anal. Letters 29 (1996) 1109.

[73] J.Y. Neira, N. Reyes, J.A. Nóbrega, L.R.A. 12 (1999) 246.

[74] J.W. Grate, R. Strebin, J. Janata, O. Egorov, J. Ruzicka, Anal. Chem. 68 (1996) 333.

[75] J.W. Grate, O. Egorov, Anal. Chem. 70 (1998) 3920.

[76] J.W. Grate, S.K. Fadeff, O. Egorov, Analyst 124 (1999) 203.

[77] O. Egorov, M.J. O'Hara, J. Ruzicka, J.W. Grate, Anal. Chem. 70 (1998) 977.

[78] J.W. Grate, O. Egorov, S.K. Fiskum, Analyst 124 (1999) 1143.

[79] O. Egorov, S.K. Fiskum, M.J. O'Hara, J.W. Grate, Anal. Chem. 71 (1999) 5420.

[80] R.N. Fernandes, M.G.F. Sales, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, A.N. Araújo, M.CB.S.M. Montenegro, J. Pharm. Biom. Anal. 25 (2001) 713.

[81] A.M. Pimenta, A.N. Araújo, M.CB.S.M. Montenegro, J. Pharm. Biom. Anal. 30 (2002) 931.

[82] A.M. Pimenta, A.N. Araújo, M.CB.S.M. Montenegro, C. Pasquini, J.J.R. Rohwedder, I.M. Raimundo Jr., J. Pharm. Biom. Anal. 36 (2004) 49.

[83] E. Santos, M.CB.S.M. Montenegro, C. Couto, A.N. Araújo, M.F. Pimentel, V.L. Silva, Talanta 63 (2004) 721.

[84] H.C. Shu, Y.C. Ling, J. Chin. Chem. Soc. 47 (2000) 979.

[85] H. Paseková, M.G. Sales, M.C. Montenegro, A.N. Araújo, M. Polásek, J. Pharm. Biom. Anal. 24 (2001) 1027.

[86] Y. Ogata, L. Scampavia, J. Ruzicka, C.R. Scott, M.H. Gelb, F. Turecek, Anal. Chem. 74 (2002) 4702.

[87] G. Samanta, S. Zhang, P. Dasgupta, J. Pharm. Sci. Techn. 57 (2003) 12.

[88] A.N. Araújo, M.CB.S.M. Montenegro, L. Kousalová, H. Sklenárová, P. Solich, R.P. Olmos, Anal. Chim. Acta 505 (2004) 161.

[89] F. Albertús, A. Cladera, V. Cerdà, Analyst 125 (2000) 2364.

[90] F. Albertús, A. Cladera, E. Becerra, V. Cerdà, Analyst 126 (2001) 903.

[91] P.C.A.G. Pinto, M.L.M.F.S. Saraiva, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, Anal. Chim. Acta 539 (2005) 173.

CAPÍTULO 2

Aspectos gerais da parte experimental

2. Aspectos Gerais da Parte Experimental

2.1 Introdução

Neste capítulo são focados os aspectos gerais comuns aos diversos trabalhos realizados, evitando assim repetições nas secções experimentais incluídas em cada capítulo.

São assim descritos equipamentos e material utilizados no decurso dos trabalhos bem como os reagentes e o modo de preparação dos mesmos. São ainda apresentados o procedimento de optimização seguido no desenvolvimento das metodologias propostas e o tratamento estatístico usado para avaliação da qualidade dos resultados obtidos.

Referem-se ainda o diagrama de fluxo de um dos sistemas desenvolvidos e os programas informáticos desenvolvidos para o controlo, por computador, dos sistemas analíticos apresentados.

2.2 Reagentes e soluções

Em todos os trabalhos desenvolvidos em meio aquoso utilizou-se água desionizada com condutividade específica inferior a 0,1 $\mu S\ cm^{-1}$, obtida a partir de água de consumo por passagem em resinas de troca iónica de leito misto, incorporadas num aparelho de desionização da marca Milli-Q, modelo RG.

Os reagentes usados na preparação das soluções eram de qualidade analítica e não foram sujeitos a nenhum tratamento de purificação adicional.

As soluções padrão concentradas eram obtidas por pesagem rigorosa do respectivo reagente sólido em balança analítica e dissolução, em solvente apropriado, em material de vidro classe A, adequadamente lavado. As soluções padrão de trabalho eram obtidas por diluição rigorosa da solução mãe usando pipetas automáticas Gilson modelos P20, P100, P200, P1000 e P5000 de volume variável e com capacidades máximas de 20, 100, 200, 1000 e 5000 µl, respectivamente. As pipetas automáticas eram regularmente calibradas com água.

Na metodologia analítica para análise de amostras de óleo (Capítulo 7) a preparação dos padrões de trabalho era efectuada, por pesagem em balança analítica, a partir de uma solução concentrada oleosa, sendo a diluição efectuada numa base oleosa isenta de metais.

2.3 Componentes dos sistemas de fluxo

2.3.1 Dispositivos de aspiração/propulsão

Os sistemas de fluxo desenvolvidos, exceptuando o utilizado na determinação de indometacina (Capítulo 6), utilizaram como unidade de propulsão/aspiração uma bomba peristáltica Gilson Minipuls 3, que incorporava tubos de impulsão de PVC de 1,02 mm de diâmetro interno ou de fluorelastomero de 1 mm de diâmetro interno (Capitulo 7), da mesma marca. A escolha do diâmetro interno do tubo de impulsão era efectuada tendo em conta o caudal de propulsão pretendido e os volumes de solução a aspirar. Os tubos eram substituídos logo que se detectavam sinais de mau funcionamento tais como alterações do caudal, perda de elasticidade ou aumento do número de pulsos. A calibração dos tubos de impulsão era efectuada por cálculo da variação de volume aspirado ou propulsionado, por pesagem. A diferença obtida após pesagem de um goblet com água, previamente tarado, sujeito a aspirações ou propulsões a partir da válvula selectora, permitia estabelecer uma relação entre tempo e caudal, que permitia a definição dos volumes, a aspirar ou propulsionar, em termos de tempo.

O funcionamento da bomba peristáltica era controlado por computador, em termos de sentido e velocidade da rotação, posição de paragem da cabeça rotativa e início e paragem de funcionamento. De modo a garantir a reprodutibilidade das características do fluxo foi introduzido, na bomba, um dispositivo de contacto que controlava a paragem da bomba numa posição predefinida. Foi fixado um íman na cabeça rotativa da bomba peristáltica e um "reed relay" numa zona exterior à cabeça da bomba (Figura 2.1). O movimento da bomba peristáltica permitia a aproximação breve entre os dois elementos, ocorrendo a mudança de posição da patilha magnética do "reed relay", o que permitia a passagem de corrente eléctrica. O sinal eléctrico era detectado pelo

computador, activando uma válvula solenóide de três vias, colocada entre a bomba e o tubo de armazenamento. Assim, no início de cada etapa, as soluções fluíam em circuito fechado até activação da válvula e no final a válvula solenóide comutava para a posição inicial interrompendo o fluxo através do tubo de armazenamento. A bomba peristáltica parava quando os dois elementos se aproximavam novamente. Deste modo era assegurando que, no início de cada etapa do ciclo analítico, o movimento da bomba peristáltica se iniciasse a partir da mesma posição.

Este mecanismo não foi utilizado no trabalho que visava a análise de amostras oleosas (Capítulo 7), já que a amostragem era efectuada recorrendo a uma válvula de injecção e o efeito do dispositivo na aspiração do reagente não se mostrou significativo. No sistema referente a este mesmo trabalho foi incorporada uma bomba peristáltica adicional através da qual se fazia o carregamento da alça de amostragem da válvula de injecção, com amostra.

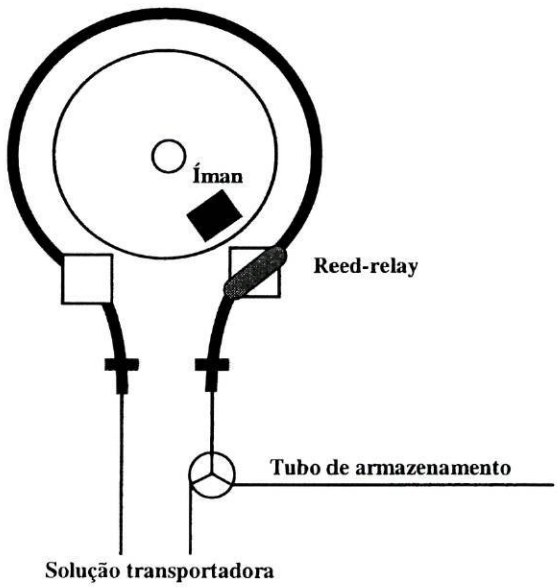


Figura 2.1 Representação esquemática do mecanismo de controlo dos movimentos da bomba peristáltica.

O sistema de fluxo pulsado, desenvolvido para a determinação de indometacina em formulações farmacêuticas (Capítulo 6), usou, como sistema de aspiração/propulsão, duas microbombas solenóides de pulso fixo de 8 µl (090SP12-8 Biochem Valve Inc., Boonton, EUA), ligadas a uma confluência de perspex por porções de tubo de 5 cm. As características das microbombas solenóides bem como o seu modo de funcionamento serão abordados em detalhe no Capítulo 6.

2.3.2 Dispositivos de selecção de fluidos

Todas as montagens que utilizaram uma bomba peristáltica como unidade de propulsão, exceptuando a descrita no Capítulo 7, incorporavam, tal como já foi referido, uma válvula solenóide de três vias NResearch, modelo 161T031 (W. Caldwell, NJ, EUA), ligada à bomba peristáltica, como interruptor do escoamento entre a bomba e o tubo de armazenamento (Figura 2.1). Uma válvula igual à descrita foi acoplada à válvula selectora da montagem descrita no Capítulo 4, com o objectivo de efectuar a aspiração em linhas dos reagentes envolvidos na determinação do ácido aminocapróico.

Como dispositivo selector de fluidos usou-se uma válvula selectora de 10 portas Valco, série C20 (Houston, TX, EUA). Esta válvula apresenta um canal central que a cada momento pode estar conectado com um dos 10 canais laterais (Figura 2.2), permitindo o direccionamento dos fluidos.

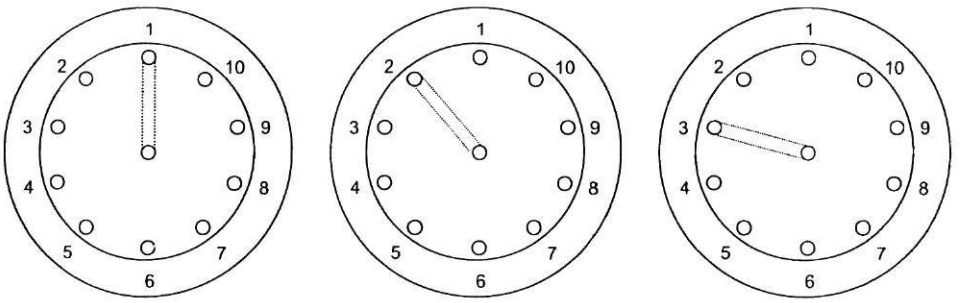


Figura 2.2 Representação esquemática de três posições consecutivas da válvula selectora de fluidos.

A montagem, apresentada no Capítulo 7, utilizou um equipamento Crison que incorporava uma válvula selectora de 8 portas, semelhante à descrita para as restantes montagens, e uma válvula de injecção de 6 portas. A válvula de injecção incorporava, entre as portas 2 e 5, uma alça de amostragem constituída por uma porção de tubo de teflon de 0,8 mm de diâmetro interno, com 30 cm de comprimento. Nesta válvula apenas duas posições eram possíveis (Figura 2.3), uma que permitia o enchimento da alça com amostra (Posição B, posição de enchimento) e outra em que ocorria a passagem de fluidos pela alça, empurrando a amostra (Posição A, posição de injecção).

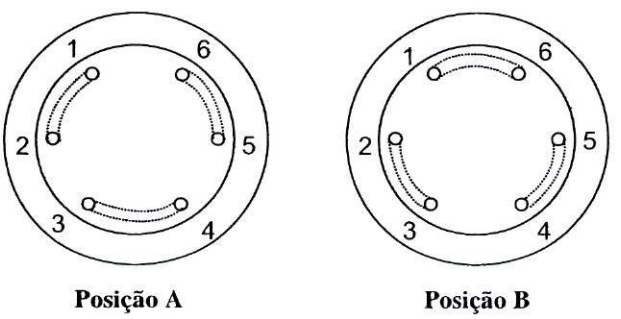


Figura 2.3 Representação esquemática das duas posições possíveis da válvula de injecção. Posição A: injecção; Posição B: enchimento.

2.3.3 Tubagem e outros componentes das montagens

Os diferentes elementos, dos sistemas de fluxo desenvolvidos, estavam conectados por tubo de PTFE Omnifit de diâmetro interno de 0,8 mm. A tubagem utilizada na ligação da válvula ao detector apresentava, na maior parte das situações, configuração em oito, por enrolamento nessa forma, ao longo de um malha de plástico de 2 cm. Com esta configuração pretendia-se intensificar o transporte radial e diminuir o transporte laminar das soluções ao longo do percurso.

As montagens descritas nos Capítulos 3 e 7 incorporavam câmaras de mistura com agitação mecânica, de volume interno regulável. Para a determinação de nitratos e nitritos (Capitulo 3) foi incorporada no sistema uma câmara de mistura de perspex de aproximadamente 450 µl de volume interno e na análise de amostras oleosas (Capitulo 7) utilizou-se uma câmara de mistura de teflon de aproximadamente 350 µl de volume interno. Em ambas as situações, a câmara consistia numa cavidade cilíndrica, perfurada na base em dois pontos diametralmente opostos (Figura 2.4).

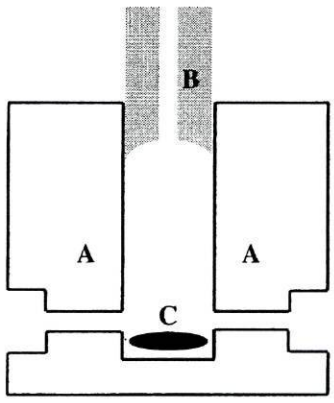


Figura 2.4 Representação esquemática da câmara de mistura de volume interno regulável. A: bloco de perspex (Capítulo 3) ou teflon (Capítulo 7); B: peça móvel; C: agitador magnético.

A parte superior da câmara era fechada por uma peça móvel roscada e perfurada, que permitia regular o volume interno da mesma. As câmaras eram colocadas num agitador magnético, que promovia a rotação de uma barra magnética colocada no seu interior. Quando incorporadas nas montagens, as válvulas passavam a operar de modo que o líquido entrava por um dos canais laterais e emergia pelo canal superior, tendo o outro canal lateral sido obstruído.

Uma confluência de perspex em forma de Y foi usada para conectar duas microbombas solenóides na montagem apresentada no Capitulo 6.

2.4 Instrumentação

As metodologias espectrofotométricas descritas nos Capítulos 3, 5 e 7 utilizaram como sistema de detecção um espectrofotometro da marca Jenway, modelo 6300, equipado com uma célula de fluxo, de 1 cm de percurso óptico, de 18 (Capítulo 3) ou 30 μl (Capítulos 5 e 7), da marca Hellma (Müllheim, Balden, Alemanha) com as referências 178.712-QS e 178.711-QS, respectivamente.

As medidas espectrofluorimétricas envolvidas nas metodologias descritas nos Capítulos 4, 5 e 6 foram efectuadas num fluorimetro da marca LabAlliance, modelo LC 305, equipado com um célula de fluxo de 8 μl de volume interno.

Os sinais analíticos eram registados num registador da marca Kipp & Zonen, modelo BD 111, que se encontrava conectado ao sistema de detecção ou no computador equipado com a interface conveniente. No trabalho descrito no Capítulo 5 foi acoplado um registador a cada um dos dois detectores utilizados.

Nas metodologias descritas nos Capítulos 3 e 5, os reactores e as soluções foram imersas num banho de água, com temperatura controlada, da marca Falc, modelo FA 90.

As medições espectrofométricas, relativas aos métodos de referência, para os vários parâmetros estudados foram efectuadas num espectrofotometro Perkin Elmer, modelo Lambda 45 UV/Vis.

A análise de indometacina em formulações de libertação prolongada (Capítulo 6), segundo a Farmacopeia Americana [1], foi realizada num cromatografo da marca Merck Hitachi, modelo Lachrom 7000, equipado com um detector L-7455, uma bomba L-7100 e uma interface D-7000.

Quando necessário o pH das soluções, usadas nos vários trabalhos, era medido num milivoltímetro de alta impedância de entrada da marca Crison, modelo GLP 22

equipado com um eléctrodo de vidro combinado de Ag/AgCl, da mesma marca e com a referência 52-02.

2.5 Controlo informático dos sistemas

2.5.1 Controlo das válvulas e dispositivos de propulsão

Os dispositivos selectores de fluidos (válvulas solenóides, válvula selectora, válvula de injecção) e os dispositivos de propulsão (bomba peristáltica, microbombas solenóides) encontravam-se interligados, através de um computador Pentium I, por uma interface activa Advantech PCL 711B.

O controlo da posição da válvula selectora de 10 portas era efectuado por desactivação, em combinações predefinidas de 6 saídas digitais de 5 V. A bomba peristáltica era, por seu lado, controlada por apenas duas saídas digitais da mesma voltagem, que definiam a activação e sentido de rotação da bomba. A velocidade de rotação da bomba era controlada por uma saída analógica de modo que os sinais enviados pelo computador variavam entre 0 e 5 V, correspondendo às velocidades de rotação mínima (0 rotações por minuto) e máxima (45 rotações por minuto).

Dado que o funcionamento das válvulas solenóides de três vias requer uma tensão de 12 V foi colocado, entre cada válvula e a placa de controlo, um interruptor electrónico, que era accionado por intermédio da activação de uma saída digital da placa.

2.5.2 Controlo dos sistemas de análise por injecção sequencial

As metodologias baseadas na análise por injecção sequencial (SIA) assentavam na actuação automática e sincronizada do dispositivo de aspiração/propulsão e dos dispositivos selectores de fluidos. Os programas usados nos vários métodos apresentados eram escritos em Microsoft QuickBasic 4.5 e foram adaptados aos elementos utilizados em cada situação. De um modo geral, cada programa permitia

definir a sequência de etapas para cada determinação, bem como a sua repetição programada. Em cada caso particular as instruções dadas referiam-se à posição da válvula selectora a aceder, ao tempo de permanência na posição definida, ao sentido de funcionamento das unidades de aspiração/propulsão e ainda à posição da válvula solenóide nos casos em que foi utilizada (Figura 2.5)

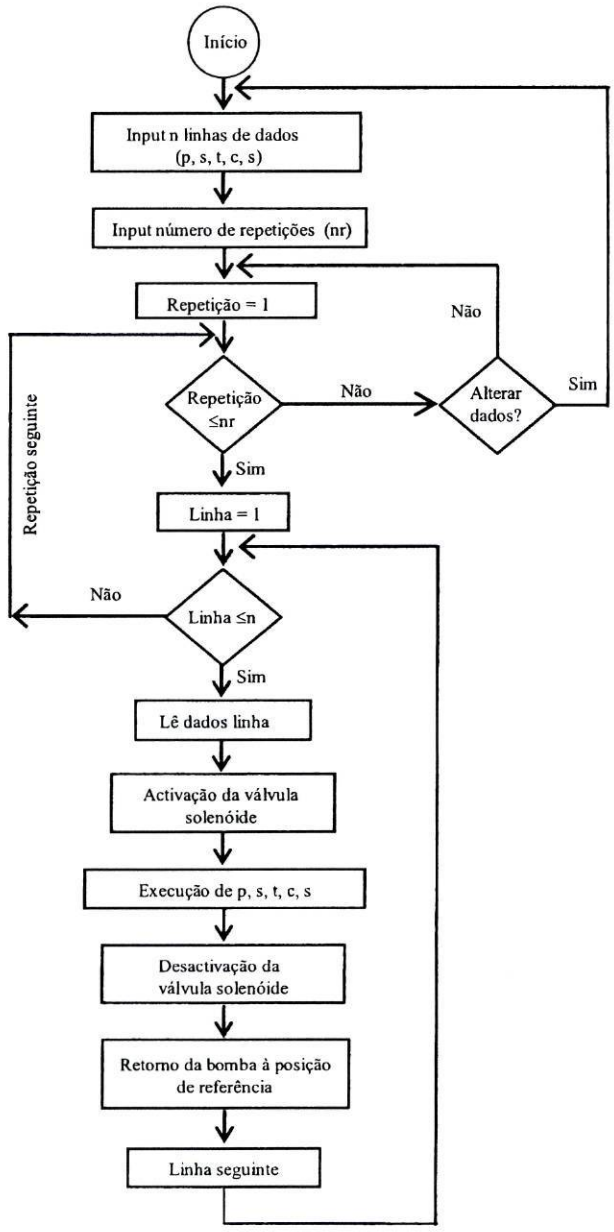


Figura 2.5 Diagrama de fluxo do programa usado para controlar um sistema SIA composto por uma válvula selectora, uma válvula solenóide, uma bomba peristáltica e um dispositivo de controlo da posição da bomba peristáltica.

A progressão de cada ciclo analítico era visualizada no ecrã tal como se pode ver na Figura 2.6, que representa o aspecto do programa utilizado na determinação de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas (Capítulo 4).

PROGRAMA DE CONTROLO DO SISTEMA SIA

Posição (1 a 10)	Solenóide (a/f)	Tempo (s)	Caudal (0 a 47)	Sentido (a/b)

Alterar dados (s/n)?

Número de repetições do ciclo:

Alterar quadro ou fazer quadro novo (a/n)?

Para interromper prima P

Tempo	Posição
Ciclo	
Velocidade	Sentido

Figura 2.6 Visualização no ecrã do programa utilizado na metodologia desenvolvida para determinação de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas.

Em anexo são fornecidos os programas utilizados no controlo dos diversos sistemas SIA desenvolvidos.

2.6 Desenvolvimento e optimização dos sistemas de análise por injecção sequencial

No desenvolvimento e optimização dos sistemas apresentados, foram tidos em conta parâmetros como a sensibilidade, limite de detecção, ritmo de amostragem, precisão, exactidão e consumo de amostra e reagentes.

Os estudos de optimização foram implementados recorrendo ao método univariante, que basicamente consiste em fazer variar, num determinado intervalo, o parâmetro a optimizar, mantendo fixos todos os outros.

O intervalo de concentrações em que se verificava uma relação linear entre a concentração da espécie e a medida a efectuar, era definido através do traçado de curvas de calibração, com soluções de concentração crescente da espécie a determinar, e pelo estabelecimento do intervalo de concentrações no qual se observava uma relação linear do sinal analítico com a concentração do analito.

O limite de detecção, definido como o valor mínimo de concentração que pode ser determinado com certeza pelo método desenvolvido, foi calculado de acordo com as especificações da IUPAC [2], a partir dos sinais analíticos de 10 determinações consecutivas de branco.

O ritmo de amostragem, expresso em número de determinações por hora, era calculado tendo em conta o tempo necessário para a realização de cada operação do ciclo analítico, mas também o tempo necessário à mudança da posição da válvula selectora entre cada etapa.

A repetibilidade da metodologia era avaliada em termos de desvio padrão relativo (RSD, do inglês "Relative Standard Deviation"), expresso em percentagem. Amostras, com diferentes concentrações da espécie a determinar, eram injectadas 10 vezes consecutivas, no sistema de fluxo, de forma a avaliar a repetibilidade da metodologia, ao longo de todo o intervalo de concentração linear.

2.7 Tratamento estatístico dos resultados

Os valores dos parâmetros a analisar eram obtidos a partir da avaliação da intensidade dos sinais analíticos registados na análise das amostras, sendo esta calculada a partir de um conjunto de 4 medidas consecutivas da mesma amostra. O valor final do parâmetro a analisar era calculado por interpolação da intensidade de sinal obtida, na curva de calibração estabelecida para cada metodologia.

A exactidão de cada metodologia era avaliada por comparação dos resultados obtidos com os fornecidos pelo método de referência vigente ou por outro convencional bem estabelecido. Em todos os capítulos, aos resultados da análise pelos métodos propostos e de comparação encontra-se sempre associado o desvio padrão de 4 determinações (Resultado ± Desvio Padrão).

Para cada determinação calcularam-se os desvios relativos para cada par de resultados obtidos (DR %) com base na expressão (Cfluxo-Cref) x 100/ Cref.

Nas metodologias referentes à análise de nitratos e nitritos (Capítulo 3) os resultados foram comparados através de uma regressão linear do tipo SIA (mg l^{-1}) = C_0 + SRef (mg l^{-1}). No caso de haver concordância entre os dois métodos a ordenada na origem (C_0) é igual a zero (0) e o declive (S) igual a um (1). O cálculo dos limites de confiança da ordenada na origem e do declive, para um nível de significância de 95% permitem verificar a hipótese nula, confirmando a concordância entre as duas metodologias [3].

Nos casos em que houve comparação dos resultados com um método de referência ou de comparação, foi ainda aplicado um teste *t* de Student emparelhado (paired t-test) aos valores obtidos pelas duas metodologias. O valor de t foi calculado com base na expressão $t = \frac{\overline{X}}{S}\sqrt{n}$, com n-1 graus de liberdade e onde $\overline{X}$ é média da diferença entre cada par de valores, S é o desvio padrão e n o número de medidas. O valor calculado ($t_{calculado}$) quando comparado com o valor tabelado ($t_{tabelado}$), para um nível de

significância de 95%, permite confirmar a concordância entre os dois métodos quando se verifica a hipótese nula [3, 4].

Na metodologia referente à determinação de ferro em óleos (Capítulo 7), perante a impossibilidade de analisar as amostras por um procedimento de referência ou de comparação, a exactidão foi avaliada pela análise de amostras certificadas de referência e os resultados e possíveis interferências de matriz foram avaliados através de ensaios de recuperação [5]. Estes ensaios foram conduzidos de forma que a cada amostra foram adicionadas quantidades de solução padrão concentrada do elemento a dosear em dois níveis de concentração. O índice de recuperação foi calculado com base na expressão $(C_{a+p} - C_a) \times 100 / C_p$, em que C_{a+p} é a concentração encontrada para a amostra adicionada de padrão, C_a é a concentração encontrada para a amostra e C_p é a concentração de elemento na amostra resultante da adição de padrão. Neste tipo de ensaio resultados entre 95 e 105 % são indicadores de que não existem efeitos de matriz na metodologia proposta.

2.8 Referências bibliográficas

[1] USP 24/NF 19, 1999, The United States Pharmacopeial Convention Inc., 874.

[2] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Anal. Chem. 48 (1976) 2294.

[3] J.N. Miller, Analyst 116 (1991) 3.

[4] J.C. Miller, J.N. Miller, Estadística para Química Analítica, Addison-Wesley Iberoamericana, Wilmington, Delaware, EUA, 2ª edição, 1988.

[5] Eurachem, The Fitness for Purpose of Analytical Methods- A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998.

CAPÍTULO 3

Determinação enzimática de nitratos e nitritos

Aplicação a soro humano e águas naturais

3. Determinação enzimática de nitratos e nitritos. Aplicação a soro humano e águas naturais

3.1 Introdução

O recurso a metodologias enzimáticas como base de determinações analíticas, em variadas matrizes, tem vindo a crescer uma vez que possibilita a obtenção de procedimentos analíticos expeditos, que envolvem um elevado grau de especificidade das reacções para os substratos. Por outro lado, a utilização de enzimas com fins analíticos evita o recurso a produtos químicos tóxicos e vai assim ao encontro das preocupações da química analítica moderna, permitindo reduzir o volume de efluentes nocivos. Efectivamente, as enzimas são produtos naturais biodegradáveis com reduzido impacto ambiental sendo também conhecidas pela sua elevada especificidade, selectividade e eficiência o que torna as determinações em que estão envolvidas menos sujeitas a interferências de outros elementos que não o analito.

A automatização de metodologias enzimáticas, em sistemas de fluxo, torna a sua utilização ainda mais atractiva já que é possível reduzir os volumes de amostra de uma forma reprodutível e diminuir o tempo de análise e a intervenção do operador, o que torna as determinações mais rápidas e económicas.

A utilização de enzimas em sistemas de análise por injecção em fluxo (FIA) tem assumido vários contornos e de uma forma geral nas metodologias desenvolvidas é possível encontrar as enzimas em solução, imobilizadas num suporte físico inerte ou integradas em sensores ópticos ou electroquímicos [1]. A escolha da forma de utilização

da enzima depende essencialmente das características da mesma e do tipo de matriz a analisar. Mais recentemente tem-se observado a implementação de métodos enzimáticos noutros sistemas de fluxo nomeadamente sistemas multiseringa [2], multicomutados [3] e de injecção sequencial (SIA) [4-7], sendo as enzimas incorporadas nos sistemas de formas semelhantes às descritas para os sistemas FIA.

Os sistemas SIA, em particular, apresentam características e um modo de funcionamento, já referidos no Capítulo 1, que facilitam a implementação de métodos enzimáticos obtendo-se metodologias simples, robustas e envolvendo consumo reduzido de enzima e amostra, facto que pode assumir mais ou menos importância dependendo do tipo de enzima e de determinação.

O trabalho aqui apresentado pretendia explorar as vantagens da automatização de uma reacção enzimática implementada num sistema SIA, recorrendo à enzima nitrato reductase (NR). A metodologia desenvolvida foi aplicada à determinação de nitratos e nitritos em soro humano e águas naturais, matrizes que apresentam usualmente concentrações de nitratos significativamente diferentes. A automatização do procedimento enzimático num sistema SIA visou a obtenção de um método robusto e aplicável num amplo intervalo de concentrações, que tornasse possível a determinação de nitratos e nitritos nas matrizes referidas. Teoricamente, a utilização da enzima NR garantia a sensibilidade do método para a análise de nitratos em baixas concentrações (soro) e a versatilidade do sistema SIA tornava possível o alargamento do intervalo de concentrações, essencial à análise de amostras de água, já que permite a implementação de procedimentos de diluição em linha, sem reconfiguração física da montagem.

O desenvolvimento de uma metodologia enzimática para determinação de nitratos e nitritos justifica-se pela importância de que se reveste actualmente as determinações em soro humano e em águas naturais. Nitratos e nitritos estão presentes no soro humano

como principais produtos da degradação endógena rápida do radical óxido nítrico (NO) e são portanto usadas para quantificar a variação deste. O radical NO é uma molécula gasosa que participa na regulação de algumas funções biológicas e fisiológicas como a neurotransmissão, a resposta imune e a regulação cardíaca, sendo bem conhecidas as suas capacidades citoprotectoras e citotóxicas [8-10]. Deste modo, a concentração de NO pode variar como consequência de alterações fisiológicas, tornando-se assim importante a sua monitorização. No entanto a determinação directa de NO em amostras biológicas é inviabilizada pela sua natureza radicalar e pela sua curta semi-vida [11]. Consequentemente, a determinação de nitratos e nitritos começou recentemente a ser utilizada como indicador da variação de produção de NO no soro humano, podendo associar-se a sua variação a alterações fisiológicas [12, 13]. Num indivíduo saudável, as concentrações de nitratos e nitritos encontram-se entre 0,06 - 0,60 e 0,25 - 2,8 mg l^{-1}, respectivamente. Quando ambos se apresentam em concentrações acima do normal, nitratos e nitritos podem ser usados como marcadores inflamatórios em algumas doenças graves como infecção por HIV [14], esclerose múltipla [15], doença de Alzheimer [16], asma [17], gastrite induzida por *Helicobacter pylori* [18], entre outras. Dada a importância da determinação, nos últimos anos têm surgido vários métodos para a determinação de nitratos e nitritos em soro humano, consistindo a maior parte em métodos colorimétricos discretos laboriosos [12, 13, 19] e muitas vezes de custo elevado [20, 21]. H. Mori propôs um método de análise por injecção em fluxo para determinação de nitratos em amostras biológicas, com redução através da NR e posterior medição da diminuição de NADPH a 340 nm [22]. No entanto, esta metodologia não apresentava a robustez e consumos reduzidos de amostra e enzima essenciais quando se trabalha com matrizes desta natureza. Mais recentemente foi proposta uma outra metodologia FIA para determinação de nitratos e nitritos baseada na

reacção com nitroanilina após redução numa coluna de zinco [23]. Perante este cenário, a automatização da determinação de nitratos e nitritos em soro humano num sistema SIA parece ser capaz de colmatar algumas das limitações metodológicas já existentes, uma vez que permite a determinação de uma forma rápida, económica e com reduzida produção de efluentes tóxicos.

Numa perspectiva ambiental, nitratos e nitritos aparecem em águas naturais como contaminantes resultantes da utilização crescente de fertilizantes à base de azoto e da sua lixiviação das terras cultivadas [24]. Este fenómeno tem um impacto elevado não só nos ciclos do azoto [25] mas também na saúde humana devido à presença de nitritos nas águas para consumo humano. De facto, os nitritos são percursores de nitrosaminas com efeito carcinogénico, representando portanto um risco para o metabolismo humano [26]. Consequentemente, nas últimas décadas várias entidades internacionais têm trabalhado em normas e directivas que visam regular os níveis de nitratos e nitritos em diferentes tipos de águas (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Directivas Internacionais para a regulamentação dos níveis de nitratos e nitritos em diferentes tipos de água.

Organismo	Tipo de água	Valor máximo recomendado (mg l^{-1} de N)	Valor máximo admissível (mg l^{-1} de N)	Referência
União Europeia	Água de superfície para a produção de água para consumo humano	NO_3^-= 5,6 NO_2^- -----	NO_3^-= 11,3 NO_2^- <0.1	(27)
Organização Mundial de Saúde	Água para consumo humano	NO_3^-=11	NO_3^-= 22	(28)
Agência de Protecção do Ambiente (EPA, EUA)	Água para consumo humano	NO_3^-= 10 NO_2^-= 1 NO_3^-+NO_2^-=10	NO_3^-= 10 NO_2^-= 1 NO_3^-+NO_2^-=10	(29)
União Europeia	Águas residuais	-----	Azoto total* = 10 – 15	(30)

* Azoto total = Azoto Kjeldahl + nitritos + nitratos

Os níveis de nitratos e nitritos nos diversos tipos de água encontram-se também legislados em Portugal (Diário da República I Série A, Dec. Lei Nº176, Artigo 83º, 1-8-1998) e estão de acordo com os estipulados pela União Europeia (Tabela 3.1).

Por tudo o que foi exposto, a determinação de nitratos e nitritos passou a fazer parte da análise de rotina de águas e consequentemente tem sido feito um grande investimento no desenvolvimento de novos métodos para a sua determinação. Podemos assim encontrar, para a determinação de nitratos e nitritos em águas, métodos espectrofotométricos, fluorimétricos, quimioluminométricos, cromatográficos, potenciométricos e até electroforéticos [31]. A implementação destas metodologias em sistemas de fluxo tem vindo também a crescer numa tentativa de tornar as determinações mais rápidas e económicas de modo que actualmente existe uma quantidade razoável de metodologias FIA para a determinação de nitratos, nitritos ou ambos, em diversos tipos de água (Tabela 3.2). Mais recentemente têm surgido propostas envolvendo sistemas baseados na análise por injecção sequencial e na multicomutação (Tabela 3.2). Tal como se pode observar por análise da Tabela 3.2., os métodos de fluxo já existentes recorrem a diferentes agentes redutores para transformar os nitratos em nitritos e a diferentes técnicas de detecção do produto final das reacções.

Tabela 3.2 Métodos de fluxo para a determinação de nitratos e nitritos em águas.

Tipo de água	Agente redutor	Intervalo linear ($mg\ l^{-1}$)	Técnica de fluxo	Detecção	Referência
Água natural	Cádmio	$0 - 3\ NO_3^-$	Fluxo segmentado	Espectrofotométrica	(32)
Água do mar	Cádmio	$0,2 - 2\ NO_3^-$	Fluxo segmentado	Espectrofotométrica	(33)
Água de rio e de mar	Cádmio	$0 - 12,4\ NO_3^-$	FIA	Fluorimétrica	(34)
Água da chuva	Cádmio	$0,006 - 0,12\ NO_3^-$	FIA	Fluorimétrica	(35)
Água natural	Cádmio	$0,0009 - 0,013\ NO_3^-$	FIA	Fluorimétrica	(36)

Água natural	Cádmio	0,06 – 62 NO_3^-	FIA	Voltamétrica	(37)
Água de rio e de lago	Cádmio	0,1 – 1,3 NO_3^- 0,08 – 6,6 NO_2^-	FIA	Espectrofotométrica	(38)
Água ambiental	Cádmio	0,1 – 3,5 NO_3^- 0,01 – 2,2 NO_2^-	FIA	Espectrofotométrica	(39)
Água natural	Cádmio	1,0 – 5,0 NO_3^- 0,1 – 0,5 NO_2^-	FIA	Espectrofotométrica	(40)
Água residual e do mar	Cádmio	0,06 – 4 NO_2^-	FIA	Espectrofotométrica	(41)
Água da chuva e de rio	Cádmio	0,01 – 53 NO_3^-	FIA	Espectrofotométrica	(42)
Água de rio	Cádmio	0 – 53 NO_3^-	FIA	Espectrofotométrica	(43)
Água de superfície, subterrânea e doméstica	Cádmio	0 – 5 NO_3^- 0 – 0,5 NO_2^-	FIA	Espectrofotométrica	(44)
Água residual	Cádmio	0,25 – 50 NO_3^- 0,05 – 5 NO_2^-	FIA	Espectrofotométrica	(45)
Água residual	Cádmio	0,092 – 4,6 NO_3^- 0,023 – 1,84 NO_2^-	SIA	Espectrofotométrica	(46)
Água residual	Cádmio	0,05 – 15 NO_3^- 0,05 – 25 NO_2^-	SIA	Espectrofotométrica	(47)
Água natural	Cádmio	0,01 – 5 NO_3^-	SIA	Espectrofotométrica	(48)
Água natural e residual	Cádmio	0,09 – 4,4 NO_3^- 0,06 – 3,3 NO_2^-	SIA	Espectrofotométrica	(49)
Água ambiental	Cádmio	0,4 – 17,7 NO_3^- 0,1 – 13 NO_2^-	SIA	Espectrofotométrica	(50)
Água de superfície	Cádmio	2,2 – 221 NO_3^- 0,16 – 3,3 NO_2^-	SIA	Espectrofotométrica	(51)
Água de rio	Cádmio	0,43 – 4,3 NO_3^- 0,1 – 1 NO_2^-	Multicomutação	Espectrofotométrica	(52)
Água residual	Hidrazina	0,2 – 24,8 NO_3^- 0,07 – 18,4 NO_2^-	SIA	Espectrofotométrica	(53)
Água natural	Hidrazina	1 – 10 NO_3^-	FIA	Espectrofotométrica	(54)
Água de rio e de mar	Radiação UV	0,003 – 0,6 NO_3^-	FIA	Espectrofotométrica	(55)
Água natural e para consume humano	Radiação UV	$4,9x10^{-7}$ – $6,2x10^{-4}$ NO_3^-	FIA	Quimioluminométrica	(56)
Efluentes industriais	Nitrato reductase	0,017 – 7 NO_3^-	FIA	Espectrofotométrica	(57)
Água de rio e de lago	Nitrato reductase	0,31 – 6,2 NO_3^-	FIA	Espectrofotométrica	(58)
Água de rio	Cloreto de titânio	0,03 – 12,4 NO_3^-	FIA	Fluorimétrica	(59)
Água mineral	Zinco	0,9 – 6,6 NO_3^-	FIA	Condutivimétrica	(60)
Fluidos Hidropónicos	HCl/H_2SO_4	5,6 – 300 NO_3^-	FIA	Amperométrica	(61)

Apesar do elevado número de metodologias existentes para a determinação de nitratos e nitritos em águas, a importância e necessidade das determinações justificam o investimento no desenvolvimento de novos métodos automatizados. De facto, tratando-se de análises de rotina de amostras de água torna-se importante dispor de métodos automáticos e robustos capazes de trabalhar independentemente por períodos de tempo razoáveis, de forma a rentabilizar a análise em série. Por outro lado, o facto de este tipo de amostra apresentar gamas de concentração alargadas obriga à existência de metodologias com resposta linear num largo intervalo de concentrações ou que permitam o ajuste das mesmas em linha, de forma automática. Há ainda a considerar as preocupações, cada vez mais prementes, relacionadas com a segurança ambiental e do operador, que exigem o desenvolvimento de métodos seguros e com baixo impacto ambiental.

As determinações envolvidas no trabalho desenvolvido basearam-se na determinação dos nitritos totais pela reacção de Griess [62], após redução dos nitratos em nitritos através da NR na presença de NADPH. A utilização de NR pretendia evitar as desvantagens de outros agentes redutores já utilizados como o cádmio [46-51], a hidrazina [53, 54] e a radiação UV [55, 56], que se prendem sobretudo com a sua toxicidade. A reacção de Griess [62], que tem vindo a ser usada em grande parte dos procedimentos existentes para a determinação de nitritos em matrizes variadas [19, 23, 48, 53, etc], baseia-se na formação de um sal diazónio corado após reacção de diazotização e apresenta características de sensibilidade que viabilizavam a determinação em ambas as matrizes.

Em conclusão, o desenvolvimento de uma metodologia de fluxo enzimática, que permite a determinação de nitratos e nitritos em soros e em águas, fundamentou-se em dois grandes objectivos; o primeiro era fornecer uma alternativa, no que respeita à

redução de nitratos, mais segura em termos ambientais do que as já existentes e o segundo era conseguir com a mesma montagem analisar amostras com concentrações de nitrato significativamente diferentes e portanto obter uma metodologia adaptável às concentrações de ambos os analitos nas matrizes em questão.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Reagentes e soluções

As enzimas e o co-factor NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo) usados na determinação de nitratos eram preparados em tampão fosfato ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$) 0,5 mol l^{-1}, pH 7,5.

Semanalmente, dez unidades (10 U) de NR de *Aspergillus niger* (pó liofilizado, 300 U g^{-1}) eram dissolvidas em 1 ml de água. A enzima reconstituída era separada em porções de 200 µl que eram depois congeladas devidamente protegidas da luz, até ao momento da sua utilização. Diariamente cada alíquota era reconstituída no tampão fosfato já referido de modo a obter-se uma solução de NR com concentração final de 1,5 U ml^{-1}.

Imediatamente antes do início das determinações preparavam-se soluções de NADPH 1 mmol l^{-1} e de desidrogenase láctica (DL) de músculo de coelho (suspensão de sulfato de amónio, 1,2U mg^{-1} proteína) 6,64U μl^{-1} e piruvato $2,6x10^{-4}$ mg μl^{-1}, no mesmo tampão. Durante as determinações as soluções descritas atrás eram mantidas em gelo e protegidas da luz [20].

O reagente de Griess era preparado diariamente por adição de volumes iguais de soluções de sulfanilamida (SA) 4 % (m/v) e de N- (1-naftil) etilenodiamina (NED) 0,4 % (m/v). Os reagentes eram dissolvidos em 25 ml de água e 2,5 ml de ácido fosfórico 85 %. Durante o uso o reagente de Griess era protegido da luz [13].

Soluções concentradas de nitrato e nitrito 1 g l^{-1} eram preparadas a partir dos seus sais de potássio e sódio, respectivamente. Diariamente, preparavam-se soluções padrão de nitrato e nitrito por diluição rigorosa das soluções concentradas em água.

Como solução transportadora, no sistema de fluxo, era usada água desionizada já descrita no Capítulo 2 (Reagentes e soluções).

3.2.2 Aparelhagem

O sistema SIA (Figura 3.1), desenvolvido para a determinação de nitratos e nitritos, apresentava um reactor (TR) de 2 m de comprimento, com configuração em figuras de oito, que originava um valor de dispersão óptimo para o desenvolvimento das reacções. O tubo de armazenamento (TA), de 4 m de comprimento, garantia que não havia contaminação da solução de transporte com as soluções aspiradas a partir da válvula selectora.

Uma câmara de mistura (Figura 3.1, CM), já descrita no Capítulo 2 na secção "Tubagens e outros componentes das montagens", foi acoplada a uma das portas da válvula selectora e colocada sobre uma placa agitadora com aquecimento. A placa, além de promover a rotação do pequeno agitador magnético colocado no interior da câmara, permitia manter a temperatura em aproximadamente 37 °C, temperatura à qual a actividade enzimática demonstrou ser mais extensa, como foi comprovado por estudos, que serão descritos mais adiante neste capítulo, em Resultados e Discussão (Optimização dos parâmetros físico-químicos).

Os restantes componentes da montagem nomeadamente bomba peristáltica, válvula selectora, válvula solenóide, espectrofotometro e registador, foram já referidos pormenorizadamente no Capítulo 2. A detecção do produto da reacção de diazotização no sistema de fluxo era efectuada a 540 nm.

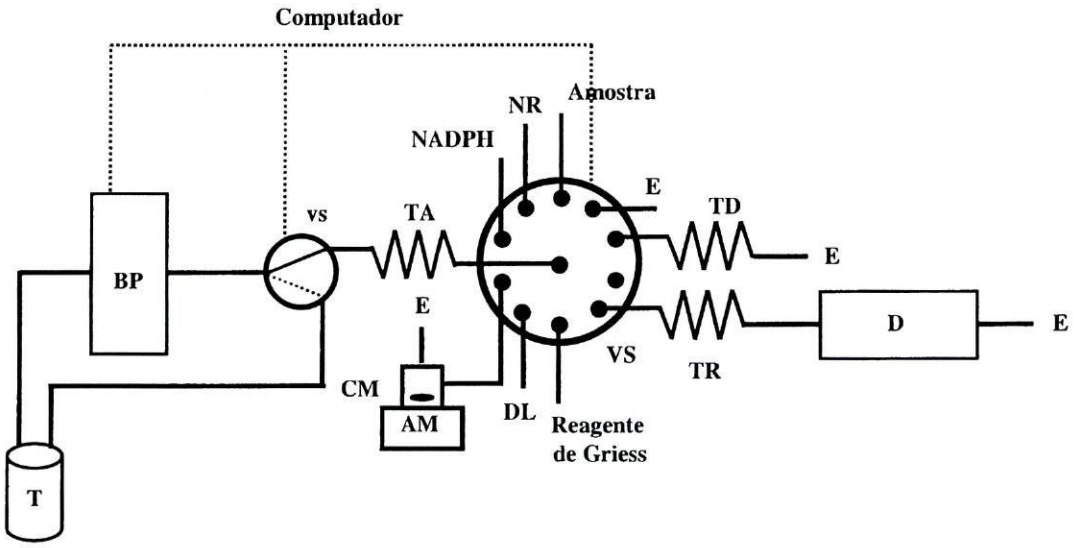


Figura 3.1 Representação esquemática do sistema SIA usado na determinação de nitratos e nitritos em soro humano e águas. T: solução transportadora; BP: bomba peristáltica; VS: válvula selectora; vs: válvula solenóide; TA: tubo de armazenamento; TR: tubo reactor; D: espectrofotometro; NR: nitrato reductase; DL: desidrogenase láctica; CM: câmara de mistura; AM: agitador magnético; TD: tubo de diluição; E: esgoto.

3.2.3 Preparação das amostras

A metodologia desenvolvida foi aplicada à análise de amostras de águas naturais e de soro humano. As amostras de água eram introduzidas, sem qualquer tratamento prévio, no sistema de fluxo, sendo a concentração de nitratos ajustada através de um procedimento de diluição em linha. As amostras de soro eram sujeitas a um tratamento prévio simples, que tinha por objectivo a remoção das proteínas da matriz. Para tal, foram usados tubos de centrifugação Centrisart I (Sartorius) nos quais eram colocados 2,5 ml de amostra a desprotreinizar. Em seguida, as unidades de tratamento, assim

preparadas, eram sujeitas a uma centrifugação de 2500 G, sendo o ultrafiltrado recolhido e analisado pelos métodos desenvolvido e de comparação.

Durante a fase de escolha do método de tratamento da amostra foi também estudada a utilização do reagente de Carrez II (sulfato de zinco e hexacianoferrato de potássio) para promover a precipitação das proteínas do soro. No entanto, este método exigia a diluição prévia das amostras o que se traduziria numa redução acentuada dos níveis de nitratos e nitritos, facto que inviabilizava a determinação quer pelo método desenvolvido quer pelo de comparação.

3.2.4 Procedimento experimental

Antes do início das determinações, toda a tubagem do sistema e a célula de fluxo eram preenchidos com água desionizada, os tubos da válvula selectora eram preenchidos com as soluções respectivas e a câmara de mistura era esvaziada.

No procedimento desenvolvido os nitritos eram determinados usando, tal como já foi referido, o reagente de Griess. Amostra e reagente eram aspirados sequencialmente para o tubo de armazenamento e à medida que a sequência aspirada era encaminhada para o detector, formava-se por diazotização um composto corado que era detectado. Por seu lado os nitratos eram determinados como nitritos totais (nitritos da amostra mais nitritos resultantes da redução) após redução com NR na presença de NADPH.

O ciclo analítico para determinação de nitratos e nitritos em águas foi adaptado, a partir do procedimento optimizado para análise de soro, às altas concentrações de nitratos presentes nas águas, permitindo assim a aplicação da metodologia a duas matrizes diferentes, sem reconfiguração física do sistema. Numa fase inicial da optimização, tal como será descrito mais à frente neste capítulo, reduziu-se o volume de amostra usado

na determinação de nitratos em soro, tendo sido possível aumentar o limite superior da determinação cerca de 12 vezes, o que permitia a análise de amostras de água contendo até 50 mg l^{-1} de nitratos. No entanto, este aumento não era suficiente já que as concentrações deste analito em águas naturais pode atingir valores bastante superiores. Deste modo, foi desenvolvido um procedimento de diluição em linha, baseado na utilização de um tubo de diluição colocado numa das portas da válvula selectora (Figura 3.1, TD), que permitia efectuar o ajuste da concentração de nitratos de forma automática.

