Ana Paula Monteiro Morgado Oliveira Pinto

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE DETECÇÃO POTENCIOMÉTRICO DIFERENCIAL PARA A DETERMINAÇÃO POR FIA DO TEOR DE AZOTO TOTAL EM ALIMENTOS E ÁGUAS

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

PORTO, 1997

Ana Paula Monteiro Morgado Oliveira Pinto

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE DETECÇÃO POTENCIOMÉTRICO DIFERENCIAL PARA A DETERMINAÇÃO POR FIA DO TEOR DE AZOTO TOTAL EM ALIMENTOS E ÁGUAS

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 01/04/2004
Reg. 3328
Cota

FFP
PIN
3328

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

PORTO, 1997

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em **Controlo de Qualidade** pela Faculdade de Farmácia do Porto

RESUMO

Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento e utilização analítica de um sistema de detecção potenciométrico diferencial para a determinação por FIA do teor de azoto total em alimentos e águas. O sistema proposto permite o doseamento de uma forma automática e com sensibilidade acrescida dos sais de amónio formados na digestão ácida das amostras, eliminando as tradicionais operações de destilação e titulação.

Para o sistema de detecção potenciométrico foram construídos eléctrodos tubulares sem solução de referência interna, sensíveis ao catião amónio. A solução sensora foi imobilizada numa membrana de PVC e era constituida por uma mistura de nonactin e monactin em fosfato de tris (2-etilhexil), com adição de uma pequena quantidade de tetraquis (4-clorofenil)borato de potássio para reduzir a resistência da membrana e aumentar, consequentemente, a velocidade de resposta.

Os eléctrodos tubulares assim construidos, foram inicialmente avaliados num sistema FIA de baixa dispersão determinando os parâmetros gerais da curva de calibração, o efeito do pH no valor do potencial, a repetibilidade do sinal analítico e a reprodutibilidade dos potenciais ao longo de um dia de trabalho, o ritmo de amostragem e os coeficientes de selectividade potenciométricos relativamente a alguns interferentes. Estes parâmetros foram posteriormente comparados com os obtidos na avaliação dos respectivos eléctrodos convencionais.

Procedeu-se de seguida ao estabelecimento do sistema de detecção diferencial, colocando sequencialmente na montagem FIA dois eléctrodos tubulares sensíveis ao catião amónio, a uma determinada distância entre si. Os eléctrodos funcionavam alternativamente um como referência do outro, permitindo deste modo determinações com maior sensibilidade. O sistema de detecção assim desenvolvido, foi inicialmente avaliado relativamente às suas principais características de funcionamento, num sistema FIA de baixa dispersão e posteriormente utilizado no doseamento potenciométrico dos sais de amónio formados na digestão ácida das amostras.

Para a análise de amostras reais estabeleceu-se uma montagem FIA que para além de incorporar o sistema de detecção diferencial, também incluia uma membrana permeável

a gases, com o objectivo de eliminar qualquer interferência de matriz. As amostras após a digestão ácida eram introduzidas no sistema de análise por injecção em fluxo onde, por alcalinização, o amónio era convertido em gás amoníaco. Este atravessava a membrana e era recolhido num fluxo aceitador onde era novamente convertido em amónio e doseado potenciometricamente.

Os resultados obtidos foram posteriormente comparados com os provenientes da metodologia de referência.

ABSTRACT

In this work it is described the development and analytical application of a differential potentiometric detection system for nitrogen determination in food and waters by flow injection analysis. The system allows the automatic determination of ammonium salts after sample digestion with increased sensitivity and need for distillation/titration step is eliminating.

Tubular electrodes without inner reference solution sensitive to ammonium ion were constructed for potentiometric detection. Tubular electrodes were prepared with PVC membrane composed of nonactin and monactin in tris (2-ethylhexyl) phosphate and potassium tetrakis (4-chlorophenyl) borate for reducing membrane resistance.

In order to assess the characteristics of the constructed tubular units it was calculated the correspondent calibration curve general parameters, effect of pH on the potential values, the analytical signal reproducibility, sampling rate and potentiometric selectivity coefficients to several interferents. The working characteristics were evaluated in a low dispersion manifold and results were compared with those obtained with conventionally-shaped electrodes.

The differential potentiometric detection system was established with two tubular electrodes of the same kind placed sequentially with a defined distance, with each one working alternatively as a reference of the other to allow sensitivity enhancement. The detection system was evaluated in a low dispersion manifold and than it was used for sample digestion nitrogen determination.

For samples analysis it was used a FIA manifold with both a differential potentiometric detection system and a gas-diffusion unit to overcome any matrix interference. The samples digestion were injected in a carrier stream and made alkaline for conversion of ammonium into ammonia which diffuses along the gas-permeable membrane to an acceptor stream. The ammonia is converted into ammonium and led towards the differential potentiometric detection system.

The results obtained with FIA were compared with those obtained by reference procedure.