O procedimento experimental para a determinação de nitratos e nitritos em soros e águas decorreu nas mesmas condições excepto no que se refere ao volume de amostra e ao percurso desta no interior do sistema. Os ciclos analíticos para a determinação de nitratos e nitritos em soro e águas encontram-se resumidos nas Tabelas 3.3 e 3.4, respectivamente.

Tabela 3.3 Ciclo analítico para a determinação de nitratos e nitritos em soro humano.

Etapa	Posição da Válvula	Volume (µl)	Tempo (s)	Sentido do fluxo*	Caudal (ml min^{-1})	Descrição da etapa
1	8	----	1	A	0,8	Aspiração de uma bolha de ar
2	3	75	5,6	A	0,8	Aspiração de NADPH
3	8	----	1	A	0,8	Aspiração de uma bolha de ar
4	2	60	4,5	A	0,8	Aspiração de nitrato reductase
5	1	150	11,2	A	0,8	Aspiração de amostra (nitratos)
6	4	----	23,5	P	0,8	Propulsão para a câmara de mistura
7	4	----	147	----	0	Paragem de fluxo
8	1	150	11,2	A	0,8	Aspiração de amostra (nitritos)
9	6	50	1,5	A	2	Aspiração de reagente de Griess
10	7	----	80	P	2	Detecção (nitritos)
11	5	100	7,5	A	0,8	Aspiração de desidrogenase láctica
12	4	---	11	P	0,8	Propulsão para câmara de mistura
13	4	----	120	----	0	Paragem de fluxo
14	6	75	2,2	A	2	Aspiração de reagente de Griess
15	4	----	4,2	P	2	Propulsão para câmara de mistura
16	4	----	20	----	0	Paragem de fluxo
17	4	----	32	A	0,8	Aspiração do conteúdo da câmara
18	7	----	80	P	2	Detecção (nitratos)
19	4	----	25	P	3	Lavagem da câmara
20	4	----	20	A	3	Esvaziamento da câmara de mistura
21	10	----	35	P	3	Lavagem do tubo de armazenamento

* Sentido do fluxo - A: aspiração, B: propulsão

Tabela 3.4 Ciclo analítico para a determinação de nitratos e nitritos em águas.

Etapa	Posição da válvula	Volume (µl)	Tempo (s)	Sentido do fluxo*	Caudal (ml min^{-1})	Descrição da etapa
A	1	70	8,6	A	0,5	Aspiração de amostra para diluição
B	9	128	9,6	P	0,8	Propulsão para o tubo de diluição
C	10	----	10	P	1,5	Lavagem do tubo de armazenamento
1	8	----	1	A	0,8	Aspiração de uma bolha de ar
2	3	75	5,6	A	0,8	Aspiração de NADPH
3	8	----	1	A	0,8	Aspiração de uma bolha de ar
4	2	60	4,5	A	0,8	Aspiração de nitrato reductase
5	9	25	3	A	0,5	Aspiração de amostra (nitratos)
6	4	----	15	P	0,8	Propulsão para a câmara de mistura
7	4	----	147	----	0	Paragem de fluxo
8	1	150	11,2	A	0,8	Aspiração de amostra (nitritos)
9	6	50	1,5	A	2	Aspiração de reagente de Griess
10	7	----	80	P	2	Detecção (nitritos)
11	5	100	7,5	A	0,8	Aspiração de desidrogenase láctica
12	4	---	11	P	0,8	Propulsão para câmara de mistura
13	4	----	120	----	0	Paragem de fluxo
14	6	75	2,2	A	2	Aspiração de reagente de Griess
15	4	----	4,2	P	2	Propulsão para câmara de mistura
16	4	----	20	----	0	Paragem de fluxo
17	4	----	20	A	0,8	Aspiração do conteúdo da câmara
18	7	----	80	P	2	Detecção (nitratos)
19	4	----	25	P	3	Lavagem da câmara
20	4	----	20	A	3	Esvaziamento da câmara de mistura
21	10	----	35	P	3	Lavagem do tubo de armazenamento
22	9	----	6	P	3	Lavagem do tubo de diluição

* Sentido do fluxo - A: aspiração, B: propulsão

Quando se procedia à aplicação da metodologia a águas e a concentração de nitratos era superior a 50 mg l^{-1}, o ciclo analítico iniciava-se com o procedimento de diluição em linha. Assim, 70 µl de amostra de água eram aspirados para o tubo de armazenamento e em seguida uma parte da zona aspirada era propulsionada para um tubo de diluição (Figure 3.1, TD), por um período de tempo previamente definido, garantindo a diluição da amostra para níveis de nitratos determináveis pela metodologia desenvolvida (Tabela 3.4, etapas A-C). Nas restantes situações envolvidas na aplicação da metodologia a ambas as matrizes, o ciclo analítico iniciava-se com a aspiração de 75 µl de NADPH, entre duas bolhas de ar, para o tubo de armazenamento (Tabelas 3.3 e 3.4, etapas 1-3). Em seguida, procedia-se à aspiração de 60 µl da enzima NR e 150 ou 25 µl de amostra dependendo se se tratava da aplicação a soros ou a águas, respectivamente (Tabelas 3.3 e 3.4, etapas 4 e 5). A aspiração da amostra ocorria ou a partir da porta da válvula correspondente à amostra ou a partir do tubo de diluição, nos casos em que fora aplicado o procedimento de diluição. A sequência de soluções aspiradas era encaminhada para a câmara de mistura, posicionada na porta 4 da válvula selectora, por um período de tempo que garantia a entrada na câmara de todos os segmentos (Tabelas 3.3 e 3.4, etapa 6).

A determinação de nitritos, referentes às etapas 8, 9 e 10 do ciclo analítico, acontecia enquanto a redução decorria na câmara de mistura, já que era necessário proceder a uma paragem de fluxo de 147 segundos (Tabelas 3.3 e 3.4, etapa 7) que perfazia, juntamente com a determinação de nitritos, uma paragem efectiva de 240 segundos.

Após a determinação de nitritos, 100 µl da solução de DL e piruvato eram aspirados para o tubo de armazenamento e de imediato enviados para a câmara de mistura onde, após uma paragem de fluxo de 120 segundos, o excesso de NADPH era eliminado (Tabela 3.3 e 3.4, etapas 11-13). Por fim, o reagente de Griess era aspirado e

propulsionado para a câmara onde se visualizava de imediato a formação de sal diazónio corado (Tabela 3.3 e 3.4, etapas 14-16). A mistura corada era aspirada para o tubo de armazenamento e encaminhada para o detector onde o produto era detectado a 540 nm (Tabelas 3.3 e 3.4, etapas 17 e 18).

O ciclo analítico terminava com a lavagem e esvaziamento da câmara de mistura (Tabelas 3.3 e 3.4, etapas 19-21), de modo a que no ciclo seguinte não se encontrassem na câmara vestígios da mistura reaccional da determinação anterior. A lavagem compreendia uma etapa em que a solução transportadora, encaminhada pela bomba peristáltica num movimento de propulsão, fluía pela câmara a um caudal elevado, saindo pelo canal de esgoto (Tabelas 3.3 e 3.4, etapa 19). Na etapa seguinte, procedia-se ao esvaziamento da câmara por aspiração da solução transportadora que permaneceu no seu interior (Tabelas 3.3 e 3.4, etapa 20). A etapa 21 refere-se ao direccionamento, para uma porta de esgoto, da solução aspirada da câmara, de modo a garantir que toda a tubagem está preenchida apenas com solução transportadora.

No caso da aplicação da metodologia à análise de águas, o ciclo analítico terminava com a lavagem do tubo de diluição (Tabela 3.4, etapa 22).

Em cada ciclo analítico obtinham-se dois sinais analíticos, um correspondente ao composto corado formado por reacção dos nitritos da amostra e outro referente aos nitritos totais após redução dos nitratos a nitritos. A concentração de nitratos da amostra calculava-se por subtracção dos nitritos iniciais aos nitritos totais.

3.2.5 Metodologias de comparação e de referência

As amostras de soro e água foram também analisadas, com objectivos comparativos, por metodologias de comparação [21] e de referência [63], respectivamente. Os

resultados obtidos por análise das amostras de soro no sistema de fluxo foram comparados com os fornecidos pela análise através de um kit comercial [21] que se baseava também na redução enzimática dos nitratos a nitritos e determinação destes através da reacção de Griess. No caso das amostras de água, a determinação de comparação de nitratos baseou-se na medição da absorvência a 220 e 275 nm e a de nitritos na reacção de Griess [63].

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos

A optimização dos parâmetros físico-químicos das determinações decorreu de modo a estabelecer uma metodologia base que por pequenas modificações se adaptasse à determinação de concentrações elevadas de nitratos.

A versatilidade da válvula selectora de fluidos, já destacada no Capítulo 1, permitiu a introdução, no sistema SIA, de uma câmara de mistura, já descrita no Capítulo 2, através de uma das suas portas laterais. O posicionamento da câmara e o modo de funcionamento peculiar dos sistemas SIA, por inversão do sentido do fluxo, facilitaram a criação das condições óptimas para o desenvolvimento da reacção enzimática, ao permitir a aspiração das diferentes zonas em diferentes momentos e a sua introdução na câmara de mistura na altura propícia. Foram assim criadas as condições de mistura adequadas para o desenvolvimento da reacção de redução de nitratos a nitritos e foi possível proceder à determinação de nitritos, enquanto na câmara de mistura ocorria a redução.

A configuração básica do sistema e as condições reaccionais, tal como já foi referido na descrição do ciclo analítico, eram assim comuns às duas aplicações (soro e águas) encontrando-se apenas diferenças no ciclo analítico relativamente ao volume de amostra para a determinação de nitratos e ao tratamento a que ela é sujeita no interior do sistema. O volume de amostra, para a determinação de nitratos em soro, foi estudado tendo em conta a sensibilidade da determinação, a necessidade de economizar a amostra de soro e enzima NR e ainda o grau de mistura dos diferentes segmentos em linha. Embora se observasse um aumento da intensidade dos sinais analíticos de cerca de 300 % quando se utilizavam amostras de volume entre 50 e 300 μl, o grande aumento de

sinal (200 %) verificava-se entre 50 e 150 µl (Figura 3.2). Tendo em conta os factores enumerados o volume de 150 µl foi seleccionado para efectuar as determinações.

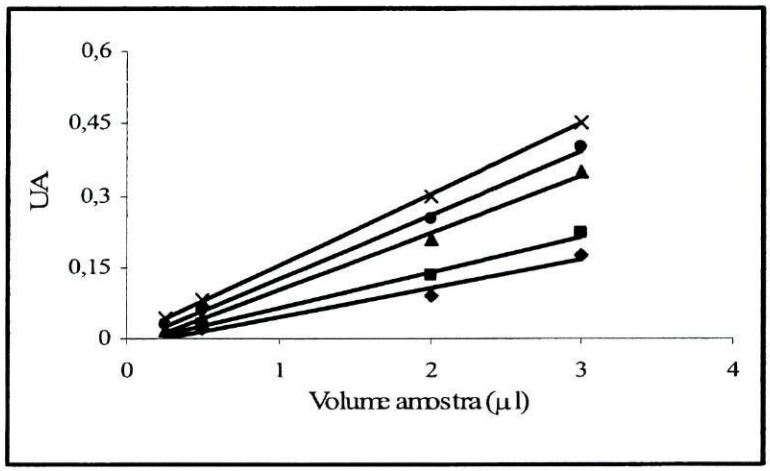


Figura 3.2 Variação dos sinais analíticos, referentes à determinação de nitratos, em função do volume de amostra. ♦ 50 µl; ■ 100 µl; ▲ 150 µl; ● 200 µl; x 300 µl.

No caso da aplicação da metodologia a amostras de água, o volume da amostra foi reduzido de forma alargar o intervalo de concentrações de nitratos determináveis, já que nesta matriz estes se encontram em concentrações que podem ser cerca de 100 vezes superiores às encontradas habitualmente em soro. Deste modo, foram testados volumes de amostra entre 15 e 40 µl e os estudos prosseguiram utilizando um volume de 25 µl, como um compromisso entre a sensibilidade e a economia de reagentes, uma vez que a utilização de volumes de amostra superiores implicaria um gasto acrescido de NR e de co-factor para que se reunissem condições para a redução. Este volume originava um

intervalo de linearidade até 50 mg l^{-1} de nitrato, o que garantia a análise de grande parte das amostras tendo em conta os valores habitualmente encontrados.

No entanto, amostras de águas originárias por exemplo de zonas rurais onde os solos são intensamente fertilizados, podem atingir concentrações de nitratos superiores, surgindo assim a necessidade de alargar o intervalo de concentrações. Foi assim desenvolvido um procedimento de diluição em linha, que permitia a análise das amostras por aspiração directa sem tratamento prévio fora do sistema.

Várias estratégias de diluição em linha têm vindo a ser utilizadas em sistemas SIA, de modo a tornar os sistemas analíticos mais autónomos e a obter graus de diluição apropriados, por um processo controlado e reprodutível, já que a diminuição do volume de amostra não é muitas vezes suficiente para atingir os níveis de diluição desejados. Na maioria dos casos, recorre-se a um tubo de diluição, colocado numa das portas da válvula selectora, para gerar um gradiente de concentrações [64-69]. Foi igualmente descrito um procedimento em que o grau de diluição desejado é atingido por mistura em linha com uma quantidade adequada de solvente [64]. No sistema de fluxo desenvolvido a diluição era conseguida recorrendo a um tubo de diluição localizado numa das portas da válvula selectora, e traduziu-se na adição de três etapas ao ciclo analítico (Tabela 3.3, etapas A-C). Assim, tal como já foi descrito, a amostra era aspirada e enviada para o tubo de diluição durante um período de tempo optimizado, que garantia a sua rejeição parcial e permitia depois, ao aspirar a amostra do tubo de diluição, encontrá-la numa diluição adequada ao intervalo de concentrações linear da metodologia. Num procedimento de diluição deste género o grau de diluição depende do volume de amostra aspirado inicialmente para o tubo de armazenamento, do volume transferido do tubo de armazenamento para o tubo de diluição e do volume final aspirado do tubo de diluição para o tubo de armazenamento [65]. Os três parâmetros foram estudados com o

objectivo de se atingir um grau de diluição de cerca de cinco vezes, que garantia a análise de amostras num largo intervalo de concentrações de nitrato. Uma vez que o procedimento de diluição pretendia introduzir o mínimo de alterações na metodologia, já optimizada, considerou-se como volume final 25 μl (aspirado do tubo de diluição), volume já optimizado para a determinação directa sem diluição da amostra. Sendo assim, o grau de diluição da alíquota de 25 μl aspirada do tubo de diluição era determinado pelo volume de amostra aspirado inicialmente e pela dispersão que esta sofria durante o seu percurso do tubo de armazenamento até ao tubo de diluição. O volume de amostra aspirado inicialmente foi estudado no intervalo de 15 a 80 μl e pode constatar-se que a aspiração de 70 μl de amostra e um volume transferido de 128 μl (escolhido em estudos envolvendo volumes entre 55 e 166 μl) resultavam num grau de diluição de 4,4 vezes, com uma repetibilidade associada inferior a 3 %. Volumes inferiores a 70 μl, embora diminuíssem o tempo de análise e originassem diluições superiores, estavam associados a problemas de reprodutibilidade dos sinais analíticos. Os estudos relativos ao procedimento de diluição decorreram comparando os sinais analíticos obtidos por diluição de padrões no interior do sistema, pelo procedimento de diluição desenvolvido, com os fornecidos pela análise de padrões preparados por diluição fora do sistema de fluxo, de forma a estabelecer o nível de diluição atingido em cada situação.

A metodologia desenvolvida recorre à enzima NR para efectuar a redução de nitratos a nitritos distinguindo-se assim de outros métodos em que o agente redutor tem impacto negativo no ambiente e na saúde do operador. A optimização do processo de redução envolveu o estudo do volume óptimo de NR e do tempo de paragem de fluxo necessário para se atingir um grau de redução mensurável na câmara de mistura, no intervalo de concentrações pretendido. De modo a minimizar a manipulação da enzima, os estudos

decorreram usando uma solução de NR de concentração fixa de 1,5 U ml^{-1}, fazendo variar o número de unidades gastas em cada determinação por variação do volume da solução. Deste modo, foram estudados volumes entre 30 e 70 µl e tempos de paragem entre 60 e 600 segundos. Concluiu-se que 0,09 U de NR por determinação, o que corresponde a 60 µl de solução 1,5 U ml^{-1}, e uma paragem de fluxo de 240 segundos promoviam a redução de nitratos a nitritos na câmara de mistura, originando uma metodologia com sensibilidade adequada para análise de amostras no intervalo de concentrações em que se incluíam os nitratos presentes nas amostras. A escolha do tempo de paragem do fluxo na câmara de mistura teve como base estudos que revelaram que tempos de paragem inferiores a 240 segundos ocasionavam uma diminuição significativa da sensibilidade da determinação. Os mesmos estudos permitiram concluir que embora a paragem de fluxo na câmara por períodos superiores a 240 segundos levasse a um pequeno aumento da sensibilidade da determinação, comprometia o ritmo de amostragem inviabilizando a aplicação da metodologia desenvolvida na rotina laboratorial.

O NADPH, co-factor da NR, foi um dos factores com mais peso na sensibilidade da determinação e no sucesso do processo de redução, já que a enzima só apresenta capacidade redutora depois do seu local activo ter sido reduzido pelo NADPH. Relativamente ao co-factor estudou-se inicialmente, no sistema de desenvolvido, a influência da ordem da sua aspiração relativamente à amostra e à própria enzima. Verificou-se que se obtinham melhores resultados em termos de intensidade de sinais analíticos quando o NADPH era aspirado separadamente e adicionado à amostra e enzima apenas na câmara de mistura, o que confirma dados já referenciados na literatura [70].

De forma a tornar o ciclo analítico mais simples recorreu-se à estratégia de fluxo monosegmentado (MSFA) [71], que se caracteriza pela aspiração da zona reaccional entre duas bolhas de ar, o que se traduz numa redução da dispersão e em última análise num aumento da sensibilidade da determinação. Optou-se assim por aspirar o NADPH entre duas bolhas de ar, garantindo assim a sua individualidade e limitando a dispersão que sofria no transportador (Figura 3.3).

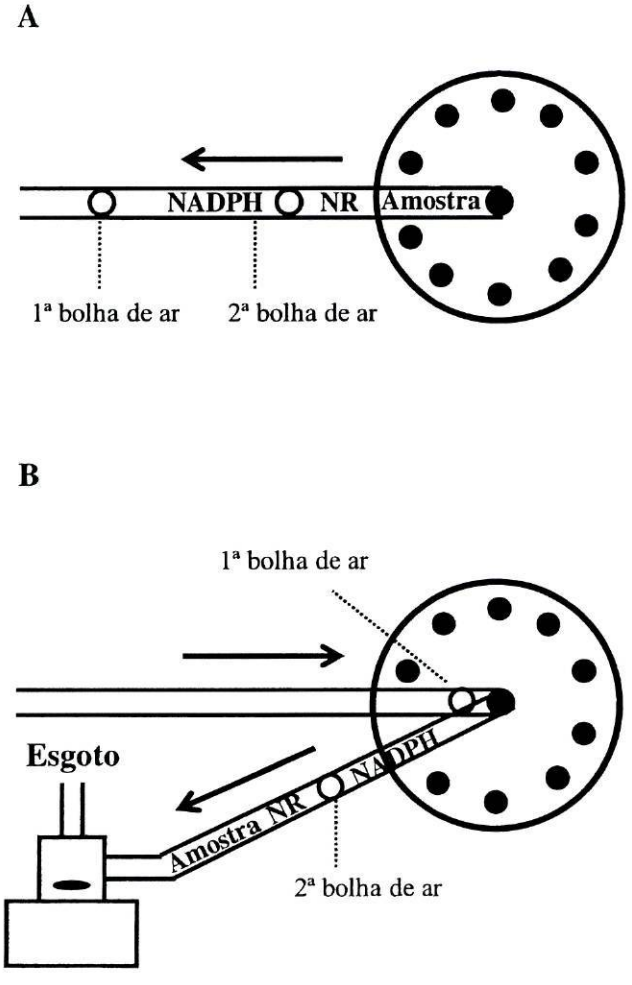


Figura 3.3 Representação esquemática da aspiração, para o tubo de armazenamento (A), e propulsão, para a câmara de mistura (B), das zonas de NADPH, nitrato reductase (NR) e amostra para determinação de nitratos.

Deste modo combinaram-se as vantagens do fluxo monosegmentado com a versatilidade do sistema SIA, baseada sobretudo no modo de funcionamento da válvula selectora, tendo a estratégia resultado em algumas vantagens relativamente à solução de NADPH mas também no que respeita à determinação em si. Efectivamente, intercalando a zona de NADPH entre duas bolhas de ar, era possível mantê-la separada das restantes zonas e adicioná-la à mistura só na câmara de mistura. Por outro lado, era possível controlar a dispersão das zonas aspiradas sequencialmente a seguir à segunda bolha, de modo que as zonas de amostra e NR eram sujeitas a uma dispersão reduzida no tubo de armazenamento. Para além disto, era possível controlar, através do movimento da primeira bolha aspirada, o percurso das zonas aspiradas para a câmara de mistura, o que permitia um controlo rigoroso do tempo necessário para introduzir todas as zonas na câmara, sem dispersão adicional devido à entrada de transportador.

Devido ao facto de a câmara de mistura se encontrar conectada ao sistema (Figura 3.3) através de um dos seus orifícios laterais, encontrando-se o outro fechado, as bolhas de ar, ao entrarem na câmara de mistura, eram de imediato expelidas pelo canal de esgoto superior, não afectando a repetibilidade dos sinais analíticos obtidos. É de assinalar que, a implementação da estratégia de fluxo monosegmentado só foi possível graças ao funcionamento do sistema SIA baseado em inversões do sentido do fluxo, que permitia a aspiração sequencial das diferentes zonas e a sua introdução faseada na câmara de mistura.

Ainda relativamente à solução de NADPH, era importante estabelecer a quantidade adequada para promover a redução da NR. No entanto, verificou-se que concentrações elevadas de NADPH interferiam com o desenvolvimento da reacção de Griess (Figura 3.4) que decorria posteriormente para determinação dos nitritos totais, e que por outro lado quantidades demasiado baixas inviabilizavam a actuação da NR.

A interferência do NADPH na reacção de Griess foi detectada durante estudos que pretendiam avaliar a percentagem da redução de nitratos a nitritos na câmara de mistura com o objectivo de verificar se era possível rentabilizar ainda mais a determinação nas condições do ensaio. Estes estudos eram efectuados analisando padrões de nitrato e nitrito nas mesmas condições, de forma a calcular a percentagem de conversão de nitratos a nitritos. Ora, observou-se que a diferença entre os sinais analíticos de nitrato e nitrito não era a mesma para todas as concentrações analisadas, sendo superior para os padrões mais baixos, o que indicava algum tipo de interferência dependente da concentração de analito. Após vários estudos e alterações, concluiu-se que esta variação não se devia a diferenças na percentagem de redução mas sim à presença de um excesso de NADPH no meio reaccional, que não era totalmente consumido durante a redução e que era assim tanto maior quanto menor a concentração de nitrato. De facto, a redução de soluções menos concentradas consome uma quantidade menor de NADPH, o que resulta numa maior quantidade a afectar posteriormente a reacção de Griess. Este tipo de interferência confirma resultados anteriores de Verdon *et al* [70] que propôs uma remoção enzimática do excesso de NADPH, não utilizado na redução, à base de glucose 6-fosfato (GD) desidrogenase.

No trabalho aqui apresentado a interferência do NADPH na reacção de Griess foi comprovada por análise de soluções padrão de nitrito, no sistema SIA, na presença e na ausência do co-factor (Figura 3.4).

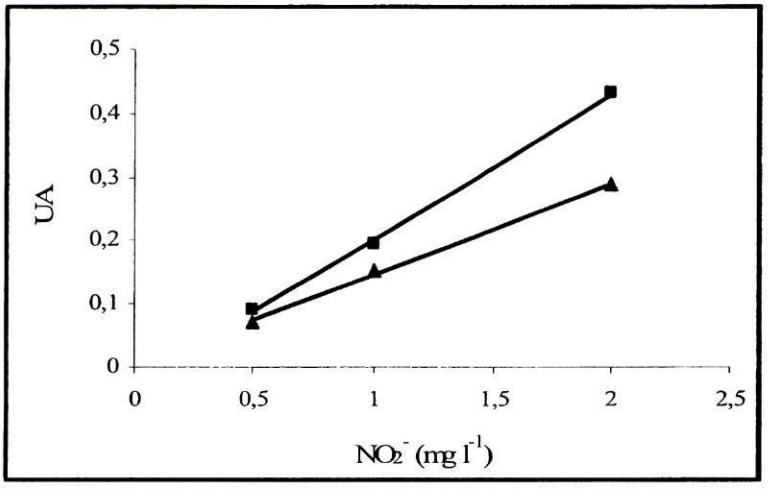


Figura 3.4 Sinais analíticos referentes à determinação de nitritos na presença (▲) e na ausência (■) de NADPH.

Como se pode observar, ocorria uma diminuição significativa dos sinais analíticos na presença de NADPH. Foi então adoptada uma estratégia de remoção de NADPH que envolvia a utilização da enzima DL e de piruvato após estudos comparativos com a estratégia que envolve GD. A enzima DL promove a conversão do NADPH na presença de piruvato segundo a reacção:

$$\text{NADPH} + \text{piruvato} \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{L-lactato}$$

não se observando interferência, na reacção de Griess, de qualquer dos compostos resultantes. Numa primeira fase, partindo da aspiração de um alíquota de 75 µl de NADPH, foram realizados estudos que pretendiam estabelecer a concentração mínima de NADPH capaz de promover a redução de nitratos a nitritos no intervalo de concentrações adequado. Com uma solução de NADPH de concentração 1 mmol l^{-1}

obtinha-se uma boa sensibilidade e a eliminação do seu excesso era relativamente simples. Numa segunda fase, estudou-se a estratégia de remoção do NADPH, tendo-se obtido uma eliminação total da interferência por adição de 100 μl de solução de DL e piruvato ao conteúdo da câmara de mistura, após a fase do ciclo correspondente determinação de nitritos. Para remoção efectiva do NADPH em excesso era necessário efectuar uma paragem do fluxo, na câmara de mistura, igual ou superior a 120 segundos. Os estudos, que permitiram a implementação da estratégia de remoção do excesso de NADPH, foram efectuados comparando os resultados da determinação de nitratos, após a remoção, com os obtidos por análise de nitritos usando o ciclo analítico para determinação de nitratos, tal como acontecia nos estudos que permitiram detectar a interferência. Comparando os resultados da análise de padrões de nitritos com os de igual concentração final de nitritos, após a redução enzimática, era possível verificar se havia alguma interferência do NADPH e se a remoção estava a ser efectiva.

Após a redução de nitratos a nitritos, foram testadas duas estratégias para a quantificação dos nitritos totais; uma envolvia a aspiração sequencial de uma alíquota da câmara de mistura e de reagente de Griess de uma das portas da válvula selectora e posterior encaminhamento da zona reaccional para o detector; a outra passava igualmente pela aspiração de reagente de Griess para o tubo de armazenamento mas depois pelo seu encaminhamento para a câmara de mistura, aspiração de uma alíquota da mistura reaccional da câmara e posterior encaminhamento para o detector. Os estudos decorreram testando volumes de reagente entre 50 e 150 μl mediante as duas estratégias e observou-se que os melhores resultados em termos de sensibilidade eram obtidos quando se aspirava 75 μl de reagente e se encaminhava a zona aspirada para a câmara de mistura, onde o reagente se misturava com a totalidade da mistura reaccional durante um período de paragem de fluxo de 20 segundos (Figura 3.5). Volumes

superiores resultavam em problemas de homogeneização da mistura reaccional na câmara, o que implicava um aumento do tempo de paragem de fluxo para que ocorresse desenvolvimento de cor.

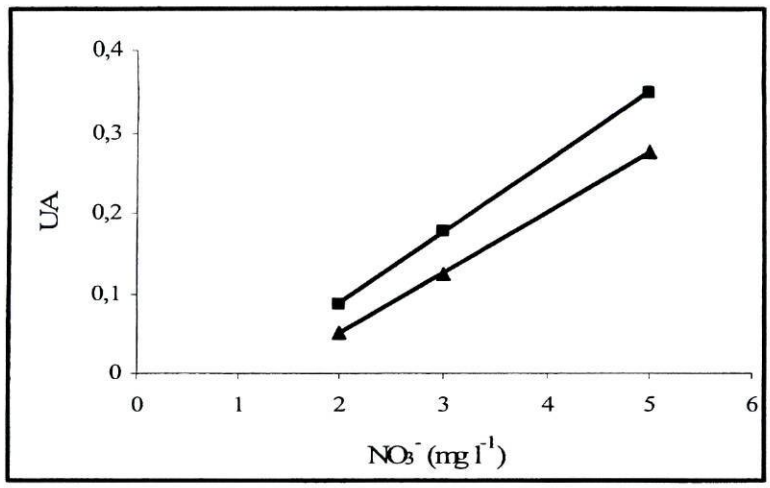


Figura 3.5 Variação dos sinais analíticos de nitrato obtidos por aspiração sequencial de mistura reaccional da câmara e reagente de Griess (▲) ou por adição do reagente ao conteúdo da câmara (■). O estudo foi efectuado aspirando com 75 µl de reagente.

A adição do reagente de Griess à mistura reaccional, directamente na câmara de mistura, favorecia a mistura do reagente com o conteúdo da câmara, aumentando a sensibilidade da determinação. Por outro lado, permitia ao mesmo tempo reduzir a dispersão sofrida pela alíquota de mistura reaccional aspirada da câmara de mistura, uma vez que, como esta se encontrava já misturada com o reagente, era necessário apenas encaminhá-la rapidamente até ao detector.

Relativamente à determinação de nitritos, foram também estudas as condições reaccionais óptimas e concluiu-se que a análise envolvendo a aspiração de 150 µl de amostra e 50 µl de reagente de Griess garantia a linearidade da curva de calibração no intervalo de nitritos normalmente presentes em soros e em águas. A utilização de volumes superiores não resultava, aparentemente, numa melhoria da sensibilidade e ocasionava problemas de mistura com a zona de amostra, o que implicava a alteração das condições da determinação de forma a incrementar a mistura. Esta situação acabaria por afectar o ritmo de amostragem, já que envolveria quase inevitavelmente o recurso a reactores mais longos e caudal de propulsão menor. Por outro lado, implicaria também um aumento da dispersão que era indesejável na determinação de nitratos.

A concentração dos dois componentes do reagente de Griess foi estudada individualmente e foi usada uma mistura de volumes iguais de sulfanilamida 4 % e de NED 0,4 % em ambas as determinações, uma vez que havia um aumento da sensibilidade das determinações com o aumento dos dois componentes até estes valores, e acima deles não ocorria uma variação significativa.

O estudo de optimização do comprimento e configuração do tubo reactor e do caudal de propulsão da zona reaccional para o detector pretendia estabelecer as condições que permitissem o desenvolvimento da reacção durante a determinação de nitritos e que originassem a mínima dispersão possível no caso da determinação de nitratos. O compromisso entre as duas situações foi conseguido incorporando no sistema um tubo reactor de 2 m, em figuras de oito, e propulsionando a zona reaccional para o detector a um caudal de 2 ml min^{-1}.

O caudal de aspiração das soluções foi fixado em 0,8 ml min^{-1} como um compromisso entre o ritmo de amostragem e a reprodutibilidade das aspirações sobretudo dos volumes pequenos, excepto no caso da aspiração do reagente de Griess. Efectivamente,

devido aos volumes reduzidos de reagente utilizados observava-se uma dispersão acentuada da alíquota aspirada no transportador, quando a aspiração ocorria a um caudal inferior a 2 ml min^{-1}.

Foi ainda efectuado um estudo que pretendia estabelecer as condições de temperatura óptimas para a actuação da enzima NR. Foram realizados ensaios à temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), a 37 °C e 40 °C, tendo-se observado actividade máxima da enzima a 37 °C, pelo que a determinação foi efectuada com termostatização a esta temperatura.

Nas condições optimizadas para a determinação de nitratos e nitritos em soros as curvas de calibração obtidas apresentavam uma resposta linear nos intervalos de 0,4 – 4 e 0,1 – 3 mg l^{-1} de nitratos e nitritos, respectivamente. As equações das curvas de calibração eram: Abs (UA) = 0,1465 (±0,0154) $C_{nitritos}$ (mg l^{-1}) + 0,0128 (±0,0288), R^2 = 0,9992 e Abs (UA) = 0,0616 (±0,0075) $C_{nitratos}$ (mg l^{-1}) + 0,0588 (±0,0029), R^2 = 0,9994, em que Abs se refere ao valor de intensidade do sinal de absorvência e C à concentração em mg l^{-1}.

Os limites de detecção foram calculados em 0,03 e 0,14 mg l^{-1} de nitritos e nitratos, respectivamente, seguindo o procedimento descrito no Capítulo 2.

A Figura 3.6 representa o registo dos sinais analíticos obtidos durante a elaboração das curvas de calibração de nitritos (A) e nitratos (B) e na análise das amostras de soro.

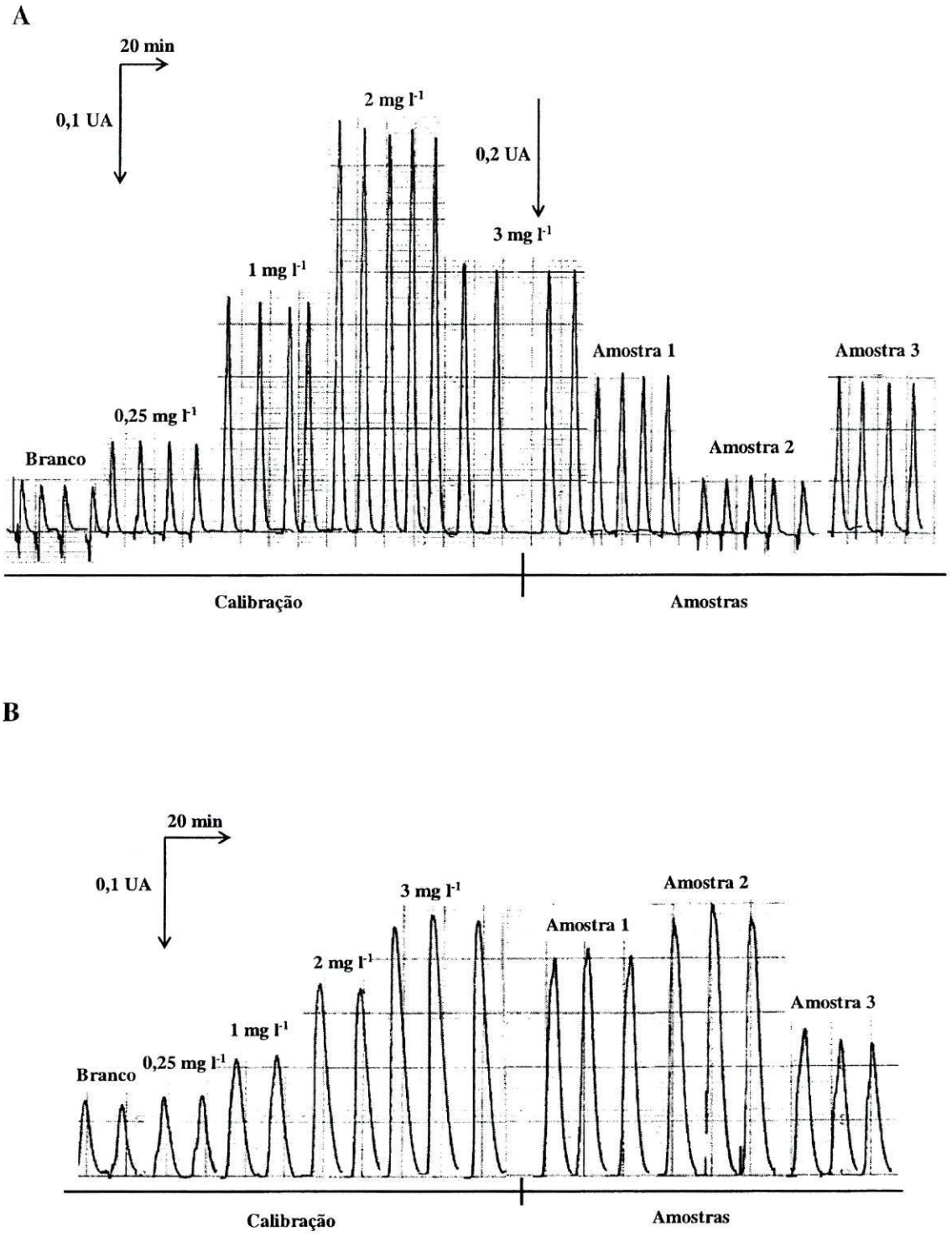


Figura 3.6 Registo dos sinais analíticos obtidos durante a elaboração das curvas de calibração de nitritos (A) e nitratos (B) e na análise das amostras de soro.

As condições optimizadas para aplicação da metodologia a águas também permitiram estabelecer, por regressão linear, curvas de calibração com resposta linear até 50 e 3 mg l^{-1} de nitratos e nitritos, respectivamente. As equações das curvas de calibração eram: Abs (AU) = 0,1671 (± 0,0099) $C_{nitritos}$ (mg l^{-1}) + 0,0071 (± 0,0129), R^2 = 0,9992 e Abs (AU) = 0,008 (± 0,0003) $C_{nitratos}$ (mg l^{-1}) + 0,0005 (± 0,0082), R^2 = 0,9991, em que Abs se refere ao valor de intensidade do sinal de absorvência e C à concentração em mg l^{-1}. Neste caso os limites de detecção da metodologia, também calculados após processamento do sinal de branco, eram 0,03 mg l^{-1} de nitritos e 0,73 mg l^{-1} de nitratos.

A Figura 3.7 representa o registo dos sinais analíticos obtidos durante a elaboração da curva de calibração de nitratos e na análise das amostras de água com concentrações de nitrato superiores a 4 mg l^{-1}.

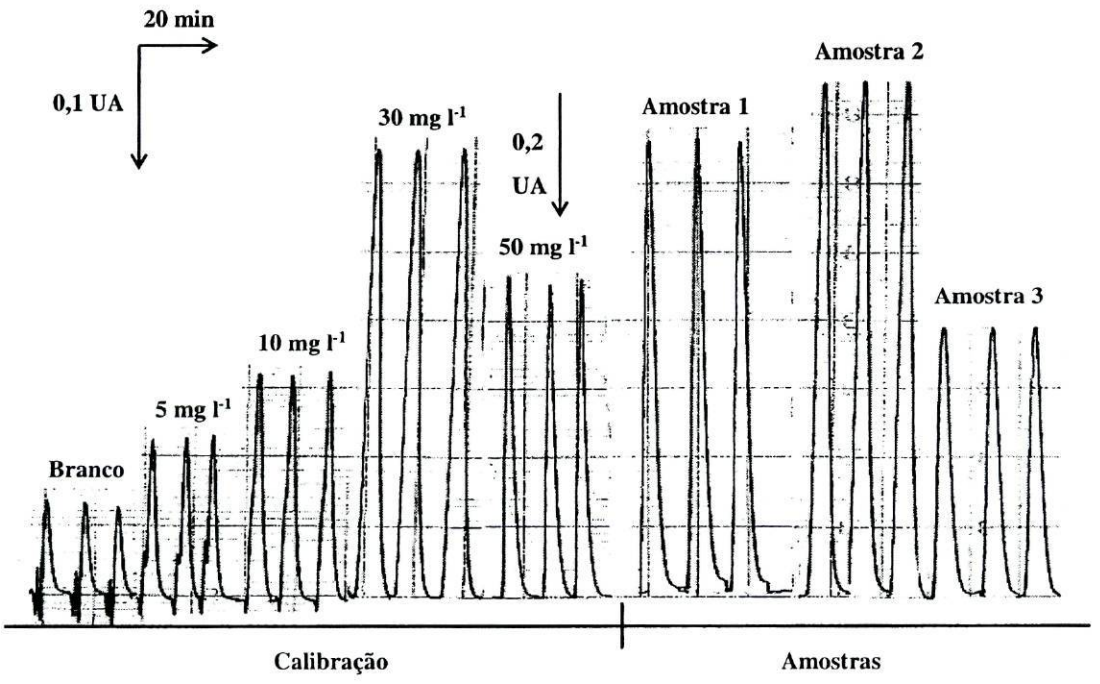


Figura 3.7 Registo dos sinais analíticos obtidos durante a elaboração da curva de calibração de nitratos e na análise das amostras de água com concentrações de nitrato superiores a 4 mg l^{-1}.

Em ambos os casos a metodologia permitia efectuar 12 determinações por hora, sendo 6 de nitritos e 6 de nitratos.

3.3.2 Análise das amostras de soro

A metodologia de fluxo optimizada foi aplicada na determinação de nitratos e nitritos em 15 amostras de soro humano tratadas como foi referido na secção Materiais e métodos (Preparação das amostras).

Por análise repetida das amostras (n=15) de amostras de soro com concentrações significativamente diferentes de nitratos (1,7 e 2,3 mg l^{-1}) e nitritos (0,31 e 0,54 mg l^{-1}) não se obtiveram desvios padrão relativos superiores a 3,8 % o que confirma a aplicabilidade da metodologia num intervalo alargado de concentrações.

De forma a avaliar a exactidão da metodologia, os resultados obtidos por análise das amostras no sistema SIA forma comparados com os fornecidos pelas metodologias de comparação [21].

Os resultados encontram-se na Tabela 3.5, onde também se podem analisar os desvios relativos entre as duas metodologias. Como se pode observar não se verificaram desvios estatisticamente significativos entre os resultados obtidos pela metodologia de fluxo e de comparação.

Tabela 3.5 Resultados da determinação de nitratos e nitritos em soros pelas metodologias SIA e de comparação [21].

Amostras	Metodologia SIA* ($mg\ l^{-1}$)		Metodologia de comparação* ($mg\ l^{-1}$)		Desvio Relativo (%)	
	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato
1	0,375 ± 0,031	1,74 ± 0,06	0,390 ± 0,012	1,81 ± 0,07	- 4,8	- 4,0
2	0,260 ± 0,022	1,23 ± 0,04	0,260 ± 0,015	1,29 ± 0,02	0	- 4,6
3	0,410 ± 0,021	1,96 ± 0,02	0,430 ± 0,022	1,87 ± 0,04	- 4,8	+ 4,0
4	0,930 ± 0,006	1,44 ± 0,01	0,900 ± 0,011	1,38 ± 0,05	+ 3,2	+ 4,8
5	0,237 ± 0,011	1,69 ± 0,03	0,236 ± 0,017	1,76 ± 0,04	+ 0,4	- 4,0
6	0,263 ± 0,012	1,70 ± 0,03	0,270 ± 0,008	1,63 ± 0,04	- 2,6	+ 4,0
7	0,450 ± 0,011	1,91 ± 0,03	0,470 ± 0,011	1,85 ± 0,01	- 4,4	+ 3,0
8	0,396 ± 0,005	3,23 ± 0,05	0,389 ± 0,013	3,19 ± 0,07	+ 1,7	+ 1,2
9	0,317 ± 0,005	2,28 ± 0,03	0,319 ± 0,009	2,24 ± 0,03	- 0,6	+ 1,7
10	0,354 ± 0,008	2,11 ± 0,07	0,345 ± 0,021	2,10 ± 0,05	+ 2,5	+ 0,5
11	0,609 ± 0,005	2,21 ± 0,09	0,632 ± 0,006	2,23 ± 0,02	- 3,6	- 1,2
12	0,540 ± 0,005	0,86 ± 0,03	0,532 ± 0,011	0,90 ± 0,02	+ 1,4	- 4,6
13	0,620 ± 0,011	1,20 ± 0,01	0,607 ± 0,021	1,21 ± 0,06	+ 2,1	- 0,25
14	0,370 ± 0,004	2,91 ± 0,02	0,360 ± 0,008	2,77 ± 0,07	+ 2,7	+ 4,8
15	0,510 ± 0,012	2,59 ± 0,02	0,490 ± 0,041	2,50 ± 0,05	+ 3,9	+ 3,4

* ± desvio padrão de 3 determinações

3.3.3 Análise das amostras de água

A metodologia SIA desenvolvida foi também aplicada na determinação de nitratos e nitritos em amostras de água para consumo humano de diferentes origens. As amostras foram colhidas, segundas as especificações aceites para esta determinação [63], em frascos de vidro e de imediato refrigeradas até à análise. Tal como é aconselhado, as amostras foram analisadas logo que possível após a colheita. As amostras com

concentrações de nitratos superiores a 50 mg l^{-1} eram sujeitas ao procedimento de diluição em linha desenvolvido.

Os resultados da análise das amostras pela metodologia de fluxo desenvolvida foram comparados com os fornecidos pelos métodos de referência [63]. Os resultados assim como os desvios relativos encontram-se resumidos na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 Resultados da determinação de nitratos e nitritos em águas pelas metodologias SIA e de referência [63].

Amostras	Metodologia SIA* (mg l^{-1})		Metodologia de referência* (mg l^{-1})		Desvio Relativo (%)	
	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato
1	< LD	15,0 ± 0,3	< LD	14,7 ± 0,2	----	- 2,0
2	0,201 ± 0,008	36,2 ± 0,6	0,210 ± 0,008	36,8 ± 0,5	- 4,2	- 0,6
3	0,253 ± 0,021	20,7 ± 0,4	0,243 ± 0,009	20,2 ± 0,3	- 4,1	+ 3,5
4	0,275 ± 0,009	35,9 ± 0,1	0,266 ± 0,011	36,8 ± 0,8	+ 3,3	- 2,4
5	0,261 ± 0,009	24,2 ± 0,2	0,268 ± 0,012	24,6 ± 0,1	- 2,6	- 1,6
6	0,225 ± 0	13,1 ± 0,1	0,215 ± 0,006	13,4 ± 0,2	+ 4,6	- 2,2
7	0,144 ± 0,004	27,2 ± 0,2	0,149 ± 0,008	26,2 ± 0,3	- 3,3	+ 3,8
8	0,078 ± 0,006	113,0 ± 0,4	0,080 ± 0,009	112,0 ± 0,9	- 2,4	+ 0,9
9	0,500 ± 0,008	141,2 ± 0,4	0,520 ± 0,021	143,7 ± 1,2	- 3,8	- 1,7
10	0,140 ± 0,005	89,7 ± 1	0,130 ± 0,007	85,7 ± 0,8	+ 4,4	+ 4,4
11	< LD	3,3 ± 0,3	< LD	3,4 ± 0,1	----	- 2,9
12	< LD	2,7 ± 0,2	< LD	2,8 ± 0,3	----	- 3,6
13	< LD	106,7 ± 0,8	< LD	111,9 ± 0,6	----	- 4,6
14	0,030 ± 0,002	153,7 ± 1,7	0,031 ± 0,008	158,2 ± 1,2	- 2,3	- 2,9
15	< LD	2,6 ± 0,1	< LD	2,5 ± 0,1	----	+ 4,0

* ± desvio padrão de 3 determinações

A análise repetida de amostras com diferentes concentrações de nitratos (23,3 e 94,3 mg l^{-1}) e nitritos (0,31 e 0,54 mg l^{-1}) resultou em desvios padrão relativos entre 2,5 e 3,8 %, garantindo a aplicabilidade da metodologia nos intervalos de concentrações estudados.

3.3.4 Validação dos resultados

Os resultados obtidos por aplicação das metodologias a soros e águas foram ainda confirmados pelo estabelecimento de uma regressão linear entre as duas metodologias (SIA e de comparação e/ou de referência), do tipo SIA (mg l^{-1}) = C_0 + S Comparação/Referência (mg l^{-1}) (Figuras 3.8 e 3.9), e por aplicação do teste *t* de Student (Tabela 3.7) [72].

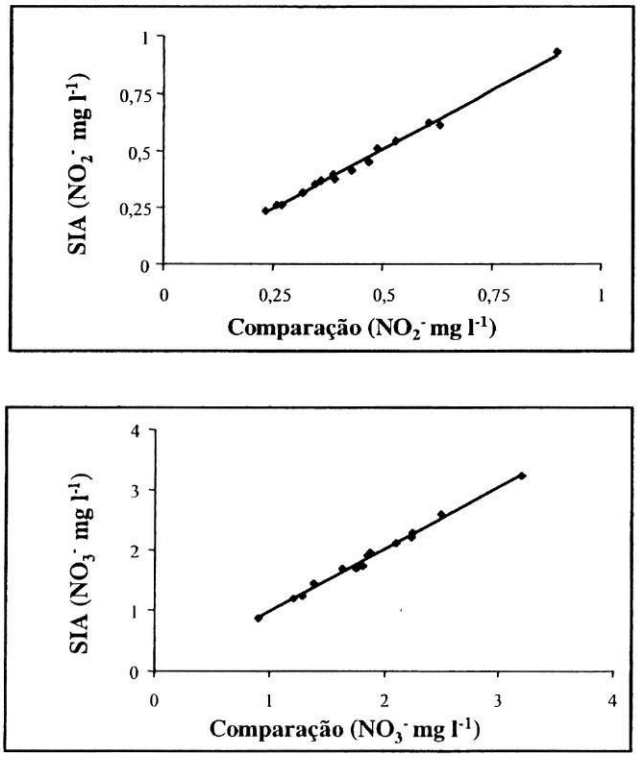
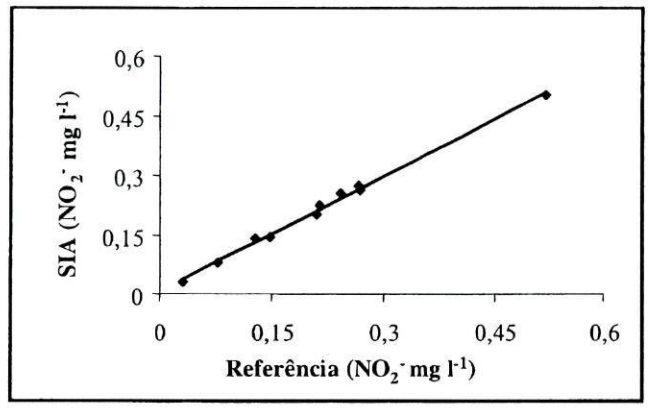


Figura 3.8 Representação gráfica da comparação dos resultados obtidos pelas metodologias SIA e de comparação para a determinação de nitratos e nitritos em soro.



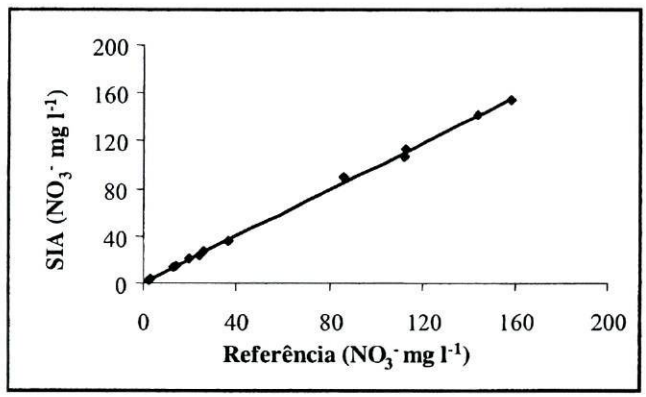


Figura 3.9 Representação gráfica da comparação dos resultados obtidos pelas metodologias SIA e de referência para a determinação de nitratos e nitritos em águas.

Tabela 3.7 Parâmetros da equação de correlação das metodologias SIA e de comparação ou de referência e do teste *t* de Student.

	Determinação	C_0 [a]	S [a]	r [b]	$t_{0,05}$ calculado	$t_{0,05}$ tabelado
Soro	**Nitrito**	-0,013 (± 0,023)	1,0301 (± 0,0496)	0,9931	0,924	2,14
	Nitrato	-0,056 (± 0,111)	1,0373 (± 0,0571)	0,9902	0,211	2,14
Água	**Nitrito**	0,007 (± 0,010)	0,9645 (± 0,0548)	0,9952	0,155	2,26
	Nitrato	0,544 (± 1,601)	0,9800 (± 0,0215)	0,9987	0,869	2,14

[a] os valores entre parênteses correspondem aos limites de confiança para um nível de confiança de 95%

[b] r: coeficiente de correlação

Ambos os testes confirmaram a concordância entre os dois métodos, para um nível de confiança de 95 % (Tabela 3.7). O valor de *t* calculado quando comparado com o valor tabelado confirma a hipótese nula e por outro lado na correlação dos dois métodos, os valores da ordenada na origem e do declive não diferem significativamente de 0 (zero) e 1 (um), respectivamente confirmando a ausência de diferenças estatisticamente significativas.

3.4 Conclusões

A metodologia SIA desenvolvida para a determinação de nitratos e nitritos foi aplicada com sucesso a soros humanos e águas, não se tendo observado diferenças significativas entre os resultados obtidos e os fornecidos pelos métodos de comparação e de referência.

A automatização recorrendo a um sistema SIA confirmou as vantagens da associação de um procedimento enzimático a esta técnica de fluxo, uma vez que quando comparada com as metodologias já existentes para o mesmo fim, a metodologia desenvolvida envolveu um gasto reduzido de NR (0,09 U por determinação), permitiu um controlo rigoroso dos volumes aspirados e das paragens de fluxo o que resultou na rentabilização do tempo de análise e numa produção reduzida de efluentes. Além disto a utilização da enzima NR, para efectuar a redução de nitratos a nitritos, tornou o método muito selectivo e sensível, evitando ao mesmo tempo a exposição do operador e a contaminação ambiental com agentes redutores tóxicos como o cádmio e a hidrazina.

A aplicação da metodologia a soros apresentou também vantagens relativamente ao consumo reduzido de amostra, pois tratando-se de uma amostra biológica existem limitações relacionadas com o seu uso em grandes quantidades.

Relativamente à aplicação do método proposto a águas para consumo humano, a possibilidade de efectuar diluições em linha até 4,4 vezes tornou a metodologia muito versátil, garantindo a sua aplicabilidade em amostras com concentração de nitratos até 250 mg l^{-1}, ou seja num intervalo de concentrações que não foi obtido com nenhum dos sistemas SIA já existentes para determinação desta espécie, por introdução directa das amostras no sistema. O largo intervalo de concentrações determináveis é conseguido introduzindo a amostra directamente no sistema sem qualquer tratamento prévio fora do sistema de fluxo. Muitas vezes este tipo de tratamento acontece numa fase anterior à

introdução da amostra no sistema, o que se traduz geralmente numa diminuição do ritmo de amostragem e num aumento considerável da possibilidade de ocorrerem erros durante a manipulação da amostra.

O sistema desenvolvido para determinação de nitratos e nitritos em soro e água ilustra bem a versatilidade deste tipo de técnica ao permitir a incorporação, numa das portas da válvula selectora, de uma câmara de mistura que garantiu o estabelecimento das condições óptimas para o desenvolvimento da reacção enzimática. O modo de funcionamento peculiar da válvula selectora e a facilidade de inversão do sentido do fluxo facilitaram a gestão das soluções envolvidas nas reacções, tendo permitido implementar uma estratégia de reamostragem a partir da válvula selectora, após as reacções enzimáticas, que se mostrou determinante para a sensibilidade e viabilidade da determinação de nitratos.

As características particulares da montagem permitiram ainda a implementação de uma estratégia de fluxo monosegmentado durante a aspiração das soluções envolvidas na determinação de nitratos.

A metodologia SIA desenvolvida e depois adaptada à análise de soro e água de diferentes origens apresenta assim robustez, segurança e sensibilidade que justificam a sua utilização na análise de rotina de ambas as matrizes, podendo constituir uma alternativa aos métodos já existentes para o mesmo fim.

3.5 Referências bibliográficas

[1] E.H. Hansen, Anal, Chim, Acta 216 (1989) 257.

[2] N. Pizá, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerda, Anal. Chem. 76 (2004) 773.

[3] C.A. Tumang, E.P. Borges, B.F. Reis, Anal. Chim. Acta 438 (2001) 59.

[4] A.N. Araújo, J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva, E.A.G. Zagatto, Am. J. Enol. Vitic. 48 (1997) 428.

[5] R.M. Peña, J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva, Anal. Chim. Acta 514 (2004) 37.

[6] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, I.V.O.S. Pinto, Food Chem. 81 (2003) 141.

[7] M.A. Segundo, A.O.S.S. Rangel, Anal. Chim. Acta 458 (2002) 131.

[8] S. Moncada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs, Pharmacol. Ver. 143 (1991) 109.

[9] J.P. Cooke, P.S. Tsao, Circulation 88 (1993) 2451.

[10] L. Bergmann, K.D. Kröncke, C. Suschek, H. Kolb, V. Kolb-Bachofen, FEBS Letters 299 (1992) 103.

[11] R.G. Knowles, S. Moncada, Biochem. J. 298 (1994) 249.

[12] H. Moshage, B. Kok, J.R. Huizenga, P.L.M. Jansen, Clin. Chem. 41 (1995) 892.

[13] G. Giovannoni, J.M. Land, G. Keir, E.J. Thompson, S.J.R. Heales, Ann. Clin. Biochem. 34 (1997) 193.

[14] R. Zangerle, D. Fuchs, G. Reibnegger, G. Werner-Felmayer, H. Gallati, H. Wachter, E.R. Werner, Immunobiology 193 (1995) 59.

[15] A.W. Johnson, J.M. Land, E.J. Thompson, J.P. Bolanos, J.B. Clark, S.J. Heales, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 58 (1995) 107.

[16] Y. Vodovotz, M.S. Lucia, K.C. Flanders, L. Chesler, Q.W. Xie, T.W. Smith, J. Weidner, R. Mumford, R. Webber, C. Nathan, A.B. Roberts, C.F. Lippa, M.B. Sporn, J. Exp. Med. 184 (1996) 1425.

[17] Q. Hamid, D.R. Springall, V. Riveros-Moreno, P. Chanez, P. Howarth, A. Redington, J. Bousquet, P. Godard, S. Holgate, J.M. Polak, Lancet 342 (1993) 1510.

[18] E.E. Mannick, L.E. Bravo, G. Zarama, J.L. Realpe, X.J. Zhang, B. Ruiz, E.T. Fontham, R. Mera, M.J. Miller, P. Correa, Cancer Res. 56 (1996) 3238.

[19] I. Guevara, J. Iwanejko, A. Dembińska-Kieć, J. Pankiewicz, A. Wanat, P. Anna, I. Golabek, S. Bartuś, M. Malczewska-Malec, A. Szczudlik, Clin. Chim. Acta 274 (1998) 177.

[20] Nitric oxide synthase assay kit, colorimetric, Calbiochem, nº catálogo 482702.

[21] Nitrite/Nitrate colorimetric method, Boehringer, nº catálogo 1746081.

[22] H. Mori, J. Health Scie. 47 (2001) 65.

[23] K. Suvardhan, K. Surech kumar, S. Hari babu, B. Jayaraj, P. Chiranjeevi, Talanta 66 (2005) 505.

[24] C. Grignani, L. Zavattaro, Europ. J. Agron. 12 (2000) 251.

[25] P. Brimblecombe, D.H. Stedman, Nature 298 (1982) 460.

[26] R. Hasegawa, M. Futakuchi, Y. Mizoguchi, T. Yamaguchi, T. Shirai, N. Ito, W. Lijinsky, Cancer Letters 123 (1998) 185.

[27] Council Directive 80/778/EEC, Official Journal of the European Communities, L229, 1980 e revisão 98/83/CE.

[28] European standards for drinking water, World Health Organization, Copenhaga, 2ª edição, 1970.

[29] Drinking water regulations and health advisories, U.S. Environmental Protection Agency: Office of water, Outubro 1996.

[30] Council Directive 91/271/EEC, Official Journal of the European Communities, L135, 1991.

[31] M.J. Moorcroft, J. Davis, R.G. Compton, Talanta 54 (2001) 785.

[32] R.B. Williis, Anal. Chem. 52 (1980) 1376.

[33] C. Oudot, Y. Montel, Marine Chem. 24 (1988) 239.

[34] S. Motomizu, H. Mikasa, K. Toei, Anal. Chim. Acta 193 (1987) 343.

[35] T. Taniai, A. Sakuragaea ,T. Okutani, Anal. Scien. 16 (2000) 275.

[36] T. Pérez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomás, Anal. Chim. Acta 265 (1992) 103.

[37] F. Nydahl, Talanta 23 (1976) 349.

[38] M.A. Koupparis, K.M. Walczak, H.V. Malmstadt, Anal. Chim. Acta 142 (1989) 119.

[39] M.J. Ahmed, C.D. Stalikas, S.M. Tzouwara-Karayanni, M.I. Karayannis, Talanta 43 (1996) 1009.

[40] M.F. Giné, H. Bergamin F., E.A.G. Zagatto, B.F. Reis, Anal. Chim. Acta 114 (1980) 191.

[41] R.S. Guerrero, C.G. BBenito, J.M. Calatayud, Talanta 43 (1996) 239.

[42] J.R. Clinch, P.J. Worsfold, R. Casey, Anal. Chim. Acta 200 (1987) 523.

[43] H. Casey, R.T. Clarke, S.M. Smith, J.R. Clinch, P.J. Worsfold, Anal. Chim. Acta 227 (1989) 379.

[44] J.F. van Staden, Anal. Chim Acta 138 (1982) 403.

[45] D. Gabriel, J. Baeza, F. Valero, J. LaFuente, Anal. Chim. Acta 359 (1998) 173.

[46] A. Cerdà , M.T. Ohms, R. Corteza, V. Cerdà, Anal. Chim. Acta 371 (1998) 63.

[47] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, I.V.O.S. Pinto, Anal. Sci. 16 (2000) 1157.

[48] E.B. Naidoo, J.F. van Staden, Water SA 27 (2001) 355.

[49] C.X. Galhardo, J.C. Masini, Anal. Chim. Acta 438 (2001) 39.

[50] Chao-Hsiang Wu, J. Ruzicka, Analyst 126 (2001) 1947.

[51] Z. Legnerová, P. Solich, H. Sklenárová, D. Satínský, Water Res. 36 (2002) 2777.

[52] F.R.P. Rocha, P.B. Martelli, B.F. Reis, Anal. Chim. Acta 438 (2001) 11.

[53] M.T. Oms, A. Cerdà, V. Cerdà, Anal. Chim. Acta 315 (1995) 321.

[54] B.C. Madsen, Anal. Chim. Acta 124 (1981) 437.

[55] K. Takeda, K. Fuijwara, Anal. Chim. Acta 276 (1993) 25.

[56] P. Mikuska, Z. Vecera, Anal. Chim. Acta 474 (2002) 99.

[57] D.R. Senn, P.W. Carr, L.N. Klatt, Anal. Chem. 48 (1976) 954.

[58] H. Mori, J. Health Scie. 46 (2000) 385.

[59] T. Aoki, S. Uemura, M. Munemori, Environm. Sci. Technol. 20 (1986) 515.

[60] L. Cardoso de Faria, C. Pasquini, Anal. Chim. Acta 245 (1991) 183.

[61] A.G. Fogg, S.P. Scullion, T.E. Edmonds, Analyst 115 (1990) 599.

[62] P. Griess, Ber. Deutsch. Chem. Ges. 12 (1879) 426.

[63] Standard Methods for the examination of Waters and Wastewaters, American Public Health Association, Washington DC, 20ª edição, 1998.

[64] J.F. van Staden, R.E. Taljaard, Fresenius J. Anal. Chem 357 (1997) 577.

[65] A. Baron, M. Guzman, J. Ruzicka, G.D. Christian, Analyst 117 (1992) 1839.

[66] G.D. Christian, Analyst 119 (1994) 2309.

[67] P.C.C. Oliveira, J.C. Masini, Analyst 123 (1998) 2085.

[68] S. Maskula, J. Nyman, A. Ivaska, Talanta 52 (2000) 91.

[69] M.S.P. Silva, I.S. Silva, G. Abate, J.C. Masini, Talanta 53 (2001) 843.

[70] C.P. Verdon, B.A. Burton, R.L. Prior, Anal. Biochem. 224 (1995) 502.

[71] C. Pasquini, W.A. Oliveira, Anal. Chem. 57 (1985) 2575.

[72] J.N. Miller, Analyst 116 (1991) 3.

CAPÍTULO 4

Determinação de ácido aminocapróico e ensaios de dissolução de formulações farmacêuticas sólidas

4. Determinação de ácido aminocapróico e ensaios de dissolução de formulações farmacêuticas sólidas

4.1 Introdução

Nos últimos anos muitos esforços têm sido feitos no sentido de desenvolver métodos analíticos, que permitam um controlo laboratorial rigoroso e adaptado às exigências da indústria farmacêutica dos nossos dias. Uma das maiores limitações encontrada na caracterização deste tipo de amostras prende-se, sobretudo, com a necessidade de desenhar um perfil de dissolução dos fármacos, processo no qual se enfrentam grandes variações de concentração da espécie a analisar, sendo portanto necessário dispor de processos de medida capazes de abarcar um intervalo de resposta linear largo ou que permitam o ajuste das concentrações por diluição.

Nesta perspectiva, os métodos analíticos existentes para a determinação de ácido aminocapróico (ácido 6-aminohexanóico), em formulações farmacêuticas, além de serem escassos, não se adequam às necessidades actuais. O ácido aminocapróico é um agente antifibrinolítico, usado no tratamento e profilaxia de hemorragias associadas a uma fibrinólise excessiva, inibindo a activação do plasminogénio [1], geralmente determinado segundo métodos de referência preconizados pelas farmacopeias [2, 3] que envolvem titulações ácido-base em meio não aquoso, com detecção visual do ponto final, estando portanto o resultado da análise dependente da intervenção e interpretação do operador. Para além destes, existem disponíveis na literatura apenas três métodos

cromatográficos demorados e dispendiosos [4-6] e um método potenciométrico [7] para a determinação de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas.

O objectivo principal do trabalho apresentado neste capítulo consistiu em automatizar a determinação de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas e o estudo do perfil de dissolução de comprimidos contendo o mesmo princípio activo, tendo-se recorrido para tal a um sistema de análise por injecção sequencial (SIA). Este tipo de sistema, graças ao seu funcionamento particular, baseado na válvula selectora, e às vantagens já expostas no Capítulo 1, apresenta elevado potencial para implementação na análise farmacêutica de rotina, garantindo o desenvolvimento de uma metodologia económica, rápida e com intervenção mínima do operador.

Embora o ácido aminocapróico seja originalmente um composto não fluorescente, a presença de um grupo amina na sua estrutura torna possível a sua derivatização com *o*-ftalaldeído (OPA) e, consequentemente, o desenvolvimento de um procedimento analítico fluorimétrico simples e rápido, para a sua determinação. A detecção fluorimétrica de produtos de reacção de derivatização de grupos amina através do OPA [8-10], na presença de um dador de grupo tiol, tem provado ser uma opção expedita para a determinação de várias espécies, tirando partido da sensibilidade e selectividade das medições fluorimétricas e estendendo a aplicabilidade destas a compostos sem fluorescência nativa própria. Os compostos dadores de grupo tiol mais utilizados são o mercaptoetanol (ME) [8] e a N-acetilcisteína (NAC) [9, 10] tendo mais recentemente surgido o tiofluor (TF) como uma eventual alternativa [11].

Assim, o procedimento analítico, automatizado numa montagem SIA, baseou-se na reacção de derivatização, entretanto optimizada, da amina primária do ácido aminocapróico (Figura 4.1) com OPA e NAC, formando-se um derivado isoindole, que é medido fluorimetricamente (λ_{ex} = 350 nm; λ_{em} = 450 nm).

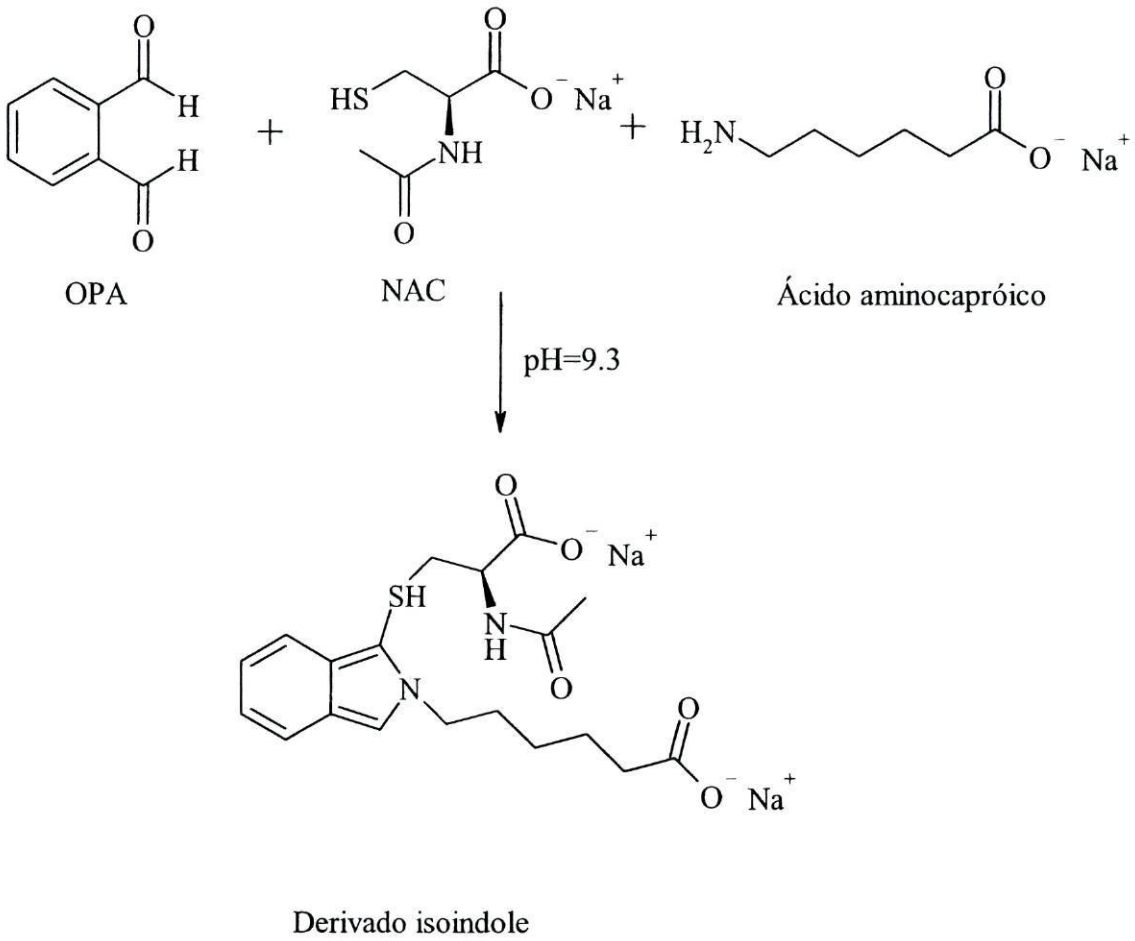


Figura 4.1 Reacção de derivatização envolvida na determinação de ácido aminocapróico.

Neste trabalho foi utilizada uma válvula solenóide, acoplada ao sistema SIA, com o objectivo de testar um esquema de mistura dos reagentes em linha, seguindo uma estratégia baseada na amostragem binária [12]. O recurso a este tipo de estratégia, tal como já foi referido Capítulo 1, tem-se revelado de grande interesse no que respeita à mistura de soluções em linha, em sistemas de fluxo, obviando neste caso o problema da mistura de soluções aspiradas sequencialmente em sistemas SIA.

A metodologia analítica desenvolvida, para além de permitir a determinação de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas, pretendia ainda dar resposta a uma das necessidades actuais do controlo de qualidade na indústria farmacêutica: o estudo do perfil de dissolução de fármacos em formulações orais sólidas. Trata-se de uma das etapas do controlo de qualidade de formulações farmacêuticas que requer mais dispêndio de tempo, permitindo prever a biodisponibilidade das substâncias e também avaliar a estabilidade e a forma de libertação das formulações que as incorporam [13, 14]. O desenvolvimento e o uso crescente de formulações de libertação prolongada tornaram urgente o desenvolvimento de ensaios de dissolução, que envolvam consumo reduzido de reagentes e abarquem um largo intervalo de resposta linear, efectuando o acompanhamento da variação da concentração de principio activo em tempo real. A automatização deste tipo de ensaio foi pela primeira vez proposta por Kouparis *et al* num sistema de análise por injecção em fluxo (FIA), que se baseava na recirculação contínua do meio de dissolução através da alça de amostragem da válvula de injecção, o que colocava limitações à determinação da variação de princípio activo em tempo real [15]. Mais recentemente, têm sido propostos outros sistemas de fluxo, envolvendo ensaios de dissolução em linha de vários fármacos [16-19]. Estes incluem um sistema multicomutado para determinação de isoniazida [16] e alguns sistemas de análise por injecção sequencial, em que os aparelhos de dissolução se encontravam acoplados à válvula selectora [17-19]. Os sistemas SIA apresentam características ideais para a implementação deste tipo de ensaio, sobretudo devido à versatilidade da válvula selectora, que facilita a associação do aparelho de dissolução à montagem, sem alteração do seu funcionamento peculiar, baseado em inversões do sentido do fluxo. Por outro lado, este tipo de sistema exibe a vantagem de requerer baixos volumes para análise e de estes serem definidos numa base de tempo, factos que permitem manter o

volume do meio de dissolução sem alteração significativa, não havendo assim necessidade de fazer recircular a amostra como acontece com outros procedimentos.

Tal como já foi referido no Capítulo 3 (Resultados e Discussão, Optimização dos parâmetros físico-químicos) desta dissertação, várias estratégias de diluição em linha têm vindo a ser utilizadas em sistemas SIA. No trabalho desenvolvido, a estratégia de diluição foi implementada por adaptação do conceito de amostragem de zonas [20] ao funcionamento de um sistema SIA. Esta estratégia baseava-se originalmente na utilização de um injector-comutador, tendo sido mais tarde implementada num sistema automatizado que incorporava válvulas rotativas. A solução injectada por uma das válvulas era direccionada para uma segunda válvula, sendo que o grau de diluição da amostra era definido automaticamente através de uma linha de retorno [21]. O conceito de amostragem de zonas tem vindo a ser explorado essencialmente em sistemas multicomutados envolvendo válvulas solenóides [22, 23].

Deste modo, por implementação da estratégia de diluição em linha, amostras com diferentes níveis de concentração do analito podiam ser sujeitas a diferentes graus de diluição no sistema analítico, sem necessidade de reconfiguração física, viabilizando-se desta forma a realização dos ensaios de dissolução, uma vez que era possível efectuar determinações num intervalo alargado de concentrações do analito, por ajuste das concentrações elevadas por diluição.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Reagentes e soluções

Foi usada, como solução de transporte no sistema de fluxo e como solvente para preparação dos outros reagentes, uma solução desoxigenada de "tampão borato" ($HB_4O_7^-/B_4O_7^{2-}$) pH 9,3, com 4 % metanol.

Semanalmente preparava-se uma solução padrão de ácido aminocapróico (Sigma; mínimo 99 %) $5{,}0 \times 10^{-3}$ mol l^{-1}, em água desionizada. As soluções de calibração eram preparadas, diariamente, por diluição rigorosa da solução mais concentrada.

Soluções de *o*-ftalaldeído (OPA) 10 mmol l^{-1} e N-acetilcisteína (NAC) 0,8 mmol l^{-1} eram preparadas diariamente no "tampão borato" cuja preparação já foi referida anteriormente. Os reagentes eram mantidos protegidos da luz e em gelo durante a sua utilização, de modo a garantir a sua conservação ao longo do tempo. As soluções de tiofluor (TF) e mercaptoetanol (ME), usadas na avaliação do efeito do composto dador do grupo tiol, eram preparadas da mesma forma que a solução de NAC.

4.2.2 Aparelhagem

O sistema SIA (Figura 4.2) apresentava um reactor (TR) de 1 m de comprimento com uma configuração em figuras de oito. O tubo de armazenamento (TA) com um comprimento de 4 m garantia que não havia contaminação da solução de transporte pelas soluções aspiradas a partir da válvula selectora.

A válvula solenóide (Figura 4.2, vs_2) usada para a mistura dos reagentes, e já descrita no Capítulo 2, encontrava-se ligada à porta 8 da válvula selectora por 3 cm de tubo de PTFE, igual ao usado na conexão dos diferentes elementos do sistema.

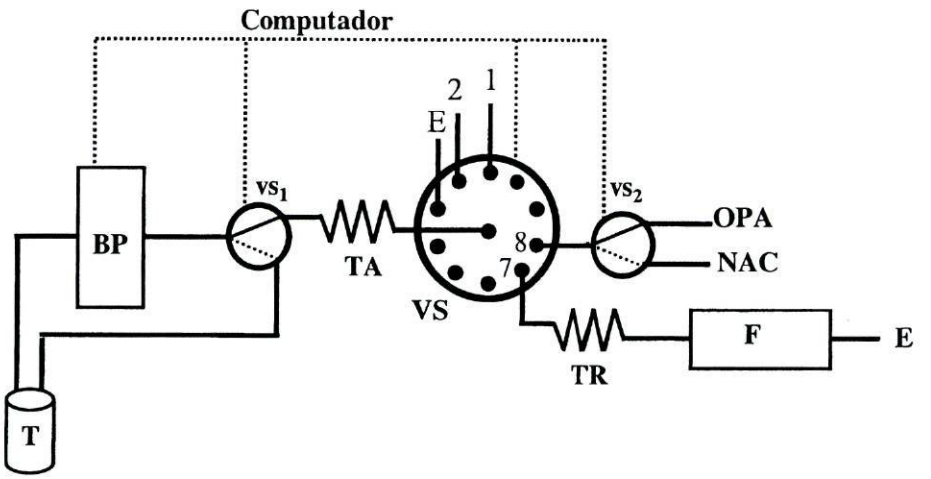


Figura 4.2 Esquema da montagem SIA usada na determinação de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas e nos ensaios de dissolução de comprimidos. T: solução transportadora; BP: bomba peristáltica; VS: válvula selectora; VS_1, VS_2: válvula solenóide; TA: tubo de armazenamento; TR: tubo reactor; F: fluorimetro; E: esgoto.

Um aparelho com pá agitadora (100 rpm) da marca Erweka DT (Figura 4.3), para ensaios de dissolução de comprimidos [24], foi acoplado ao sistema de fluxo usado na determinação de ácido aminocapróico. O aparelho era constituído por um vaso cilíndrico de fundo hemisférico de vidro, com capacidade de 1000 ml, e encontrava-se munido de pá agitadora sustentada por uma haste vertical.

A ligação do aparelho ao sistema era efectuada através de uma das portas laterais (Figura 4.2, 2) da válvula selectora, por tubo de PTFE de 0,8 mm de diâmetro (20 cm) interno, através do qual eram aspiradas as alíquotas para a análise.

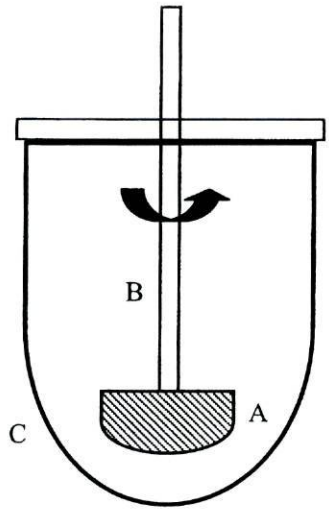


Figura 4.3 Representação esquemática do aparelho de pá agitadora. A: pá agitadora; B: haste vertical de aço inoxidável; C: vaso de dissolução (1000 ml).

Devido à possibilidade de existirem, durante os ensaios de dissolução, partículas não dissolvidas no meio de dissolução, o tubo de conexão incorporava uma unidade de filtração Schleicher & Schuell (1,3 cm de diâmetro) de aço inoxidável, na qual era colocado um filtro de papel Whatman nº 1, com 1 cm de diâmetro.

Os restantes componentes da montagem nomeadamente bomba peristáltica, válvula selectora, fluorimetro e registador, foram já referidos pormenorizadamente no Capítulo 2. As determinações fluorimétricas foram efectuadas a comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 450 nm, respectivamente.

4.2.3 Procedimento experimental

Antes do início de cada utilização da montagem, toda a tubagem do sistema e a célula de fluxo eram preenchidas com solução transportadora ("tampão borato", pH 9,3) e os tubos da válvula selectora eram preenchidos com as soluções respectivas.

Como já foi referido, o ácido aminocapróico foi determinado fluorimetricamente (λ_{ex}=350 nm; λ_{em}=450 nm), no sistema SIA, após reacção com uma mistura de OPA e NAC. O ciclo analítico completo perfazia 75 segundos e era composto por 8 etapas (Tabela 4.1). Os reagentes (OPA e NAC) eram aspirados alternadamente para o tubo de armazenamento, por mudanças sequenciais de posição (aberta/fechada) da válvula solenóide, colocada na porta 8 da válvula selectora de fluidos (Figura 4.2). A aspiração das soluções de OPA e NAC era efectuada por períodos de 1 segundo, a um caudal 0,5 ml min^{-1}, até se completarem 50 µl (6 x 1 segundo), o que corresponde à aspiração sequencial de fragmentos de cerca de 8 µl, segundo uma estratégia de amostragem binária [12], o que permitia a entrada dos reagentes na válvula selectora praticamente misturados. Em seguida eram aspirados, para o tubo de armazenamento, 25 µl de amostra a um caudal 0,5 ml min^{-1} (3 segundos). O composto fluorescente formado era encaminhado para o detector fluorimétrico a um caudal de 1,5 ml min^{-1}, registando-se, ao fim de 40 segundos, um pico com altura proporcional à concentração de ácido aminocapróico.

Sempre que se efectuava a mudança de amostras, procedia-se à aspiração de 200 µl da nova amostra através do tubo de amostragem. A porção de amostra que atingia o tubo de armazenamento era imediatamente encaminhada para o esgoto, evitando-se assim a contaminação entre amostras.

Tabela 4.1 Ciclo analítico para a determinação de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas.

Etapa	Válvula selectora	Válvula solenóide	Volume (µl)	Tempo (s)	Sentido do fluxo	Caudal (ml min^{-1})	Descrição da etapa
1	8	Aberta	8	1	Aspiração	0,5	Aspiração de OPA
2	8	Fechada	8	1	Aspiração	0,5	Aspiração de NAC
3	8	Aberta	8	1	Aspiração	0,5	Aspiração de OPA
4	8	Fechada	8	1	Aspiração	0,5	Aspiração de NAC
5	8	Aberta	8	1	Aspiração	0,5	Aspiração de OPA
6	8	Fechada	8	1	Aspiração	0,5	Aspiração de NAC
7	1	Fechada	25	3	Aspiração	0,5	Aspiração de amostra
8	7	Fechada	----	60	Propulsão	1,5	Propulsão para detector

Quando se monitorava o perfil de dissolução dos comprimidos de ácido aminocapróico, recorria-se a um procedimento de diluição em linha baseado na amostragem de zonas [20]. Nesta situação, o ciclo analítico apresentava mais uma etapa após a aspiração da mistura de reagentes e amostra, em que se efectuava a rejeição, para uma porta de esgoto, de uma parte da zona dispersa, durante 16 segundos a um caudal de 0,5 ml min^{-1}, perfazendo o ciclo 93 segundos.

4.2.4 Metodologia de referência das formulações farmacêuticas

As formulações farmacêuticas foram também analisadas pelo método de referência, para comprimidos, preconizado pela Farmacopeia Americana USP 24 [2], uma titulação ácido-base em meio anidro, com detecção visual do ponto final, que usa como titulante ácido perclórico 0,1 mol l^{-1} (em ácido acético glacial) e como indicador o cristal violeta.

Vinte comprimidos ou dez saquetas eram pesados e pulverizados em almofariz de porcelana. A uma quantidade de amostra correspondente a 500 mg de ácido aminocapróico adicionava-se 100 ml de ácido acético, sendo a solução resultante titulada como já foi descrito.

As soluções de amostra para análise no sistema de fluxo desenvolvido eram preparadas por dissolução, da quantidade adequada da formulação pulverizada, em água. A formulação injectável era preparada por diluição do volume adequado em água.

4.2.5 Ensaios de dissolução de comprimidos contendo ácido aminocapróico

O acompanhamento analítico dos ensaios de dissolução de comprimidos de ácido aminocapróico, no sistema de fluxo, decorreu tendo em conta as indicações da Farmacopeia Americana USP 24 [24], usando um aparelho de pá rotativa, ao qual se acoplou o sistema SIA, ambos já descritos neste capítulo em Materiais e Métodos (Aparelhagem).

Para a realização dos ensaios de dissolução, não foram introduzidas alterações na configuração da montagem de fluxo utilizada na determinação de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas e mantiveram-se as condições reaccionais, nomeadamente a concentração e volume dos reagentes.

O líquido de dissolução usado foi a água termostatada a 37,0 ± 0,5 °C, tal como recomendado na USP 24 para ensaios de dissolução de comprimidos de ácido aminocapróico [24]. O ensaio iniciava-se logo após a introdução do comprimido no vaso de dissolução e as alíquotas de amostra eram depois aspiradas por um tubo, que fazia a ligação entre a montagem SIA e o aparelho de dissolução, através de um filtro, a intervalos controlados de tempo e sujeitas ao procedimento analítico desenvolvido para

a determinação de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas (Tabela 4.1). Cada medição fornecia informação acerca da concentração de ácido aminocapróico no interior do vaso de dissolução, no momento da aspiração da alíquota.

Durante os ensaios, verificou-se que as concentrações de ácido aminocapróico atingidas no vaso de dissolução eram muito superiores às compreendidas no intervalo de concentrações determináveis nas condições estabelecidas, surgindo a necessidade de implementar, no sistema SIA, o já referido procedimento de diluição baseado na amostragem de zonas.

Não se observaram perturbações das condições hidrodinâmicas no interior do vaso de dissolução, devido ao interfaciamento dos dois dispositivos ou alteração da concentração de ácido aminocapróico, devido aos volumes retirados para análise. De facto, o volume de amostra retirado para cada análise era de cerca de 50 μl; 25 μl para garantir o preenchimento efectivo da tubagem com a amostra a analisar e outros 25 μl para a análise em si. É ainda importante referir que o volume retido pelo sistema de filtragem não afectava significativamente as determinações.

Os resultados dos ensaios de dissolução foram comparados com os obtidos no ensaio de dissolução de referência, que se encontra descrito na USP 24, um método espectrofotométrico que envolve uma única determinação de princípio activo ao fim de 45 minutos de ensaio de dissolução, por comparação com uma solução padrão [24].

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos

A metodologia desenvolvida para a determinação de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas baseia-se, como já foi referido, na reacção de derivatização da amina primária presente no composto na presença de OPA e de um dador de grupo tiol. A selecção do composto dador de grupo tiol baseou-se em dados da literatura, tendo-se testado três compostos designadamente NAC, ME e TF [8-11]. Assim, avaliaram-se os sinais analíticos, obtidos por análise no sistema de fluxo, de padrões de concentração crescente de ácido aminocapróico com uma mistura de reagentes, que apresentava uma concentração constante de OPA de 2 mmol l^{-1}, e de grupo dador de tiol de 0,4 mmol l^{-1} [8] (Figura 4.4).

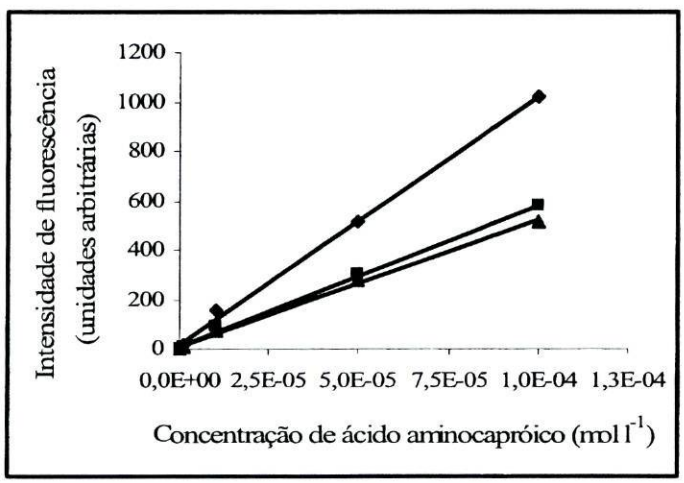


Figura 4.4 Influência do composto dador de grupo tiol nos sinais analíticos. ♦NAC: N-acetilcisteína 0,4 mol l^{-1}; ■ ME: mercaptoetanol 0,4 mol l^{-1}; ▲ TF: tiofluor 0,4 mol l^{-1}.

Os resultados mais satisfatórios, em termos de extensão de formação de derivado fluorescente e portanto de sensibilidade, foram obtidos com NAC, tendo-se observado uma diminuição da intensidade dos sinais analíticos relacionada com a utilização dos outros dois compostos, nas condições dos ensaios.

A concentração de NAC foi optimizada, no sistema SIA, no intervalo de 0,25 – 20 mmol l^{-1}, mantendo constante a concentração de OPA em 2 mmol l^{-1} [8]. Por seu lado, na optimização da concentração de OPA, entre 1 e 6 mmol l^{-1}, utilizou-se uma solução de NAC 0,4 mmol l^{-1}. Os melhores resultados, em termos de intensidade de fluorescência, foram obtidos com uma mistura de NAC 0,4 mmol l^{-1} e OPA 5 mmol l^{-1}. O aumento da razão NAC/OPA afectava a cinética da reacção, tornando-a mais lenta e diminuindo consequentemente os sinais analíticos, até deixarem de ser detectados para uma concentração de NAC de 20 mmol l^{-1}.

Numa fase inicial da optimização verificou-se que, ao longo de um dia de trabalho, se obtinham, nas mesmas condições, sinais analíticos com intensidades de fluorescência variáveis, observando-se uma diminuição da intensidade dos mesmos com o decorrer do tempo. Presumiu-se que tal facto se deveria a uma eventual instabilidade da mistura de reagentes (OPA e NAC). Procedeu-se então a uma série de alterações, que visavam eliminar eventuais interferências de factores externos como oxigénio, luz e temperatura, sobre os reagentes. Passou-se assim a desoxigenar a solução "tampão borato", em que a mistura de reagentes era preparada, com azoto e a manter a solução de reagentes protegida da luz e acondicionada em gelo. No entanto, e apesar das alterações, os sinais analíticos obtidos com a mistura de reagentes imediatamente após a sua preparação eram superiores aos que se obtinham posteriormente, parecendo indicar que a mistura dos dois reagentes era instável e que deveria ser preparada imediatamente antes das determinações. Perante estas observações, optou-se por preparar as soluções

separadamente e misturá-las, no interior da montagem, imediatamente antes de aspirar a amostra. No entanto, havia que garantir que a mistura dos reagentes fosse efectiva antes da aspiração da amostra, de modo a que não ocorressem problemas de homogeneização das duas zonas durante o percurso para o detector, facto que acarretaria irreprodutibilidade do sinal analítico.

Foi então testada a preparação da mistura de reagentes em linha, no sistema SIA, baseada na estratégia de amostragem binária [12], processo pelo qual se obtém, por intercalação de pequenos volumes de duas soluções, uma homogeneização mais rápida, eficiente e com menor dispersão das zonas aspiradas. Esta estratégia foi inicialmente proposta por Reis *et al* para a introdução de amostra e reagente num sistema multicomutado desenvolvido para a determinação de ferro em digestos de plantas e tem vindo a ser utilizada em inúmeros trabalhos como estratégia de introdução e mistura de soluções em sistemas baseados em válvulas solenóides [25].

No trabalho aqui apresentado, foi introduzida no sistema SIA uma válvula solenóide, que permitia a aspiração alternada de OPA e NAC. A válvula foi ligada a uma das portas da válvula selectora de fluidos (Figura 4.2, vs_2) e o seu funcionamento alternado, entre as duas posições correspondentes ao OPA e à NAC (aberta/fechada), garantia a aspiração reprodutível de pequenos volumes de ambas as soluções. Esta estratégia conduzia à dispersão e mistura mútua das soluções, durante a fase de aspiração para o tubo de armazenamento, originando uma zona de reagente praticamente homogeneizada. Seguindo este esquema de inserção de reagentes foi possível contornar o problema de estabilidade da mistura de reagentes e obter sinais analíticos com intensidade de fluorescência constante ao longo do dia de trabalho.

A aspiração alternada de OPA e NAC por períodos de 1 segundo, a um caudal de 0,5 ml min^{-1}, até se completarem 50 µl (aproximadamente 6 vezes 8 µl) foi a situação, dentro

das estudadas, que originou os melhores sinais analíticos em termos de intensidade de fluorescência. Esta situação corresponde à aspiração de um total de 25 μl de cada um dos reagentes, em 3 ciclos de intercalação. Não se observou um aumento da intensidade dos sinais analíticos com 4 (64 μl) e 5 (80 μl) ciclos de intercalação de reagentes, possivelmente devido ao aumento da dispersão que acompanha o aumento de volume de reagentes. Por outro lado, volumes de mistura de reagentes entre 16 e 32 μl, correspondendo a 1 ou 2 ciclos de intercalação, originavam sinais analíticos mais baixos, possivelmente devido à escassez de reagentes para a derivatização. Os estudos prosseguiram usando 50 μl de mistura de OPA e NAC, aspirados alternadamente.

O efeito do volume de amostra nos sinais analíticos foi estudado fazendo variar o seu valor entre 12,5 e 50 μl, tendo-se observado que volumes inferiores a 25 μl conduziam a uma diminuição da intensidade de fluorescência, enquanto que volumes superiores originavam a saturação do detector, com padrões acima de $1{,}0\text{x}10^{-5}$ mol l^{-1}. Pelas razões expostas, os restantes estudos e a determinação com soluções das formulações farmacêuticas foram realizados utilizando 25 μl de amostra.

Tal como se referiu no Capítulo 1, a sequência de aspiração das diferentes soluções nos sistemas SIA influência o grau de dispersão das zonas aspiradas e, ao mesmo tempo, a forma como estas se interdispersam umas nas outras [26]. O melhor resultado, em termos de mistura e de amplitude de sinal, era obtido quando se aspirava primeiro a mistura dos reagentes e em seguida a amostra, justificável pelo menor grau de dispersão sofrido pela zona de amostra e pelo maior grau de penetração da zona de reagente na amostra.

O caudal a que se efectuam as aspirações e propulsões e o comprimento do tubo reactor que liga a válvula ao detector determinam o tempo de residência das zonas aspiradas num sistema SIA, afectando em última análise a dispersão sofrida pelas mesmas. O

caudal de aspiração, da amostra e dos reagentes (NAC e OPA), optimizado entre 0,3 e 1,5 ml min^{-1}, foi fixado em 0,5 ml min^{-1}. Para caudais superiores, o tempo necessário para aspirar o mesmo volume era menor, mas observava-se uma diminuição da reprodutibilidade (RSD> 2 %) nos sinais obtidos, devido à ocorrência de erros durante a aspiração das soluções. O estudo de optimização do caudal de propulsão e do comprimento do reactor pretendia estabelecer um tempo de residência, da mistura reaccional no sistema, que permitisse uma eficiente mistura entre a amostra e o reagente, mas em que a dispersão sofrida pelo produto formado fosse a menor possível, uma vez que se trata de um reacção relativamente rápida. Assim, foram testados caudais entre 1 e 3 ml min^{-1}, e reactores inferiores a 1 m. Caudais superiores a 1,5 ml min^{-1} tornavam o tempo de residência demasiado curto, originando sinais analíticos de baixa intensidade e comprometendo a sensibilidade. Verificou-se também que reactores superiores a 0,5 m conduziam a um aumento da dispersão e consequente diminuição dos sinais analíticos. Dos vários formatos testados (lisos, enrolados e figuras de oito), seleccionou-se o reactor em figuras de oito, pois garantia sinais de maior amplitude.

Nas condições experimentais optimizadas obteve-se uma recta de calibração linear no intervalo de concentrações entre $1{,}0\times10^{-7}$ e $6{,}0\times10^{-5}$ mol l^{-1}, com a equação: $IF = 1\times10^{7}$ ($\pm4\times10^{5}$) C + 6,2 (±13,3), com $R^2 = 0{,}9995$, em que IF se refere ao valor de intensidade de fluorescência e C à concentração de ácido aminocapróico expressa em mol l^{-1}.

A Figura 4.5 representa o registo gráfico obtido na elaboração da referida curva de calibração e na análise das amostras de formulações farmacêuticas contendo ácido aminocapróico.

O limite de detecção da determinação, calculado após o processamento repetido do sinal de branco, era $2{,}5\times10^{-7}$ mol l^{-1} e a metodologia permitia efectuar cerca de 40 determinações por hora.

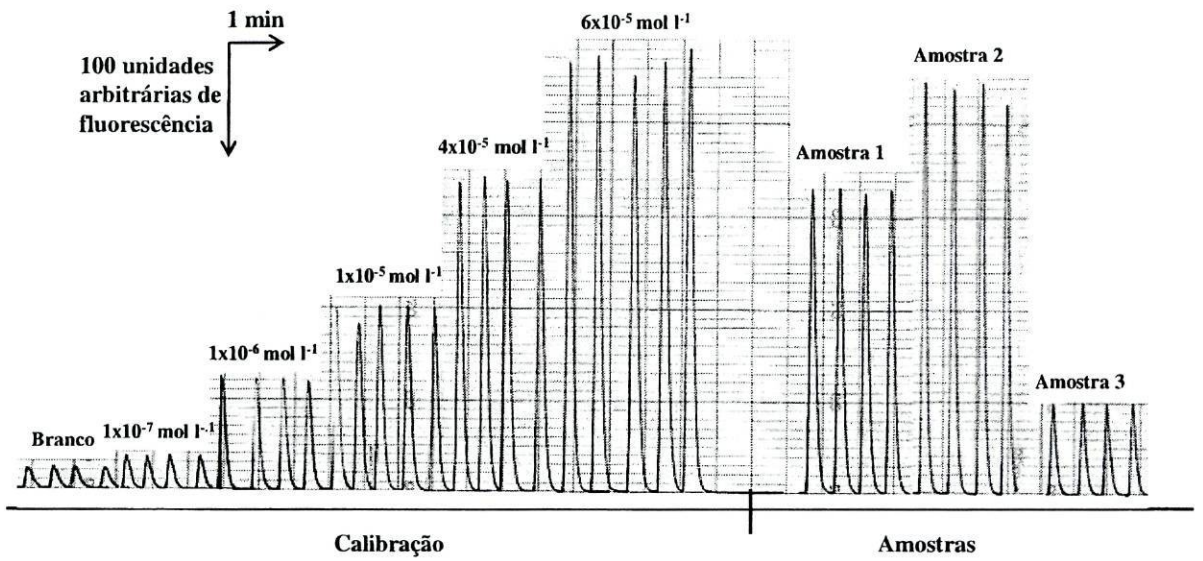


Figura 4.5 Registo gráfico obtido na elaboração da curva de calibração e na análise das amostras de formulações farmacêuticas. Amostra 1: comprimidos; amostra 2: pó; amostra 3: injectável.