Agradecimentos

À Faculdade de Farmácia agradeço o ter-me aceite como estudante de Mestrado e todas as facilidades concedidas.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, Programa PRAXIS XXI, agradeço a concessão de uma bolsa de Mestrado para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima agradeço o ter-me aceite no seu grupo de trabalho e todas as facilidades concedidas para a realização deste trabalho. Como meu Professor de Mestrado, quero ainda manifestar-lhe o meu apreço e admiração.

À Professora Doutora Maria da Conceição Branco da Silva de Mendonça Montenegro agradeço o ter aceite supervisionar este trabalho. Agradeço ainda a disponibilidade e paciência com que sempre me ajudou a resolver as dúvidas que foram surgindo ao longo do trabalho.

A todo o grupo de trabalho do Laboratório de Química-Física pela simpatia e boa disposição e em particular à Goretti, Cristina Couto e Belmira pela prontidão com que sempre acorreram aos meus pedidos de ajuda e à Sra. Teresa pelo seu espírito jovem e dinâmico.

Ao Dr. Paulo Costa gostaria de agradecer os esclarecimentos úteis sobre o programa de desenho.

Aos meus familiares, colegas de Mestrado e amigos agradeço todo o apoio manifestado.

Ao meu marido agradeço todo o amor e carinho que sempre me manifestou e a paciência redobrada com que superou todas as minhas "birras", principalmente durante a escrita da dissertação.

A todos quantos de algum modo contribuiram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

ÍNDICE

Pág.

INTRODUÇÃO GERAL I

1-Enquadramento e objectivos gerais do trabalho II

2-Organização da Dissertação III

1-DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AZOTO TOTAL 1

1.1-Importância da determinação em alimentos e águas 2

1.2-Evolução da metodologia de doseamento 4

1.3-Doseamento pela metodologia de Kjeldahl 8

1.3.1-Digestão da amostra 8

1.3.2-Doseamento dos sais de amónio formados na digestão 9

1.3.2.1-Doseamento por destilação 9

1.3.2.2-Doseamento por colorimetria 10

1.3.2.3-Doseamento cromatográfico e polarográfico 11

1.3.2.4-Doseamento por potenciometria 12

1.4-Bibliografia 14

2-ASPECTOS GERAIS DA PARTE EXPERIMENTAL 18

2.1-Aparelhagem e eléctrodos 19

2.2-Material utilizado nas montagens FIA 20

2.3-Reagentes e soluções 24

2.4-Construção dos eléctrodos de configuração convencional 25

2.4.1-Preparação do corpo do eléctrodo 25

2.4.2-Preparação e aplicação do suporte condutor no corpo do eléctrodo 28

2.4.3-Preparação e aplicação da membrana sensora 30

2.4.4-Recuperação do corpo dos eléctrodos 30

2.5-Construção dos eléctrodos de configuração tubular 31

2.5.1-Preparação do corpo do módulo sensor tubular 31

2.5.2-Preparação e aplicação do suporte condutor no módulo tubular 33

2.5.3-Preparação e aplicação da membrana sensora..... 33
2.5.4-Inserção dos eléctrodos tubulares no sistema de fluxo..... 34
2.5.5-Recuperação dos módulos tubulares..... 34

2.6-Construção do sistema de detecção potenciométrico diferencial.. 36

2.7-Metodologia utilizada na avaliação dos eléctrodos convencionais. 37
2.7.1-Avaliação das características de resposta..... 37
2.7.2-Determinação do tempo de resposta..... 42
2.7.3-Avaliação da influência do pH na resposta dos eléctrodos..... 42
2.7.4-Determinação dos coeficientes de selectividade potenciométricos..... 43

2.8-Metodologia utilizada na avaliação dos detectores tubulares..... 47
2.8.1-Estabelecimento do sistema FIA..... 47
2.8.2-Avaliação das características de resposta..... 50
2.8.3-Determinação do ritmo de amostragem..... 50
2.8.4-Avaliação da influência do pH na resposta dos detectores tubulares..... 51
2.8.5-Determinação dos coeficientes de selectividade potenciométricos..... 53

2.9-Metodologia utilizada na avaliação do sistema de detecção diferencial..... 54
2.9.1-Optimização da montagem FIA..... 54
2.9.2-Avaliação das características de resposta..... 57

2.10-Metodologia de referência para a determinação do teor de azoto nas amostras..... 58
2.10.1-Resumo do processo..... 58
2.10.2-Procedimento analítico..... 58

2.11-Bibliografia..... 60

3-ELÉCTRODOS SELECTIVOS SENSÍVEIS AO AMÓNIO..... 62

3.1-Introdução..... 63

3.2-Parte experimental..... 64
3.2.1-Aparelhagem e eléctrodos..... 64
3.2.2-Reagentes e soluções..... 64
3.2.3-Preparação do sistema sensor..... 64

3.3-Resultados e discussão 67
3.3.1-Características de resposta 67
3.3.2-Tempo de resposta dos eléctrodos 72
3.3.3-Efeito do pH no valor do potencial dos eléctrodos 74
3.3.4-Coeficientes de selectividade potenciométricos 76
3.4-Conclusões 78
3.5-Bibliografia 79