4.3.2 Estudo de interferências

Uma vez que a metodologia SIA desenvolvida seria posteriormente aplicada à análise de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas e ao acompanhamento dos ensaios de dissolução de comprimidos, foi realizado um estudo das interferências de diversos compostos, usualmente utilizados como excipientes em formulações sólidas contendo ácido aminocapróico como glucose, lactose, sacarose, frutose e amido.

O estudo foi realizado testando soluções de amostra de concentração fixa de ácido aminocapróico de $1{,}0 \times 10^{-6}$ mol l^{-1}, às quais foram adicionadas concentrações crescentes da espécie eventualmente interferente. As concentrações de espécies interferente foram

definidas em razões molares, em relação ao ácido aminocapróico, de 1, 5, 10, 50 e 100 vezes. As amostras assim preparadas eram analisadas pela metodologia desenvolvida e os sinais analíticos obtidos eram comparados com os obtidos por análise de uma amostra de igual concentração de ácido aminocapróico, na ausência do interferente. Uma espécie era considerada não interferente se a variação do sinal analítico, por comparação com o obtido na sua ausência, fosse inferior a 3 %.

Os resultados obtidos demonstraram que, neste caso, os excipientes testados, em concentrações 100 vezes superiores à do princípio activo, não tiveram qualquer efeito sobre a intensidade dos sinais registados, não apresentando portanto efeito interferente.

4.3.3 Análise das formulações farmacêuticas

O método analítico desenvolvido foi aplicado à determinação de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas sólidas disponíveis no mercado português e brasileiro. As soluções de amostras de diferentes concentrações foram preparadas, a partir das formulações em estudo, como referido na secção Metodologia de referência das formulações farmacêuticas, e posteriormente analisadas no sistema de fluxo optimizado. Para testar os resultados obtidos e a eficiência do procedimento de diluição desenvolvido para o estudo do perfil de dissolução dos comprimidos de ácido aminocapróico, foram analisadas amostras menos concentradas, preparadas por diluição fora do sistema, e os resultados foram comparados com os obtidos por aplicação do procedimento de diluição em linha.

Por análise repetida (n = 15) de amostras de concentrações significativamente diferentes com ($3{,}9 \times 10^{-2}$ e $7{,}4 \times 10^{-3}$ mol l^{-1}) e sem ($2{,}0 \times 10^{-7}$ e $4{,}2 \times 10^{-5}$ mol l^{-1}) procedimento de

diluição não se registaram desvios padrão relativos superiores a 2 %, o que garantia a reprodutibilidade do método em toda a gama de concentrações analisadas.

De forma a avaliar a exactidão do sistema proposto, os resultados obtidos pela metodologia SIA foram comparados com os obtidos pelo método de referência preconizado pela Farmacopeia Americana USP 24 [2], não se tendo verificado desvios relativos superiores a 1,7 % (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 Resultados da análise de formulações farmacêuticas contendo ácido aminocapróico pelas metodologias SIA e de referência (USP 24).

Amostras	SIA* (mg/unidade)	Metodologia de referência* (mg/unidade)	Desvio Relativo (%)
Epsicaprom, 3 g			
-com diluição	3,066 ± 0,002	3,024 ± 0,006	+1,4
-sem diluição	3,072 ± 0,003		+1,6
Epsicaprom, 2.5 g			
-com diluição	2,480 ± 0,007	2,505 ± 0,009	-1,0
-sem diluição	2,501 ± 0,005		-0,1
Ípsilon, 0.5 g			
-com diluição	0,490 ± 0,005	0,497 ± 0,002	-1,4
-sem diluição	0,496 ± 0,005		-0,2

* ± desvio padrão de 4 determinações

Adicionalmente, a realização do teste *t* de Student para um nível de confiança de 95 % (n=6), ilustrou a ausência de diferenças estatísticas para os resultados obtidos ($t_{calculado}$= 0,739, $t_{tabelado}$= 2,570) pelos métodos SIA e de referência.

4.3.4 Optimização dos ensaios de dissolução de comprimidos no sistema de fluxo

A metodologia desenvolvida foi também aplicada em ensaios de dissolução de comprimidos contendo ácido aminocapróico, avaliando a aplicabilidade da metodologia no controlo de qualidade de formulações farmacêuticas sólidas, contendo este fármaco.

Foi ligado, directamente a uma porta da válvula selectora, um aparelho de pá agitadora a partir do qual eram recolhidas alíquotas de amostra, que eram depois sujeitas ao procedimento analítico, permitindo acompanhar através de um processo automático a evolução da concentração do princípio activo no meio de dissolução.

De forma a garantir a compatibilidade dos elementos acoplados, para a realização dos ensaios de dissolução das formas farmacêuticas sólidas, foi necessário avaliar o comportamento da montagem SIA após a sua associação ao aparelho de dissolução e ao dispositivo de filtração, ambos já referidos neste capítulo na secção Materiais e métodos. Foi assim estudado o efeito do dispositivo de filtração sobre o comportamento do sistema, uma vez que, sendo um elemento adicional poderia eventualmente introduzir alguma resistência durante a aspiração das alíquotas, a partir do vaso de dissolução, e sendo assim a aspiração, em termos de tempo, dos volumes optimizados teria que ser reajustada. Observou-se que o comportamento dos fluidos no sistema de fluxo não sofria qualquer alteração, pelo que as velocidades de aspiração e propulsão foram mantidas e os parâmetros do procedimento automático não necessitaram de nenhum reajuste.

Garantido o funcionamento do sistema após a associação dos diferentes elementos, procedeu-se ao ensaio de dissolução propriamente dito. A extremidade do tubo, usado para a aspiração das alíquotas a analisar, foi imersa no vaso de dissolução de tal forma que as condições hidrodinâmicas no interior do mesmo não sofreram alterações significativas. O comprimido era colocado no recipiente que continha o líquido de

dissolução, nas condições já referidas na secção Materiais e métodos, e aspirava-se, num primeiro passo, o volume necessário para preencher o tubo (rejeitando a porção que atingia o tubo de armazenamento) e, em seguida, o necessário para a análise, de acordo com procedimento analítico desenvolvido para a determinação de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas. Este procedimento iniciava-se logo que o comprimido era colocado no vaso de dissolução e repetia-se a intervalos de 3, até 45 minutos. O perfil de dissolução dos comprimidos de ácido aminocapróico foi avaliado após registo da variação da concentração de princípio activo durante o tempo já referido (Figura 4.6), sendo bem visível o aumento da concentração de ácido aminocapróico em solução ao longo do ensaio e a sua estabilização ao fim de cerca de 45 minutos.

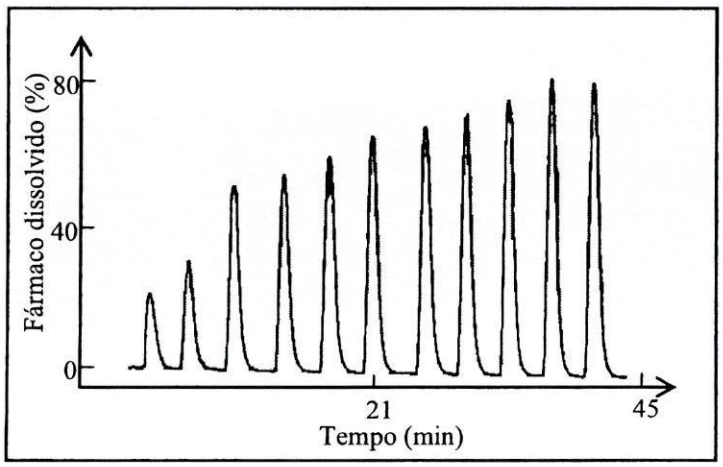


Figura 4.6 Registo gráfico obtido num dos ensaios de dissolução de comprimidos de ácido aminocapróico.

As formulações estudadas exibiram um perfil de dissolução (Figura 4.7) de acordo com a USP 24, que define que não menos do que 75 % da quantidade de princípio activo presente na formulação deve estar dissolvida ao fim de 45 min [24].

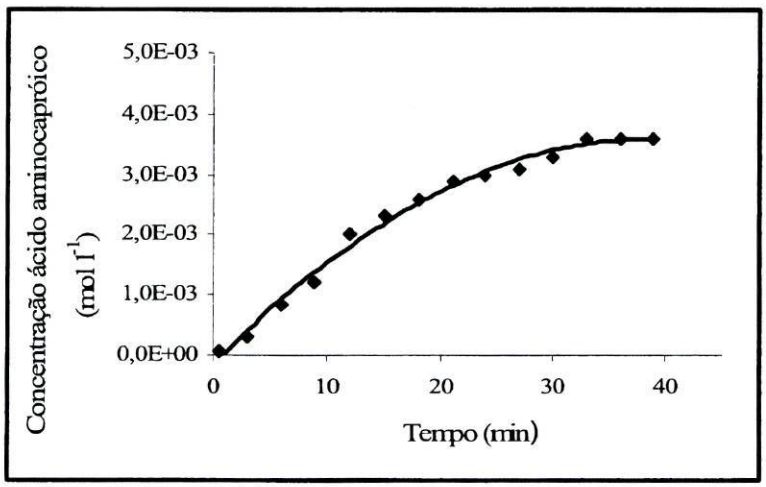


Figura 4.7 Perfil de dissolução de comprimidos de ácido aminocapróico.

Apesar dos ensaios de dissolução terem decorrido sem necessidade de reconfiguração física da montagem SIA, foi necessário adaptar a metodologia analítica às elevadas concentrações de ácido aminocapróico atingidas no decorrer dos mesmos, de forma a poder avaliar-se o perfil de dissolução dos comprimidos ao longo do tempo. Assim, como não era possível aumentar infinitamente a dispersão apenas por redução do volume de amostra, foi implementado um procedimento de diluição em linha, que permitiu adaptar a concentração variável das alíquotas, retiradas do vaso de dissolução, ao intervalo de concentrações determináveis.

Recorreu-se então ao conceito de amostragem de zonas [20] e, sem reconfiguração física do sistema, foi desenvolvido um procedimento de diluição em linha, que permitiu a adaptação do ciclo analítico às concentrações crescentes de ácido aminocapróico atingidas no vaso de dissolução. Para tal, após a aspiração, para o tubo de armazenamento, das zonas de reagente e amostra, parte da zona entretanto dispersa era removida para uma porta de esgoto da válvula selectora de fluidos, sendo descartada. A parte da zona de reacção que permanecia no tubo de armazenamento era então direccionada para o detector, obtendo-se assim uma diminuição significativa da quantidade de produto a alcançar o detector. A relação entre o tempo de remoção de parte do segmento de amostra e o factor de diluição obtido (Figure 4.8) foi avaliada a partir da diminuição de sinal obtida (em percentagem) com uma solução padrão com uma concentração de $1{,}0\text{x}10^{-6}$ mol l^{-1} ácido aminocapróico.

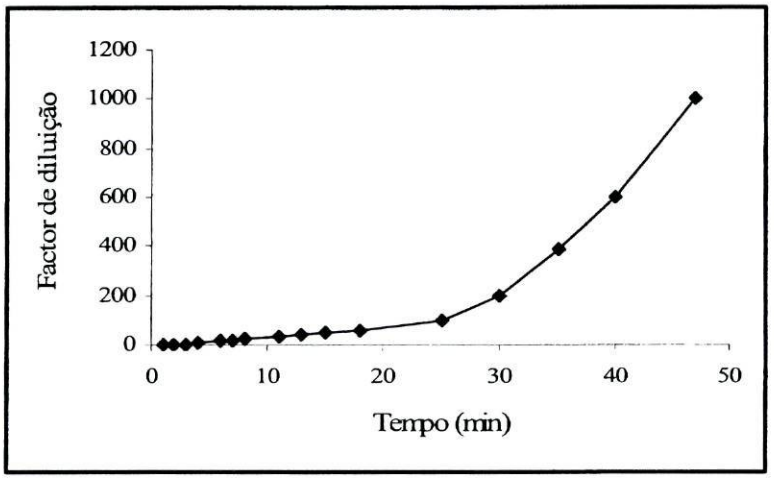


Figura 4.8 Variação do factor de diluição com o tempo de remoção.

Como seria de esperar, os resultados evidenciaram uma diminuição dos sinais analíticos com o aumento do tempo de remoção, uma vez que cada vez fracções mais pequenas atingiam o detector. Em última análise, se um tempo de remoção excessivo fosse aplicado, toda a zona aspirada seria rejeitada e não haveria registo de um sinal analítico. Nas condições dos ensaios obtiveram-se graus de diluição de cerca de 100, 200, 600 e 1000 vezes para 25, 30, 40 e 47 s de tempo de remoção, respectivamente, o que significa que a versatilidade do procedimento de diluição permitia ajustar o grau de diluição à concentração da amostra por selecção do tempo de remoção. Verificou-se, por análise dos resultados que um tempo de remoção de 16 s (a um caudal de 0,5 ml min^{-1}) originava um grau de diluição que permitia o acompanhamento dos ensaios de dissolução até dissolução completa do comprimido. Efectivamente, o uso de uma diluição fixa ao longo de todo o ensaio de dissolução era suficiente para fazer o acompanhamento da variação da concentração de princípio activo no vaso de dissolução e era adicionalmente mais simples.

Foi, assim, introduzido no ciclo analítico um passo de rejeição de parte da zona aspirada entretanto dispersa, de 16 segundos, a um caudal 0,5 ml min^{-1}, o que correspondia a uma diminuição de sinal da ordem dos 99 % e que permitia a análise de todas as alíquotas aspiradas do vaso de dissolução, excepto a primeira, até ao final do ensaio. Efectivamente, só a primeira alíquota era analisada pelo procedimento analítico que não envolvia diluição no interior do sistema. O acompanhamento da variação da concentração de ácido aminocapróico no vaso de dissolução na fase inicial do ensaio só foi possível graças ao baixo limite de detecção da metodologia. Todas as outras alíquotas, retiradas a intervalos de tempo definidos, como já foi referido nesta secção, eram sujeitas ao procedimento de amostragem de zonas uma vez que à medida que

aumentava o grau de dissolução do comprimido as alíquotas apresentavam concentrações cada vez mais elevadas de ácido aminocapróico.

O facto dos sistemas de fluxo baseados na análise por injecção sequencial requererem um baixo volume de amostra para análise foi determinante no desenvolvimento dos ensaios de dissolução de comprimidos e tem sido uma das razões que tem levado à utilização de sistemas SIA neste tipo de ensaio. De facto, nestas condições é possível manter quase constante o volume do meio de dissolução sem haver necessidade de fazer recircular a amostra, não sendo os resultados afectados por qualquer efeito de variação de volume.

4.4 Conclusões

A metodologia analítica desenvolvida associa as vantagens reconhecidas dos sistemas SIA, à selectividade e sensibilidade da detecção fluorimétrica do produto da reacção de derivatização com OPA e NAC.

Relativamente aos métodos, anteriormente referidos na literatura, [2-7] existentes para a determinação de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas, a metodologia desenvolvida mostrou ser mais rápida e económica, possibilitando, com um equipamento simples a realização de um número razoável de determinações por hora (40) de forma reprodutível, com consumo mínimo de reagentes e produção reduzida de efluentes. De facto eram gastos $1{,}2\text{x}10^{-4}$ μg de NAC e $1{,}9\text{x}10^{-3}$ μg de OPA e gerava-se cerca de 1,7 ml de efluente por determinação. Além disto, o método automático desenvolvido obriga a uma intervenção mínima do operador, não estando portanto os resultados sujeitos à avaliação subjectiva do mesmo, como acontece na metodologia de referência usada para comparação dos resultados em que se requer a detecção visual do ponto final da titulação [2, 3].

O controlo informático dos sistemas SIA acrescenta-lhes flexibilidade, permitindo a alteração, de uma forma expedita, das condições de análise, sem reconfiguração física dos sistemas através de um procedimento de diluição típico de sistemas FIA. De facto, apenas por introdução de mais um passo no ciclo analítico, foi possível a análise de amostras num intervalo alargado de concentrações e a realização dos ensaios de dissolução, sem se afectar a determinação em termos de repetibilidade e obtendo-se resultados estatisticamente semelhantes aos obtidos pelo método de referência.

A associação do sistema de fluxo ao aparelho de dissolução evidenciou a versatilidade do sistema SIA, destacando-o mais uma vez das metodologias existentes para o mesmo efeito [4-7], e não resultou na perda das características específicas de ambos. A

implementação dos ensaios de dissolução na montagem SIA permitiu efectuar o acompanhamento da variação da concentração de princípio activo em tempo real, facto que distingue esta situação da implementação de ensaios de dissolução em sistemas FIA, constituindo assim uma alternativa automatizada aos ensaios de dissolução recomendados.

Demonstrou-se com esta metodologia como a combinação da técnica SIA com elementos típicos de outras técnicas de fluxo, como as válvulas solenóides, permitiu a implementação, com sucesso, da estratégia de amostragem binária para inserção de reagentes no sistema.

4.5 Referências bibliográficas

[1] B.G. Katzung, Basic & Clinic Pharmacology, Lange Medical books, 8ª edição, 2001, p. 578.

[2] USP 24/NF 19, Official Monographs, 1999, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., p. 112, Uniformity of dosage units (905).

[3] British Pharmacopeia 1998, volume I, p 80, British Pharmacopeia Commission, The Stationery Office, Londres, Reino Unido.

[4] R. Kulkarni, P. Kanekar, Process Control Qual. 9 (1997) 31.

[5] C. Sarbach, E. Postaire, J. Sauzieres, J. Liq. Chromatogr. 17 (1994) 2737.

[6] C.A. Lau-Cam, R.W. Roos , J. Liq. Chromatogr. 16 (1990) 403.

[7] N.N. Golovnev, O.S. Romanova, N.V. Busygina, J. Anal. Chem. 55 (2000) 457.

[8] P. Viñas, C. López-Erroz, F.J. Cerdán, M. Hernández-Córdoba M., Talanta 47 (1998) 455.

[9] D. Kutlán, P. Presitis, I. Molnár-Perl, J. Cromatogr. A 949 (2002) 235.

[10] C. Vannecke, E. Van Gyseghem, M.S. Bloomfield, T. Coomber, Y. Vander Heyden, D.L. Massart , Anal. Chim. Acta 446 (2001) 413.

[11] Pickering Laboratorios [Online, 2005 Setembro 21];

disponível a partir de : URL: http://pickeringlabs.com/catalog/RC_thiofluor.php4.

[12] B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A. Lapa, Anal. Chim. Acta 293 (1994) 129.

[13] M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, J. Pharm. Biomed. Anal. 4 (1990) 329.

[14] E. Lamparter, C.H. Lunkenheimer, J. Pharm. Biomed. Anal. 10 (1992) 727.

[15] M.A. Koupparis, A. Barcuchová, Analyst 111 (1986) 313.

[16] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, J.L.M. Santos, Anal. Chim. Acta 419 (2000) 17.

[17] Z. Legnerová, H. Sklenářová, P. Solich, Talanta 58 (2002) 1151.

[18] X.Z. Liu, Z.L. Fang, Anal. Chim. Acta 358 (1998) 103.

[19] X.Z. Liu, S.S. Liu, J.F. Wu, Z.L. Fang, Anal. Chim. Acta 392 (1999) 273.

[20] B.F. Reis, A.O. Jacintho, J. Mortatti, F.J. Krug, E.A.G. Zagatto, H. Bergamin-Filho, L.C.R. Pessenda, Anal. Chim. Acta 123 (1981) 221.

[21] J.M.P.J. Garrido, R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, C. Delerue-Matos, J.L.M. Santos, J. Autom. Chem. 18 (1996) 17.

[22] A.N. Araújo, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 310 (1995) 447.

[23] R.A.S Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, Anal. Chim. Acta 377 (1998) 103.

[24] USP 24/NF 19, Official Monographs, 1999, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., p. 112, Dissolution (711).

[25] F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, J.L.M. Santos, Anal. Chim. Acta 468 (2002) 119.

[26] G.D. Marshall, J. van Staden, Process Control and Quality 3 (1992) 251.

CAPÍTULO 5

Avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio do radical ABTS e da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio em vinhos

5. Avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio do radical ABTS e da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio em vinhos

5.1 Introdução

Têm sido propostos, nos últimos anos, vários sistemas de análise baseados na injecção sequencial (SIA), que permitem efectuar a determinação sequencial de mais do que um analito, tirando partido das características peculiares deste tipo de sistema.

Min *et al* propuseram a monitorização quimioluminométrica de glucose e penicilina em culturas bacterianas, recorrendo a reacções enzimáticas distintas [1]. Mais recentemente, foi proposto um sistema SIA para determinação de hormonas tiróideias em formulações farmacêuticas recorrendo a imuno e biosensores amperométricos, adaptados a cada determinação [2]. É ainda possível encontrar um caso em que o mesmo composto é determinado, no mesmo sistema SIA, recorrendo a diferentes técnicas de detecção [3].

No trabalho desenvolvido rentabilizou-se a versatilidade de um sistema SIA por implementação de duas metodologias, que permitiam efectuar duas determinações distintas no mesmo ciclo analítico, sem reconfiguração física da montagem. As metodologias compreendiam dois métodos de detecção distintos de modo que foram incorporados, em duas portas da válvula selectora, um detector espectrofotométrico e um fluorimétrico. A incorporação de dois detectores no sistema de fluxo tornou possível o desenvolvimento de duas metodologias que permitiram a avaliação da capacidade antioxidante de vários tipos de vinho.

O vinho é, de facto, rico em substâncias com actividade biológica, das quais se destacam os polifenóis, responsáveis em grande parte pelas suas características organolépticas mas também pela sua capacidade antioxidante *in vivo*. Numerosos estudos comprovam os benefícios da ingestão moderada de vinho, principalmente tinto, ao nível das doenças coronárias [4-6]. Na última década, inúmeros autores têm sugerido métodos que permitem a avaliação da capacidade antioxidante do vinho, recorrendo a métodos potenciométricos [7], voltamétricos [8] e espectrofotométricos, nomeadamente ao da N,N-dimetil-p-fenilenodiamina (DMPD) [9] e do ácido 2,2′-azinobis(3-etilbenzotiazolina) sulfónico (ABTS) [10-12].

Um método de análise por injecção em fluxo (FIA), em que se avaliava a capacidade antioxidante através da detecção quimioluminométrica do permanganato de potássio, em meio ácido [13], é a única proposta envolvendo uma técnica de fluxo nesta área.

Dada a importância da avaliação da capacidade antioxidante de amostras alimentares, nomeadamente do vinho, parece fundamental investir no desenvolvimento de métodos automáticos, económicos e robustos que forneçam, num curto espaço de tempo e com intervenção mínima do operador, informações acerca da acção antioxidante da amostra.

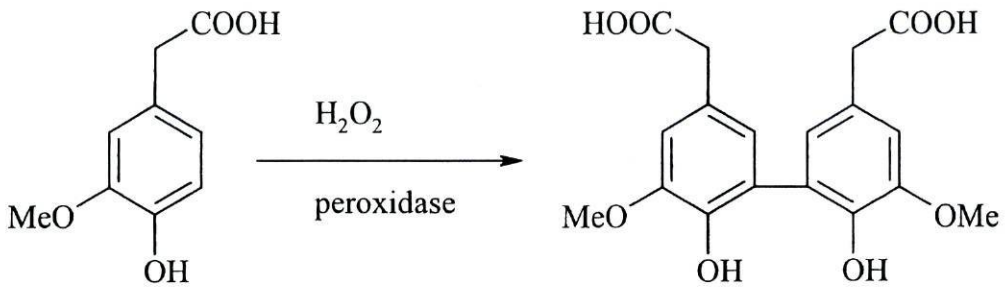
As metodologias desenvolvidas no sistema de fluxo agora apresentado basearam-se nos ensaios do radical ABTS [10-12] e de determinação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio, através da oxidação do ácido homovanílivo (AHV) [14].

O ensaio do ABTS é uma metodologia espectrofotométrica em que se avalia a capacidade "scavenge" da substância antioxidante, sobre o radical monocatião do ABTS ($ABTS^{\cdot+}$), por diminuição da absorvência inicial da solução de radical a 734 nm [15]. O radical $ABTS^{\cdot+}$ pode ser gerado, a partir do ABTS, enzimaticamente usando mioglobina [16] ou peroxidase [17], quimicamente por reacção com MnO_2 [18], persulfato de potássio [19] e radicais peróxido [20] ou até electroquimicamente [21]. O espectro de

absorção do radical gerado é muito característico, apresentando máximos a 414, 645, 734 e 815 nm. Embora a 414 nm a determinação seja mais sensível, a detecção a 734 nm minimiza a interferência de componentes de amostras como o vinho, pelo que esse foi o comprimento de onda escolhido para a metodologia em desenvolvimento [22]. A automatização do ensaio do radical $ABTS^{\cdot+}$, num sistema SIA, surge como resposta ao uso crescente desta metodologia em procedimentos discretos para análise de bebidas e outros produtos alimentares, com o objectivo de avaliar a sua actividade antioxidante.

O ensaio de avaliação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio é uma das metodologias que permite estimar a actividade "scavenging" do oxigénio em vários tipos de amostras, incluindo as biológicas [14, 23]. Este tipo de actividade não pode ser expressa como actividade antioxidante total uma vez que os antioxidantes podem actuar por "scavenging" de espécies reactivas, mas também por regulação de sistemas antioxidantes endógenos. A avaliação da actividade "scavenging" envolve geralmente o uso da enzima peroxidase e a oxidação de um substrato pelo peróxido de hidrogénio. Vários substratos têm vindo a ser utilizados nomeadamente o ácido *p*-hidroxifenilacético, o ácido homovanílico, o ácido *p*-hidroxifenilpropriónico, a tiramina [24] e a escopoletina [25, 26].

A metodologia desenvolvida baseou-se na reacção de oxidação do AHV ao seu dímero fluorescente (λ_{ex}= 325 nm, λ_{em}= 425 nm), na presença de peróxido de hidrogénio e peroxidase (Figura 5.1). Embora em termos de intensidade de fluorescência, que origina, o AHV não se distinga significativamente dos restantes substratos, este tem vindo a ser o reagente mais utilizado neste tipo de determinação, muito possivelmente devido à grande estabilidade do dímero formado.



AHV dímero

Figura 5.1 Formação do dímero de AHV na presença de peróxido de hidrogénio e peroxidase.

Substâncias com actividade "scavenging" do peróxido hidrogénio diminuem a oxidação do AHV, por remoção de peróxido de hidrogénio, o que ocasiona uma diminuição da intensidade da fluorescência, proporcional à actividade antioxidante.

De um modo geral, a avaliação da capacidade antioxidante de amostras variadas baseia-se na comparação da acção da amostra com a de uma substância padrão, com propriedades reconhecidamente antioxidantes, como o trolox, o ácido gálhico ou o ácido ascórbico, tratando-se portanto de valorações relativas. A substância padrão mais utilizada é o trolox, um análogo do tocoferol, e nestes casos os resultados das determinações são geralmente expressos em TEAC (do inglês "Trolox Equivalent Antioxidant Capacity") que não é mais do que a concentração de trolox (mmol l^{-1}) com actividade antioxidante equivalente à da amostra não diluída ou à de substância antioxidante em estudo, na concentração de 1 mmol l^{-1} [19].

A implementação, num sistema SIA, da metodologia de avaliação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio e do ensaio do ABTS, permitiu o desenvolvimento de um sistema automático que fornecia, de uma forma rápida,

informações complementares relativas à capacidade antioxidante das amostras de vinho, permitindo a prever a sua acção antioxidante *in vivo*.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Reagentes e soluções

Semanalmente era preparada uma solução de radical monocatião do ABTS por mistura de volumes iguais de soluções de persulfato de potássio 2,45 mmol l^{-1} e de ABTS 7 mmol l^{-1}, ambas preparadas em água. A solução era armazenada no escuro e à temperatura ambiente durante 12 horas, período no qual decorria a formação do radical [19]. Esta solução era estável até uma semana. Antes das determinações a solução de radical era diluída em água 1:25.

Diariamente, preparavam-se soluções de AHV 1,25 mmol l^{-1} e de peróxido de hidrogénio 0,3 mmol l^{-1}, ambas em água desoxigenada em corrente de azoto.

A solução de peroxidase, usada na oxidação do AHV, era preparada por pesagem e dissolução da quantidade adequada de enzima em água, de modo a obter uma concentração final de 10 U ml^{-1}.

As soluções de calibração de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) eram preparadas diariamente por diluição rigorosa de uma solução de concentração 0,5 mmol l^{-1}.

Como solução de transporte no sistema SIA usava-se uma solução "tampão fosfato" ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$) 25 mmol l^{-1}, pH 7,5.

Para a determinação da capacidade "scavenging" do peróxido de hidrogénio, no sistema SIA, as amostras de vinho tinto e branco eram diluídas, em água, 1:150 e 1:25, respectivamente. As amostras usadas no ensaio do ABTS eram diluídas, no interior do sistema SIA, a partir das preparadas previamente para o ensaio de determinação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio, uma vez que neste caso o grau de diluição necessário era superior. O procedimento de diluição em linha optimizado

permita atingir graus de diluição de 1:2000 para os vinhos tintos e de 1:400 para os vinhos brancos. Em ambos os ensaios, as diluições efectuadas, quer manual quer automaticamente, pretendiam tornar as actividades antioxidante e "scavenging" das amostras comparáveis às dos padrões de trolox, utilizados para elaborar as curvas de calibração.

5.2.2 Aparelhagem

O sistema SIA, usado para avaliação da actividade antioxidante e de "scavenging" do peróxido de hidrogénio (Figura 5.2), incluía um detector espectrofotométrico (DE), ligado à porta 6 da válvula selectora por um tubo reactor de 1 m (TR1), e um detector fluorimétrico (DF), acoplado à válvula pela porta 7 através de um tubo reactor de 2 m (TR2). Os detectores foram já descritos em pormenor no Capitulo 2. Os tubos reactores apresentavam uma configuração em figuras de oito e o tubo de armazenamento (TA), com um comprimento de 4 m, garantia que não havia contaminação da solução de transporte com as soluções aspiradas a partir da válvula selectora.

O sistema incorporava ainda dois tubos de 1 m, com configuração enrolada (TD1 e TD2), ligados às portas 9 e 10 da válvula selectora, que foram usados para efectuar a diluição em linha das amostras para o ensaio do ABTS.

Os restantes componentes da montagem nomeadamente bomba peristáltica, válvula selectora, válvula solenóide e registador, foram já descritos em pormenor no Capítulo 2.

A detecção espectrofotométrica era efectuada a 734 nm e a fluorimétrica a comprimentos de onda de excitação e de emissão de 325 e 425 nm, respectivamente.

No ensaio de determinação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio as soluções e o tubo reactor encontravam-se termostatizados a 20,0 ± 0,5 °C, num banho de temperatura controlada, já descrito no Capítulo 2.

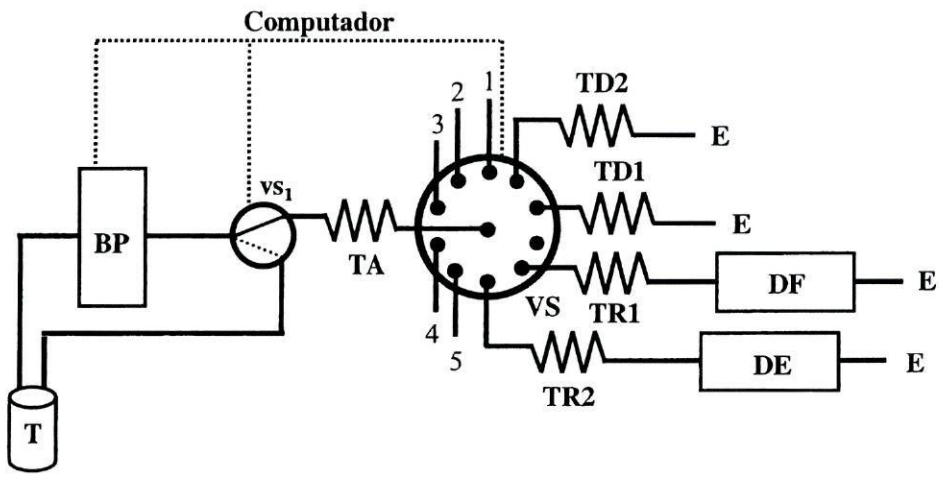


Figura 5.2 Representação esquemática do sistema SIA usado para realização dos ensaios do ABTS e de avaliação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio. T: solução transportadora; BP: bomba peristáltica; VS: válvula selectora; vs: válvula solenóide; TA: tubo de armazenamento; TR1, TR2: tubos reactores; BT: banho de água (20,0 ± 0,5 °C); DE: espectrofotometro; DF: fluorimetro; TD1, TD2: tubos de diluição; E: esgoto.

5.2.3 Procedimento experimental

Antes do início das determinações, toda a tubagem do sistema e as células de fluxo eram preenchidos com solução transportadora ("tampão fosfato" 25 mmol l^{-1}, pH 7,5) e os tubos da válvula selectora com as soluções respectivas.

O procedimento experimental era constituído por 15 etapas que resultavam na obtenção de dois sinais analíticos, um referente à avaliação da actividade antioxidante pelo ensaio do ABTS e outro correspondente à determinação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio. As determinações iniciavam-se pela medição de um sinal de branco, correspondente ao sinal máximo de fluorescência ou absorvência, a partir do qual se avaliava a capacidade antioxidante de cada amostra, por diminuição da intensidade de sinal inicial.

O ciclo analítico (Tabela 5.1) iniciava-se com a aspiração sequencial de 10 μl de peróxido de hidrogénio (Figura 5.2, porta 1), 25 μl de amostra (Figura 5.2, porta 2), 10 μl de peroxidase (Figura 5.2, porta 3) e 10 μl de AHV (Figura 5.2, porta 4) (Tabela 5.1, etapas 1-4). A zona de reacção, formada pelos segmentos referidos anteriormente, era encaminhada para o detector fluorimétrico e era registado um sinal com altura proporcional à actividade "scavenging" (Tabela 5.1, etapa 5).

O ciclo analítico prosseguia intercalando 25 μl de ABTS (Figura 5.2, porta 5) entre dois segmentos de 150 μl de amostra (Figura 5.2, porta 2) (Tabela 5.1, etapas 10-12). A sequência aspirada era encaminhada para o detector espectrofotométrico originando um sinal proporcional à actividade antioxidante (Tabela 5.1, etapa 13).

Durante a análise das amostras, o procedimento analítico era adaptado de modo a tornar possível a diluição em linha das amostras para o ensaio do ABTS. De facto, neste ensaio as amostras de vinho tinham que ser sujeitas a um grau de diluição superior ao necessário para a avaliação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio. Assim, e para que uma mesma amostra pudesse ser sujeita à análise sequencial pelos dois métodos, a diluição adicional necessária para o ensaio do ABTS era efectuada em linha, directamente no sistema, a partir das amostras diluídas de forma discreta para o ensaio de avaliação da actividade "scavenging". Este procedimento, constituído por 4

etapas (Tabela 5.1, etapas 6-9), era efectuado imediatamente após a finalização da parte do ciclo referente à avaliação da actividade "scavenging".

O facto de a análise das amostras pelo método do ABTS se efectuar intercalando uma porção de solução de ABTS entre duas porções de amostra (Tabela 5.1), implicou que o procedimento de diluição permitisse obter, antes do início do ciclo, dois segmentos de amostra exactamente com o mesmo grau de diluição, sendo deste modo possível proceder à análise utilizando o mesmo ciclo analítico. Eram, assim, aspirados, para o tubo de armazenamento, 50 µl de amostra (Figura 5.2, porta 2), encaminhando-se de seguida, para um tubo de diluição (Figura 5.2, TD1), a zona aspirada e entretanto dispersa, durante 15 ou 16 segundos se se tratava de vinho tinto ou branco, respectivamente (Tabela 5.1, etapas 6 e 7). Em seguida repetia-se este procedimento, encaminhando-se uma nova alíquota de 50 µl de amostra para outro tubo de diluição (Figura 5.2, TD2) (Tabela 5.1, etapas 8 e 9) de modo a obter-se, como já foi referido, antes do ensaio do ABTS, dois tubos com a amostra disponível, com o mesmo grau de diluição, podendo o ciclo analítico, já exposto, prosseguir sem alterações e sem reconfiguração física do sistema.

O ciclo analítico terminava com a lavagem dos tubos de diluição com solução transportadora (Tabela 5.1, etapas 14 e 15).

A mudança de amostras decorria aspirando 200 µl da nova amostra através do tubo de amostragem. A porção de amostra que atingia o tubo de armazenamento era imediatamente encaminhada para o esgoto evitando-se assim a contaminação entre amostras.

Tabela 5.1 Procedimento analítico para a avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio do ABTS e determinação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio.

Determinação	Etapa	Posição válvula	Volume (µl)	Tempo (s)	Caudal (ml/min)	Sentido do fluxo*	Descrição da etapa
Actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio	1	1	10	2	0,3	A	Aspiração de H_2O_2
	2	2	25	3	0,5	A	Aspiração de amostra
	3	3	10	2	0,3	A	Aspiração de peroxidase
	4	4	10	2	0,3	A	Aspiração de AHV
	5	7	----	150	0,8	P	Propulsão para o detector fluorimétrico
ABTS	6	2	50	6	0,5	A	Aspiração de amostra
	7	9 (TD1)	250 ou 265	15 ou 16	1	P	Diluição da amostra
	8	2	50	6	0,5	A	Aspiração de amostra
	9	10 (TD2)	250 ou 265	15 ou 16	1	P	Diluição da amostra
	10	9	150	18	0,5	A	Aspiração de amostra diluída
	11	5	25	3	0,5	A	Aspiração de ABTS
	12	10	150	18	0,5	A	Aspiração de amostra diluída
	13	8	----	45	1,5	P	Propulsão para o detector espectrofotométrico
	14	9	----	10	4	P	Lavagem do tubo de diluição
	15	10	----	10	4	P	Lavagem do tubo de diluição

5.3 Resultados e Discussão

A optimização da metodologia automática, que viabiliza com a mesma montagem duas determinações, foi efectuada recorrendo ao trolox como substância padrão, tal como é corrente neste tipo de ensaios [14]. As determinações baseavam-se na avaliação da diminuição da intensidade dos sinais de fluorescência e absorvência iniciais, na presença de substâncias com acção antioxidante, sendo os resultados expressos em percentagem de diminuição desses sinais. O objectivo principal da optimização consistia em aumentar as percentagens de diminuição dos sinais inicias de fluorescência ou de absorvência, obtendo ao mesmo tempo uma relação linear entre esse aumento de percentagem e a concentração de trolox.

5.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos

Os resultados da optimização dos diversos parâmetros serão expostos separadamente para as duas determinações, de modo a expor mais facilmente a interpretação para cada caso.

5.3.1.1 Determinação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio

No caso da determinação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio o sinal de fluorescência inicial era estabelecido a partir da oxidação do AHV, ao seu dímero fluorescente, por acção da enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogénio. Foram então optimizadas as condições que permitiam a obtenção de um sinal inicial (na ausência de amostra ou padrão com acção antioxidante) com intensidade suficiente para que se avaliasse a sua diminuição, na presença de compostos com acção antioxidante.

Em sistemas SIA, a ordem de aspiração das soluções envolvidas na reacção pode influenciar significativamente a forma e a intensidade de sinal obtido pois determina o grau de interdispersão das várias zonas aspiradas [27]. Deste modo, a ordem de aspiração das diferentes soluções foi estudada de forma a encontrar a sequência que favorecia a mistura, incrementando a actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio, pela amostra antioxidante. Concluiu-se, com base nos resultados obtidos, que a situação óptima seria aspirar sequencialmente solução de peróxido de hidrogénio, amostra, solução de peroxidase e por fim solução de AHV. De facto, o estudo revelou que esta sequência permitia um contacto mais eficaz da amostra com o peróxido de hidrogénio e consequentemente uma actividade "scavenging" mais intensa, o que se traduziu em percentagens de diminuição do sinal inicial mais elevadas, no mesmo intervalo de concentrações.

O volume de amostra antioxidante, responsável pela inibição da oxidação do AHV ao seu dímero fluorescente, foi estudado no intervalo de 10 – 30 μl. Os estudos posteriores foram efectuados com 25 μl de amostra uma vez que este volume permitiu obter percentagens de diminuição do sinal de fluorescência inicial até cerca de 80%, mantendo-se uma relação linear com a concentração de trolox até 0,008 mmol l^{-1}. É importante salientar que percentagens de inibição da oxidação do AHV mais elevadas poderiam ser sinónimo de erros acrescidos, dado tratar-se de uma metodologia em que se avaliava a diminuição de sinal.

A enzima peroxidase desempenhou um papel importante no estabelecimento do sinal de fluorescência inicial, a partir do qual se avaliava a actividade "scavenging", por permitir, juntamente com o peróxido de hidrogénio, a oxidação do AHV com obtenção de um produto fluorescente. O volume de peroxidase, a introduzir no sistema, foi estudado entre 5 e 20 μl e a sua concentração entre 5 e 15 U ml^{-1}. Observou-se um

aumento linear da percentagem de inibição da oxidação do AHV à medida que se diminuía o volume de peroxidase até 10 µl. De facto, verificou-se que volumes superiores ocasionavam um sinal inicial de fluorescência muito elevado, e portanto uma dimerização extensa, o que obrigava a um aumento da concentração da substância antioxidante, para se obterem percentagens de inibição semelhantes. Deste modo, como se procedia à optimização uniparamétrica e o volume de amostra não variava durante este ensaio, os melhores resultados em termos de percentagem de inibição do sinal inicial obtiveram-se com volumes reduzidos de peroxidase (10 µl). Relativamente à concentração, verificou-se que uma solução de peroxidase 10 U ml^{-1} permitia obter uma actividade "scavenging" máxima. De facto, concentrações inferiores originavam uma perda de linearidade, a partir de 0,008 mmol l^{-1} de trolox, no mesmo intervalo de concentrações, e concentrações superiores não alteravam os sinais obtidos com a solução de peroxidase 10 U ml^{-1}. Deste modo, a restante optimização prosseguiu utilizando-se 10 µl de uma solução com concentração de 10 U ml^{-1} de peroxidase. É importante salientar que enquanto que o aumento da concentração de peroxidase originava um aumento da percentagem de inibição, o aumento do volume não tinha efeitos semelhantes. Isto sugere que o aumento da percentagem de inibição por diminuição do volume de peroxidase está relacionado com uma melhor interdispersão das zonas de AHV, peroxidase e peróxido de hidrogénio.

Relativamente à solução de peróxido de hidrogénio verificou-se que quantidades muito pequenas eram suficientes para estabelecer um sinal inicial de fluorescência com uma intensidade, a partir da qual se podia avaliar a actividade "scavenging", pelo que o seu volume foi estudado entre 5 e 30 µl e a sua concentração entre 0,15 e 0,6 mmol l^{-1}. Os estudos restantes foram conduzidos usando 10 µl de uma solução de peróxido de hidrogénio 0,3 mmol l^{-1}. Efectivamente, o peróxido de hidrogénio, quando em volumes

e concentrações superiores, ocasionava sinais de branco elevados, relacionados com uma elevada formação de dímero fluorescente, não permitindo atingir percentagens de inibição aceitáveis no mesmo intervalo de concentrações de trolox. Por outro lado, volumes e concentrações inferiores aos escolhidos ocasionavam uma situação em que não se verificava linearidade no intervalo de concentrações estudado.

A oxidação do AHV ao seu dímero fluorescente é a base da determinação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio. O estudo de optimização do volume de AHV foi efectuado com volumes entre 5 e 20 μl, tendo-se verificado que a diminuição do volume, até 10 μl, conduzia a um aumento da percentagem de inibição da oxidação do AHV. A concentração de AHV foi testada no intervalo 0,7 – 2 mmol l^{-1} e conclui-se que a situação óptima, em termos de sinal relativo à actividade "scavenging", era obtida com uma solução de AHV 1,25 mmol l^{-1}. Efectivamente, soluções de concentração superior levavam a uma diminuição da percentagem de inibição da oxidação e concentrações inferiores ocasionavam uma situação em que não se observava uma variação linear das percentagens de inibição com a concentração de trolox, no mesmo intervalo de concentrações. Os restantes estudos forma efectuados utilizando 10 μl de uma solução de AHV com concentração 1,25 mmol l^{-1}.

Tal como já foi referido no Capítulo 1 desta dissertação, num sistema SIA, são vários os elementos que afectam a dispersão da zona reaccional sendo importante estabelecer as condições físicas que originam um grau de dispersão que facilite o desenvolvimento da reacção, sem diluição significativa do produto formado. Desta forma, foram estudados o caudal de propulsão bem como a configuração e comprimento do tubo reactor. Estudaram-se caudais de propulsão, da zona reaccional até ao detector, entre 0,3 e 1 ml min^{-1} e optou-se por continuar a restante optimização trabalhando a um caudal de 0,8 ml min^{-1}, como um compromisso entre o ritmo de amostragem e a linearidade no intervalo

de concentrações de trolox até então estudado. Relativamente ao tubo reactor (Figura 5.1, TR2), a sua optimização foi orientada de forma a estabelecer o comprimento e configuração que permitissem uma extensão de reacção que originasse uma variação de sinal mensurável, no menor espaço de tempo. Foram testados tubos de comprimento entre 0,5 – 2,5 m e formatos enrolado e em oito. Os estudos prosseguiram com um reactor de 2 m com configuração em figuras de oito, uma vez que reactores de comprimento menor levavam a sinais de actividade "scavenging" menores e reactores superiores ocasionavam uma diluição relativamente extensa da zona reaccional, afectando de forma negativa a percentagem de inibição.

As determinações fluorimétricas são extremamente sensíveis a variações de temperatura, podendo diferenças de poucos graus celsius originar sinais analíticos significativamente diferentes, pelo que foi efectuado um estudo de influência da temperatura, sobre a extensão da reacção (Figura 5.3).

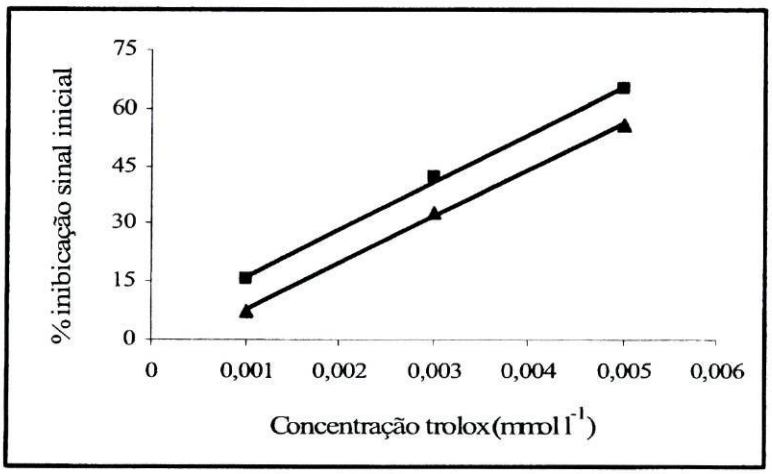


Figura 5.3 Efeito da variação da temperatura nos sinais analíticos. Os resultados referem-se a ensaios de avaliação da actividade "scavenging" efectuados com o tubo reactor e as soluções termostatizados a 20 °C (■) e 30 °C (▲).

Passou a trabalhar-se com as soluções e tubo reactor (Figura 5.1, TR2) termostatizados a 20,0 ± 0,5°C uma vez que se observaram desvios significativos nos sinais por pequenas oscilações da temperatura.

5.3.1.2 Avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio do ABTS

No caso da determinação da actividade antioxidante pelo ensaio do ABTS foi fundamental estabelecer as condições iniciais óptimas de forma a obter, na ausência de substância antioxidante, um sinal espectrofotométrico referente ao radical $ABTS^{\cdot+}$, com uma intensidade de absorvência adequada à avaliação do efeito da amostra.

Deste modo, o volume de $ABTS^{\cdot+}$, foi estudado entre 20 e 100 µl, tendo ficado determinada a utilização, em estudos posteriores, de uma alíquota de 25 µl dado que permitia a obtenção de um sinal espectrofotométrico inicial com as características referidas.

O volume de amostra antioxidante responsável pela diminuição do sinal de branco, foi testado entre 50 e 350 µl, tendo-se fixado o volume em 300 µl, uma vez que se verificava um aumento da inibição da oxidação do radical monocatião do ABTS por aumento do volume até 300 µl.

Também neste caso foi avaliada a ordem de aspiração das soluções, de forma a estabelecer as condições que garantiam a obtenção do melhor grau de mistura das duas zonas. A diferença considerável existente entre os volumes das duas zonas aspiradas sequencialmente (300 µl/25 µl) dificultava a mistura do reagente com a totalidade da amostra. A intercalação da zona correspondente ao ABTS entre dois segmentos de amostra iguais (150 µl) resultou numa melhor interpenetração das mesmas originando a melhor situação, em termos de inibição da oxidação, dentro do intervalo de

concentrações pretendido. Deste modo tal como já referido, o ciclo analítico referente ao ensaio do ABTS decorria intercalando 25 μl de ABTS entre dois segmentos de 150 μl de amostra (Tabela 5.1).

Dos factores que afectam a dispersão foram estudados o comprimento e a configuração do tubo reactor (Figura 5.1, TR1) e o caudal de propulsão. Foram avaliados tubos de comprimento entre 0,5 m e 1,5 m, lisos e com configuração em figuras de oito. O reactor de 1 m com configuração em figuras de oito permitia efectuar as determinações em menor tempo, com garantia de linearidade no intervalo de concentrações pretendido, indicando que a reacção se processa de uma forma relativamente rápida, já que tubos reactores de comprimento superior a 1 m conduziam apenas à diluição da zona reaccional. No entanto, reactores de 0,5 m de comprimento originavam percentagens de diminuição de sinal inferiores, muito provavelmente devido ao facto do percurso da zona reaccional até ao detector ser insuficiente para o desenvolvimento óptimo da reacção. Reactores de formato liso ocasionavam inibições de fluorescência inferiores, talvez devido a um menor grau de mistura das soluções.

Como resultado do estudo de optimização que se efectuou entre 0,8 e 2 ml min^{-1}, o caudal de propulsão foi fixado em 1,5 ml min^{-1} já que permitia os melhores resultados em menor tempo, confirmando desta forma as conclusões tiradas, durante a optimização do tubo reactor, acerca da velocidade da reacção.

Avaliou-se ainda o efeito da temperatura sobre a determinação, tendo-se termostatizado as soluções e o tubo reactor entre 20,0 ± 0,5°C e 30,0 ± 0,5°C. Não se observou, no entanto, qualquer variação na amplitude dos sinais analíticos, pelo que se prosseguiram os estudos sem termostatização.

As metodologias analíticas desenvolvidas foram testadas recorrendo a padrões de trolox tendo-se obtido, nas condições optimizadas, rectas de calibração lineares entre de 0,001

e 0,008 mmol l^{-1} no ensaio fluorimétrico e entre 0,001 e 0,01 mmol l^{-1} no ensaio espectrofotométrico (Tabela 5.2).

As curvas de calibração foram para o ensaio do ABTS: "Percentagem de inibição" = 8287 (±81) C_{trolox} (mmol l^{-1}) + 4,21 (±0,51), R^2 = 0,9997 e para o ensaio de avaliação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio: "Percentagem de inibição" = 3994 (±23) C_{trolox} (mmol l^{-1}) + 5,17 (±0,12), R^2 = 0,9995.

Na Figura 5.4 apresenta-se um registo gráfico típico obtido durante a elaboração das curvas de calibração e análise de algumas amostras, com as metodologias desenvolvidas para avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio do ABTS (A) e da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio (B).

Nas mesmas condições foram também estudados os comportamentos antioxidantes do ácido gálhico, ácido cafeíco, ácido ascórbico, catequina e taxifolina. Analisou-se assim o comportamento de cada uma das substâncias como uma substância padrão, estabelecendo, para cada uma delas o seu intervalo de linearidade, limite de detecção e desvio padrão relativo obtido com duas soluções de concentrações distintas. Para além disto, comparou-se ainda a sua potência antioxidante com a do trolox, tendo-se expresso as suas actividades antioxidante e "scavenging" do peróxido de hidrogénio em TEAC (mmol l^{-1}), que representa a concentração de um a solução de trolox com actividade antioxidante igual à apresentada por uma solução de substância antioxidante de concentração 1 mmol l^{-1} (Tabela 5.2).

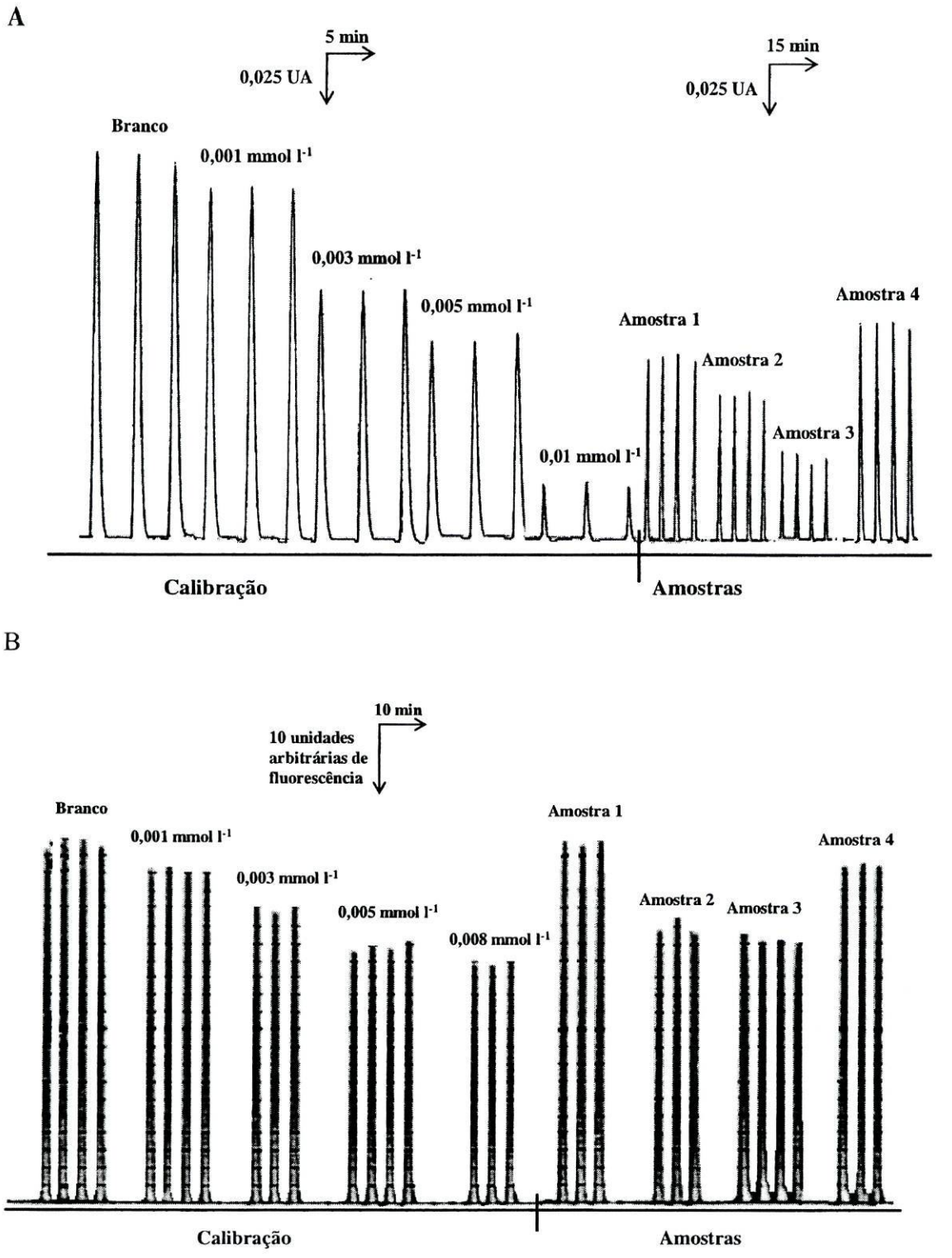


Figura 5.4 Registo gráfico obtido na elaboração das curvas de calibração (com padrões de concentração crescente de trolox) e na análise das amostras de vinho pelas metodologias desenvolvidas para avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio do ABTS (A) e da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio (B).

Tabela 5.2 Resultados da análise de substâncias antioxidantes pelos ensaios do ABTS e de avaliação da capacidade "scavenging" do peróxido de hidrogénio

Substância	Equações de calibração*		Limite de detecção (mmol l^{-1})		Limite superior (mmol l^{-1})		Desvio padrão relativo (%)		TEAC (mmol l^{-1})	
	ASPH	ABTS	ASPH	ABTS	ASPH	ABTS	ASPH	ABTS	ASPH	ABTS
Trolox	y = 3994(±23)x + 5,17(±0,12)	y = 8287(±81) x+ 4,21(±0,51)	$1,4x10^{-4}$	$8,4x10^{-7}$	0,008	0,01	0,7 – 2,4	1 – 2,4	1	1
Ácido gálhico	y = 5728(±108)x + 9,68(±0,68)	y = 27888(±400)x + 0,81(±0,75)	$2,8x10^{-4}$	$1,8x10^{-7}$	0,01	0,003	1,3 – 4,8	0,8 – 4,2	1,47±0,03	4,20±0,19
Ácido cafeíco	y = 1014(±16)x – 8,06(±0,85)	y = 8974(±273)x – 5,00(±1,50)	$2,0x10^{-3}$	$4,2x10^{-7}$	0,08	0,008	0,5 – 2,1	1,7 – 3,5	0,15±0,05	0,78±0,01
Ácido ascórbico	y = 7572(±143)x + 7,11(±0,97)	y = 8626(±193)x – 4,58(±1,33)	$4,4x10^{-4}$	$1,7x10^{-6}$	0,01	0,01	3,0 – 4,8	1,0 – 2,3	1,00±0,10	0,68±0,01
Catequina	y = 1368(±22)x + 5,81(±0,43)	y = 21932(±234)x + 1,61(±0,44)	$1,5x10^{-3}$	$2,1x10^{-7}$	0,03	0,003	2,2 – 4,6	0,4 – 1,4	0,018±0,003	1,35±0,01
Taxifolina	y = 1767(±28)x – 4,32(±0,90)	y = 63750(±1366)x + 2,83(±1,24)	$1,2x10^{-3}$	$9,8x10^{-8}$	0,05	0,0013	3,4 – 4,6	1,3 – 2,1	0,37±0,02	8,79±0,10

* y: percentagem de inibição; x: concentração (mmol l^{-1})

Os limites de detecção dos ensaios do ABTS e de avaliação da actividade "scavenging", calculados após processamento do sinal de branco (Capítulo 2), eram $8{,}4 \times 10^{-7}$ e $1{,}4 \times 10^{-4}$ mmol l^{-1}, respectivamente. A metodologia desenvolvida permitia efectuar 30 determinações por hora, obtendo-se em cada ciclo analítico informação acerca da actividade antioxidante (ABTS) e da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio. No entanto, se os dois ensaios forem realizados independentemente, o que é possível dada a versatilidade do sistema, seria possível efectuar 22 determinações por hora para o ensaio de avaliação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio e 42 determinações por hora para o ensaio do ABTS.

5.3.2 Análise das amostras de vinho

A metodologia SIA desenvolvida foi depois aplicada a amostras de vinho branco e tinto, após as respectivas diluições. Os vinhos brancos sofreram diluições de 1:25 e de 1:400 e os tintos de 1:150 e de 1:2000, para os ensaios da actividade "scavenging" e do ABTS respectivamente. As diluições iniciais necessárias para avaliar a actividade "scavenging" (1:25 e 1:150) eram efectuadas de modo discreto, antes das amostras serem introduzidas no sistema SIA. Por outro lado, as amostras para o ensaio do ABTS (1:400 e 1:2000) eram preparadas por diluição em linha, no sistema de fluxo, a partir das utilizadas no ensaio de avaliação da actividade "scavenging". Foi assim desenvolvido um procedimento de diluição das amostras que se baseava na utilização de dois tubos de diluição, situados em duas portas da válvula selectora (TD1 e TD2, Figura 5.1), e envolvia a adição de 4 passos ao ciclo analítico apresentado anteriormente. Tal como já foi referido no Capítulo 3, o grau de diluição obtido, num procedimento deste tipo, dependia do volume de amostra aspirado inicialmente para o tubo de

armazenamento, do volume transferido para o tubo de diluição e do volume de amostra usado na determinação [28]. Dado que o volume de amostra, usado na determinação, correspondente a duas alíquotas de 150 µl de amostra separados por 25 µl de ABTS, já tinha sido previamente definido passou-se ao estudo dos outros dois parâmetros (volume de amostra aspirado inicialmente e volume transferido) de modo a obter-se diluições de 13 e 16 vezes para as amostras de vinho branco e tinto, respectivamente. O grau de diluição desejado resultou da combinação da aspiração de uma alíquota de 50 µl de amostra e da sua dispersão no transportador durante o percurso para o tubo de diluição. O volume transferido foi testado entre 170 e 275 µl (10,5-16,5 segundos), tendo-se obtido os graus de diluição, desejados para o ensaio, com 265µl (16 segundos) para os vinhos brancos e 250 µl (15 segundos) para os vinhos tintos. O procedimento de diluição envolvia então a aspiração de 50 µl de amostra para o tubo de armazenamento e encaminhamento da zona aspirada, para o tubo de diluição, durante os tempos optimizados. Este pequeno ciclo era efectuado duas vezes de modo que na altura de iniciar a parte do ciclo analítico correspondente ao ensaio do ABTS, tivéssemos dois tubos, com a amostra diluída de igual modo, a partir dos quais era possível fazer a aspiração de dois segmentos de 150 µl de amostra separados por 25 µl de ABTS. Assim, por encaminhamento da amostra vinho branco para o tubo de diluição durante 15 segundos era possível diluir a amostra cerca de 13 vezes e assim obter uma diluição de 1:400, a partir da amostra diluída fora do sistema de fluxo. No que diz respeito aos vinhos tintos, conseguiu obter-se uma diluição de 16 vezes por dispensa da amostra para o tubo de diluição durante 16 segundos, o que permitia obter a amostra diluída 1:2000, a partir da diluída fora do sistema para o ensaio de avaliação da actividade "scavenging". Os estudos relacionados com procedimento de diluição foram efectuados comparando os resultados com os obtidos por diluição manual dos padrões.

A análise repetida de amostras (n=15), de diferentes concentrações, por ambos os métodos, resultou em desvios padrão relativos (%) inferiores a 2,4 % o que indica que as metodologias podem ser aplicadas num intervalo de concentrações alargado.

Os resultados da análise das amostras de vinho foram expressos em TEAC (Tabela 5.3) e como se pode observar a capacidade antioxidante das amostras está relacionada com tipo de vinho (branco/tinto), tal como se esperava.

Tabela 5.3 Resultados da análise das amostras de vinho pelos ensaios do ABTS e de actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio (ASPH).

Vinho, região	TEAC (mmol l^{-1})*	
	ASPH	ABTS
Tinto, Alentejo	11,4 ± 0,4	0,59 ± 0,05
Tinto, Alentejo	11,6 ± 0,2	0,64 ± 0,02
Tinto, Dão	12,9 ± 0,1	0,75 ± 0,06
Tinto, Ribatejo	17,5 ± 0,3	0,99 ± 0,05
Tinto, Beira Alta	15,5 ± 0,2	0,70 ± 0,03
Tinto, Algarve	13,7 ± 0,2	0,72 ± 0,06
Tinto, Douro	14,0 ± 0,1	0,69 ± 0,09
Tinto, Ribatejo	16,7 ± 0,2	0,84 ± 0,05
Tinto, Região do Vinho Verde	3,13 ± 0,06	0,086 ± 0,004
Branco, Alentejo	1,83 ± 0,06	0,11 ± 0,01
Branco, Alentejo	1,4 ± 0,1	0,10 ± 0,02
Branco, Penafiel	1,77 ± 0,06	0,19 ± 0,01
Branco, Estremadura	2,5 ± 0,1	0,012 ± 0,002
Branco, Douro	2,91 ± 0,06	0,07 ± 0,01
Branco, Douro	1,90 ± 0,06	0,06 ± 0,01
Branco, Região do Vinho Verde	2,45 ± 0,06	0,18 ± 0,01
Branco, Região do Vinho Verde	2,63 ± 0,06	0,20 ± 0,01
Branco, Região do Vinho Verde	2,78 ± 0,06	0,21 ± 0,01
Branco, Região do Vinho Verde	2,73 ± 0,06	0,16 ± 0,01
Branco, Madeira	0,81 ± 0,01	0,029 ± 0,002

* ± desvio padrão de 4 determinações

5.4 Conclusões

Relativamente às metodologias discretas já existentes é de realçar que as metodologias automáticas baseadas na estratégia SIA, aqui apresentadas, permitiram, num só sistema e com apenas um ciclo analítico, efectuar duas determinações que fornecem informações complementares acerca da capacidade antioxidante total dos vinhos. De facto, com a mesma montagem foi possível implementar um só procedimento analítico, que fornecia informação acerca de dois parâmetros num curto espaço de tempo. Tal situação só se tornou possível graças à grande versatilidade deste tipo de sistema, que permitiu a incorporação na mesma montagem de dois detectores diferentes, funcionando independentemente.

Por outro lado é importante salientar que as metodologias desenvolvidas são totalmente automáticas e representam uma evolução relativamente aos métodos clássicos, sujeitos à intervenção constante de um operador e a todos os erros associados a esta intervenção. De facto, para o ensaio do ABTS foi possível efectuar uma diluição das amostras, em linha, a partir das utilizadas para o ensaio de avaliação da actividade "scavenging", minimizando os erros que advêm deste tipo de operação, tendo em conta os níveis de diluição desejados (1:2000 e 1:400).

As metodologias desenvolvidas distinguiram-se ainda pelo baixo consumo de reagentes e baixa produção de efluentes. Comparando as metodologias para avaliação da actividade "scavenging" do peróxido de hidrogénio, a metodologia desenvolvida consumia 0,002 mg de AHV, 0,1 U de peroxidase e 0,0001 mg de peróxido de hidrogénio por determinação, enquanto que a metodologia discreta [14] correspondente gastava 0,02 mg de AHV, 0,1 U de peroxidase e 0,007 mg de peróxido de hidrogénio por determinação. Relativamente ao ensaio do ABTS, as metodologias desenvolvidas e

discretas [11] consumiam 0,002 e 0,08 mg de ABTS por determinação, respectivamente.

Adicionalmente, quando comparados com a metodologia desenvolvida em FIA [13], os métodos desenvolvidos em SIA apresentaram-se mais económicos em termos de reagentes, não exigiram a utilização de solventes orgânicos para diluição das amostras e graças à sua versatilidade permitiram, recorrendo a uma montagem simples, efectuar num curto espaço de tempo duas determinações com apenas um ciclo analítico.

Relativamente aos resultados obtidos pelas duas metodologias propostas, a comparação dos mesmos só pode ser feita a um nível relativo uma vez que os valores de TEAC são de uma ordem de grandeza completamente diferente, dada a especificidade das matrizes para determinados mecanismos antioxidantes. Deste modo, só podemos referir que os diferentes vinhos analisados, pelas duas metodologias, apresentaram um perfil de actividade antioxidante semelhante.

A análise das amostras revelou, como se esperava, uma forte relação do poder antioxidante com o tipo de vinho. Efectivamente, os vinhos tintos apresentaram em ambas as determinações capacidades antioxidantes, em termos de TEAC, muito superiores, estando em bom acordo com dados exibidos na literatura [7, 11, 13, 29-31] em que se associa a elevada capacidade antioxidante dos vinhos tintos com o elevado teor de substâncias polifenólicas presentes neste tipo de vinho. A baixa capacidade antioxidante dos vinhos brancos provenientes das diversas regiões está, muito provavelmente, associada ao processo de fabrico a que são sujeitos e ao tipo de uvas usadas na sua produção.

Relativamente às substâncias antioxidantes estudadas adicionalmente, é de salientar que na sua maioria apresentaram capacidades antioxidantes inferiores à exibida pelo trolox, nas mesmas condições, e que apenas o ácido gálhico exibiu um perfil semelhante nos

dois ensaios, sendo a única substância que apresentou capacidade antioxidante e capacidade "scavenging" superiores às do trolox, nas condições dos ensaios.

As duas metodologias, recorrendo a mecanismos reaccionais totalmente diferentes, permitiram a avaliação do poder antioxidante específico para cada uma das situações e forneceram portanto informações que se complementam no estudo do poder antioxidante total do vinho e das substâncias antioxidantes em geral, podendo constituir uma alternativa às metodologias já existente ou mesmos ser implementadas na análise enológica de rotina.

Adicionalmente, as metodologias desenvolvidas podem, em situações em que tal possa ser vantajoso, ser aplicadas independentemente dada a simplicidade do ciclo analítico e a independência em termos de detecção. De facto, as duas metodologias poderão ser implementadas separadamente, dividindo o ciclo analítico em duas partes distintas, correspondentes a cada uma das determinações.

5.5 Referências bibliográficas

[1] R.Wei Min, J. Nielsen, J. Villadsen, Anal. Chim. Acta 320 (1996) 199.

[2] R.I. Stefan, J.F. van Staden, H.Y. Aboul-Enein, Talanta 64 (2004) 151.

[3] A.M. Pimenta, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, Anal. Chim Acta 470 (2002) 185.

[4] O.I. Aruoma, A. Múrcia, J. Butler, B. Halliwell, J. Agric. Food Chem. 41 (1993) 1880.

[5] R.J. Gronbaek, A. Deis, T.I.A. Sorensen, U. Becker, P. Schnohr, G. Jensen, Br. Med. J. 310 (1995) 1165.

[6] R.J. Gryglewsky, R.Korbut, J. Robak, J. Swies, Biochem. Pharmacol. 36 (1987) 317.

[7] L.Campanella, A. Bonami, E. Finotti, M. Tomassetti, Biosens. Bioelectron- 19 (2004) 641.

[8] P.A. Kilmartin, H. Zou, A.L. Waterhouse, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 1957.

[9] V. Fogliano, V. Verde, G. Randazzo, A. Ritieni, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 1035.

[10] M. B. Arnao, Trends Food Sci. Technol. 11 (2000) 419.

[11] R.C. Minussi, M. Rossi, L. Bologna, L. Cordi, D. Rotilio, G.M. Pastore, N. Durán, Food Chem. 82 (2003) 409.

[12] D. Villaño, M.S. Fernández-Pachón, A.M. Trancoso, M.C. García-Parrilla, Talanta 64 (2004) 501.

[13] J.W. Costin, N.W. Barnett, S.W. Lewis, D.J. McGillivery, Anal. Chim. Acta 499 (2003) 47.

[14] M. Paździoch-Czochra, A. Wideńska, Anal. Chim. Acta 452 (2002) 177.

[15] J.N. Miller, C. Rice-Evans, V. Gopinathan, A. Milner, Clin. Sci. 84 (1993) 407.

[16] C. Rice Evans, N.J. Miller, Methods Enzymol. 234 (1994) 279.

[17] M.B. Arnao, A. Cano, J. Hernández-Ruiz, F. Gracía-Cánovas, M. Acosta, Anal. Biochem. 236 (1996) 255.

[18] O Benavente-García, J. Castillo, J. Lorente, A. Ortuño, Food Chem. 68 (2000) 457.

[19] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Free Radic. Biol. Med. 26 (1999) 1231.

[20] R. van den Berg. G.R.M.M. Haenen, H van den Berg, A. Bast, Food Chem. 66 (1999) 511.

[21] A.M. Alonso, C. Domínguez, D.A. Guillén, C.G. Barroso, J. Agric. Food Chem 50 (2002) 3112.

[22] M. Antolovich, P.D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards, Analyst 127 (2002) 183.

[23] F.Gaboriau, J.G. Delcros, J.P. Moulinoux, J. Pharm. Toxic. Meth. 47 (2002) 33.

[24] Y.Z. Li, A. Townshend, Anal. Chim. Acta 340 (1997) 159.

[25] A. Boveris, E. Martino, A.O.M. Stoppani, Anal. Biochem. 80 (1997) 145.

[26] J.T. Cobett, J. Biochem. Biophys. Meth. 18 (1989) 297.

[27] G.D. Marshall, J.F. van Staden, Proc. Contr. Qual. 3 (1992) 251.

[28] A Baron, M. Guzman, J. Ruzicka, G.D. Christian, Analyst 117 (1992) 1839.

[29] E.N. Frankel, A.L. Waterhouse, P.L. & Teissedre, J. Agric. Food Chem. 43 (1995) 890.

[30] J. Kanner, E. Frankel, R. Granit, B. German, J.E.& Kinsella, J. Agric. Food Chem. 42 (1994) 64.

[31] D.P. Makris, E. Psarra, S. Kallithraka, P. Kefalas, Food Res. Inter. 36 (2003) 805.

CAPÍTULO 6

Determinação de indometacina em formulações farmacêuticas

6. Determinação de indometacina em formulações farmacêuticas

6.1 Introdução

Em sistemas de fluxo, a unidade de propulsão de fluidos é um elemento crítico já que o seu modo de actuação determina as característica do fluxo gerado, afectando inevitavelmente a natureza do movimento das soluções no interior da montagem e em última análise a extensão da mistura das zonas inseridas [1, 2].

As diferentes técnicas de fluxo nomeadamente a análise por injecção em fluxo (FIA), a análise por injecção sequencial (SIA) e a multicomutação recorrem a unidades de propulsão similares dependendo a escolha do tipo de montagem, do tipo e número de reagentes envolvidos na determinação e das características do fluxo [3]. Várias unidades de propulsão têm vindo a ser descritas e usadas em sistemas de fluxo nomeadamente bombas peristálticas [4], de pistão [5] e electrosmóticas [6], seringas automáticas [7], unidades baseadas na força da gravidade [8] e reservatórios de gás pressurizado [9]. A escolha tem recaído mais frequentemente sobre as bombas peristálticas provavelmente devido à sua elevada versatilidade e robustez [1, 3]. No entanto, tal como já foi referido no Capítulo 1 desta dissertação, este tipo de dispositivo exibe algumas limitações relacionadas sobretudo com oscilações indiscriminadas das características do fluxo gerado, muitas vezes erradamente consideradas fluxo pulsado [3, 10]. De facto, o modo de operação das bombas peristálticas e a perda de elasticidade dos tubos de propulsão [1] originam o aparecimento de pulsos não controlados, que podem ser particularmente

inconvenientes em situações que envolvem períodos de propulsão/aspiração curtos. Este tipo de problema pode ser contornado pela troca periódica do tubo de propulsão e, no caso dos sistemas SIA, pela incorporação de um mecanismo de sincronização, como o descrito no Capítulo 2 (Componentes dos sistemas de fluxo, Dispositivos de aspiração/propulsão). As bombas de pistão e as seringas automáticas embora sejam dispositivos robustos capazes de gerar um fluxo praticamente isento de pulsos, são de custo elevado e necessitam de reenchimento durante as determinações, o que diminui consideravelmente o ritmo de amostragem destas [2]. As restantes unidades de propulsão referidas têm sido aplicadas em situações muito específicas, sendo o seu uso relativamente restrito.

De um forma geral, a unidade de propulsão deverá, qualquer que seja o sistema em que está incorporada, originar um fluxo laminar de caudal reprodutível e isento de pulsos aleatórios, ser resistente a reagentes e solventes agressivos, permitir o rápido ajuste do caudal e envolver baixos custos de manutenção [3].

O conceito de unidade de propulsão aqui apresentado foi recentemente alterado de modo significativo, devido à utilização de microbombas solenóides como unidades propulsoras em sistemas de fluxo, originando um fluxo pulsado totalmente controlado [11, 12]. As microbombas solenóides são unidades económicas e robustas que originam um fluxo pulsado reprodutível e facilmente controlado, que tem sido considerado uma mais valia no desenvolvimento de procedimentos analíticos [10, 11-16]. De facto as microbombas, responsáveis pela aspiração e propulsão de soluções em sistemas de fluxo, actuam por movimento repentino do seu diafragma interno, provocando um movimento caótico das soluções em todas as direcções o que contribui para uma mistura mais rápida e eficiente de zonas vizinhas, favorecendo o desenvolvimento da reacção [17].

Em sistemas SIA convencionais, graças ao funcionamento da válvula selectora por aspiração sequencial e inversão do sentido do fluxo, a mistura das zonas aspiradas é limitada, já que ocorre a partir da colocação de soluções topo a topo. Deste modo, justifica-se o investimento em estratégias que incrementem o grau de mistura das zonas vizinhas, neste tipo de montagem. De forma a incrementar o grau de mistura das zonas, recorre-se muitas vezes a estratégias para aumentar a dispersão tais como a utilização de câmaras de mistura, caudais de propulsão baixos, tubos reactores longos e paragens de fluxo. Como já foi referido no Capítulo 1, noutras técnicas de fluxo em que a mistura das diversas zonas ocorre por confluência, a mistura é mais eficiente e o recurso a este tipo de estratégia é mais limitado [18].

O objectivo do trabalho desenvolvido consistia em hifenizar os sistemas SIA e multibomba numa mesma montagem, utilizando microbombas solenóides, como unidades propulsoras no sistema SIA. O modo de funcionamento do sistema SIA, de fluxo pulsado, resultante seria avaliado analisando as características hidrodinâmicas do fluxo obtido e a influência deste no grau de mistura das zonas aspiradas, através de estudos de penetração de zonas, semelhantes aos realizados por Gübeli *et al* [19] em sistemas SIA em que, supostamente, a natureza do fluxo é laminar. De facto, a incorporação de microbombas solenóides, como sistema de propulsão, num sistema SIA, parece ser teoricamente uma boa estratégia para incrementar o grau de mistura das zonas aspiradas sequencialmente, melhorando assim a performance analítica das montagens.

A utilidade analítica da estratégia proposta foi testada por aplicação da mesma à determinação de indometacina em formulações farmacêuticas. A determinação baseava-se na reacção de hidrólise alcalina da indometacina, na presença de hidróxido de sódio [20]. A indometacina (ácido 1-(*p*-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-3-indolacético) é um

derivado indol metilado com propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas similares às do salicilato, utilizada no tratamento de artrite reumatóide e outras doenças reumáticas [21].

Arruda *et al* efectuaram a determinação fosforimétrica de indometacina usando papel cromatográfico como substrato sólido [22]. Foram propostos alguns métodos espectrofotométricos, que se baseavam na formação de compostos corados por reacção com N-bromosuccinimida [23], molibdato de amónio [24] e com uma mistura de m-aminofenol e cloramina T [25], efectuando-se neste caso também a detecção fluorimétrica do produto da reacção. A utilização de técnicas potenciométricas, recorrendo a eléctrodos selectivos a iões [26], e voltamétricas, fazendo uso de eléctrodos de pasta de carbono [27], revelou-se interessante em termos de sensibilidade, o que poderá ter interesse apenas na aplicação a amostras biológicas. Mais recentemente, foi desenvolvido um sistema SIA para estudos de libertação de indometacina a partir de formulações semi-sólidas, envolvendo a determinação fluorimétrica do produto da hidrólise em meio alcalino [28]. A calibração era efectuada meramente por aspiração de padrões de indometacina preparados em NaOH e registo dos sinais, ocorrendo a reacção fora do sistema de fluxo.

A maioria das metodologias correntemente utilizadas requerem equipamentos específicos e dispendiosos e manipulações extensas das amostras, o que afecta o ritmo de amostragem e aumenta a possibilidade de ocorrência de erros que afectam a precisão e a exactidão.

6.2 Materiais e métodos

6.2.1 Reagentes e soluções

Visando avaliar o efeito das microbombas na extensão da mistura das zonas aspiradas no sistema de fluxo, foram efectuados estudos de penetração de zonas recorrendo a soluções de azul de bromotimol e de quinino 10 mg l^{-1}, ambas preparadas em água. A solução de azul de bromotimol era preparada dissolvendo 0,4 g de corante em 25 ml de etanol 96 %, perfazendo-se o volume de 100 ml com uma solução de bórax 0,01 mol l^{-1}. Diariamente preparava-se uma solução de trabalho diluindo 1 ml da solução de azul de bromotimol em 199 ml de solução de bórax [29].

As soluções de calibração de indometacina eram preparadas diariamente por diluição rigorosa de um solução de concentração $1x10^{-4}$ mol l^{-1}, numa solução de brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB) 20 mmol l^{-1}.

Diariamente preparava-se uma solução de NaOH de concentração 0,1 mol l^{-1}, por dissolução da quantidade adequada de sólido em água.

6.2.2 Aparelhagem

O sistema de fluxo foi idealizado como um sistema SIA de configuração convencional, mas em que a bomba peristáltica ou seringa, correntemente utilizadas, foram substituídas por duas microbombas solenóides, de 8 µl de volume de pulso, (Figura 6.1, MB1 e MB2) conectadas por uma confluência em forma de Y (Figura 6.1, Y). Uma vez que são dispositivos unidireccionais (entrada-saída), as microbombas foram posicionadas no sistema em posições opostas, de modo que a MB1 tinha a sua posição de entrada conectada à confluência, enquanto que a MB2 se encontrava ligada à

confluência através da sua posição de saída. Deste modo a microbomba MB1 era responsável pela aspiração das soluções, para o tubo de armazenamento, a partir da válvula selectora e a microbomba MB2 estava encarregue da propulsão da solução transportadora ao longo do sistema e, mais concretamente, do encaminhamento das soluções aspiradas em direcção ao detector.

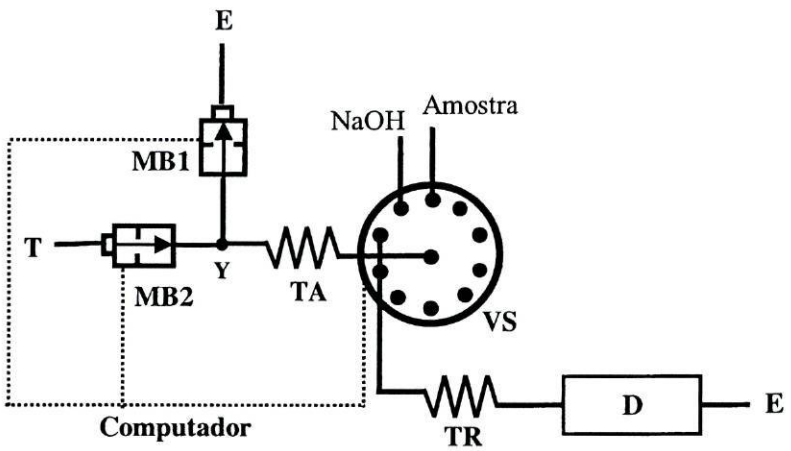


Figura 6.1 Esquema da montagem SIA usada na determinação de indometacina em formulações farmacêuticas. T: solução transportadora; MB1, MB2: micro bomba solenóide; VS: válvula selectora; TA: tubo de armazenamento; TR: tubo reactor; F: detector fluorimétrico; E: esgoto.

A montagem SIA incorporava tubos de armazenamento e reactor de 1,5 m cada (Figura 6.1, TA e TR).

Nos estudos de penetração de zonas foram também utilizadas micro bombas de 5 µl (090SP12-5 Bio-chem Valve Inc., Boonton, EUA) e 25 µl (120SP12-25 Bio-chem Valve Inc., Boonton, EUA) de volume de pulso.

As determinações espectrofotométricas (λ=620 nm) foram efectuadas num espectrofotometro adaptado a determinações de fluxo, já descrito no Capítulo 2. Os estudos de penetração de zona envolvendo detecção fluorimétrica decorreram a comprimentos de onda de excitação e de emissão de 350 e 450 nm, respectivamente.

As microbombas funcionavam por intermédio de uma placa CoolDrive^{TM}, NResearch Inc.

Os restantes componentes da montagem nomeadamente válvula selectora, fluorimetro e registador, foram já referidos pormenorizadamente no Capítulo 2.

As determinações fluorimétricas referentes à determinação de indometacina foram efectuadas a comprimentos de onda de excitação e emissão de 278 e 358 nm, respectivamente.

A análise das cápsulas de libertação prolongada, pelo procedimento de referência preconizado pela Farmacopeia Americana USP 24 [30], foi efectuada num cromatografo da marca Merck Hitachi. As amostras de comprimidos e cápsulas foram analisados segundo a mesma farmacopeia num espectrofotometro UV/VIS (318 nm). Ambos os aparelhos foram já referidos no Capítulo 2 (Instrumentação).

6.2.3 Procedimento experimental

O modo de operação do sistema de fluxo idealizado para a determinação de indometacina em formulações farmacêuticas estava condicionado pelo funcionamento particular das microbombas, que origina um fluxo pulsado. A optimização dos volumes de amostra e reagente era efectuada em termos do número de pulsos, sendo os volumes, múltiplos do volume de pulso (8xn pulsos). Por seu lado os caudais de aspiração e propulsão eram definidos em termos de frequência de actuação das microbombas.

Antes do início das determinações, toda a tubagem do sistema e a célula de fluxo eram preenchidas com água desionizada, já referida no Capítulo 2.

O ciclo analítico (Tabela 6.1) iniciava-se com a aspiração de 8 μl (1pulso) de NaOH entre 2 segmentos de amostra de 24 μl cada (3 pulsos), através da microbomba MB1 (Figura 6.1, MB1). Em seguida, por actuação da microbomba MB2 (Figura 6.1, MB2), a zona reaccional era encaminhada para o detector originando um sinal analítico de amplitude proporcional à concentração de indometacina.

Tabela 6.1 Ciclo analítico para a determinação de indometacina em formulações farmacêuticas no sistema de fluxo pulsado.

Etapa	Posição da válvula	Volume (μl)	Caudal (ml min^{-1})	Sentido do fluxo	Descrição da etapa
1	1	24	0,8	Aspiração	Aspiração de amostra
2	2	8	0,8	Aspiração	Aspiração de NaOH
3	1	24	0,8	Aspiração	Aspiração de amostra
4	3	----	0,8	Propulsão	Propulsão para o detector fluorimétrico

6.2.4 Metodologia de referência

Com objectivos comparativos, as amostras das formulações farmacêuticas contendo indometacina, foram também analisadas pelas metodologias de referência preconizadas pela Farmacopeia Americana USP 24, para comprimidos, cápsulas e cápsulas de libertação prolongada [30].

O conteúdo de vinte comprimidos (Dolovin, comprimidos 25 mg) e cápsulas (Indocid, cápsulas 25 mg) era pesado e pulverizado em almofariz de porcelana. Calculava-se a quantidade correspondente ao peso médio de uma unidade de cada formulação e dissolvia-se em metanol uma quantidade de amostra referente a 25 mg de indometacina. Em seguida procedia-se à extracção do princípio activo com diclorometano. A concentração de indometacina era avaliada por medição da absorvência da solução final a 318 nm.

O conteúdo de vinte cápsulas de libertação prolongada (Indocid retard, cápsulas de libertação prolongada 75 mg) era pulverizado em almofariz de porcelana. Posteriormente dissolvia-se o equivalente a 75 mg de indometacina numa mistura de acetonitrilo e ácido fosfórico. A solução obtida era filtrada e analisada por HPLC (do inglês "High Performance Liquid Chromatography". O sistema cromatográfico incorporava uma coluna C-18 e usava como eluente uma mistura de metanol, água e ácido fosfórico (600:400:0,8). A detecção da indometacina era efectuada a 240 nm.

As soluções de amostra, para análise pela metodologia desenvolvida, eram preparadas por pesagem e dissolução da quantidade adequada de formulação pulverizada, obtida como já foi descrito anteriormente para os procedimentos de referência, numa solução de CTAB 20 mmol l^{-1}.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Avaliação do grau de penetração de zonas no sistema de fluxo pulsado

A natureza pulsante, do modo de actuação das microbombas solenóides, origina um fluxo pulsado, com características distintas das do fluxo laminar obtido com bombas peristálticas ou seringas, que afecta o tipo e a extensão da mistura que ocorre no sistema de fluxo. Efectivamente, o movimento repentino e repetitivo do diafragma das microbombas origina um fluxo instantâneo, com períodos de paragem muito curtos, induzindo um movimento caótico das soluções em todas as direcções que afecta o grau de dispersão [11, 17].

Os estudos de penetração de zonas efectuados tinham como objectivo avaliar o efeito do fluxo pulsado criado pelas microbombas, no grau de dispersão e de penetração de zonas no sistema de fluxo. Por outro lado, pretendia-se ainda comparar o comportamento geral do sistema com o de um sistema SIA convencional, de fluxo laminar. Uma vez que, num sistema SIA as operações mais importantes são a aspiração sequencial e a dispersão mútua de zonas, os parâmetros $S_{1/2}$ e P foram avaliados com fins comparativos. Estudos semelhantes foram efectuados por Gübeli *et al* [19], na fase de aparecimento da técnica SIA, com o objectivo de avaliar a influência de vários factores sobre o grau de penetração de zonas de amostra e reagente.

O parâmetro $S_{1/2}$ é definido como o volume de amostra que origina um sinal correspondente a metade do obtido com a amostra não diluída ou, por outras palavras, é o volume de amostra necessário para obter um valor de dispersão igual a 2 (D=2). O valor de $S_{1/2}$ é específico de cada sistema e permite avaliar a dispersão de uma zona, em qualquer sistema de fluxo, independentemente da sua configuração ou tipo de fluxo [19, 31].

Já foi referido anteriormente (Capítulo 1) que o valor de P quantifica o grau de penetração de duas zonas aspiradas sequencialmente e é determinado, por medição, no registo gráfico de duas zonas sobrepostas. O valor de P varia entre 0 e 1, e uma sobreposição total corresponde a um valor de P=1 [19].

Procurando uma avaliação comparativa com os estudos de Gübeli *et al*, foi estipulado um procedimento que visava avaliar, através da medição do valor de P, o grau de mistura das soluções em sistemas de injecção sequencial, que operavam com microbombas de volume de pulso de 5, 8 e 25 μl ou com uma bomba peristáltica, como unidades de propulsão. O procedimento envolvia a aspiração sequencial de diferentes volumes de amostra e reagente, previamente definidos a partir do valor de $S_{1/2}$, seu encaminhamento para o detector e posterior medição do valor de P, a partir do registo gráfico das zonas sobrepostas. O valor de $S_{1/2}$ foi calculado para cada uma das montagens por aspiração de volumes crescentes de uma solução de azul de bromotimol de concentração $1x10^{-4}$ mol l^{-1} e detecção espectrofotométrica dos mesmos, já que os estudos que serão descritos em seguida visavam efectuar uma comparação com o primeiro estudo efectuado sobre sobreposição de zonas em montagens SIA [19].

Nos estudos realizados, considerou-se que em todas as situações a primeira alíquota aspirada correspondia à amostra e que a segunda correspondia ao reagente. Assim, numa primeira fase aspirava-se um dado volume de amostra (azul de bromotimol), seguido de uma alíquota de reagente (água). A zona reaccional formada era encaminhada para o detector espectrofotométrico a um caudal de 0,8 ml min^{-1}. Num ensaio posterior, a ordem de aspiração invertia-se de modo que se aspirava primeiro uma alíquota de água, agora usada como amostra, e em seguida um dado de volume de solução de azul de bromotimol, funcionando agora como reagente. A zona reaccional era encaminhada para o detector e obtinha-se o registo sobreposto dos dois ensaios, a

partir do qual se efectuava a medição do valor de P (Figura 6.2). Em ambos os ensaios os volumes de amostra (V_a) e de reagente (V_r) eram idênticos. Este procedimento foi repetido para volumes distintos de V_a e de V_r e para diferentes proporções de V_a/V_r.

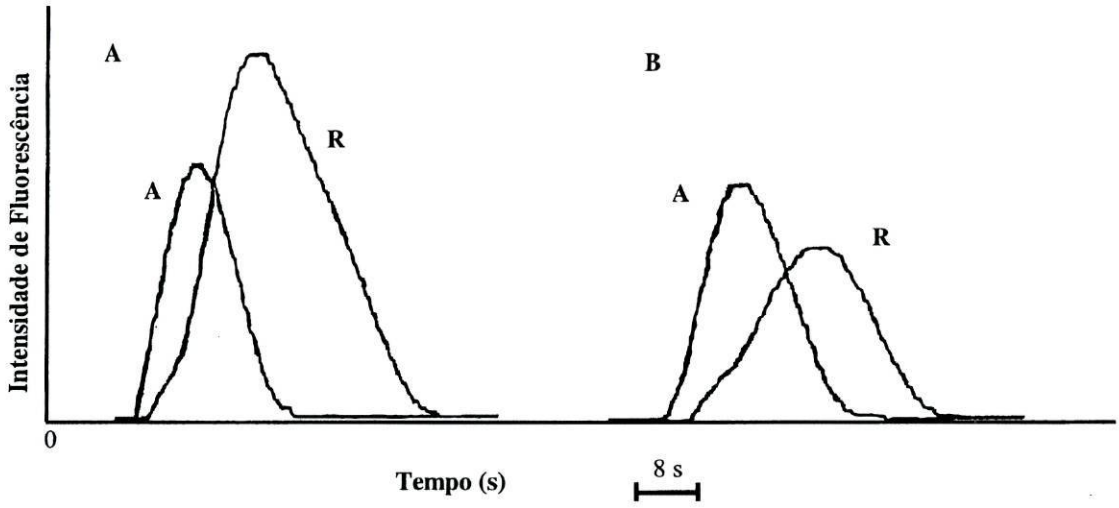


Figura 6.2 Registo gráfico da penetração de zonas de amostra (A) e reagente (R), num sistema de fluxo pulsado que incorporava duas microbombas de 25 µl de volume de pulso, um detector espectrofotométrico com uma célula de fluxo de 8 µl e um tubo reactor de 1m. A: $V_r=S_{1/2}$; $V_a=0{,}25S_{1/2}$; P=0,569; B: $V_r=V_a=S_{1/2}$; Espaçador=$0{,}25S_{1/2}$; P=0,686.

Os estudos abrangeram também uma situação de aspiração sequencial de três zonas em que se inclui uma solução espaçadora (água), de volume variável, entre as alíquotas de amostra e reagente.

utilização de microbombas como sistema de propulsão, relativamente à situação em que se recorre a uma bomba peristáltica.

Tabela 6.2 Valores de P e de $S_{1/2}$ obtidos com sistemas SIA de fluxo pulsado incorporando microbombas de 5, 8 e 25 μl de volume de pulso e de fluxo laminar incorporando uma bomba peristáltica.

Condições do ensaio	Sistema SIA de fluxo pulsado (5 μl)		Sistema SIA de fluxo pulsado (8 μl)		Sistema SIA de fluxo pulsado (25 μl)		Sistema SIA de fluxo laminar	
	$S_{1/2}$ (μl)	**P**	**$S_{1/2}$ (μl)**	**P**	**$S_{1/2}$ (μl)**	**P**	**$S_{1/2}$ (μl)**	**P**
Tubo reactor 1m								
$V_a = V_r = 0{,}25S_{1/2}$		0,947		0,936		0,878		0,875
$V_a = V_r = 2{,}5S_{1/2}$		0,710		0,690		0,635		0,623
$V_a = 0{,}25S_{1/2}$; $V_r = S_{1/2}$		0,888		0,878		0,844		0,833
$V_a = 2{,}5S_{1/2}$; $V_r = S_{1/2}$		0,654		0,643		0,569		0,560
$V_a = V_r = S_{1/2}$; Esp = $0{,}25S_{1/2}$	140	0,734	180	0,690	175	0,686	157	0,666
$V_a = V_r = S_{1/2}$; Esp = $2{,}5S_{1/2}$		0,363		0,303		0,292		0,290
Sem tubo reactor								
$V_a = V_r = 0{,}25S_{1/2}$		1		1		0,950		0,863
$V_a = V_r = 2{,}5S_{1/2}$		0,735		0,696		0,666		0,620
$V_a = 0{,}25S_{1/2}$; $V_r = S_{1/2}$	120	0,974	129	0,970	125	0,880	122	0,823
$V_a = 2{,}5S_{1/2}$; $V_r = S_{1/2}$		0,390		0,680		0,684		0,559
$V_a = V_r = S_{1/2}$; Esp = $0{,}25S_{1/2}$		0,776		0,775		0,689		0,666
$V_a = V_r = S_{1/2}$; Esp = $2.5S_{1/2}$		0,373		0,333		0,307		0,258

V_a: volume de amostra; V_r: volume de reagente; Esp: volume de solução espaçadora

Os melhores valores de P foram obtidos com o sistema de fluxo que incorporava microbombas de volume de pulso de 5 μl. É ainda de realçar que mesmo o sistema que

incorporava microbombas de 25 μl originava níveis de penetração ligeiramente superiores do que o que utilizava uma bomba peristáltica como unidade propulsora.

Num sistema SIA convencional, um dos factores que afecta a dispersão de um forma mais marcada é o comprimento do tubo reactor, que liga a válvula SIA ao detector. Era portanto importante avaliar o efeito da variação do comprimento do tubo reactor em sistemas de fluxo pulsado incorporando microbombas de 5, 8 e 25 μl de volume de pulso. A avaliação do valor de P permitiu concluir que a presença de um tubo reactor de apenas 1 m originava um decréscimo mais acentuado do grau de penetração de zonas adjacentes, em sistemas de fluxo pulsado do que em sistemas de fluxo laminar. Isto deve-se provavelmente à atenuação do efeito dos pulsos, originados pelas microbombas, como consequência do aumento do percurso analítico entre a unidade de propulsão e o detector. Deste modo, genericamente, a implementação de uma reacção química rápida num sistema de fluxo pulsado, incorporando microbombas com as características técnicas das utilizadas, deve ocorrer suprimindo o tubo reactor, reduzindo-se assim o consumo de soluções, a produção de efluentes e o tempo de análise.

Foi também estudado o efeito do volume da célula de fluxo sobre o valor de P, tendo-se verificado que este diminuía com o aumento do volume da célula, muito provavelmente devido ao aumento da dispersão que ocorre nestas situações.

Por fim avaliou-se a influência de inversões do sentido do fluxo sucessivas, no sistema de fluxo pulsado, por aspiração de uma alíquota de solução espaçadora (água), de volume igual a $1{,}5S_{1/2}$, entre as alíquotas de amostra e reagente. Foram testadas até quatro inversões de fluxo e observou-se que apenas a primeira tinha um efeito significativo sobre o grau de penetração das zonas. De facto, os resultados obtidos revelaram que a partir da segunda inversão de fluxo os sinais analíticos e a sobreposição

das zonas de amostra e reagente não sofriam alteração significativa, estando em bom acordo com os estudos de Gübeli *et al* [19].

Uma vez que a montagem desenvolvida iria ser aplicada à determinação fluorimétrica de indometacina em formulações farmacêuticas, as avaliações descritas foram também efectuadas, paralelamente, num sistema com detecção fluorimétrica, recorrendo-se neste caso a uma solução de quinino como substância padrão (λ_{ex}=350 nm, λ_{em}=450 nm). Neste caso o valor de $S_{1/2}$ era calculado matematicamente, para cada uma das montagens, por aspiração de volumes crescentes de uma solução de quinino de concentração 10 mg l^{-1}. Os resultados obtidos revelaram, tal como nos ensaios espectrofotométricos, um aumento do valor de P relacionado com a utilização de microbombas como unidade de propulsão, indicando que o efeito do fluxo pulsado na extensão da mistura das zonas, no sistema de fluxo, é independente do tipo de detector, nos casos estudados.

6.3.2 Optimização dos parâmetros físico-químicos

A indometacina é um composto relativamente estável a pH neutro e que não exibe fluorescência nativa. No entanto, em meio alcalino a indometacina é facilmente hidrolisada graças ao grupo OH^- da sua função amina, formando-se um composto que pode ser determinado fluorimetricamente [20].

A fluorescência do produto da hidrólise da indometacina pode ser aumentada se a reacção ocorrer em meio micelar, já que se origina um microambiente organizado que favorece o desenvolvimento da reacção e consequentemente o aumento da intensidade da fluorescência do produto formado [20, 32]. Vários tensioactivos têm vindo a ser frequentemente utilizados em determinações analíticas, com o objectivo de solubilizar

compostos hidrofóbicos [33], aumentar a fluorescência de compostos pouco fluorescentes [34] e estabilizar as formas fluorescentes de compostos [35]. De um modo geral, a utilização de tensioactivos resulta num aumento da sensibilidade das determinações. Deste modo, foi estudada a influência, nos sinais analíticos, de tensioactivos neutros (Triton X), catiónicos (CTAB), aniónicos (dodecilsulfato de sódio-SDS) e zwiteriónicos (hexadecilfosfocolina-HDPC). Os estudos efectuados, na montagem de fluxo, envolveram a utilização de soluções dos vários tensioactivos, em concentrações superiores à sua concentração micelar crítica (cmc), como solventes para a preparação dos padrões de indometacina. Observou-se uma diminuição da intensidade dos sinais de fluorescência relacionada com a utilização de meios micelares originados com Triton X, SDS e HDPC, o que sugere um efeito protector das micelas relativamente à hidrolise alcalina da indometacina. Por outro lado, o tensioactivo CTAB exibiu um efeito catalítico, que resultava num aumento da intensidade da fluorescência, confirmando os resultados obtidos por vários autores em determinações fluorimétricas [35-38]. Deste modo, os estudos prosseguiram preparando os padrões de indometacina numa solução de CTAB de concentração 20 mmol l^{-1}, já que soluções de concentração superior embora originassem sinais analíticos mais intensos, eram de difícil manipulação devido à formação de bolhas no interior do sistema de fluxo.

A cinética da reacção era significativamente afectada pela concentração de NaOH, que tem portanto um impacto marcado na intensidade da fluorescência dos produtos de reacção [39]. Este impacto foi avaliado no sistema de fluxo pulsado, testando soluções de NaOH de concentração compreendida entre 0,05 e 1 mol l^{-1}, tendo-se verificado que soluções de concentração superior a 0,1 mol l^{-1} ocasionavam um decréscimo nos sinais de fluorescência registados, provavelmente como consequência de fenómenos de auto-absorção dos produtos da reacção. Consequentemente, e já que os sinais aumentavam

absorção dos produtos da reacção. Consequentemente, e já que os sinais aumentavam com o aumento da concentração até 0,1 mol l^{-1}, os estudos prosseguiram com uma solução de NaOH com essa concentração (Figura 6.3).

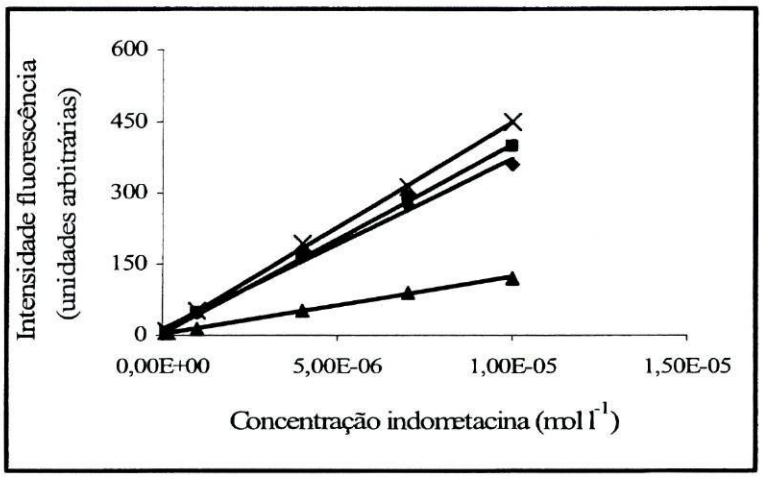


Figura 6.3 Influência da concentração da solução de NaOH nos sinais analíticos. Os resultados referem-se à análise de padrões de indometacina com soluções de NaOH de concentração 0,05 (■), 0,1 (x), 0,3 (♦) e 0,5 (▲) mol l^{-1}.

Relativamente à unidade de propulsão do sistema SIA de fluxo pulsado, foram seleccionadas microbombas de 8 µl de volume de pulso uma vez que, ainda que as microbombas de 5 µl originassem valores de P superiores, estas teriam que operar a uma frequência superior, para o mesmo caudal, o que se traduziria em irreprodutibilidade durante as aspirações e propulsões. Para além disto, considerando o limite superior de actuação das microbombas, o intervalo de caudais utilizáveis seria mais estreito.

propulsionados terem que ser obrigatoriamente múltiplos do volume de pulso da microbomba. No entanto num sistema de fluxo é mais importante haver garantia de reprodutibilidade na aspiração de um dado volume, do que existir a possibilidade de aspirar um dado volume. Por outro lado, esta limitação atenua-se à medida que diminui o volume de pulso da microbomba, uma vez que a variação de volume relativa a um pulso é cada vez menor, sendo possível ajustar o volume óptimo com alguma precisão. A avaliação da influência do volume de amostra na determinação foi efectuada estudando volumes entre 16 e 64 μl, correspondendo à aspiração de 2 a 8 pulsos de amostra. Os estudos prosseguiram utilizando 48 μl de amostra, já que, embora a utilização de volumes de amostra superiores resultasse num acréscimo da sensibilidade, originava uma perda de linearidade no intervalo de concentrações pretendido. A perda de linearidade está relacionada muito provavelmente com a escassez de NaOH para a reacção de hidrólise e poderia ser solucionada aumentando o volume de reagente. No entanto, haveria um consumo muito superior de amostra e reagente que não se justificariam com o pequeno aumento de sensibilidade.

O estudo do volume de NaOH, a intercalar na montagem, foi efectuado no intervalo entre 8 e 32 μl (1 a 4 pulsos da microbomba de 8 μl) tendo-se observado que volumes superiores a 8 μl não influenciavam significativamente o desenvolvimento da reacção, actuando meramente como agente de diluição. Deste modo, a optimização das condições experimentais prosseguiu por aspiração de apenas um pulso de NaOH, correspondente a 8 μl (Figura 6.4).

Dada a diferença de viscosidade e volume que se verificava entre amostra e a solução de NaOH, rentabilizou-se a natureza pulsada do fluxo criando duas zonas reaccionais, que contribuíram para um aumento da penetração das zonas de amostra e reagente. Assim, o

contribuíram para um aumento da penetração das zonas de amostra e reagente. Assim, o volume optimizado de amostra foi dividido em duas secções de 24 µl cada e estas foram separadas por uma alíquota de 8 µl de NaOH.

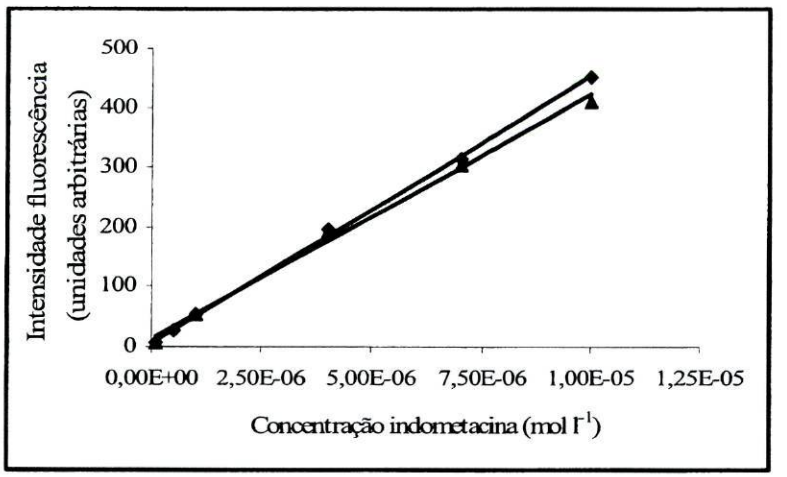


Figura 6.4 Influência do volume de NaOH nos sinais analíticos. Os resultados foram obtidos por análise de padrões de indometacina de concentração entre $1x10^{-7}$ e $1x10^{-5}$ mol l^{-1}, usando 8 (♦) e 16 µl (▲) de uma solução de NaOH 0,1 mol l^{-1}.

Dois parâmetros importantes, que afectaram a magnitude dos sinais analíticos, foram o caudal e o comprimento e configuração do tubo reactor. O caudal era determinado, neste caso, pela frequência de actuação e volume de pulso da microbomba. Tendo em conta que o limite operacional superior das microbombas é de 250 ciclos por minuto, era possível calcular o caudal máximo para cada tipo de microbomba [12]. Deste modo, a microbomba de 8 µl de volume de pulso podia funcionar até um caudal máximo de 2 ml min^{-1}. No sistema de fluxo pulsado desenvolvido o caudal era controlado em termos

de tempo de pulso que é definido como a soma dos tempos de paragem da microbomba nas posições activada e desactivada. Nestes ensaios, foram testados tempos de pulso entre 0,4 e 0,8 segundos, que correspondem a frequências de actuação entre 150 e 175 ciclos min^{-1} e a caudais entre 1,2 e 0,6 ml min^{-1}. Verificou-se que a intensidade de fluorescência aumentava com a diminuição do caudal, o que resultava num aumento do tempo de residência da zona reaccional no sistema de fluxo. Em ultima análise, caudais demasiado baixos originavam um aumento do tempo de análise e consequente diminuição do ritmo de amostragem. Como um compromisso entre a sensibilidade e o ritmo de amostragem foi escolhido um tempo de pulso de 0,6 segundos, correspondente a um caudal de 0,8 ml min^{-1}, para prosseguir a optimizações das condições experimentais.

Relativamente ao tubo reactor foram estudados comprimentos entre 0,5 e 1,5 m e configurações lisa, enrolada e em figuras de oito. Observou-se que um tubo reactor enrolado de 1,5 m assegurava uma mistura eficiente entre a amostra e o reagente conseguindo um compromisso entre a dispersão e o tempo de residência e promovendo um desenvolvimento reaccional adequado.

Nas condições experimentais optimizadas a curva de calibração era linear até uma concentração de indometacina de cerca de $1x10^{-5}$ mol l^{-1}. A equação definida por regressão linear da curva de calibração era $IF = 4x10^{7}$ ($\pm 2x10^{6}$) C + 5,2 ($\pm$10,2), com um coeficiente de correlação de 0,9990, em que IF se refere ao valor de intensidade de fluorescência e C à concentração de indometacina expressa em mol l^{-1}.

A Figura 6.5 representa o registo gráfico obtido durante a elaboração da curva de calibração e análise das amostras.

O limite de detecção da determinação, calculado como já foi exposto no Capítulo 2, era $1,6x10^{-8}$ mol l^{-1} e a metodologia permitia efectuar cerca de 30 determinações por hora.

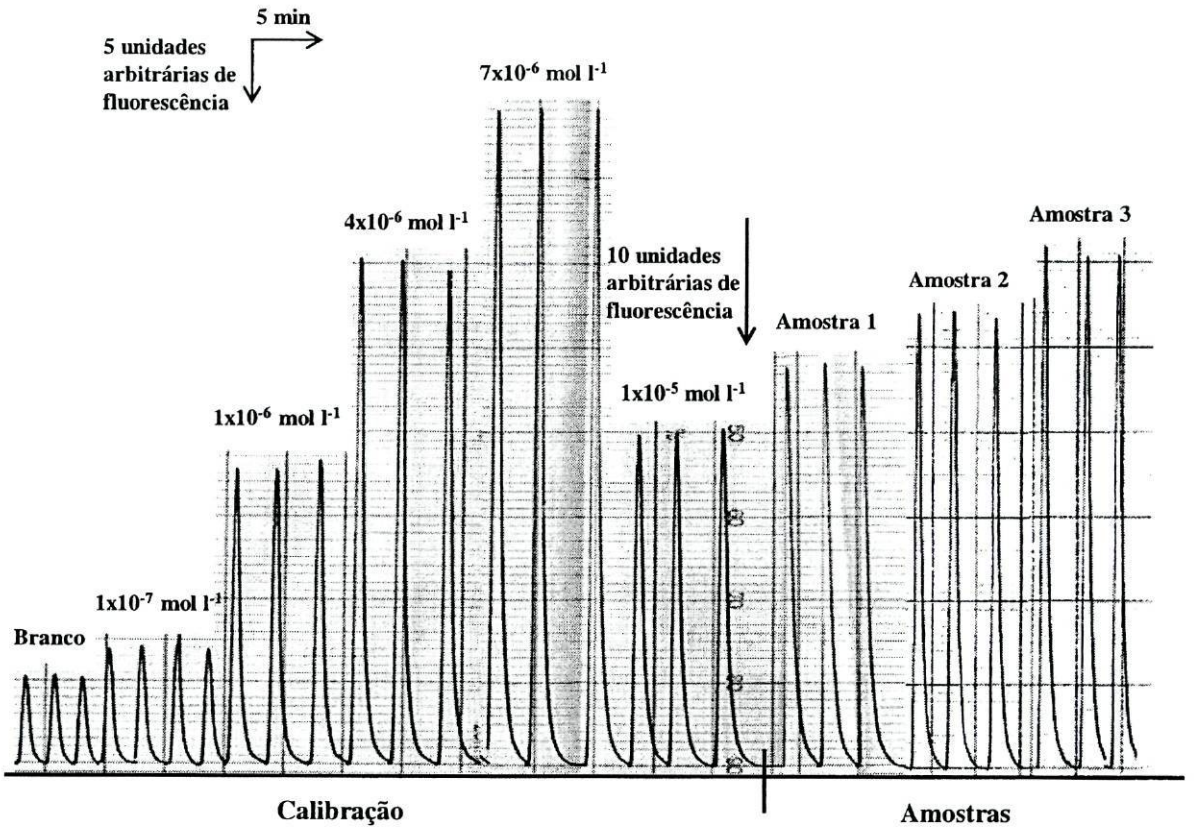


Figura 6.5 Registo gráfico obtido durante a elaboração da curva de calibração com padrões de indometacina e análise das amostras. Amostra 1: comprimidos; Amostra 2: cápsulas de libertação prolongada; Amostra 3: cápsulas.

6.3.3 Estudo de interferências

Uma vez que o procedimento analítico desenvolvido iria ser aplicado à análise de formulações farmacêuticas contendo indometacina, foi estudado o efeito sobre os sinais analíticos de alguns compostos, usualmente utilizados como excipientes nas formulações em causa. Foram analisadas, no sistema de fluxo pulsado, soluções de indometacina de concentração $1x10^{-5}$ mol l^{-1}, contendo concentrações crescentes de glucose, frutose, sacarose e galactose. Estabeleceu-se o critério de que um composto era

considerado interferente se a variação do sinal analítico, relativamente ao obtido na sua ausência, fosse superior a 3 %. Verificou-se que nenhum dos excipientes testados, em razão molar até 100 (indometacina/excipiente), originava sinais analíticos significativamente diferentes dos obtidos na sua ausência.

6.3.4 Análise das formulações farmacêuticas

A metodologia analítica desenvolvida foi aplicada à determinação de indometacina em formulações farmacêuticas sólidas, disponíveis no mercado português. As soluções de amostras de diferentes concentrações foram preparadas, a partir das formulações em estudo, como referido na secção Materiais e métodos deste capítulo, e posteriormente analisadas no sistema de fluxo pulsado optimizado. As formulações foram também analisadas pelos métodos de referência preconizados pela Farmacopeia Americana USP 24 para comprimidos, cápsulas e cápsulas de libertação prolongada [30].

Os resultados encontram-se esquematizados na Tabela 6.3 e como se pode observar não existem diferenças significativas entre os dois métodos, sendo os desvios relativos inferiores a 2,3 %.

Esta constatação foi confirmada pela realização do teste *t* de Student, para um nível de confiança de 95 %, que evidenciou a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos pelos dois métodos ($t_{calculado}$=0,626; $t_{tabelado}$=4,302).

A análise repetida (n=15) de soluções de amostra de indometacina de concentrações distintas ($4x10^{-7}$ e $4x10^{-6}$ mol l^{-1}), pela metodologia SIA desenvolvida, originou desvios padrão relativos inferiores a 1,2 %, revelando uma boa repetibilidade e confirmando a aplicabilidade da metodologia em todo o intervalo de linearidade.

Tabela 6.3 Resultados da análise das formulações farmacêuticas pelas metodologias SIA e de referência.

Amostra	SIA (mg indometacina/unidade)*	Método de referência (mg indometacina/unidade)*	Desvio Relativo (%)
Dolovin, comprimidos 25 mg	25,5 ± 0,4	25,3 ± 0,1	+0,8
Indocid, cápsulas 25 mg	24,9 ± 0,3	24,5 ± 0,1	+1,6
Indocid, cápsulas libertação prolongada 75 mg	73,5 ± 0,4	75,3 ± 0,5	-2,3

* ± desvio padrão de 4 determinações

6.4 Conclusões

O sistema de fluxo pulsado proposto, que incorporava como sistema de propulsão duas microbombas solenóides típicas de sistemas multibomba, exibia em termos de funcionamento geral as características de um sistema SIA convencional. De facto, o sistema demonstrou ser robusto, versátil, simples e fácil de operar, tendo portanto um comportamento muito semelhante aos sistemas SIA que incorporam bombas peristálticas ou seringas.

No entanto, a presença das microbombas como elemento de propulsão, originava um fluxo pulsado que revelou, tanto nos estudos de penetração de zonas como na aplicação a formulações farmacêuticas, favorecer a mistura de amostra e reagente no interior do sistema. De facto, os resultados obtidos permitiram observar um aumento significativo dos níveis de mistura de zonas adjacentes no interior do sistema, relacionado com o fluxo pulsado originado pelas microbombas, sobretudo pelas de baixo volume de pulso.

Noutra perspectiva, a ligação das microbombas através de uma confluência e o facto de elas operarem de forma independente resultou em vantagens evidentes para o sistema desenvolvido. Efectivamente, num sistema de fluxo com a configuração apresentada, os processos de aspiração e propulsão são independentes tornando impossível qualquer contaminação da solução transportadora com as soluções aspiradas. Consequentemente, foi possível encurtar o comprimento do tubo de armazenamento, que usualmente é superior a 2 m nos sistemas SIA convencionais, o que se traduziu em poupança de soluções. Por outro lado, esta particularidade poderia ser utilizada para implementação de uma estratégia de diluição para análise de amostras concentradas. É de facto possível efectuar a aspiração sequencial de amostra e reagente e proceder à rejeição de parte da zona reaccional por aspiração prolongada pela microbomba responsável pela aspiração das soluções (Figura 6.1, MB1). Deste modo, só a porção de zona reaccional que

permanecesse no tubo de armazenamento seria reamostrada e encaminhada para o detector.

Adicionalmente, o sistema de fluxo pulsado revelou ser de grande utilidade no que se refere à gestão de substâncias viscosas, tendo assumido portanto grande importância na determinação de indometacina por hidrólise alcalina na presença de NaOH. De facto, a implementação da determinação de indometacina, no sistema de fluxo pulsado, permitiu evitar as estratégias habituais para aumentar a dispersão de modo a facilitar a mistura, que se traduzem geralmente num aumento da complexidade do sistema e numa diminuição do ritmo de amostragem.

A metodologia desenvolvida para determinação de indometacina em formulações farmacêuticas pode constituir uma alternativa aos métodos já existentes para o mesmo fim, incluindo o método de referência da USP 24 [30], já que envolve a utilização de uma montagem de fluxo de configuração simples e permite efectuar a análise de uma forma rápida, sem manipulação extensiva da amostra. Adicionalmente, o consumo de amostra e reagente foi significativamente reduzido no sistema de fluxo pulsado, tendo-se gasto em cada determinação 32 μg de NaOH e 35 μg de CTAB.

Este trabalho permitiu evidenciar mais uma vez a extrema versatilidade dos sistemas SIA, baseados na aspiração sequencial a partir da válvula selectora, permitindo a sua hifenização com duas microbombas solenóides, elementos típicos de sistemas multibomba. A incorporação das microbombas no sistema SIA permitiu minimizar uma das limitações mais frequentemente referidas relativamente a esta técnica e que se prende com a mistura limitada de soluções aspiradas sequencialmente e colocadas topo a topo.

6.5 Referências bibliográficas

[1] G.D Christian, J. Ruzicka, Anal. Chim. Acta 261 (1992) 11.

[2] A. Ivaska, J. Ruzicka, Analyst 118 (1993) 885.

[3] R.C. Prados-Rosales, J.L. Luque-Garcia, M.D. Luque de Castro, Anal. Chim. Acta 461 (2002) 169.

[4] B. Karlberg, G.E. Pacey, Flow Injection Analysis: A pratical guide, Elsevier, Amesterdão, 1989.

[5] J. Ruzicka, G.D. Marshall, Anal. Chim. Acta 237 (1990) 329.

[6] S. Liu, P.K. Dasgupta, Talanta 41 (1994) 1903.

[7] G.D. Christian, J. Pharm. Biom. Anal. 10 (1992) 769.

[8] J.A. Vieira, I.M. Raimundo Jr, B.F. Reis, Anal. Chim. Acta 438 (2001) 75.

[9] P.K. Dasgupta, S. Liu, Anal. Chem. 66 (1994) 1792.

[10] P.S. Francis, S.W. Lewis, K.F. Lim, K. Carlsson, B. Karlberg, Talanta 58 (2002) 1029.

[11] R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, J. L. M. Santos, E. A. G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 466 (2002) 125.

[12] J. L. F. C. Lima, J. L. M. Santos, A.C.B. Dias, M.F.T. Ribeiro, E. A. G. Zagatto, Talanta 64 (2004) 1091.

[13] J. M. T. Carneiro, E. A. G. Zagatto, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, Anal. Chim. Acta 474 (2002) 161.

[14] J.L.F.C. Lima, S.M.O. Sá, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, J. Pharm. Biom. Anal. 32 (2003) 1011.

[15] A.C.B. Dias, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 499 (2003) 107.

[16] J.M.T. Carneiro, A.C.B. Dias, E.A.G. Zagatto, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, Anal. Chim. Acta 531 (2005) 279.

[17] E.B. van Akker, M. Bos, W.E. van der Linden, Anal. Chim. Acta 378 (1999) 111.

[18] C.E. Lenehan, N.W. Barnett, S.W. Lewis, Analyst 127 (2002) 997.

[19] T. Gübeli, G.D. Christian, J. Ruzicka, Anal. Chem. 63 (1991) 2407.

[20] C. Matos, H. Chaimovich, J.L.F.C. Lima, I.M. Cucovia, S. Reis, J. Pharm. Sci. 90 (2001) 298.

[21] Goodman & Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Pergamon Press, 8ª edição, 1990, p. 659.

[22] A.F. Arruda, A.D. Campiglia, Analyst 122 (1997) 559.

[23] S.T. Hassib, H.M. Safwat, R.I. El- Bagry, Analyst 111 (1986) 45.

[24] T. Aman, F. Naureen, A.A. Kazi, I.U. Khan, M.A. Kashmiri, Anal. Letters 35 (2002) 1007.

[25] C.S.P. Sastry, D.S. Mangala, K.E. Rao, Analyst 111 (1986) 323.

[26] R. Aubeck, C. Bräuchle, N. Hampp, Analyst 116 (1991) 811.

[27] M. Campos, M.D. Vázquez, M.L. Tascón, J.A. Acuña, P. Sánchez Batanero, Química Analítica 14 (1995) 117.

[28] P. Solich, H. Sklenářová, J. Huclová, D. Šatínský, U.F. Schaefer, Anal. Chim. Acta 499 (2003) 9.

[29] J. Ruzicka, E.H. Hansen, Flow Injection Analysis, Jonh Wiley and Sons, Nova York, 2ª edição, 1988, p.301.

[30] USP 24/NF 19, 1999, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., p. 874.

[31] A. Cladera, E. Gómez, J.M. Estela, V. Cerda, Talanta 43 (1996) 1667.

[32] W.L. Hinze, Use of Surfactant and Micellar Systems in Analytical Chemistry in Solutions Chemistry Surfactants, vol. 1, Plenum Press, Nova York, 1979, p. 79.

[33] P. Ramos-Lledó, S. Vera, M.P.S. Andrés, Fresenius J. Anal. Chem. 369 (2001) 91.

[34] N. Arnaud, S. Drevet, J. Georges, Analyst 119 (1994) 2453.

[35] M.Sbai, S.A. Lyazidi, D.A. Lerner, B. del Castillo, M.A. Martin, J. Pharm. Biom. Anal. 41(1996) 959.

[36] G. Jourquin, M.C. Mahedero, S. Paredes, J.C. Vire, J.M. Kauffmann, J. Pharm. Biom. Anal. 14 (1996) 967.

[37] S. Pandey, W.E. Acree Jr., J.C. Fetzer, Anal. Chim. Acta 324 (1996) 175.

[38] Q.G. Li, J.G. Xu, X.Z. Huang, G.Z. Chen, Anal. Chim. Acta 298 (1994) 279.

[39] M. Alkayer, J.J. Vallon, Y. Pégon, C. Bichon, Anal. Lett. 14 (1981) 1047.

CAPÍTULO 7

Estratégia de amostragem de óleos alimentares sem pré-tratamento

7. Estratégia de amostragem de óleos alimentares sem pré-tratamento

7.1 Introdução

As técnicas de fluxo, tal como já foi referido no Capítulo 1 desta dissertação, são reconhecidamente técnicas versáteis e com elevado potencial para aplicação na automatização de procedimentos analíticos, nas mais diversas áreas, tendo-se assistido, nos últimos anos, a uma utilização crescente deste tipo de técnica na análise de amostras complexas [1-3].

No entanto, a análise em sistemas de fluxo apresenta, de uma forma geral, limitações que não se colocam na análise em condições discretas. A amostragem é um dos processos que evidencia mais limitações quando a análise ocorre em condições de fluxo, sendo, na maior parte das situações, a amostra introduzida em solução, após pré-tratamento fora do sistema. De facto, são raras as situações em que amostras viscosas ou sólidas foram analisadas directamente num sistema de fluxo sem tratamento prévio [4-6].

As limitações relativas à amostragem em sistemas de fluxo são particularmente evidentes na análise de amostras de óleos alimentares. De facto, a análise e o controlo de qualidade de óleos alimentares, devido às características físico-químicas destes, têm vindo a ser efectuados recorrendo a métodos complexos, demorados e que envolvem, quase inevitavelmente, gasto elevado de reagentes e solventes orgânicos e produção de um volume elevado de efluentes [7-9].

No entanto, as vantagens dos sistemas de fluxo como a versatilidade, rapidez e simplicidade facilitam o desenvolvimento de metodologias analíticas envolvendo a utilização de solventes orgânicos, com baixa produção de efluentes, elevada precisão e ritmo de amostragem. De entre as metodologias de gestão de fluidos, que actualmente existem descritas, apenas a análise por injecção em fluxo (FIA) tem vindo a ser utilizada na análise de óleos alimentares [10]. De facto, foram já propostos sistemas FIA para a determinação, em óleos alimentares, de polifenóis [11-13], esteróis [14], peróxidos [15-17], hidroperóxidos [18, 19], ácidos gordos livres [20-24], índice de anisidina [25], índice de iodo [26], substâncias reactivas ao ácido 2-tiobarbiturico [27], metais [28, 29], pesticidas [30], glicerol [31] e anilina [32] entre outros.

A utilização limitada das técnicas de fluxo na análise de amostras oleosas prende-se, muito possivelmente, com as dificuldades relacionadas com a inserção da amostra no sistema, mas também com problemas decorrentes da dificuldade de mistura da amostra e consequente aparecimento de índices de refracção, que comprometem a detecção espectrofotométrica. Este tipo de problema tem-se revelado comprometedor ao ponto de, em algumas das metodologias FIA, já referidas no parágrafo anterior, as amostras serem sujeitas a um pré-tratamento, antes da sua introdução no sistema de fluxo, garantindo assim uma mistura total nos solventes utilizados e ausência de índice de refracção. Os pré-tratamentos mais frequentes consistem em diluições da amostra na solução transportadora [12, 17, 18, 26] mas há casos em que se aplicam tratamentos mais drásticos como extracções ou mesmos digestões [14, 19, 23, 29], sendo depois a amostra tratada injectada no sistema, numa diluição apropriada à determinação e isenta de interferências de matriz.

O objectivo principal do trabalho apresentado neste capítulo consistiu em desenvolver um sistema de fluxo baseado na análise por injecção sequencial (SIA), nunca antes usada

na análise de óleos alimentares, que permitisse a amostragem e análise de óleos alimentares sem tratamento prévio, tendo-se testado a associação de uma válvula de injecção, típica de sistemas FIA, a um sistema SIA. Esta associação pretendia abrir novas possibilidades na gestão de amostras oleosas, que não têm surgido, muito possivelmente, devido à utilização rígida de um único tipo de automatização.

A estratégia de amostragem de óleos, num sistema SIA, foi idealizada e desenvolvida tendo como base uma determinação analítica que faz parte do controlo de qualidade de rotina dos óleos edíveis, a determinação do teor de ferro (Fe(III)) [33]. O ferro está presente nos óleos na forma de Fe(III) [34], como resultado de contaminações durante o seu processamento e armazenagem. A sua presença está relacionada com alterações no sabor e na estabilidade devido a processos de oxidação. De facto, o Fe(III) actua, na presença de oxigénio, como um pró-oxidante durante a oxidação catalítica de hidroperóxidos, presentes habitualmente nos óleos. Neste processo originam-se cetonas e aldeídos, que alteram o sabor dos óleos, e novos radicais que dão continuidade ao fenómeno oxidativo [35].

Por estas razões, entidades como "The International Olive Oil Council" e "Codex Alimentarius Comission (FAO/WHO) " recomendam a determinação de Fe(III) nos vários tipos de óleos alimentares e impõem limites de 3 e 5 mg kg^{-1} de Fe(III) em azeites e 2,5 mg kg^{-1} em óleos refinados, respectivamente. O método recomendado, por estas entidades, para determinação de Fe(III) em amostras de óleo é a espectrometria de absorção atómica com atomização electrotérmica, que está também na base de alguns dos métodos referidos na literatura para o mesmo efeito [36-38]. Estes envolvem extracção previa do Fe(III) [36] ou modificação da matriz oleosa por saponificação [37] e emulsificação [38]. Existem ainda metodologias que envolvem extracção do Fe(III), em meio ácido, e posterior determinação espectrofotométrica na zona do visível [34] ou

por espectrometria de absorção atómica [39]. *Murillo et al* propuseram uma metodologia em que se procedia à emulsificação das amostras oleosas e se determinava cobre, níquel e ferro por ICP-AES [40]. Recentemente, Anthemidis *et al* apresentaram uma metodologia semelhante para análise multielementar de óleos alimentares [41]. Foi também efectuada a determinação de ferro em óleos edíveis, recorrendo ao método da adição de padrão, num sistema FIA, com detecção por espectrometria de absorção atómica, em que a amostra era usada como transportador no sistema de fluxo [42].

A determinação de Fe(III), no trabalho que se refere neste capítulo, baseou-se na reacção com tiocianato (SCN^-) em meio orgânico, tendo-se detectado o complexo formado a 510 nm. Esta reacção tem sido aplicada inúmeras vezes em meio aquoso pela sua rapidez, especificidade e simplicidade. Em meio orgânico a reacção foi já utilizada como intermediária na determinação de hidroperóxidos em óleos [18] e mais recentemente foi alvo de um estudo que demonstrou a estabilidade do complexo formado num solvente de diclorometano-metanol [43].

7.2 Materiais e métodos

7.2.1 Reagentes e soluções

Como solução transportadora, no sistema de fluxo, usava-se uma mistura de metanol:clorofórmio (15:85), desgaseificada em banho de ultra-sons, de modo a diminuir a ocorrência de bolhas gasosas no interior do sistema de fluxo.

A solução de tiocianato de amónio 0,05 mol l^{-1} era preparada por dissolução da quantidade adequada de sólido numa mistura de metanol:clorofórmio (35:65), contendo ácido nítrico, com uma concentração de 0,1 mol l^{-1}.

Os padrões oleosos de Fe(III) (0,5 – 25 mg kg^{-1}) eram preparados por diluição rigorosa de um padrão oleoso de concentração 5000 μg g^{-1} (Spex CertiPrep), numa matriz oleosa isenta de metais (Base oil 20, Spex CertiPrep). As diluições eram efectuadas por pesagem devido à dificuldade em pipetar rigorosa e reprodutivelmente os óleos.

A metodologia desenvolvida foi aplicada a nove amostras de azeite, uma de óleo de soja e uma de óleo de amendoim. Com objectivos comparativos, foram também analisadas duas amostras de óleo de soja certificadas (AOCS, contendo 7,98 ± 1.37 e 1,90 ± 0,79 mg kg^{-1} de Fe(III)).

7.2.2 Aparelhagem

O sistema SIA (Figura 7.1), desenvolvido para a determinação de Fe(III) em óleos alimentares, apresentava um reactor enrolado de 0,5 m de comprimento (Figura 7.1, TR). O tubo de armazenamento (Figura 7.1, TA), com um comprimento de 4 m, garantia que não havia contaminação da solução transportadora com as soluções aspiradas a partir da válvula selectora.

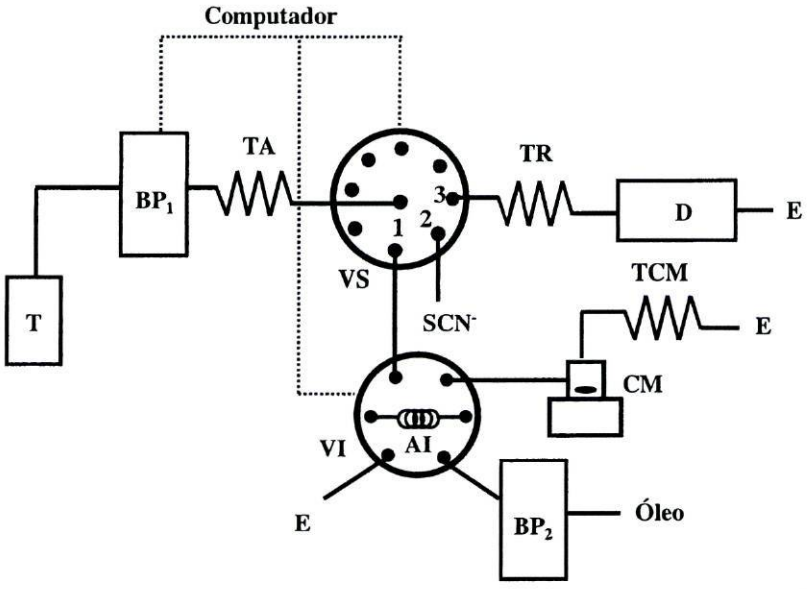


Figura 7.1 Esquema da montagem SIA usada na determinação de Fe(III) em óleos alimentares. T: solução transportadora; BP_1, BP_2: bomba peristáltica; VS: válvula selectora; VI: válvula de injecção; AI: alça de injecção; CM: câmara de mistura; TA: tubo de armazenamento; TR: tubo reactor; TCM: tubo da câmara de mistura; D: espectrofotometro; E: esgoto; SCN^-: solução de tiocianato de amónio 0,05 mol l^{-1}.

A montagem incorporava um módulo, constituído por uma válvula selectora (Figura 7.1, VS) e uma válvula de injecção (Figura 7.1, VI), com uma alça que comportava 150 µl de amostra, e uma bomba peristáltica (Figura 7.1, BP_1), já descritos no Capítulo 2. Foi utilizada uma segunda bomba peristáltica (Figura 7.1, BP_2) que era responsável pela inserção da amostra no sistema, através da alça da válvula de injecção (Figura 7.1, AI).

A câmara de mistura com agitação (Figura 7.1, CM), já referida no Capítulo 2, foi posicionada numa das saídas da válvula de injecção e tinha acoplado, ao seu orifício

superior, um tubo enrolado de 1 m de comprimento, igual ao usado na restante montagem.

Os restantes elementos da montagem, como o detector espectrofotometrico (510 nm) e o registador foram já referidos em pormenor no Capítulo 2.

7.2.3 Procedimento experimental

Antes do início das determinações, toda a tubagem do sistema e a célula de fluxo eram preenchidos com solução transportadora (metanol:clorofórmio; 15:85) e o tubo da porta 2 da válvula selectora e a alça da válvula de injecção eram preenchidos com solução de SCN^- e amostra, respectivamente.

O procedimento analítico para determinação de Fe(III) em óleos num sistema SIA, que se encontra resumido na Tabela 7.1, era composto por 7 etapas que perfaziam um total de cerca de 170 segundos.

O ciclo analítico iniciava-se com a aspiração de SCN^-, para o tubo de armazenamento, a partir da porta 2 da válvula selectora (Tabela 7.1, etapa 1). O reagente era encaminhado, por inversão do sentido do fluxo, para a câmara de mistura passando pela alça da válvula de injecção (Tabela 7.1, etapa 2), por mudança da posição desta para o modo de injecção. Ao passar pela alça, a solução de SCN^- empurrava a amostra, aí previamente inserida, para a câmara de mistura, onde a reacção colorimétrica se desencadeava. Na câmara de mistura existia, no fim das duas primeiras etapas do ciclo, uma mistura reaccional constituída por óleo, SCN^- e solução transportadora. Em seguida, uma alíquota da mistura reaccional era aspirada, pela tubagem que liga as duas válvulas, para o tubo de armazenamento e encaminhada para uma porta de esgoto (Tabela 7.1, etapas 3 e 4). Deste modo, garantia-se que toda a tubagem de ligação estava efectivamente

preenchida com mistura reaccional. A etapa 5 do ciclo analítico correspondia a uma reamostragem, em base de tempo, da mistura reaccional existente na câmara de mistura. A alíquota de mistura, aspirada para o tubo de armazenamento, era em seguida enviada, por reversão do sentido do fluxo, para o detector espectrofotométrico (Tabela 7.1, etapa 6). Ao mesmo tempo e, por activação da segunda bomba peristáltica, ocorria o processo de amostragem propriamente dito, durante o qual a alça da válvula de injecção era preenchida com nova amostra (Tabela 7.1, etapa 6). O ciclo analítico terminava com a lavagem da câmara de mistura com solução transportadora (Tabela 7.1, etapa 7).

Em cada ciclo era registado um pico com altura proporcional à concentração de Fe(III) na amostra de óleo.

Tabela 7.1 Procedimento analítico para determinação de Fe(III) em óleos num sistema SIA.

Etapa	Posição		Tempo (s)	Caudal (ml min^{-1})	Sentido do fluxo[b]		Descrição
	Válvula selecção	Válvula injecção[a]			Bomba 1	Bomba 2	
1	2	E	15	1	A	----	Aspiração de 250 µl de SCN^-
2	1	I	30	1	P	----	Propulsão do SCN^- para a câmara de mistura, pela alça de amostra
3	1	E	15	1	A	----	Aspiração de 250 µl de mistura reaccional da câmara de mistura
4	8	E	15	3	P	----	Propulsão para esgoto
5	1	E	12	1	A	----	Aspiração de 200 µl de mistura reaccional da câmara de mistura
6	3	E	40	1,5	P	A	Propulsão da mistura reaccional para o detector e preenchimento da alça com amostra
7	1	E	40	4	P	----	Lavagem da câmara de mistura

[a] Válvula injecção - E: enchimento, I: injecção

[b] Sentido do fluxo - A: aspiração, P: propulsão

7.3 Resultados e Discussão

De forma a validar os resultados obtidos e a precisão da metodologia, a estratégia de amostragem, para introdução directa de amostras viscosas num sistema SIA, recorreu à metodologia para determinação de Fe(III) em óleos alimentares, baseada na reacção de complexação com SCN^- em meio orgânico [16].

7.3.1 Optimização dos parâmetros físico-químicos

A optimização da montagem decorreu tendo em conta as características particulares da amostra oleosa e teve como objectivo a obtenção de uma metodologia analítica com introdução directa de amostra no sistema de fluxo, sem que o comportamento geral deste fosse afectado devido à natureza viscosa da amostra. De facto pretendia-se que a montagem desenvolvida exibisse as características gerais de um sistema SIA, permitindo efectuar aspirações de volumes precisos de soluções, numa base de tempo, e fazer aquisição de sinais analíticos transientes, em condições de fluxo.

Muito embora fosse difícil separar as duas componentes do trabalho, nomeadamente a estratégia de amostragem e a determinação do conteúdo em Fe(III), os estudos de optimização foram enfrentados separadamente, uma vez que era necessário garantir condições de dissolução do óleo no sistema de fluxo antes de optimizar os parâmetros relacionados com a determinação de Fe(III), propriamente dita.

A optimização da estratégia de amostragem visava estabelecer a configuração básica do sistema, o solvente orgânico apropriado, o volume de amostra e as condições de enchimento da câmara de mistura que garantissem o funcionamento geral do sistema de fluxo, sem interferências relacionadas com a natureza viscosa da amostra. Por outro lado, a optimização dos parâmetros relativos à determinação de Fe(III) pretendia

estabelecer o volume e concentração da solução de SCN^-, a concentração de ácido nítrico, o caudal e o comprimento e configuração do reactor, que permitiam a obtenção de uma metodologia adaptada às concentrações de Fe(III) a analisar nos óleos.

O primeiro aspecto encarado durante o desenvolvimento da metodologia foi o estabelecimento da configuração do sistema de fluxo, de modo que fosse possível efectuar a determinação de Fe(III), por introdução directa da amostra no sistema. Os estudos envolveram diferentes montagens (Figuras 7.1 e 7.2 A e B), e consequentemente diferentes estratégias de amostragem, tendo decorrido usando como solução transportadora uma mistura de metanol:clorofórmio (15:85) e diferentes soluções de SCN^- e volumes de amostra.

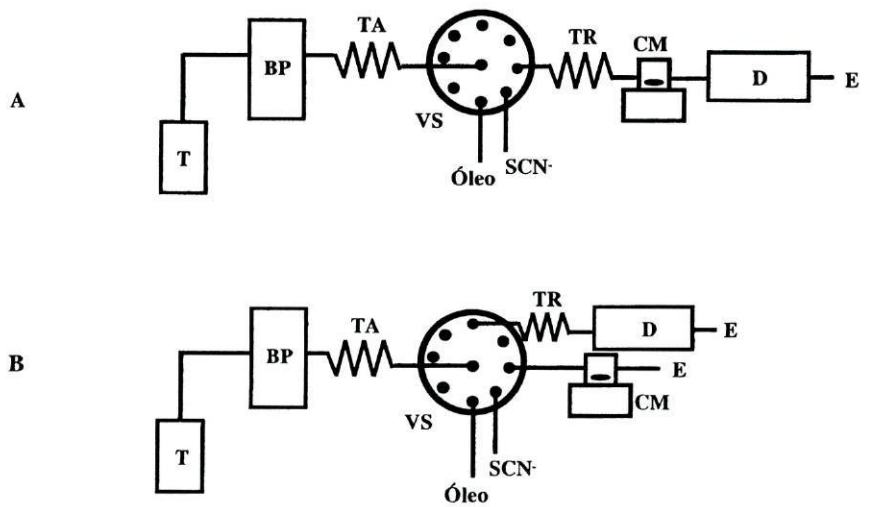


Figura 7.2 Montagens de fluxo testados durante a optimização do procedimento analítico. T: solução transportadora; BP: bomba peristáltica; VS: válvula selectora; CM: câmara de mistura; TA: tubo de armazenamento; TR: tubo reactor; D: espectrofotometro; E: esgoto.

A primeira montagem testada (Figura 7.2 A) correspondia a uma montagem SIA básica, que incorporava uma câmara de mistura no tubo reactor, imediatamente antes do detector espectrofotométrico. A amostra e a solução de SCN^- eram aspiradas sequencialmente para o tubo de armazenamento, a partir de duas das portas da válvula selectora. A sequência aspirada era encaminhada para o detector passando pela câmara de mistura numa tentativa de promover a mistura do óleo na solução transportadora. No entanto, esta estratégia revelou-se incapaz de originar uma mistura reaccional homogénea (com apenas uma fase), não originando condições adequadas à detecção espectrofotométrica do complexo formado entre o Fe(III) e o SCN^-. Efectivamente, era muito difícil eliminar, da tubagem e da célula de fluxo, as gotículas de óleo não dissolvidas. Consequentemente, foram testados, nesta montagem, tubos reactores de comprimento superior e paragens de fluxo, de forma a aumentar o tempo de residência da zona reaccional no sistema e assim aumentar o grau de mistura. Nenhuma das situações estudadas resultou numa mistura total da amostra na solução transportadora, pelo que se optou por alterar a configuração da montagem, particularmente a posição da câmara de mistura.

Na segunda montagem testada (Figura 7.2 B), a câmara de mistura foi posicionada numa das portas da válvula selectora, de forma a aumentar a dispersão da zona aspirada na solução transportadora e assim incrementar o grau de mistura. Parte dos problemas de mistura observados com a montagem anterior foram obviados com esta mudança, rentabilizando o funcionamento do sistema SIA com base em inversões do sentido do fluxo, tendo sido possível controlar de forma mais eficaz as condições de mistura na câmara. Também nesta situação, amostra e reagente eram aspirados sequencialmente para o tubo de armazenamento mas eram, desta feita, encaminhados para a câmara de mistura durante um período de tempo optimizado, que garantia a homogeneização das

zonas na câmara. A mudança da câmara, para uma das portas da válvula selectora, contribuiu para um aumento do grau de dispersão das zonas aspiradas uma vez que era possível gerir rigorosamente, em termos de tempo, a forma como estas se encontravam na câmara de mistura. Apesar de, em termos de mistura de zonas, esta estratégia ter fornecido resultados promissores a utilização sistemática do sistema continuou a evidenciar alguns problemas técnicos. Efectivamente, o óleo, aspirado directamente de uma das portas da válvula selectora, devido à sua natureza viscosa, contaminava as outras portas da válvula durante as mudanças de posição e ocasionalmente podiam observar-se gotículas de óleo na tubagem e na célula do detector espectrofotométrico. Este fenómeno, muito possivelmente, já se verificava com a montagem anterior mas não foi evidente devido aos problemas de mistura mais significativos, que ocorriam nessas condições. Numa tentativa de eliminar gotículas de óleo que pudessem ficar no sistema, foi introduzida no ciclo analítico uma etapa de lavagem, imediatamente a seguir ao encaminhamento das zonas aspiradas para a câmara de mistura, que solucionaria apenas o problema da determinação em questão, mas não a questão da irreprodutibilidade entre determinações. No entanto, esta etapa não era suficiente para obviar os problemas resultantes da aspiração directa da amostra a partir da válvula selectora e aleatoriamente gotículas de óleo apareciam na célula de fluxo, afectando os sinais analíticos e a linha de base, indicando que se tratava de um problema técnico relacionado com a válvula selectora e a viscosidade da amostra.

De forma a resolver os problemas relacionados com a aspiração directa do óleo recorreu-se a uma nova montagem, que consistia num sistema SIA ao qual foi acoplada uma válvula de injecção (Figura 7.1). A válvula de injecção encontrava-se ligada a uma das portas da válvula selectora e tornou possível a introdução da amostra no sistema, sem pré-tratamento, e a sua reamostragem após o desenvolvimento da reacção, sem nenhum

dos problemas relatados anteriormente. Adicionalmente, e com o intuito de se dispor de dois canais funcionando independentemente, e assim diminuir o tempo de análise, foi incorporada no sistema uma segunda bomba peristáltica (Figura 7.1, BP_2) que era responsável pelo enchimento da alça de amostragem da válvula de injecção de 6 portas, durante a detecção do produto da reacção. A montagem incorporava ainda uma câmara de mistura (Figura 7.1, CM), com o objectivo de melhorar a mistura da amostra na solução transportadora. A câmara foi posicionada numa das saídas da válvula de injecção de forma a recolher a mistura reaccional, à medida que a solução de SCN^- passava pela alça de amostragem.

Estabelecida a configuração básica do sistema era importante definir o solvente ou mistura de solventes que garantissem as condições de miscibilidade da amostra na solução transportadora, diminuindo a sua elevada viscosidade e evitando a sua emulsificação. A escolha do solvente teve em conta as característica físicas da amostra, mas também a solubilidade do tiocianato de amónio no próprio solvente. Efectivamente, para além de se pretender uma dissolução completa da amostra no sistema de fluxo era importante que o tiocianato de amónio fosse solúvel no solvente escolhido ou num similar, de forma a evitar fenómenos de precipitação no interior do sistema de fluxo. Por outro lado pretendia-se também evitar problemas relacionados com a mistura das diversas zonas, que poderiam levar ao aparecimento de índices de refracção que afectariam a detecção espectrofotométrica. Os estudos realizados no sentido de seleccionar o solvente (transportador) mais apropriado iniciaram-se testando uma solução de SCN^- preparada em metanol e como solução transportadora uma mistura de metanol:butanol (50:50). Observou-se que não era possível dissolver completamente a amostra nestas condições, nem mesmo usando uma câmara de mistura.

Entretanto, ensaios efectuados por metodologias discretas revelaram que era possível dissolver completamente uma alíquota dos óleos a ensaiar em clorofórmio 1:2. A utilização de clorofórmio, como solução transportadora no sistema SIA, não se mostrou apropriada uma vez que, para além dos problemas de solubilização do SCN^-, mesmo em baixas concentrações, ocorria a formação de bolhas gasosas no interior do sistema de fluxo, devido à elevada volatilidade do solvente. Foram então estudadas alternativas envolvendo a utilização de clorofórmio combinado com metanol, de modo a facilitar a solubilização do SCN^- e a diminuir a formação espontânea de bolhas no sistema de fluxo. Testaram-se soluções transportadoras com diferentes percentagens de metanol e clorofórmio (50:50; 35:65; 15:85; 10:90) e verificou-se que uma combinação de 15 partes de metanol com 85 partes de clorofórmio era a alternativa ideal para solubilizar a amostra de óleo no sistema de fluxo, sem nenhum dos problemas referidos anteriormente.

O volume de amostra foi um dos parâmetros mais importantes, quer no desenvolvimento da estratégia de amostragem quer na determinação de Fe(III), tendo definido grande parte dos passos de inserção da amostra no sistema, bem como a sensibilidade da determinação. O volume de amostra era definido pelo comprimento da alça de amostragem da válvula de injecção e a sua modificação obrigava à alteração da etapa do ciclo analítico em que a amostra era encaminhada para a câmara de mistura (Tabela 7.1, etapa 2), empurrada pela solução de SCN^-. Testaram-se volumes de amostra entre 65 e 200 μl, tendo-se adaptado, em cada caso, a etapa 2 do ciclo analítico, de modo a garantir a homogeneização da mistura reaccional no interior da câmara de mistura. Observou-se um aumento da intensidade dos sinais analíticos com o aumento da amostra até 150 μl, volume acima do qual não se registava variação significativa. Isto deve-se ao facto de o volume interno da câmara de mistura não suportar o aumento do volume da amostra,

perdendo-se o excesso para o esgoto. Os estudos que se seguiram decorreram utilizando um volume de amostra de 150 µl.

Relativamente à solução de SCN^-, quatro parâmetros foram optimizados nomeadamente volume, concentração, solvente usado na sua preparação e concentração de ácido.

O volume da solução de SCN^- foi testado entre 150 e 300 µl, tendo-se verificado um aumento da intensidade dos sinais analíticos com o aumento do volume, até 250 µl (Figura 7.3). Volumes superiores, tal como no caso do aumento do volume de amostra, não eram suportados pela câmara de mistura e o excesso era perdido pelo esgoto, não se observando uma variação da intensidade dos sinais analíticos, pelo que os estudos prosseguiram usando-se 250 µl de SCN^-.

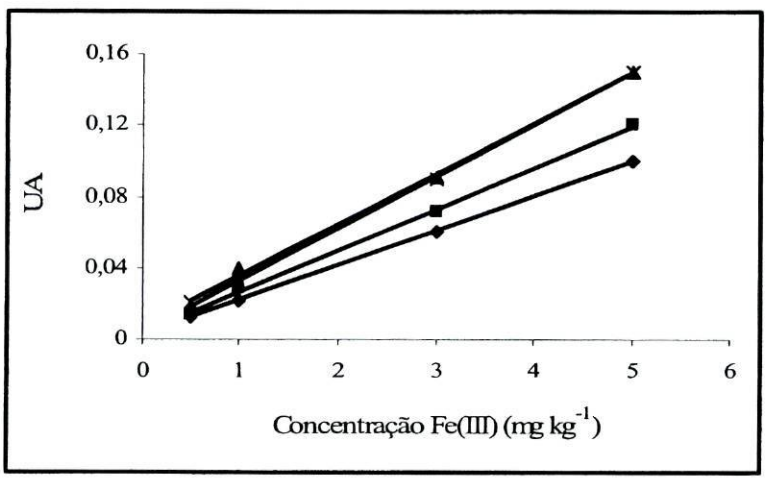


Figura 7.3 Variação dos sinais analíticos com o volume de SCN^-. Os estudos foram realizados analisando 150 µl de amostra no sistema de fluxo. ♦150 µl SCN^-; ■ 200 µl SCN^-; ▲250 µl SCN^-; x 300 µl SCN^-.

A concentração da solução de SCN^- foi estudada no intervalo entre 0,025 e 0,1 mol l^{-1}. Os resultados evidenciaram um aumento da sensibilidade da determinação de cerca de 1,7 vezes, com o aumento da concentração entre 0,025 e 0,05 mol l^{-1}. Além disto, verificou-se que soluções mais concentradas não ocasionavam um aumento significativo dos sinais analíticos, tendo-se efectuado a determinação de Fe(III) com uma solução de tiocianato de amónio 0,05 mol l^{-1}.

A escolha do solvente, para a preparação da solução de SCN^-, teve em conta a solubilidade do tiocianato de amónio, mas também as condições de mistura e de homogeneização da amostra de óleo no sistema, mais particularmente na câmara de mistura. Efectivamente, devido ao facto de a amostra ser empurrada para a câmara de mistura pela solução de SCN^-, o solvente em que esta foi preparada acabava por influenciar grandemente a composição da mistura reaccional e em última análise as condições de miscibilidade do óleo com as outras zonas. Por outro lado, era importante que o solvente escolhido apresentasse uma constituição semelhante à da solução transportadora, de modo a facilitar a mistura das diversas zonas na câmara de mistura. Assim, tal como aconteceu no caso da solução transportadora, foram testados solventes com diferentes proporções de metanol:clorofórmio (10:90, 15:85, 25:75, 35:85, 50:50) com o objectivo de escolher o solvente apropriado para a preparação da solução de tiocianato de amónio 0,05 mol l^{-1}, que tinha sido seleccionada para efectuar a análise. Verificou-se que misturas de solventes com baixa percentagem de metanol (10:90, 15:85) não se adequavam às condições optimizadas até então, uma vez que não permitiam a solubilização do SCN^-, nas concentrações desejadas. A mistura de 35 partes de metanol com 65 partes de clorofórmio permitiu a preparação da solução de SCN^-, sem problemas de solubilização, e forneceu os melhores resultados em termos de sensibilidade da determinação de Fe(III), possivelmente por garantir as condições de

miscibilidade da amostra no reagente e solução transportadora, favorecendo o desenvolvimento da reacção de complexação. De uma forma geral, observou-se que misturas de solventes com mais de 25 % de metanol não apresentavam problemas à solubilização do SCN^-. No entanto, a escolha do solvente baseou-se em observações, que permitiram concluir que solventes com metanol acima de 35 % ocasionavam problemas relacionados com a dissolução do óleo na câmara, devido à diminuição do teor de clorofórmio, e misturas com menos de 35 % de metanol conduziam a uma diminuição da sensibilidade da determinação.

A reacção de complexação do Fe(III) com SCN^-, quer em meio orgânico [16] quer em meio aquoso, ocorre em meio ácido pelo que se procedeu a alguns estudos que visavam a escolha do ácido apropriado e a optimização da sua concentração na solução de SCN^-. Assim, estudou-se o efeito da presença de ácido nítrico, sulfúrico e clorídrico 0,1 mol l^{-1} na solução de SCN^- e nos sinais analíticos. As soluções obtidas apresentavam características diferentes em termos de estabilidade química. De facto, a presença de ácido sulfúrico na solução ocasionava fenómenos de precipitação, logo no momento da sua adição. Este tipo de fenómeno não se observou com nenhum dos outros ácidos, tendo-se obtido os melhores resultados, em termos de sensibilidade, com ácido nítrico, razão pela qual a solução de SCN^- passou a ser preparada numa mistura de metanol:clorofórmio (35:65), com ácido nítrico numa concentração de 0,1 mol l^{-1}.

Após a optimização dos parâmetros relacionados com a amostra e o reagente, tornou-se importante optimizar as condições em que ambos iriam reagir na câmara de mistura. A optimização da etapa 2 do ciclo analítico (Tabela 7.1) permitiu estabelecer as condições óptimas de homogeneização do óleo, na câmara de mistura, e a melhor proporção de SCN^- e amostra, para o desenvolvimento da reacção de complexação. Esta etapa foi avaliada em termos de tempo, ou volume necessário, para fazer chegar a solução de

SCN^-, desde o tubo de armazenamento até à câmara de mistura, passando pela alça de amostragem. Assim sendo, consoante o volume envolvido, no final da etapa 2, a câmara de mistura encontrava-se preenchida com uma mistura reaccional de composição diferente. Consequentemente as condições de miscibilidade da amostra e a quantidade de complexo entre o Fe(III) e o SCN^- eram também variáveis. Foram então testados volumes entre 400 e 750 μl e observou-se que ocorria solubilização da amostra com volumes iguais ou superiores a 500 μl. No entanto, volumes superiores a 500 μl ocasionavam diluição do produto formado, ou eventual perda do mesmo pelo canal de esgoto da câmara, e consequentemente diminuição da intensidade dos sinais analíticos. A restante optimização decorreu propulsionando, em cada ciclo analítico, 500 μl de uma mistura de SCN^-, amostra e solução transportadora para a câmara de mistura.

A etapa 3 (Tabela 7.1) foi introduzida no ciclo analítico com o objectivo de preencher a tubagem de ligação entre as duas válvulas com a mistura reaccional presente na câmara de mistura. Desta forma, na etapa 5 a totalidade da alíquota aspirada correspondia garantidamente a mistura reaccional tirando-se o máximo rendimento da determinação. A aspiração de 250 μl do conteúdo da câmara de mistura era suficiente para garantir o preenchimento efectivo da tubagem com produto da reacção. O excesso de mistura reaccional que atingia o tubo de armazenamento era encaminhado para uma porta de esgoto na etapa 4 do ciclo analítico.

A optimização do volume de mistura reaccional a enviar para o detector (Tabela 7.1, etapa 5) foi limitada pelo volume da câmara de mistura, de modo que 250 μl foi o volume máximo testado uma vez que volumes superiores não garantiam aspirações reprodutíveis sem bolhas de ar, devido ao esvaziamento da câmara de mistura. Observou-se um aumento da intensidade dos sinais analíticos com o aumento do volume aspirado da câmara até 200 μl, não se tendo observado variação dos sinais com volumes

superiores. A restante optimização e a determinação decorreram aspirando 200 µl de mistura reaccional da câmara de mistura, em cada ciclo analítico.

Durante os estudos de optimização dos diversos parâmetros verificou-se que 10 segundos depois da sequência de amostra e SCN^- começar a entrar na câmara de mistura (Tabela 7.1, etapa 2), começava a haver perda de mistura corada pelo canal de esgoto, facto que conduzia a uma diminuição da sensibilidade da determinação. No entanto, a geometria particular da câmara de mistura, já descrita no Capítulo 2, e a agitação constante no seu interior, permitiam que as zonas de amostra e reagente ao abandonar a câmara se encontrassem já misturadas, sendo possível garantir as condições de análise entre determinações. Numa tentativa de rentabilizar o procedimento e aumentar a sensibilidade da determinação, foi colocado no canal de esgoto da câmara de mistura um tubo enrolado de 1m de comprimento (Figura 7.1, ECM), que recolhia parte da mistura perdida pelo canal de saída da câmara, evitando a sua perda irremediável para o esgoto. Na etapa seguinte (Tabela 7.1, etapa 3), era possível recuperar, para o sistema de fluxo, a mistura retida no tubo, o que resultava num incremento de sensibilidade de cerca de 20 %.

Testou-se ainda o efeito de tempos de paragem, após a entrada da amostra e do SCN^- na câmara de mistura, de 30 e 60 segundos não se tendo observado efeitos significativos nos sinais analíticos, o que demonstra que a reacção é relativamente rápida.

O tempo de lavagem da câmara de mistura com solução transportadora (Tabela 7.1, etapa 7) foi estabelecido de forma que no final de cada determinação não restassem, na câmara, vestígios da mistura reaccional que afectariam a determinação seguinte e em última análise a reprodutibilidade da metodologia. É ainda importante referir que a etapa de lavagem, uma vez que ocorria por propulsão de solução transportadora a um caudal elevado através da câmara, permitia também a lavagem de toda a tubagem de ligação

entre as válvulas selectora e de injecção. Apesar de se tratar de a lavagem da câmara acrescer de modo significativo o tempo de análise, há que ter em conta que se tratava de uma etapa inevitável que garantia a repetibilidade das condições de análise entre as várias determinações.

Depois de asseguradas as condições de miscibilidade da amostra de óleo na câmara de mistura, os estudos de optimização decorreram de forma a garantir o transporte da mistura reaccional até ao detector em condições que minimizassem a sua diluição, no sistema de fluxo, viabilizando a determinação no intervalo de concentrações pretendido. Deste modo, estudou-se o efeito do caudal (propulsão) e do comprimento e configuração do tubo reactor, com o objectivo de definir o tempo de residência óptimo, da mistura no sistema de fluxo, que evitava a diluição do produto formado anteriormente na câmara de mistura. Os resultados obtidos, durante o estudo de optimização do caudal entre 1 e 2 ml min^{-1}, demonstraram que a reacção decorre essencialmente na câmara de mistura, uma vez que não havia uma variação significativa da intensidade dos sinais analíticos até 1,5 ml min^{-1}. No entanto caudais superiores originavam uma pequena diminuição dos sinais revelando que nesta situação o tempo residência seria insuficiente, pelo que os restantes estudos foram efectuados encaminhando a mistura reaccional para o detector a 1,5 ml min^{-1}. O tempo de residência foi finalmente definido pelo estudo do tubo reactor. Reactores com comprimento superior a 0,5 m resultavam numa diluição excessiva da mistura reaccional e observava-se portanto uma pequena diminuição da intensidade dos sinais analíticos. Relativamente à geometria, reactores enrolados conduziram aos sinais analíticos mais intensos no intervalo de concentrações estudado. Deste modo a configuração final do sistema incluía um tubo reactor enrolado de 0,5 m de comprimento.

Quando comparado com a metodologia testada com a montagem apresentada na Figura 7.2 B, o procedimento optimizado resultou num acréscimo de sensibilidade de cerca de 2,2 vezes, que viabilizou a determinação no intervalo de concentrações pretendido e consequentemente a análise de amostras reais. De facto, a nova estratégia de amostragem permitiu aumentar consideravelmente o volume de amostra, já que foi possível melhorar as condições de mistura no interior do sistema de fluxo, assegurando a mistura da amostra com a solução transportadora.

Nas condições experimentais optimizadas obtinha-se uma recta de calibração linear até cerca de 25 mg kg^{-1} de Fe(III), sendo Abs=0,0216 (±0,0007) C + 0,017 (±0,007), R^2 = 0,9991, em que Abs é a intensidade do sinal analítico em termos de absorvência e C é a concentração de Fe(III) em mg kg^{-1}. No entanto, como a concentração de Fe(III) em óleos alimentares é usualmente baixa (<3 mg kg^{-1}), a determinação nas amostras decorreu com padrões de Fe(III) de concentração até 10 mg kg^{-1}. Nesta situação a curva de calibração era Abs=0,0197 (±0,0004) C + 0,0076 (±0,0020), R^2 = 0,9995, em que Abs é a intensidade do sinal analítico em termos de absorvência e C é a concentração de Fe(III) em mg kg^{-1}.

Antes do processamento dos padrões oleosos de Fe(III), procedia-se à análise da matriz oleosa (usada para efectuar a diluição do padrão oleoso concentrado durante a preparação dos padrões de calibração) pelo procedimento analítico optimizado, obtendo-se um sinal de branco que era subtraído aos sinais obtidos para cada um dos padrões.

A Figura 7.4 representa o registo gráfico obtido na elaboração da curva de calibração, com padrões de Fe(III) até 10 mg kg^{-1}, e na análise de algumas amostras de azeite.

O limite de detecção da determinação estimado após o processamento de branco, tal como foi descrito no Capítulo 2, era de 0,31 mg kg^{-1}.

A metodologia desenvolvida permitia efectuar cerca de 20 determinações por hora, ritmo de amostragem bastante satisfatório tendo em conta a complexidade da amostra e o inevitável recurso a uma câmara de mistura.

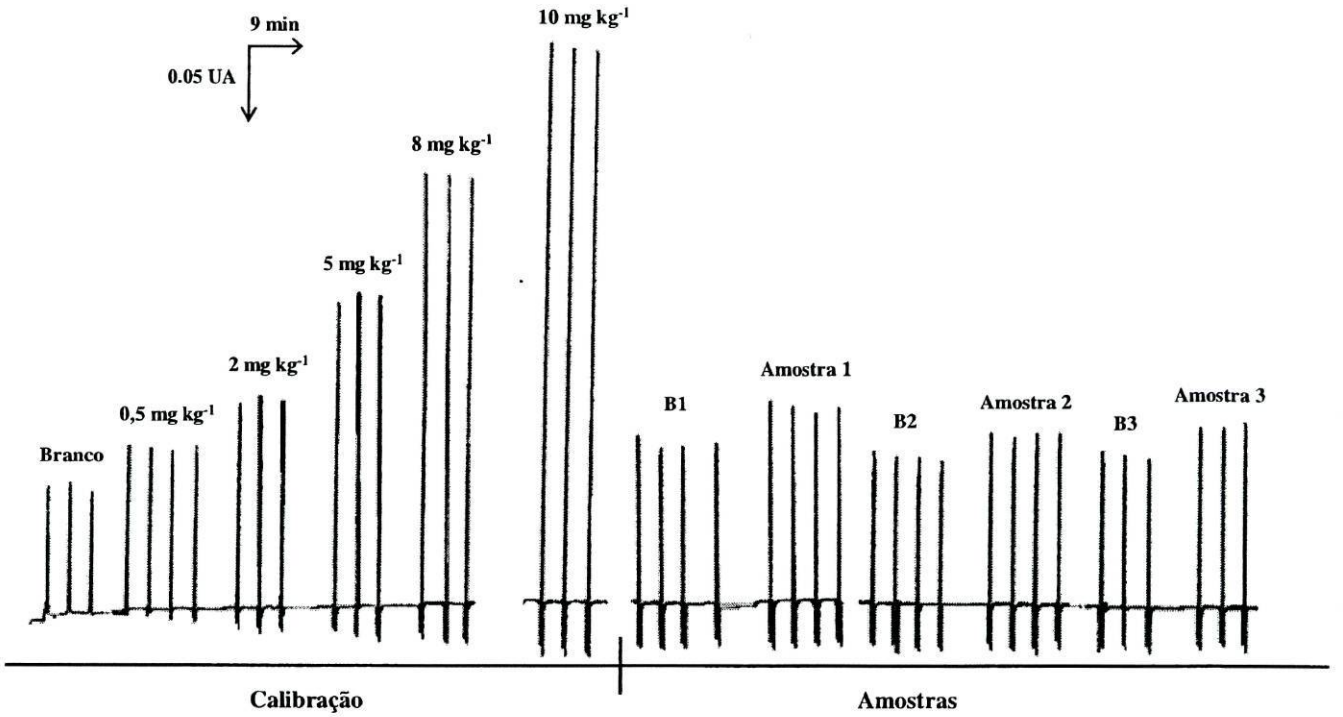


Figura 7.4 Registo gráfico obtido na elaboração da curva de calibração com padrões de Fe(III) até 10 mg kg^{-1} e na análise de algumas amostras de azeite e respectivos brancos (B1-B3).

7.3.2 Análise das amostras

Com o objectivo de avaliar os resultados fornecidos, o método analítico desenvolvido foi aplicado à determinação de Fe(III) em nove amostras de azeite, uma de óleo de soja e uma de óleo de amendoim disponíveis comercialmente.

Graças às características particulares, nomeadamente cor, das diferentes amostras, obtinha-se para cada uma delas um sinal de branco, por análise da mesma na ausência de

SCN^-, mas obedecendo ao mesmo protocolo analítico. Este sinal era subtraído ao sinal obtido por análise da amostra, pelo procedimento analítico desenvolvido.

Com o objectivo de confirmar os resultados obtidos e avaliar possíveis efeitos de matriz foram efectuados ensaios de recuperação, adicionando a cada amostra 2 e 8 mg kg^{-1} de Fe(III). As amostras adicionadas de padrão eram depois analisadas pela metodologia optimizada utilizando-se, para efeitos de interpolação, a curva de calibração obtida com padrões oleosos de Fe(III). Os resultados da análise das amostras e dos ensaios de recuperação estão esquematizados na Tabela 7.2, tendo-se obtido valores de recuperação entre 96 e 104 %.

Tabela 7.2 Resultados da análise das amostras e dos ensaios de recuperação.

Amostra	Fe(III) ± Desvio padrão* (mg kg^{-1})	Recuperação (%)*	
		2 mg kg^{-1}	8 mg kg^{-1}
Azeite, extra virgem	2,46±0,08	103,1	101,2
Azeite, extra virgem	0,95±0,01	99,5	97,3
Azeite, extra virgem	2,66±0,02	102,4	97,3
Azeite, extra virgem	0,75±0,01	98,3	102,7
Azeite, extra virgem	1,99±0,04	99,5	102,5
Azeite, refinado	1,27±0,02	104,5	103,3
Azeite	2,92±0,06	98,7	97,9
Azeite	1,57±0,01	101,7	96,4
Azeite	1,32±0,04	98,7	99,2
Óleo de soja	1,74±0,03	96,5	96,9
Óleo de amendoim	1,08±0,02	97,1	101,9

* ± desvio padrão de 4 determinações

Como forma de avaliar a exactidão dos resultados obtidos foram analisadas, pelo procedimento analítico desenvolvido, duas amostras de óleo de soja certificadas [44], tendo-se concluído que o teor de Fe(III) estava de acordo com o referenciado para cada amostra (Tabela 7.3).

A metodologia foi ainda validada por aplicação do teste *t* Student a cada amostra certificada. A hipótese nula foi aceite para um nível de confiança de 95 % já que, em ambos os casos, $|t_{calculado}| < t_{tabelado}$ (Tabela 7.3) [45].

Tabela 7.3 Resultados da análise das amostras certificadas.

Amostra certificada (AOCS)	Valor de referência		Valor encontrado		Teste *t* Student	
	Fe(III) (mg kg^{-1})	Desvio Padrão (mg kg^{-1})	Fe(III) (mg kg^{-1})*	Desvio Padrão Relativo (%)*	$t_{calculado}$	$t_{tabelado}$
Óleo de soja	1,90	0,79	1,78	0,56	-0,479	2,78
Óleo de soja	7,98	1,37	7,82	0,64	-0,559	2,78

* valores médios de 5 ensaios

Por análise repetida (n = 15) de amostras de concentrações significativamente diferentes (0,76 e 1,7 mg kg^{-1}) não se registaram desvios padrão relativos superiores a 3,5 %, o que garantia a reprodutibilidade do método em toda a gama de concentrações analisadas.

7.4 Conclusões

A incorporação de uma válvula de injecção, típica de sistemas FIA, num sistema baseado na injecção sequencial, permitiu o desenvolvimento de uma estratégia de amostragem robusta e reprodutível, em que se efectuava a inserção directa de amostras oleosas no sistema de fluxo.

A utilização de uma câmara de mistura, com o objectivo de facilitar a homogeneização da amostra na solução transportadora, viabilizou a estratégia de amostragem e foi facilmente implementada graças ao funcionamento particular do sistema com base em inversões do sentido do fluxo. De facto, a presença da câmara permitiu estabelecer um protocolo analítico que envolvia a introdução da amostra de óleo por intermédio de uma válvula de injecção, sua homogeneização na solução transportadora e por fim a reamostragem a partir da câmara de mistura, do produto formado por reacção com o SCN^-, de modo a efectuar a sua detecção espectrofotométrica.

A aplicação da montagem à determinação de Fe(III) em óleos alimentares resultou numa metodologia simples e rápida que consumia quantidades reduzidas de amostra (150 μl) e reagente (0,95 mg de SCN^-) e produzia apenas 4,2 ml de efluente por determinação. A aplicabilidade da metodologia a amostra de óleos foi confirmada através da análise amostras certificadas e por ensaios de recuperação.

A simplicidade do método proposto e a possibilidade de trabalhar num intervalo de concentrações de Fe(III) alargado (0,5 – 25 mg kg^{-1}) tornam possível a sua aplicação na análise de outros tipos de amostras viscosas, como os óleos medicinais e minerais. Por outro lado, a elevada versatilidade dos sistemas SIA viabiliza a análise de amostras com elevadas concentrações de Fe(III), como os óleos lubrificantes, apenas por implementação de um procedimento de diluição em linha facilmente implementado neste tipo de montagem.

De uma forma geral a estratégia desenvolvida pode ser uma ferramenta genérica para a análise de amostras viscosas em sistemas SIA. Efectivamente, quando comparado com outras metodologias que envolvem a análise de amostras de óleos, o procedimento desenvolvido apresenta a vantagem de não exigir pré-tratamentos da amostra antes da sua introdução no sistema de fluxo, como diluições [12, 17, 18, 26], extracções [19, 20, 41] e digestões complexas [14, 19, 23, 29, 34, 36, 39], que diminuem o ritmo de amostragem das metodologias e aumentam a possibilidade de ocorrerem erros. Deste modo, a metodologia desenvolvida apresenta uma maior independência do sistema relativamente ao operador e vantagens em termos de tempo de análise que tendo em conta o tipo de análise é bastante satisfatório.

7.5 Referências bibliográficas

[1] Z.L. Fang, Anal. Chim. Acta 400 (1999) 233.

[2] V. Grassi, A.C.B. Dias, E.AG. Zagatto, Talanta 64 (2004) 1114.

[3] G.D. Christian, Anal. Chim. Acta 499 (2003) 5.

[4] H. Bergamin Fº, F.J. Krug, E.AG. Zagatto, Anal. Chim. Acta 190 (1986) 177.

[5] H. Bergamin Fº, F.J. Krug, B.F. Reis, J.A. Nóbrega, M. Mesquita, I.G. Souza, Anal. Chim. Acta 214 (1988) 397.

[6] H. Bergamin Fº, F.J. Krug, J.A. Nóbrega, B.F. Reis, M.F. Giné, Anal. Chim. Acta 245 (1991) 211.

[7] S. Chemat, A. Lagha, H.A. Amar, F. Chemat, Ultras. Sonochem. 11 (2004) 5.

[8] S. Moret, L.S. Conte, J. Chromat. A, 882 (2000) 245.

[9] F.J. Hidalgo, R. Zamora, Food Sci. Tech., 14 (2003) 499.

[10] N.S. Thomaidis, C.A. Georgiou, Lab. Autom. Inf. Manag. 34 (1999) 101.

[11] J.A.G. Mesa, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Anal. Chem. 65 (1993) 3540.

[12] M.P. Cañizares, M.T. Tena, M.D. Luque de Castro, Anal. Chim. Acta 323 (1996) 55.

[13] J.A.G. Mesa, P. Linares, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Anal. Chim. Acta 235 (1990) 441.

[14] E. Ballesteros, M. Gallego, M. Valcárcel, Anal. Chim. Acta 308 (1995) 253.

[15] J.A.G. Mesa, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Analyst 118 (1993) 891.

[16] P.G. Nouros, C.A. Georgiou, M.G. Polissiou, Anal. Chim. Acta 389 (1999) 239.

[17] G.P. Avila, A. Salvador, M. de la Guardiã, Analyst 122 (1997) 1543.

[18] K. Tian, P. Dasgupta, Anal. Chem. 71 (1999) 2053.

[19] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, O. Val, Food Chem. 46 (1993) 301.

[20] Z. Zhi, A. Ríos, M. Valcárcel, Anal. Chim. Acta 318 (1996) 187.

[21] P.G. Nouros, C.A. Georgiou, M.G. Polissiou, Anal. Chim. Acta 351 (1997) 291.

[22] E. Mariotti, M. Mascini, Food Chem. 73 (2001) 235.

[23] T. Fuse, F. Kusu, K. Takamura, J. Pharm. Biom. Anal. 15 (1997) 1515.

[24] P. Linares, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Anal. Chim. Acta 225 (1989) 431.

[25] E.P. Labrinea, N.S. Thomaidis, C.A. Georgiou, Anal. Chim. Acta 448 (2001) 201.

[26] N.S. Thomaidis, C.A. Georgiou, Anal. Chim. Acta 405 (2000) 239.

[27] P.G. Nouros, C.A. Georgiou, M.G. Polissiou, Anal. Chim. Acta 417 (2000) 119.

[28] V. Carbonell, A.R. Mauri, A. Salvador, M. de la Guardia, J.Anal. At. Spectrom. 6 (1991) 581.

[29] R. Purohit, S. Devi, Analyst 120 (1995) 555.

[30] R. Carabias-Martinez, E. Rodriguez-Gonzalo, E. Hernadez-Fernandez, J. Hernadez-Mendez, Anal. Chim. Acta 304 (1995) 232.

[31] J.J. Berzas Nevado, P. Valiente Gonzalez, Analyst 114 (1989) 989.

[32] P. Dominguez-Sanchez, C.K. O´Sullivan, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tunon-Blanco, M.R. Smith, Anal. Chim. Acta 291 (1994) 349.

[33] FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Alimentarius Comission 14th session, 1981.

[34] T.G. Díaz, A. Guiberteau, M.D.L. Soto, J.M. Ortiz, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 3743.

[35] C.D. Evans, A.W. Schwab, H.A. Moser, J.E. Hawley, E.H. Melvin, J. Am. Oil. Chem. Soc. 28 (1951) 68.

[36] A. de Leonardis, V. Macciola, M. De Felice, Inter. J. Food Sci. Techn. 35 (2000) 371.

[37] R. Calapaj, S. Chiricosta, G. Saija, E. Bruno, At. Spectr. 9 (1988) 107.

[38] M.S. Jiménez, A. López, J.R. Castillo, At. Spectr. 23 (2002) 183.

[39] M.I. Saleh, M.S. Jab, I.A. Rahman, S. Norasiah, Analyst 116 (1991) 743.

[40] M. Murillo, Z. Benzo, E. Marcano, C. Gomez, A. Garabato, C. Marin, J. Anal. At. Spectrom. 14 (1999) 815.

[41] A.N. Anthemidis, V. Arvanitidos, J.A. Stratis, Anal. Chim. Acta 537 (2005) 271.

[42] V. Carbonell, A.R. Mauri, A. Salvador, M. de la Guardia, J.Anal. At. Spectrom. 6 (1991) 581.

[43] B. Mihaljević, D. Ražem, Croatia Chemica Acta 76 (2003) 249.

[44] Eurachem, The Fitness for Purpose of Analytical Methods- A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (1998).

[45] J.C. Miller, J.N. Miller, Estadística para Química Analítica, Addison-Wesley Iberoamericana, Wilmington, Delaware, EUA, 2ª edição, 1988.

CAPÍTULO 8

Conclusões gerais

8. Conclusões Gerais

A presente dissertação engloba um conjunto de montagens de fluxo que, para além de representarem uma evolução em termos instrumentais, permitiram a implementação de procedimentos analíticos automáticos, que vieram preencher lacunas nas áreas clínica, ambiental, farmacêutica e alimentar.

O desenvolvimento e aplicação analítica das montagens apresentadas, permitiram confirmar a elevada versatilidade e robustez da técnica SIA, que esteve na base de todas as metodologias. Efectivamente, a utilização da válvula selectora, como elemento central dos sistemas desenvolvidos, permitiu a incorporação de diversos dispositivos, que aumentaram as potencialidades analíticas das montagens, sem aumentar significativamente a sua complexidade. De um modo geral, as montagens de fluxo desenvolvidas, apesar de incorporarem elementos típicos de outras técnicas ou dispositivos exteriores ao sistema de fluxo em si, apresentavam uma configuração e um modo de funcionamento relativamente simples, confirmando as vantagens da hifenização de técnicas de fluxo, destacadas no Capítulo 1 desta dissertação. Adicionalmente, os ciclos analíticos optimizados resultaram em ritmos de amostragem, que se adaptavam à rotina laboratorial das várias áreas, a que se aplicaram as metodologias.

Os métodos desenvolvidos permitiram comprovar que o modo de funcionamento peculiar dos sistemas SIA, baseado em inversões do sentido do fluxo a partir da válvula selectora de fluidos, facilita a gestão e direccionamento de amostras e reagentes, abrindo inúmeras possibilidades em termos de manipulação da amostra e detecção do produto final das reacções envolvidas.

De um modo geral, a optimização das metodologias apresentadas foi relativamente simples, já que grande parte dos parâmetros a estudar era controlada informaticamente, não sendo necessário reconfigurar fisicamente os sistemas. Apenas no caso da análise de óleos alimentares, foi necessária a troca da alça de amostragem da válvula de injecção, para o estudo do volume de amostra, como consequência da hifenização da técnica SIA com a técnica FIA.

A incorporação de uma câmara de mistura numa das portas da válvula selectora de um sistema SIA, que foi aplicado à determinação de nitratos e nitritos em soro humano e águas, permitiu a implementação de duas reacções enzimáticas, fornecendo as condições físicas óptimas para o seu desenvolvimento. A elevada versatilidade do sistema, relacionada com o seu modo de funcionamento particular associado à facilidade de inversão do sentido do fluxo, facilitou a gestão de amostras, enzimas e reagentes e a selecção das condições óptimas para ambas as determinações. O modo de funcionamento peculiar da válvula selectora tornou possível a implementação de um procedimento de diluição em linha, baseado na utilização de um tubo de diluição acoplado à válvula, que permitiu a aplicação da metodologia à determinação de nitritos em amostras de água, confirmando mais uma vez as vantagens deste tipo de técnica na gestão de soluções.

Uma válvula solenóide, típica de sistemas multicomutados, foi acoplada a uma das portas da válvula selectora da montagem desenvolvida para determinação de ácido aminocapróico em formulações farmacêuticas. A associação das duas válvulas permitiu a implementação da estratégia de amostragem binária, para inserção de reagentes no sistema de fluxo, que se traduziu num aumento das potencialidades do sistema, comprovando as vantagens da referida associação, já destacadas no Capítulo 1. Também neste caso, foi possível implementar um procedimento de diluição em linha, desta feita

por amostragem de zonas, tornando viável a monitorização da concentração do princípio activo ao longo do tempo, durante ensaios de dissolução de comprimidos. A versatilidade da montagem foi ainda comprovada por associação de um aparelho de dissolução à válvula selectora, sem perda das funcionalidades, quer do sistema em si, quer do aparelho de dissolução.

A capacidade distribuidora da válvula selectora foi testada com sucesso num sistema que efectuava duas determinações distintas, recorrendo a dois detectores diferentes. O sistema desenvolvido, para avaliação do perfil antioxidante de vinhos, efectuava a avaliação espectrofotométrica da capacidade antioxidante e determinava fluorimetricamente a capacidade "scavenging" do peróxido de hidrogénio. Os detectores encontravam-se acoplados a duas portas da válvula selectora, funcionando independentemente e permitindo a obtenção de dois registos analíticos em cada ciclo, o que confirmou mais uma vez o potencial analítico e versatilidade da técnica SIA.

A utilização de duas microbombas solenóides, como dispositivo de propulsão num sistema SIA para determinação de indometacina em formulações farmacêuticas, permitiu confirmar as vantagens da utilização de um fluxo de natureza pulsada, no grau de sobreposição de zonas aspiradas sequencialmente. A alteração da unidade de propulsão por si só não introduziu modificações no modo de funcionamento particular do sistema SIA, tendo-se verificado que as características de funcionamento, do sistema e das microbombas, se mantinham e até que a associação se traduzia num aumento do potencial analítico da montagem resultante. De facto, observou-se um aumento do grau de sobreposição, de zonas aspiradas sequencialmente, relacionado com a utilização das microbombas, o que permitiu a implementação de um procedimento analítico para determinação de indometacina em formulações farmacêuticas, baseado na hidrólise alcalina do princípio activo, com hidróxido de sódio. Por outro lado, é importante

realçar que, no sistema de fluxo pulsado resultante, graças às características das microbombas e à sua disposição no sistema, os processos de aspiração e propulsão são independentes o que se traduz na impossibilidade de haver contaminação da solução transportadora pelas soluções aspiradas.

A associação de uma válvula de injecção e de uma câmara de mistura a um sistema SIA, através de uma das portas laterais da válvula selectora, viabilizou o desenvolvimento de uma estratégia de amostragem de óleos alimentares, sem tratamento prévio. Na montagem desenvolvida, foi possível implementar uma metodologia para determinação de Fe(III) em óleos, num largo intervalo de concentrações. Mais uma vez, a capacidade distribuidora da válvula e a facilidade de inversão do sentido do fluxo permitiram a implementação de um ciclo analítico relativamente simples, em que a lavagem da câmara e a substituição das amostras de óleo eram facilitadas. A estratégia demonstrou exibir a robustez e repetibilidade necessárias à aplicação de rotina, confirmando as vantagens da incorporação de uma válvula de injecção no sistema SIA.

Os estudos de avaliação da reprodutibilidade, efectuados nos sistemas desenvolvidos, revelaram valores de desvio padrão relativo inferiores a 3,8 %, demonstrando um comportamento muito satisfatório em todas as situações estudadas. De facto, a associação de diferentes dispositivos à válvula selectora e a utilização de microbombas solenóides como unidade de propulsão não afectaram a reprodutibilidade dos volumes aspirados ou o comportamento geral dos sistemas resultantes.

Os resultados obtidos, por aplicação das metodologias desenvolvidas às matrizes respectivas, foram em todos os casos estatisticamente comparáveis aos fornecidos por métodos de referência ou de comparação, quando estes existiam e foram aplicados. Por outro lado, na situação em que se recorreu à análise de amostras de referência e ensaios de recuperação, os resultados foram de igual forma aceitáveis.

De um modo geral, os sistemas desenvolvidos exibiram grande simplicidade, versatilidade e flexibilidade, tendo-se adaptado aos objectivos analíticos para que foram idealizados. Demonstraram ainda a aplicabilidade da técnica SIA à análise de matrizes de complexidade variada.

O trabalho desenvolvido, no âmbito desta dissertação, permitiu reforçar a ideia da grande versatilidade da técnica de análise por injecção sequencial, quando utilizada como base para o desenvolvimento de procedimentos analíticos. De facto, este tipo de sistema permite numerosas combinações, possibilitando a implementação de todo o tipo de reacções e procedimentos de tratamento de amostra e a associação a diversos tipos de detector.

Parece, portanto, evidente que, mesmo perante os mais recentes desenvolvimentos em termos técnicos na área das técnicas de fluxo contínuo, a rentabilização das diferentes técnicas passa pela sua associação em sistemas de fluxo, que combinam as vantagens e potencialidades de cada uma. Este tipo de combinação começa a ser frequente, tendo também sido efectuada no âmbito dos trabalhos descritos nesta dissertação. Existem, no entanto, ainda variadas combinações promissoras, no que diz respeito à associação da técnica SIA com estratégias de gestão de fluidos mais recentemente referidas na literatura como a multibomba e a multiseringa.

Anexos

Programa de controlo do sistema SIA que incorporava uma válvula selectora de 10 posições, um mecanismo de controlo da bomba peristáltica e uma válvula solenóide adicional

```
REM ******************** **********************

REM
REM         CONTROLADOR DE POSICAO
REM        DUAS VALVULAS SOLENOIDES
REM         BOMBA, VALVULA 10

REM ************************************************

DECLARE SUB espera (Vn, VA)
DECLARE SUB alteracao (cont!, klin!)
DECLARE SUB ECRAN ()
DECLARE SUB dados (klin, dado, w$, x, y, b$)
DECLARE SUB nquadro (cont, dado, w$, x, y, b$)
DECLARE SUB porta (p, Vn, VA)
DECLARE SUB bombear (VEL, T1, p, h, FLAG)
DECLARE SUB Aspirar (VEL, T1, p, h, FLAG)
DECLARE SUB INERCIA (VEL, r, h, p, FLAG)
DECLARE SUB paragem (VEL, r, FLAG)


pORT% = &H220
OUT pORT% + 13, 127 - 16 - 1

10 CLS
SCREEN 10
WIDTH 80, 43
OUT pORT% + 13, 127

REM ********************DEFINIÇÃO DO ECRAN**********************

CALL ECRAN

REM ***************CARACTERISTICAS DO QUADRO******************

DIM SHARED col(5)   'define um vector de colunas para os dados no ecr,,
DATA 8,24,42,54,71
   FOR c = 1 TO 5
    READ p
    col(c) = p
   NEXT c
RESTORE

REM*****************INICIALIZAÇÃO DE VARIÁVEIS*****************

DIM SHARED qua(30, 5)   'este quadro vai conter os valores das variáveis
```

```
FOR I = 1 TO 30
   FOR K = 1 TO 5
    qua(I, K) = 0
   NEXT K
NEXT I

REM**********************ENTRADA DE DADOS**********************

CALL dados(klin, dado, w$, x, y, b$)

REM COLOR 7, 1
3 LOCATE 38, 5
f: INPUT "Número de repetições do ciclo ?  ", ciclo$
   ciclo = VAL(ciclo$)
   IF ciclo = 0 AND ciclo$ <> "0" THEN
      BEEP
      GOTO 3
   END IF

REM*****************EXECUÇÃO DAS INSTRUÇÕES*************************

FOR CIC = 1 TO ciclo
REM COLOR 7, 1
LOCATE 36, 57: PRINT CIC

 FOR LIN = 1 TO (klin - 5)
  OUT pORT% + 13, 127


  qua(0, 1) = 1
  p = qua(LIN, 1)
  h = qua(LIN, 2)
  r = qua(LIN, 5)
  FLAG = 0
  Vn = qua(LIN, 1)
  VA = qua(LIN - 1, 1)
  VEL = qua(LIN, 4)
  T1 = qua(LIN, 3)
  g = (klin - 6)
  z = qua(g, 1)

CALL porta(p, Vn, VA)

CALL INERCIA(VEL, r, h, p, FLAG)
IF FLAG = 1 THEN
     OUT pORT% + 14, 0
     RET = TIMER
     DO
     LOOP WHILE TIMER - RET <= .25
     OUT pORT% + 13, 127 - 16 - 1
     GOTO 16
END IF

IF qua(LIN, 5) = 1 THEN CALL bombear(VEL, T1, p, h, FLAG)
IF qua(LIN, 5) = 0 THEN CALL Aspirar(VEL, T1, p, h, FLAG)

IF p = z THEN CALL paragem(VEL, r, FLAG)

IF FLAG = 1 THEN
     OUT pORT% + 14, 0
```

```
      RET = TIMER
      DO
      LOOP WHILE TIMER - RET <= .25
      OUT pORT% + 13, 127 - 16 - 1
      GOTO 16
 END IF

 OUT pORT% + 14, 0
 RET = TIMER
 DO
 LOOP WHILE TIMER - RET <= .25

 NEXT LIN
 OUT pORT% + 13, 127
 OUT pORT% + 13, 127 - 16 - 1
 RET = TIMER
 PEY = (11 - Vn) * 6 / 10
 DO
 LOOP WHILE TIMER - RET <= PEY

 OUT pORT% + 13, 127
 NEXT CIC

16
OUT pORT% + 13, 127 - 16 - 1
 LOCATE 38, 5: PRINT "                              "
 LOCATE 31, 69: PRINT "    "
 LOCATE 36, 56: PRINT "    "

1 BEEP
REM COLOR 7, 1
11111 LOCATE 36, 5: INPUT "Alterar dados (S/N) ? ", D$
IF LCASE$(D$) <> "s" AND LCASE$(D$) <> "n" THEN
   BEEP
   LOCATE 36, 26: PRINT SPACE$(6)
   GOTO 11111
END IF
LOCATE 40, 4: PRINT "                                        "
IF LCASE$(D$) = "s" THEN
 cont = klin - 1
 GOTO 2
END IF
LOCATE 36, 5: PRINT SPACE$(32)
IF LCASE$(D$) = "n" THEN
 GOTO 3
END IF
2  LOCATE 36, 5: PRINT SPACE$(32)
66 BEEP
67 LOCATE 40, 5: INPUT "Alterar quadro ou fazer um novo (A/N)? ", n$
IF LCASE$(n$) <> "n" AND LCASE$(n$) <> "a" THEN
      BEEP
      LOCATE 40, 42: PRINT SPACE$(4)
      GOTO 67
END IF
   LOCATE 40, 5:
   PRINT "                                    "
 IF LCASE$(n$) = "a" THEN 4000
 IF LCASE$(n$) = "n" THEN 10

STOP
```

```
4000
CALL nquadro(cont, dado, w$, x, y, b$)
GOTO 3

SUB Aspirar (VEL, T1, p, h, FLAG)

pORT% = &H220

REM ****************** ACTIVACAO DA BOMBA **********************

tt = TIMER

DO

IF VEL = 0 THEN
     IF h = 0 THEN
          OUT pORT% + 14, 0
          sol$ = "Fechado"
     END IF
     IF h = 1 THEN
          OUT pORT% + 14, 2
          sol$ = "Aberto"
     END IF
ELSE

TENSAO = INT(VEL / 45 * 4095)
lb% = TENSAO - INT(TENSAO / 256) * 256
hb% = (TENSAO - lb%) / 256
OUT pORT% + 4, lb%
OUT pORT% + 5, hb%
     IF h = 0 THEN
          OUT pORT% + 14, 140
          sol$ = "Fechado"
     END IF
     IF h = 1 THEN
          OUT pORT% + 14, 142
          sol$ = "Aberto"
     END IF
END IF

pol = XXX
REM COLOR 7, 1
LOCATE 31, 69: PRINT p
LOCATE 31, 55: PRINT USING "##.####"; TIMER - tt
LOCATE 36, 69: PRINT sol$
LOCATE 39, 68: PRINT "Aspirar"
LOCATE 39, 55: PRINT "-"
LOCATE 39, 56: PRINT USING "####.##"; pol

REM COLOR 11, 1
LOCATE 35, 5: PRINT "Para interromper prima P..."
REM COLOR 7, 1
IF UCASE$(INKEY$) = "P" THEN
 LOCATE 35, 64: PRINT SPACE$(6)
 LOCATE 31, 55: PRINT SPACE$(7)
 LOCATE 36, 69: PRINT "      "
 LOCATE 39, 55: PRINT "       "
 LOCATE 39, 68: PRINT "      "
 LOCATE 31, 69: PRINT "    "
```

```
  FLAG = 1
  EXIT DO
END IF
LOOP WHILE TIMER - tt <= T1
7854
LOCATE 35, 5: PRINT "                    "
LOCATE 31, 56: PRINT SPACE$(7)
LOCATE 36, 69: PRINT "      "
LOCATE 39, 55: PRINT "       "
LOCATE 39, 68: PRINT "      "
LOCATE 31, 69: PRINT "    "
END SUB

SUB bombear (VEL, T1, p, h, FLAG)

pORT% = &H220

REM ****************** ACTIVACAO DA BOMBA ******************

tt = TIMER
DO

IF VEL = 0 THEN
    IF h = 0 THEN
        OUT pORT% + 14, 0
        sol$ = "Fechado"
    END IF
    IF h = 1 THEN
        OUT pORT% + 14, 2
        sol$ = "Aberto"
    END IF
ELSE

TENSAO = INT(VEL / 45 * 4095)
lb% = TENSAO - INT(TENSAO / 256) * 256
hb% = (TENSAO - lb%) / 256
OUT pORT% + 4, lb%
OUT pORT% + 5, hb%
    IF h = 0 THEN
        OUT pORT% + 14, 12
        sol$ = "Fechado"
    END IF
    IF h = 1 THEN
        OUT pORT% + 14, 14
        sol$ = "Aberto"
    END IF
END IF

pol = XXX
REM COLOR 7, 1
LOCATE 31, 69: PRINT p
LOCATE 31, 55: PRINT USING "##.####"; TIMER - tt
LOCATE 35, 69: PRINT sol$
LOCATE 39, 68: PRINT "Bombear"
LOCATE 39, 55: PRINT USING "####.##"; pol

REM COLOR 11, 1
LOCATE 35, 5: PRINT "Para interromper prima P..."
REM COLOR 7, 1
IF UCASE$(INKEY$) = "P" THEN
```

```
  LOCATE 35, 64: PRINT SPACE$(6)
  LOCATE 31, 55: PRINT SPACE$(7)
  LOCATE 36, 69: PRINT "      "
  LOCATE 35, 55: PRINT "      "
  LOCATE 35, 68: PRINT "       "
  LOCATE 31, 69: PRINT "    "
  FLAG = 1
  EXIT DO
 END IF
 LOOP WHILE TIMER - tt <= T1
 7865
 LOCATE 35, 5: PRINT "                                "
 LOCATE 31, 55: PRINT SPACE$(7)
 LOCATE 36, 69: PRINT "      "
 LOCATE 35, 55: PRINT "      "
 LOCATE 35, 68: PRINT "       "
 LOCATE 31, 69: PRINT "    "
 END SUB

 SUB dados (klin, dado, w$, x, y, b$)

 REM COLOR 7, 1
 klin = 6
 DO

 11 LOCATE klin, col(1): INPUT " ", dado$
  IF klin > 6 AND dado$ = "" THEN EXIT DO
  IF dado$ <> "1" AND dado$ <> "2" AND dado$ <> "3" AND dado$ <> "4" AND dado$ <> "5" AND
 dado$ <> "6" AND dado$ <> "7" AND dado$ <> "8" AND dado$ <> "9" AND dado$ <> "10" THEN
      BEEP
      LOCATE klin, col(1): PRINT SPACE$(6)
      GOTO 11
  END IF
  dado = VAL(dado$)
  qua(klin - 5, 1) = dado

 88  LOCATE klin, col(2): INPUT " ", w$
      IF LCASE$(w$) <> "a" AND LCASE$(w$) <> "f" THEN
           BEEP
           LOCATE klin, col(2): PRINT SPACE$(6)
           GOTO 88
      END IF
   IF LCASE$(w$) = "f" THEN qua(klin - 5, 2) = 0
   IF LCASE$(w$) = "a" THEN qua(klin - 5, 2) = 1

 22 LOCATE klin, col(3): INPUT " ", x$
  x = VAL(x$)
  IF (x = 0 AND x$ <> "0") OR x < 0 THEN
      BEEP
      LOCATE klin, col(3): PRINT SPACE$(6)
      GOTO 22
  END IF
  qua(klin - 5, 3) = x

 33 LOCATE klin, col(4): INPUT " ", y$
  y = VAL(y$)
  IF (y = 0 AND y$ <> "0") OR y < 0 OR y > 48 THEN
      BEEP
      LOCATE klin, col(4): PRINT SPACE$(6)
      GOTO 33
```

```
 END IF
 qua(klin - 5, 4) = y

55  LOCATE klin, col(5): INPUT " ", b$
  IF LCASE$(b$) <> "a" AND LCASE$(b$) <> "b" THEN
          BEEP
          LOCATE klin, col(5): PRINT SPACE$(6)
          GOTO 55
  END IF
  IF LCASE$(b$) = "a" THEN qua(klin - 5, 5) = 0
  IF LCASE$(b$) = "b" THEN qua(klin - 5, 5) = 1
  klin = klin + 1

LOOP

END SUB

SUB ECRAN

REM COLOR 14, 1
WINDOW (1000, 1000)-(0, 0)
LINE (0, 0)-(1000, 1000), , B
LINE (10, 900)-(990, 985), , B
LINE (640, 50)-(965, 410), , B
REM COLOR 7, 1
LOCATE 2, 24: PRINT "PROGRAMA DE CONTROLO DO SISTEMA SIA"
LOCATE 4, 2: PRINT "POSIÇAO (1 a 10)"
LOCATE 4, 19: PRINT "SOLENOIDE (a/f)"
LOCATE 4, 39: PRINT "TEMPO (s)"
LOCATE 4, 51: PRINT "CAUDAL (0-47)"
LOCATE 4, 67: PRINT "SENTIDO (a/b)"
LOCATE 29, 55: PRINT "TEMPO"; 0
LOCATE 34, 55: PRINT "CICLO"
LOCATE 29, 67: PRINT "POSI€AO"
LOCATE 34, 67: PRINT "SOLENOIDE"
LOCATE 38, 55: PRINT "VELOCIDADE"
LOCATE 38, 68: PRINT "SENTIDO"

END SUB

SUB INERCIA (VEL, r, h, p, FLAG)

pORT% = &H220

REM ****************** ACTIVACAO DA BOMBA **********************

IF VEL = 0 THEN
     OUT pORT% + 14, 0
     GOTO 6900
END IF
TENSAO = INT(VEL / 45 * 4095)
lb% = TENSAO - INT(TENSAO / 256) * 256
hb% = (TENSAO - lb%) / 256
OUT pORT% + 4, lb%
OUT pORT% + 5, hb%
IF r = 0 THEN OUT pORT% + 14, 136 ELSE OUT pORT% + 14, 8
pol = XXXX
REM COLOR 11, 1
LOCATE 39, 68: PRINT "activacao"
LOCATE 39, 55: PRINT "*"
```

```
LOCATE 35, 5: PRINT "Para interromper prima P..."
LOCATE 39, 56: PRINT USING "####.##"; pol
REM COLOR 7, 1
LOCATE 31, 69: PRINT p

REM ***************** tempo de espera ***************

tt = TIMER
DO
LOOP WHILE TIMER - tt <= .5

REM ******************* ENTRADA DO SINAL DIGITAL ****************

DO
  IF UCASE$(INKEY$) = "P" THEN
    LOCATE 35, 64: PRINT SPACE$(6)
    LOCATE 39, 55: PRINT "       "
    LOCATE 39, 68: PRINT "       "
    LOCATE 31, 69: PRINT "    "
    FLAG = 1
    EXIT DO
  END IF
LOOP WHILE (INP(pORT% + 6) AND 1) <> 0
IF FLAG = 1 THEN 6900


REM ***************** VALVULA SOLENOIDE ****************

IF r = 0 THEN OUT pORT% + 14, 140 ELSE OUT pORT% + 14, 12

REM ******************************************************

6900
LOCATE 35, 5: PRINT "                    "
LOCATE 31, 56: PRINT SPACE$(7)
LOCATE 39, 55: PRINT "       "
LOCATE 39, 68: PRINT "       "
END SUB

SUB nquadro (cont, dado, w$, x, y, b$)

REM COLOR 7, 1
FOR hh = 1 TO cont - 5

1111 LOCATE hh + 5, col(1): INPUT "  ", dado$
     IF dado$ <> " " THEN
          dado = VAL(dado$)
          qua(hh, 1) = dado
      END IF

2222 LOCATE hh + 5, col(2): INPUT " ", w$
    IF w$ <> "" THEN
          IF LCASE$(w$) = "a" THEN qua(hh, 2) = 1
          IF LCASE$(w$) = "f" THEN qua(hh, 2) = 0
     END IF

3333 LOCATE hh + 5, col(3): INPUT " ", x$
     IF x$ <> "" THEN
          x = VAL(x$)
          qua(hh, 3) = x
```

```
    END IF

4444 LOCATE hh + 5, col(4): INPUT " ", y$
    IF y$ <> "" THEN
        y = VAL(y$)
        qua(hh, 4) = y
    END IF

5555 LOCATE hh + 5, col(5): INPUT " ", b$
    IF b$ <> "" THEN
        IF LCASE$(b$) = "b" THEN qua(hh, 5) = 1
        IF LCASE$(b$) = "a" THEN qua(hh, 5) = 0
    END IF

NEXT hh

END SUB

SUB paragem (VEL, r, FLAG)

pORT% = &H220

REM ************ BOMBA A BAIXA ROTACAO ******************

IF FLAG = 1 THEN 2345

IF VEL = 0 THEN
    OUT pORT% + 14, 0
    GOTO 2345
ELSE
    IF r = 0 THEN OUT pORT% + 14, 136 ELSE OUT pORT% + 14, 8
    OUT pORT% + 4, 1   'EQUIVALENTE A 1,51 RPM
    OUT pORT% + 5, 1
END IF

pol = XXX

REM ******************** ENTRADA DIGITAL ****************

REM COLOR 11, 1
LOCATE 39, 55: PRINT "*"
LOCATE 39, 56: PRINT USING "####.##"; pol
LOCATE 35, 5: PRINT "Para interromper prima P..."
LOCATE 39, 68: PRINT "paragem"

DO
    IF UCASE$(INKEY$) = "P" THEN
        LOCATE 35, 64: PRINT SPACE$(6)
        LOCATE 39, 55: PRINT "       "
        LOCATE 35, 5: PRINT "                          "
        LOCATE 39, 68: PRINT "       "
        FLAG = 1
        EXIT DO
    END IF
LOOP WHILE (INP(pORT% + 6) AND 1) <> 0

2345
LOCATE 35, 64: PRINT SPACE$(6)
LOCATE 39, 55: PRINT "       "
LOCATE 39, 68: PRINT "       "
```

```
LOCATE 35, 5: PRINT "                    "
END SUB

SUB porta (p, Vn, VA)
 pORT% = &H220
     IF p = 10 THEN p = 32


 OUT pORT% + 13, (127 - 16 - p)

  IF Vn > VA THEN
     TESP = (Vn - VA) * 6 / 10
     TTT = TIMER
     DO
     LOOP WHILE TIMER - TTT <= TESP
  END IF
  IF Vn < VA THEN
     TESP = ((11 - VA) + Vn) * 6 / 10
     TTT = TIMER
     DO
     LOOP WHILE TIMER - TTT <= TESP
  END IF
END SUB
```

Programa de controlo do sistema SIA que incorporava uma válvula selectora e duas microbombas solenóides como unidade de propulsão

```
DECLARE SUB porta ()
DECLARE SUB ajuda ()
DECLARE SUB ler ()
DECLARE SUB entrada ()
DECLARE SUB escala ()
DECLARE SUB gravar ()
DECLARE SUB iniciar ()
DECLARE SUB executar ()
DECLARE SUB binaria ()
DECLARE SUB lavar ()
DECLARE SUB definir ()
DECLARE SUB varrer ()
DECLARE SUB inicio ()

COMMON SHARED p%, p2%
COMMON SHARED fase
COMMON SHARED grava
COMMON SHARED escalaX
COMMON SHARED escalay
COMMON SHARED FICHEIRO$
COMMON SHARED flagravar
COMMON SHARED posSIA, bitSIA, posSIAP
DIM SHARED controlo(20, 10)
DIM SHARED col(7)

'****************** ENDEREÇO DA PLACA ***********************************
p% = &H300 + 13     '1 E 2 PARA BOMBAS, O RESTO PARA VALVULAS
p2% = &H300 + 14    'PARA VALVULAS CASO HAJA MUITAS BOMBAS
'************************************************************************
DATA 5,16,24,34,47,61,74
FOR a = 1 TO 7
READ p
col(a) = p
NEXT a
RESTORE
CALL iniciar

escalay = 1800              'escala dos Y = 1800 segundos
escalaX = 2.5               'escala dos X = 2.5 unidades de absorvancia
SCREEN 9
WINDOW (0, 0)-(escalay, 3)
LINE (0, escalaX)-(escalay, escalaX), 6
OUT p%, 0
1
CLS
LINE (0, 2.95)-(escalay, 2.95), 9
LINE (0, 2.7)-(escalay, 2.7), 9
COLOR 13: LOCATE 2, 4: PRINT "1": LOCATE 2, 18: PRINT "2": LOCATE 2, 35: PRINT "3":
LOCATE 2, 53: PRINT "4": LOCATE 2, 66: PRINT "F"
```

```
COLOR 11: LOCATE 2, 5: PRINT " - LAVAGEM": LOCATE 2, 19: PRINT " - VARRIMENTO":
LOCATE 2, 36: PRINT " - NOVO ENSAIO": LOCATE 2, 54: PRINT " - GRAVADO": LOCATE 2, 67:
PRINT " - FIM"; ""
COLOR 13: LOCATE 4, 50: PRINT "5"
COLOR 13: LOCATE 6, 50: PRINT "6"
COLOR 11: LOCATE 4, 51: PRINT " - Ver registos em disco"
COLOR 10: LOCATE 6, 51: PRINT " - AJUDA EM CASO DE EMERGENCIA"
DO
a$ = INKEY$
LOOP UNTIL UCASE$(a$) = "1" OR UCASE$(a$) = "3" OR UCASE$(a$) = "4" OR UCASE$(a$) =
"5" OR UCASE$(a$) = "6" OR UCASE$(a$) = "F"

IF UCASE$(a$) = "6" THEN
CALL ajuda
GOTO 1
END IF

IF UCASE$(a$) = "S" THEN
CLS
END
END IF

IF UCASE$(a$) = "1" THEN
CALL lavar
GOTO 1
END IF
'IF UCASE$(a$) = "2" THEN
'CALL varrer
'GOTO 1
'END IF

IF UCASE$(a$) = "3" THEN
CALL definir
CALL executar
GOTO 1
END IF

IF UCASE$(a$) = "4" THEN
CALL entrada
IF fase > 0 THEN CALL executar
GOTO 1
END IF


IF UCASE$(a$) = "5" THEN
CALL ler
GOTO 1
END IF



SUB ajuda
CLS
COLOR 11: LOCATE 2, 5: PRINT
LOCATE 3, 5: PRINT
LOCATE 5, 5: PRINT "Ctrl C - para escolher nome do arquivo"
COLOR 11: LOCATE 7, 5: PRINT "APAGAR ARQUIVO DE DADOS:"
COLOR 15: LOCATE 8, 5: PRINT "No DOS escrever:  del c:\dados\nome do arquivo + .dad"
LOCATE 9, 5: PRINT "por exemplo: c:\dados\josiane.dad"
```

```
COLOR 11: LOCATE 11, 5: PRINT "COPIAR ARQUIVO PARA DISKETTE:"
COLOR 15: LOCATE 12, 5: PRINT "No DOS escrever: copy c:\dados\nome do arquivo + .dad a:"
LOCATE 13, 5: PRINT "por exemplo: c:\dados\josiane.dad a:"
COLOR 11: LOCATE 15, 5: PRINT "Bits para actuar valvulas: V1  V2  V3  V4  V5  V6  V7
Todas"; ""
COLOR 15: LOCATE 16, 26: PRINT "Bits: 1  2  4  8  16  32  64  255"
LOCATE 17, 5: PRINT "Conjuntos de valvulas = soma dos bits,  por exemplo: V1+V2 = 1+2 = 3"
COLOR 12: LOCATE 18, 5: PRINT
COLOR 14: LOCATE 20, 5: PRINT "ENDERECO DA PLACA:  p% = &H220 + 13 ou +14"
LOCATE 21, 10: PRINT "no inicio do modulo principal paula-P.BAS"
COLOR 12: LOCATE 23, 5: PRINT "ENTER para sair"
DO
a$ = INKEY$
LOOP WHILE a$ = ""

END SUB

'********** SUB-ROTINA PARA ENTRADA DE PARAMETROS ********
'
'
SUB definir


SCREEN 9
WINDOW (0, 0)-(escalay, 3)
CLS
n = 1
COLOR 14: LOCATE 2, 1: PRINT "Valv-Bomb: 1  2  3  4  5  6  7"
COLOR 3: LOCATE 3, 1: PRINT "Bit:     1  2  4  8  16  32  64 (Somam-se este valores)"

COLOR 11: LOCATE n, 1: PRINT "ENTRADA DE DADOS "
COLOR 13: LOCATE n + 3, 38: PRINT "1          2          3"
COLOR 10: LOCATE n + 3, 40: PRINT "- Nova Fase": LOCATE n + 3, 55: PRINT "- Repetir":
LOCATE n + 3, 68: PRINT "- Sair"
COLOR 12: LOCATE n + 5, 5: PRINT "FASE     B1     B2     PULSOS     T. PULSO     POS. SIA
POS. SOLEN."
LINE (0, 2.45)-(escalay, 2.45), 9
LINE (0, 2.2)-(escalay, 2.2), 9

a = 1
500
COLOR 15
LOCATE a + 7, col(1): PRINT a: controlo(a, 1) = a
LOCATE a + 7, col(2): INPUT "", VALV1: controlo(a, 2) = VALV1
LOCATE a + 7, col(3): INPUT "", VALV2: controlo(a, 3) = VALV2
LOCATE a + 7, col(4): INPUT "", pulsos: controlo(a, 4) = pulsos
LOCATE a + 7, col(5): INPUT "", tempulso: controlo(a, 5) = tempulso
LOCATE a + 7, col(6): INPUT "", posSIA: controlo(a, 6) = posSIA
LOCATE a + 7, col(7): INPUT "", posvalv: controlo(a, 7) = posvalv
    DO
    FOR c = 1 TO 600
    COLOR 15: LOCATE n + 3, 30: PRINT "[TECLA]"
    NEXT c
    a$ = INKEY$
    FOR c = 1 TO 600
    LOCATE n + 3, 30: PRINT SPACE$(7)
    NEXT c
    LOOP UNTIL UCASE$(a$) = "1" OR UCASE$(a$) = "2" OR UCASE$(a$) = "3"
    IF UCASE$(a$) = "1" THEN
    a = a + 1
```

```
    LOCATE 1, 30: PRINT SPACE$(7)
    END IF
    IF UCASE$(a$) = "2" THEN
    a = a
    LOCATE a + 7, col(1): PRINT SPACE$(5)
    LOCATE a + 7, col(2): PRINT SPACE$(5)
    LOCATE a + 7, col(3): PRINT SPACE$(5)
    LOCATE a + 7, col(4): PRINT SPACE$(5)
    LOCATE a + 7, col(5): PRINT SPACE$(5)
    LOCATE a + 7, col(6): PRINT SPACE$(5)
    LOCATE a + 7, col(7): PRINT SPACE$(5)
    LOCATE 1, 30: PRINT SPACE$(7)
    END IF
    IF UCASE$(a$) = "3" THEN
    OUT p%, 0
    fase = a
    CALL gravar
    EXIT SUB
    END IF

GOTO 500

END SUB

SUB entrada
OPEN "c:\param.par" FOR INPUT AS #1
B = 1
WHILE NOT EOF(1)
FOR a = 1 TO 7
INPUT #1, n
controlo(B, a) = n
NEXT a
B = B + 1
WEND
CLOSE #1
fase = controlo(B - 1, 1)
CLS
n = 1
COLOR 14: LOCATE 2, 1: PRINT "Valvulas: 1  2  3  4  5  6  7"
COLOR 3: LOCATE 3, 1: PRINT "Bit:    1  2  4  8  16  32  64 (Somam-se este valores)"
COLOR 11: LOCATE n, 1: PRINT "ENTRADA DE DADOS "
COLOR 13: LOCATE n + 3, 38: PRINT "1          2          3"
COLOR 10: LOCATE n + 3, 40: PRINT "- Nova Fase": LOCATE n + 3, 55: PRINT "- Repetir":
LOCATE n + 3, 68: PRINT "- Sair"
COLOR 12: LOCATE n + 5, 5: PRINT "FASE     B1     B2     PULSOS     T. PULSO     POS. SIA
POS. SOLEN."
LINE (0, 2.45)-(escalay, 2.45), 9
LINE (0, 2.2)-(escalay, 2.2), 9

FOR a = 1 TO fase
COLOR 15
LOCATE a + 7, col(1): PRINT controlo(a, 1)
LOCATE a + 7, col(2): PRINT controlo(a, 2)
LOCATE a + 7, col(3): PRINT controlo(a, 3)
LOCATE a + 7, col(4): PRINT controlo(a, 4)
LOCATE a + 7, col(5): PRINT controlo(a, 5)
LOCATE a + 7, col(6): PRINT controlo(a, 6)
LOCATE a + 7, col(7): PRINT controlo(a, 7)
NEXT a
```

```
DO
FOR c = 1 TO 150
COLOR 15: LOCATE 4, 30: PRINT "[TECLA]"
NEXT c
a$ = INKEY$
FOR c = 1 TO 150
LOCATE 4, 30: PRINT SPACE$(7)
NEXT c
LOOP UNTIL UCASE$(a$) = "1" OR UCASE$(a$) = "2" OR UCASE$(a$) = "3"
IF UCASE$(a$) = "1" THEN
CALL definir
EXIT SUB
END IF
IF UCASE$(a$) = "2" THEN EXIT SUB
IF UCASE$(a$) = "3" THEN
'fase = 1
EXIT SUB
END IF

END SUB

SUB executar

FICHEIRO$ = MID$(DATE$, 4, 2) + LEFT$(DATE$, 2) + LEFT$(TIME$, 2) + MID$(TIME$, 4, 2)
IF flagravar = 1 THEN OPEN "c:\dados\" + FICHEIRO$ + ".dad" FOR OUTPUT AS #1

25
CLS
LINE (0, 0)-(escalay, 2.5), 9, B

LOCATE 1, 62: PRINT "Escala X:"; escalaX
LOCATE 2, 62: PRINT "Escala Y:"; escalay; "s"
COLOR 12: LOCATE 3, 62: PRINT "S - SAIR"
COLOR 15
ch% = 0: gain% = 1
PSET (0, 0)

OUT p% + 11, 1          'ENABLE SOFTWARE TRIGGER

flag = 0

ttt = TIMER
tttt = TIMER
600
OUT p2%, 127
FOR a = 1 TO fase
COLOR 11: LOCATE 1, 5: PRINT "FASE"; "("; fase; ")"; ": ": COLOR 15: LOCATE 1, 15: PRINT
controlo(a, 1)
bit1 = controlo(a, 2)
bit2 = controlo(a, 3)
pulsototal = controlo(a, 4)
ttpulso = controlo(a, 5)
posSIA = controlo(a, 6)
bitSIA = posSIA
posSIAP = controlo(a - 1, 6)
posvalv = controlo(a, 7)

OUT p%, posvalv         '*********  posiciona as valvulas
CALL porta
```

```
DO
IF flag = 0 THEN
    OUT p%, bit2 + posvalv
    flag = 1
    ELSE
    OUT p%, bit1 + posvalv
    flag = 0
    pulso = pulso + 1
    COLOR 11: LOCATE 2, 5: PRINT "PULSO"; "("; controlo(a, 4); ")"; ": ": COLOR 15: LOCATE 2,
16: PRINT pulso,
    COLOR 9: LOCATE 3, 5: PRINT "BIT VALVULAS: "; controlo(a, 6)
    COLOR 11
    END IF

    T = TIMER
    DO
    tt = TIMER - T
    COLOR 15: LOCATE 1, 30: PRINT USING "TEMPO: ###.#  "; tt
    LOOP WHILE tt < ttpulso
    IF INKEY$ = "s" OR INKEY$ = "S" THEN
    CLOSE #1
    EXIT SUB
    END IF

LOOP WHILE pulso < pulsototal
LOCATE 2, 5: PRINT SPACE$(20)
pulso = 0
NEXT a

LOCATE 4, 4: PRINT "<ENTER> - injectar novamente     <SPACE> - Sair"
DO
a$ = INKEY$
LOOP WHILE UCASE$(a$) = ""

IF UCASE$(a$) = CHR$(13) THEN
OUT p2%, 127
OUT p2%, 127 - 16 - 1
ret = TIMER
pey = (11 - posSIAP) * 6 / 10
DO
LOOP WHILE TIMER - ret <= pey
GOTO 600
ELSE
EXIT SUB
END IF

'    DO              '******* INICIO AQUISICAO *********
    media = 0: valor = 0
    DUMMY = INP(p% + 4)    'DUMMY READ, CLEAR DRDY
    FOR B = 1 TO 5000
        OUT p% + 10, 0     'multiplexador
        OUT p% + 9, gain%    'ganho
        OUT p% + 12, 0      'TRIG
690       dh = INP(p% + 5)              'HIGH BYTE

REM           IF dh > 15 GOTO 690    'CHECK DRDY READY ?
        dl = INP(p% + 4)    'LOW BYTE
        sinal = dh * 256 + dl - 2048            'data A/D , BIPOLAR
        media = media + sinal
    NEXT B
```

```
    IF INKEY$ = "s" OR INKEY$ = "S" THEN
    CLOSE #1
    EXIT SUB
    END IF
    valor = (media / 5000000) * 11.89
    COLOR 15: LOCATE 3, 30: PRINT USING "SINAL: #.###"; valor
    LOCATE 2, 30: PRINT USING "TEMPO TOTAL: ####"; ttotal
    ttotal = TIMER - ttt
    tttotal = TIMER - tttt
    IF valor < escalaX AND valor > 0 THEN LINE -(ttotal, valor)
    IF valor < 0 THEN LINE -(ttotal, 0)
    IF valor > escalaX THEN LINE -(ttotal, valor)

    IF flagravar = 1 THEN WRITE #1, tttotal, valor
    OUT p% + 11, 0          'DISABLE ALL TRIG MODES
    tt = TIMER - T
    COLOR 15: LOCATE 1, 30: PRINT USING "TEMPO: ###.#  "; tt
    'LOOP WHILE tt < ttpulso

IF UCASE$(a$) = CHR$(13) THEN GOTO 600
OUT p2%, 0


'LOOP WHILE pulso < pulsototal
'LOCATE 2, 5: PRINT SPACE$(20)
'pulso = 0
'NEXT a

IF ttotal > escalay THEN
CLS
LINE (0, 0)-(escalay, 2.5), 9, B
LOCATE 1, 62: PRINT "Escala X:"; escalaX
LOCATE 2, 62: PRINT "Escala Y:"; escalay; "s"
ttt = TIMER
PSET (0, valor)
END IF


LOCATE 4, 4: PRINT "<ENTER> - injectar novamente     <SPACE> - Sair"
DO
a$ = INKEY$
LOOP WHILE UCASE$(a$) = ""

IF UCASE$(a$) = CHR$(13) THEN GOTO 600
OUT p2%, 0

'ELSE
'GOSUB sair:
'END IF

'sair:
'CLOSE #1
'OUT p%, 0


END SUB

SUB gravar
LINE (600, 1.15)-(1300, .7), 15, B
```

```
DO
      FOR d = 1 TO 150
      COLOR 11: LOCATE 17, 30: PRINT "GRAVAR DADOS <S/N>"
      NEXT d
      FOR d = 1 TO 150
      COLOR 11: LOCATE 17, 30: PRINT SPACE$(12)
      NEXT d
a$ = INKEY$
LOOP UNTIL UCASE$(a$) = "S" OR UCASE$(a$) = "N"

IF UCASE$(a$) = "S" THEN
SHELL "del c:\param.par"
OPEN "c:\" + "param" + ".par" FOR OUTPUT AS #1
FOR a = 1 TO fase
      FOR B = 1 TO 7
      WRITE #1, controlo(a, B)
      NEXT B
NEXT a
CLOSE #1
END IF

COLOR 13: LOCATE 17, 30: PRINT "GRAVAR REGISTO <S/N>"
      DO
      a$ = INKEY$
      LOOP UNTIL UCASE$(a$) = "S" OR UCASE$(a$) = "N"
      IF UCASE$(a$) = "N" THEN
      flagravar = 0
      EXIT SUB
      END IF
      IF UCASE$(a$) = "S" THEN
700    COLOR 15: LOCATE 18, 30: INPUT "NOME ARQUIVO (<8): ", FICHEIRO$
      IF LEN(FICHEIRO$) > 8 THEN
      LOCATE 19, 30: PRINT SPACE$(60)
      GOTO 700
      END IF
      flagravar = 1
      EXIT SUB
      END IF


END SUB

SUB iniciar
SCREEN 9
WINDOW (0, -.01)-(10000, 3)
COLOR 11: LOCATE 15, 34: PRINT "[ENTER]"
COLOR 11: LOCATE 7, 29: PRINT "Software da Paula 1.0"; ""
COLOR 15: LOCATE 10, 32: PRINT "SIA-BOMBA 2003"
COLOR 13: LOCATE 11, 28: PRINT "Bombas e valvulas Inc."
COLOR 9: LOCATE 21, 28: PRINT "TOMARA QUE DE CERTO"
50
FOR a = 1 TO 9500 STEP 25
LINE (0, 1.6)-(a, 1.4), 9, BF
IF INKEY$ <> "" THEN EXIT SUB
NEXT a
FOR a = 1 TO 9500 STEP 25
LINE (0, 1.6)-(a, 1.4), 1, BF
IF INKEY$ <> "" THEN EXIT SUB
NEXT a
FOR a = 8500 TO 0 STEP -25
```

```
LINE (a, 1.6)-(9500, 1.4), 9, BF
IF INKEY$ <> "" THEN EXIT SUB
NEXT a
FOR a = 9500 TO 0 STEP -25
LINE (a, 1.6)-(9500, 1.4), 1, BF
IF INKEY$ <> "" THEN EXIT SUB
NEXT a

GOTO 50

END SUB
SUB lavar
COLOR 14
bit1 = 0
bit2 = 0

tlavar = .3

OUT p%, 0
LOCATE 4, 5: PRINT "1 - Porta 1"
LOCATE 5, 5: PRINT "2 - Porta 2"
LOCATE 6, 5: PRINT "3 - Porta 3"
LOCATE 7, 5: PRINT "4 - Porta 4"
LOCATE 8, 5: PRINT "5 - Porta 5"
LOCATE 9, 5: PRINT "6 - Porta 6"
LOCATE 10, 5: PRINT "7 - Porta 7"
LOCATE 11, 5: PRINT "8 - Porta 8"
LOCATE 12, 5: PRINT "9 - Porta 9"
LOCATE 13, 5: PRINT "0 - Porta 10"
COLOR 12: LOCATE 15, 5: PRINT "L - LIXO"
COLOR 10: LOCATE 16, 5: PRINT "D - DETECTOR"
COLOR 11: LOCATE 17, 5: PRINT "S - SAIR"

1000
OUT p2%, 127
    IF flag = 0 THEN
    OUT p%, bit1
    flag = 1
    ELSE
    OUT p%, bit2
    flag = 0
    END IF
T = TIMER
DO
tt = TIMER - T
a$ = INKEY$: IF UCASE$(a$) <> "" THEN EXIT DO
LOOP UNTIL tt >= tlavar

IF UCASE$(a$) = "" THEN
GOTO 1000
ELSE
    IF UCASE$(a$) = "1" THEN
    OUT p2%, 27 - 16 - 1
    bit2 = 1
    bit1 = 0
    END IF
    IF UCASE$(a$) = "2" THEN
    OUT p2%, 127 - 16 - 2
    bit2 = 1
    bit1 = 0
```

```
END IF
IF UCASE$(a$) = "3" THEN
OUT p2%, 127 - 16 - 3
bit2 = 1
bit1 = 0
END IF
IF UCASE$(a$) = "4" THEN
OUT p2%, 127 - 16 - 4
bit2 = 1
bit1 = 0
END IF
IF UCASE$(a$) = "5" THEN
OUT p2%, 127 - 16 - 5
bit2 = 1
bit1 = 0
END IF
IF UCASE$(a$) = "6" THEN
OUT p2%, 127 - 16 - 6
bit2 = 1
bit1 = 0
END IF
IF UCASE$(a$) = "7" THEN
OUT p2%, 127 - 16 - 7
bit2 = 1
bit1 = 0
END IF
IF UCASE$(a$) = "8" THEN
OUT p2%, 127 - 16 - 8
bit2 = 1
bit1 = 0
END IF
IF UCASE$(a$) = "9" THEN
OUT p2%, 127 - 16 - 9
bit2 = 1
bit1 = 0
END IF
IF UCASE$(a$) = "0" THEN
OUT p2%, 127 - 16 - 32
bit2 = 1
bit1 = 0
END IF
IF UCASE$(a$) = "L" THEN
OUT p2%, 127 - 16 - 32
bit2 = 2
bit1 = 0
END IF
IF UCASE$(a$) = "D" THEN
OUT p2%, 127 - 16 - 32
bit2 = 2
bit1 = 0
END IF

IF VAL(a$) <> 0 THEN
COLOR 10: LOCATE 19, 5: PRINT "LAVANDO:  "; a$; " "; SPACE$(10)
ELSE
    IF UCASE$(a$) = "L" THEN
    COLOR 10: LOCATE 19, 5: PRINT "PARA LIXO..."; SPACE$(10)
    END IF
    IF UCASE$(a$) = "D" THEN
    COLOR 12: LOCATE 19, 5: PRINT "PARA DETECTOR..."
```

```
        END IF
    END IF
    IF UCASE$(a$) = "S" THEN
    FOR a = 4 TO 20
    LOCATE a, 5: PRINT SPACE$(40)
    NEXT a
    OUT p2%, 0
    EXIT SUB
    END IF
END IF
GOTO 1000
END SUB

SUB ler

175
SHELL "DIR C:\dados\*.dad> DIRFILE"
SHELL "TYPE DIRFILE|more "
PRINT
PRINT

185 INPUT "NOME DO FICHEIRO:", NOME$
IF NOME$ = "" THEN GOTO 185
FICHEIRO$ = "C:\DADOS\" + NOME$ + ".DAD"
CLS
IF FICHEIRO$ <> "" THEN
OPEN FICHEIRO$ FOR INPUT AS #1
B = 1
WHILE NOT EOF(1)
INPUT #1, X, Y
B = B + 1
WEND
CLOSE #1
WINDOW (0, 0)-(B, 3)
LINE (0, 0)-(B, 2.5), 9, B
PSET (0, 0)
OPEN FICHEIRO$ FOR INPUT AS #1
WHILE NOT EOF(1)
INPUT #1, X, Y
LINE -(X, Y)
WEND
CLOSE #1
ELSE
EXIT SUB
END IF
BEEP
LOCATE 1, 5: PRINT "1 - VER NOVO ARQUIVO     2 - SAIR"

DO
a$ = INKEY$
LOOP UNTIL UCASE$(a$) = "1" OR UCASE$(a$) = "2"

IF UCASE$(a$) = "1" THEN
CLS
GOTO 175
END IF

EXIT SUB

END SUB
```

```
SUB porta
IF bitSIA = 10 THEN bitSIA = 32
OUT p2%, (127 - 16 - bitSIA)
IF posSIA > posSIAP THEN tesp = (posSIA - posSIAP) * 6 / 10
IF posSIA < posSIAP THEN tesp = ((11 - posSIAP) + posSIA) * 6 / 10
ttt = TIMER
DO
LOOP WHILE TIMER - ttt <= tesp
END SUB

SUB varrer
WINDOW (0, -.2)-(escalay, 3)
COLOR 10
LOCATE 4, 23: INPUT "Pulsos Iniciais: ", pulsoamostra
LOCATE 5, 23: INPUT "Incremento: ", inc
LOCATE 6, 23: INPUT "Pulsos Finais: ", pulsoamostrafinal
LOCATE 7, 23: INPUT "Tempo de Pulso: ", tempulso
LOCATE 8, 23: INPUT "Numero de Leituras: ", leituras
LOCATE 9, 23: INPUT "Pulsos de transportador: ", pulsotrans
LOCATE 11, 23: PRINT "I - INICIAR  S - SAIR"
DO
a$ = INKEY$
LOOP UNTIL UCASE$(a$) = "I" OR UCASE$(a$) = "S"

IF UCASE$(a$) = "S" THEN
FOR a = 4 TO 11
LOCATE a, 21: PRINT SPACE$(40)
NEXT a
EXIT SUB
END IF

CLS
LOCATE 1, 62: PRINT "Escala X:"; escalaX
LOCATE 2, 62: PRINT "Escala Y:"; escalay; "s"
COLOR 12: LOCATE 3, 62: PRINT "S - SAIR"
LINE (0, 0)-(escalay, 2.5), 9, B
COLOR 15


FICHEIRO$ = MID$(DATE$, 4, 2) + LEFT$(DATE$, 2) + LEFT$(TIME$, 2) + MID$(TIME$, 4, 2)
OPEN "c:\dados\" + FICHEIRO$ + ".dad" FOR OUTPUT AS #1

ch% = 0: gain% = 1
xx = 0
PSET (0, 0)

OUT p% + 11, 1          'ENABLE SOFTWARE TRIGGER

flag = 0
flag2 = 0
pulso1 = 1
pulso2 = 1
leitura = 1
ttotal = 0
ttt = TIMER
90

IF pulsoamostra <= pulsoamostrafinal THEN
   IF leitura <= leituras THEN
```

```
    IF pulso1 <= pulsotrans THEN
        IF flag = 0 THEN
            OUT p%, 0
            flag = 1
        ELSE
            OUT p%, 4
            flag = 0
            LOCATE 2, 30: PRINT "PULSO (T): "; pulso1
            pulso1 = pulso1 + 1
        END IF
    ELSE

        IF pulso2 <= pulsoamostra THEN
            IF flag2 = 0 THEN
                OUT p%, 0
                flag2 = 1
            ELSE
                OUT p%, 2
                flag2 = 0
                LOCATE 3, 30: PRINT "PULSO (A): "; pulso2
                pulso2 = pulso2 + 1
            END IF
        ELSE
            leitura = leitura + 1
            pulso2 = 1
            pulso1 = 1
        END IF
    END IF

  ELSE
  pulsoamostra = pulsoamostra + inc
  leitura = 1
  END IF

T = TIMER
DO
    media = 0: valor = 0
        DUMMY = INP(p% + 4)     'DUMMY READ, CLEAR DRDY
    FOR a = 1 TO 5000
        IF INKEY$ = "s" OR INKEY$ = "S" THEN
        CLOSE #1
        EXIT SUB
        END IF
        OUT p% + 10, 0      'multiplexador
        OUT p% + 9, gain%     'ganho
        OUT p% + 12, 0        'TRIG
670       dh = INP(p% + 5)     'HIGH BYTE
        IF dh > 15 GOTO 670     'CHECK DRDY READY ?
        dl = INP(p% + 4)     'LOW BYTE
        sinal = dh * 256 + dl - 2048   'data A/D , BIPOLAR
        media = media + sinal
    NEXT a
    valor = (media / 5000000) * 11.89
    LOCATE 3, 30: PRINT USING "SINAL: #.###"; valor
    ttotal = TIMER - ttt
    LOCATE 2, 30: PRINT USING "TEMPO TOTAL: ####"; ttotal
    IF valor < escalaX AND valor > 0 THEN
    LINE -(ttotal, valor)
    ELSE IF valor < 0 THEN LINE -(ttotal, 0)
    ELSE IF valor > escalaX THEN LINE -(ttotal, valor)
```

```
    END IF

    WRITE #1, ttotal, valor
    OUT p% + 11, 0          'DISABLE ALL TRIG MODES
    tt = TIMER - T
    LOCATE 1, 30: PRINT USING "TEMPO: ###.#"; tt
LOOP UNTIL tt >= tempulso

GOTO 90
END IF
END SUB
```

Programa de controlo do sistema SIA que incorporava uma válvula selectora e uma válvula de injecção

```
REM************************************************************************
REM*                                        *
REM*                                        *
REM*        UTILIZAÇÃO DA VALVULA CRISOM. software          *
REM*         VALVULA FIA  2 BOMBAS SEM CIRCUITO 1 SOLENOIDE
REM*
REM*                                        *
REM************************************************************************

DECLARE SUB porta (p, tesp, valvula)

DECLARE SUB bomb (VEL, T1, flag, alfa, beta, sol)

OPEN "com1: 2400,e,7,2,asc,rs,ds0" FOR RANDOM AS #1
PRINT #1, "N"

10 CLS

port% = &H220

SCREEN 11


REM*******************DEFINIÇÃO DO ECRAN*************************************

WINDOW (1000, 1000)-(0, 0)

LINE (0, 0)-(1000, 1000), , B
LINE (10, 900)-(990, 985), , B
LINE (680, 56)-(965, 320), , B
LOCATE 2, 10: PRINT "PROGRAMA DE CONTROLO DO SISTEMA SIA COM VALVULA A/FIA
CRISOM"
LOCATE 4, 2: PRINT "Posiçao"
LOCATE 5, 2: PRINT "(1-8)"
LOCATE 4, 10: PRINT "Tempo"
LOCATE 5, 11: PRINT "(s)"
LOCATE 4, 16: PRINT "Caudal"
LOCATE 5, 16: PRINT "(0-45)"
LOCATE 4, 23: PRINT "BombaS"
LOCATE 5, 23: PRINT "(a/b/c)"
LOCATE 4, 31: PRINT "Posiçao"
LOCATE 5, 32: PRINT "(1-2)"
LOCATE 4, 39: PRINT "BombaF"
LOCATE 5, 39: PRINT "(a/b/c)"
LOCATE 4, 47: PRINT "Solenoide"
LOCATE 5, 48: PRINT "(a/f)"
LOCATE 19, 56: PRINT "tempo"
LOCATE 19, 69: PRINT "posição"
LOCATE 22, 62: PRINT "ciclo"

REM***************CARACTERÍSTICAS DO QUADRO*********************************
```

```
DIM col(7)     'define um vector de colunas para os dados no ecr,,
DATA 4,10,17,25,34,40,48
      FOR C = 1 TO 7
       READ p
       col(C) = p
      NEXT C
RESTORE

REM*************INICIALIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS*********************************

DIM SHARED qua(30, 7)  'este quadro vai conter os valores das variáveis
FOR I = 1 TO 30
      FOR k = 1 TO 7
       qua(I, k) = 0
      NEXT k
NEXT I

REM*************ENTRADA DE DADOS*******************************************

klin = 6
DO
 LOCATE klin, col(1): INPUT " ", dado$
 IF dado$ = "" THEN EXIT DO
 dado = VAL(dado$)
 qua(klin - 5, 1) = dado
 LOCATE klin, col(2): INPUT " ", x
 qua(klin - 5, 2) = x
 LOCATE klin, col(3): INPUT " ", y
 qua(klin - 5, 3) = y
 LOCATE klin, col(4): INPUT " ", B$
   IF LCASE$(B$) = "a" THEN qua(klin - 5, 4) = 1
   IF LCASE$(B$) = "b" THEN qua(klin - 5, 4) = 0
   IF LCASE$(B$) = "c" THEN qua(klin - 5, 4) = 2
 LOCATE klin, col(5): INPUT " ", valvula$
 valvula = VAL(valvula$)
 qua(klin - 5, 5) = valvula
 LOCATE klin, col(6): INPUT " ", C$
   IF LCASE$(C$) = "a" THEN qua(klin - 5, 6) = 1
   IF LCASE$(C$) = "b" THEN qua(klin - 5, 6) = 0
   IF LCASE$(C$) = "c" THEN qua(klin - 5, 6) = 2
88 LOCATE klin, col(7): INPUT " ", w$
      IF LCASE$(w$) <> "a" AND LCASE$(w$) <> "f" THEN
         BEEP
            LOCATE klin, col(6): PRINT SPACE$(6)
            GOTO 88
      END IF
  IF LCASE$(w$) = "f" THEN qua(klin - 5, 7) = 0
  IF LCASE$(w$) = "a" THEN qua(klin - 5, 7) = 1


   klin = klin + 1
LOOP
1 BEEP
20 LOCATE 13, 56: INPUT "alterar dados? (s/n) ", d$
IF LCASE$(d$) <> "n" AND LCASE$(d$) <> "s" THEN 1
IF LCASE$(d$) = "s" THEN
cont = klin - 1
  GOTO 4000
END IF
LOCATE 15, 56: PRINT "n£mero de repeti‡"es"
```

```
LOCATE 16, 56: INPUT "do ciclo: ", CICLO
LOCATE 16, 70: PRINT " "

REM*************EXECUÇÃO DAS INSTRUÇÕES*************************************

   FOR cic = 1 TO CICLO
   LOCATE 23, 64: PRINT cic

    FOR lin = 1 TO (klin - 6)
     flag = 0
    valvula = qua(lin, 5)
     p = qua(lin, 1)
     IF lin = 1 THEN
       VN = 2 * p + 3
       VA = p
     END IF
      IF lin > 1 THEN
       VN = qua(lin, 1)
       VA = qua(lin - 1, 1)
      END IF
     IF VN > VA THEN tesp = (VN - VA) + 2
     IF VN < VA THEN tesp = (8 - VA) + VN + 2
     IF VN = VA THEN tesp = 5
    CALL porta(p, tesp, valvula)


    VEL = qua(lin, 3)
    T1 = qua(lin, 2)
    sol = qua(lin, 7)
    alfa = qua(lin, 4)
    IF qua(lin, 6) = 0 THEN beta = 16
    IF qua(lin, 6) = 1 THEN beta = 0
    IF qua(lin, 6) = 2 THEN beta = 24
    CALL bomb(VEL, T1, flag, alfa, beta, sol)

    IF flag = 1 THEN 333
    NEXT lin
    PRINT #1, "0A1" + CHR$(13)
    SLEEP 1
    PRINT #1, "0B1" + CHR$(13)
    SLEEP 1
NEXT cic
333  PRINT #1, "0A1" + CHR$(13)
    SLEEP 4
    PRINT #1, "0B1" + CHR$(13)
2 BEEP
 LOCATE 4, 56: INPUT "mudar posição (s/n)? ", E$
 IF LCASE$(E$) <> "n" AND LCASE$(E$) <> "s" THEN 2
 IF LCASE$(E$) = "s" THEN
       LOCATE 5, 56: INPUT "válvula: ", valv$
       LOCATE 6, 56: INPUT "posição: ", h$
       m$ = UCASE$(valv$)
       PRINT #1, "0" + m$ + h$ + CHR$(13)
       SLEEP 4
       END IF
 IF LCASE$(E$) = "n" THEN 4
 GOTO 2
4 BEEP
 LOCATE 11, 56: INPUT "limpar o quadro (s/n)? ", n$
 IF LCASE$(n$) <> "n" AND LCASE$(n$) <> "s" THEN 4
```

```
 IF LCASE$(n$) = "s" THEN 10
 IF LCASE$(n$) = "n" THEN 20
STOP

REM*******************ALTERAÇÃO DO QUADRO**********************************

4000 FOR hh = 1 TO cont - 5
 LOCATE hh + 5, col(1): INPUT " ", dado$
     IF dado$ <> "" THEN
          dado = VAL(dado$)
          qua(hh, 1) = dado
     END IF
 LOCATE hh + 5, col(2): INPUT " ", x$
     IF x$ <> "" THEN
          x = VAL(x$)
          qua(hh, 2) = x
     END IF
 LOCATE hh + 5, col(3): INPUT " ", y$
     IF y$ <> "" THEN
          y = VAL(y$)
          qua(hh, 3) = y
     END IF
 LOCATE hh + 5, col(4): INPUT " ", B$
     IF B$ <> "" THEN
          IF LCASE$(B$) = "a" THEN qua(hh, 4) = 1
          IF LCASE$(B$) = "b" THEN qua(hh, 4) = 0
          IF LCASE$(B$) = "c" THEN qua(hh, 4) = 2

     END IF
 LOCATE hh + 5, col(5): INPUT " ", valvula$
     IF valvula$ <> "" THEN
          valvula = VAL(valvula$)
          qua(hh, 5) = valvula

     END IF
 LOCATE hh + 5, col(6): INPUT " ", C$
     IF C$ <> "" THEN
          IF LCASE$(C$) = "a" THEN qua(hh, 6) = 1
          IF LCASE$(C$) = "b" THEN qua(hh, 6) = 0
          IF LCASE$(C$) = "c" THEN qua(hh, 6) = 2

     END IF

 LOCATE hh + 5, col(7): INPUT " ", w$
     IF w$ <> " " THEN
          IF LCASE$(w$) = "a" THEN qua(hh, 7) = 1
          IF LCASE$(w$) = "f" THEN qua(hh, 7) = 0
     END IF


NEXT hh
GOTO 1

SUB aspirar (VEL, T1, flag)
 port% = &H220
 tt = TIMER
DO
TENSAO = INT(VEL / 45 * 16 * 4095)
lb% = TENSAO MOD 256
hb% = TENSAO \ 256
```

```
OUT port% + 4, lb%
OUT port% + 5, hb%
OUT port% + 13, 0
LOCATE 20, 56: PRINT USING "###.##"; TIMER - tt
    IF UCASE$(INKEY$) = "P" THEN
    flag = 1
    EXIT DO
    END IF
LOOP WHILE TIMER - tt < T1
OUT port% + 13, 3
END SUB

SUB bomb (VEL, T1, flag, alfa, beta, sol)
 port% = &H220
 tt = TIMER
DO
TENSAO = INT(VEL / 45 * 4095)
lb% = TENSAO - INT(TENSAO / 256) * 256
hb% = (TENSAO - lb%) / 256
OUT port% + 4, lb%
OUT port% + 5, hb%

    IF alfa = 0 THEN
        IF sol = 0 THEN
            OUT port% + 13, 64
        END IF
        IF sol = 1 THEN
            OUT port% + 13, 66
        END IF
    END IF

    IF alfa = 1 THEN
        IF sol = 0 THEN
            OUT port% + 13, 0
        END IF
        IF sol = 1 THEN
            OUT port% + 13, 2
        END IF
    END IF

    IF alfa = 2 THEN
        IF sol = 0 THEN
            OUT port% + 13, 96
        END IF
        IF sol = 1 THEN
            OUT port% + 13, 98
        END IF
    END IF


OUT port% + 14, beta



LOCATE 20, 56: PRINT USING "###.##"; TIMER - tt
    IF UCASE$(INKEY$) = "P" THEN
    flag = 1
```

```
    EXIT DO
    END IF

LOOP WHILE TIMER - tt < T1
OUT port% + 13, 96
OUT port% + 14, 24
END SUB

SUB porta (p, tesp, valvula)

 tt = TIMER
 DO
 f$ = MID$(STR$(p), 2, 1)
 PRINT #1, "0A" + f$ + CHR$(13)
 FOR y = 1 TO 2000000: NEXT
 g$ = MID$(STR$(valvula), 2, 1)
PRINT #1, "0B" + g$ + CHR$(13)
 LOOP WHILE TIMER - tt <= tesp
 END SUB
```

Listagem de publicações científicas directa ou indirectamente relacionadas com esta dissertação

- Paula C.A.G. Pinto, José L.F.C. Lima, M. Lúcia M.F.S. Saraiva, Sequential injection analysis of nitrites and nitrates in human serum using nitrate reductase, Clinica Chimica Acta 337 (2003) 69-76.

- Paula C.A.G. Pinto, M. Lúcia M.F.S. Saraiva, José L.F.C. Lima, A greener flow analysis methodology for the determination of nitrates and nitrites in waters, J. Environ. Anal. Chem. 85 (2005) 29-40.

- Paula C.A.G. Pinto, M. Lúcia M.F.S. Saraiva, João L.M. Santos, José L.F.C. Lima, A pulsed sequential injection analysis flow system for the fluorimetric determination of indomethacin in pharmaceutical preparations, Anal. Chim. Acta 539 (2005) 173-179.

- Paula C.A.G. Pinto, M. Lúcia M.F.S. Saraiva, M. Salette Reis, José L.F.C. Lima, Automatic sequential determination of the hydrogen peroxide scavenging activity and evaluation of the antioxidant potential by the ABTS assay in wines by sequential injection analysis, Anal. Chim. Acta 531 (2005) 25-32.

- Paula C.A.G. Pinto, M. Lúcia M.F.S. Saraiva, João L.M. Santos, José L.F.C. Lima, Fluorimetric determination of aminocaproic acid in pharmaceutical formulations using a sequential injection analysis system, Talanta, in press (2005).

- Zisiou Eftychia-Pavlina, Paula A.G. Pinto, M. Lúcia M.F.S. Saraiva, Christophe Siquet, José L.F.C. Lima, Sensitive sequential injection determination of naproxen based on interaction with β-cyclodextrin, Talanta, in press.

- Paula C.A.G. Pinto, M. Lúcia M.F.S. Saraiva, José L.F.C. Lima, A flow sampling strategy for the analysis of oil samples without pre-treatment in a sequential injection analysis system, Anal. Chim. Acta, in press.

- Simone Vicente, Elias A.G. Zagatto, Paula C.A.G. Pinto, Maria Lúcia M.F.S. Saraiva, José L.F.C. Lima, Exploiting gas diffusion for non-invasive sampling in flow analysis: determination of ethanol in alcoholic beverages, aceite para publicação na revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.