4-DETECTORES POTENCIOMÉTRICOS TUBULARES SENSÍVEIS AO AMÓNIO 80
4.1-Introdução 81
4.2-Parte experimental 83
4.2.1-Aparelhagem e eléctrodos 83
4.2.2-Reagentes e soluções 83
4.2.3-Preparação do sistema sensor 83
4.2.4-Montagem FIA de baixa dispersão 84
4.3-Resultados e discussão 88
4.3.1-Características de resposta dos detectores tubulares 88
4.3.2-Efeito do pH no potencial dos detectores tubulares 93
4.3.3-Coeficientes de selectividade potenciométricos 95
4.4-Conclusões 97
4.5-Bibliografia 98

5-DESENVOLVIMENTO DE UMA MONTAGEM FIA COM DETECÇÃO POTENCIOMÉTRICA DIFERENCIAL 99
5.1-Introdução 100
5.2-Parte experimental 102
5.2.1-Aparelhagem utilizada 102
5.2.2-Reagentes e soluções 102
5.2.3-Sistema de detecção 102
5.2.4-Montagem FIA utilizada 103

5.3-Resultados e discussão 107

5.4-Conclusões 111

5.5-Bibliografia 112

6-DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AZOTO TOTAL EM ALIMENTOS E ÁGUAS 113

6.1-Introdução 114

6.2-Parte experimental 116

6.2.1-Aparelhagem utilizada 116

6.2.2-Reagentes e soluções 116

6.2.3-Montagem FIA utilizada 117

6.2.4-Preparação das amostras para o doseamento potenciométrico 125

6.3-Resultados e discussão 126

6.3.1-Características de resposta do sistema de detecção após a incorporação da membrana 126

6.3.2-Determinação por FIA do teor de azoto das amostras 128

6.4-Conclusões 134

6.5-Bibliografia 135

7-CONCLUSÕES GLOBAIS 136

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

INTRODUÇÃO GERAL

1-Enquadramento e objectivos gerais do trabalho

A determinação do teor de azoto total em produtos alimentares e águas, é habitualmente efectuada recorrendo à metodologia de Kjeldahl em que a amostra é inicialmente submetida a uma digestão ácida, seguida das etapas de destilação e titulação. Estas diferentes operações analíticas tornam o método moroso, situação que é incompatível com a procura que actualmente se faz sentir no campo analítico, e que vai no sentido de obter um maior número de análises por unidade de tempo e com menores custos associados.

Desde o aparecimento do método de Kjeldahl, à cem anos atrás, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com o objectivo de reduzir o tempo de análise associado a esta metodologia. Enquanto os trabalhos iniciais foram essencialmente dirigidos para a pesquisa de novos catalizadores e para o desenvolvimento de equipamento que permitisse uma digestão mais rápida da amostra, actualmente os esforços são dirigidos para o desenvolvimento de procedimentos alternativos à quantificação dos sais de amónio formados pela digestão ácida das amostras, com preferência para a utilização de técnicas de fácil automatização.

A determinação do teor de azoto pode ser significativamente simplificada pelo doseamento potenciométrico dos sais de amónio. Como técnica analítica, a potenciometria com eléctrodos selectivos de iões, tem vindo a despertar um crescente interesse nas mais diversas áreas, substituindo com êxito outras técnicas instrumentais de análise. Para além de mais económica, pois requer equipamento simples e não dispendioso, a potenciometria apresenta numerosas vantagens entre as quais a rapidez de resposta, a possibilidade de efectuar determinações com elevada sensibilidade analítica num amplo intervalo de concentrações e a aplicação directa em amostras com cor ou turvação, sem que o seu funcionamento seja afectado. Para além disso, a grande vantagem da potenciometria no campo analítico, deve-se ao facto de ela se apresentar hoje como uma técnica de fácil

automatização. Esta característica está directamente relacionada com a utilização de eléctrodos selectivos de configuração tubular e sem solução de referência interna, especificamente construídos para a incorporação em sistemas de análise por injecção em fluxo (FIA), possibilitando a automatização do processo analítico recorrendo a montagens muito simples.

É inserido neste contexto que surge o trabalho proposto e que consistiu no desenvolvimento de um sistema de detecção potenciométrico diferencial para a determinação por FIA, do teor de azoto total em alimentos e águas, a partir da digestão ácida das amostras. A metodologia desenvolvida, para além de permitir o doseamento automático dos sais de amónio, sem a necessidade de recorrer às tradicionais operações de destilação e titulação, permitiu também um aumento da sensibilidade analítica das determinações, devido à utilização sequencial de dois eléctrodos tubulares sensíveis à mesma espécie, colocados a uma determinada distância entre si e funcionando alternativamente, um como referência do outro.

Embora tenham sido referidos na literatura algumas tentativas de automatização da etapa analítica da metodologia de Kjeldahl, a sua aplicação à análise de alimentos é muito limitada ou mesmo inexistente, o que justificou a realização deste trabalho.

2-Organização da Dissertação

O trabalho desenvolvido consta essencialmente de uma parte teórica e uma parte experimental, num total de sete capítulos.

Na parte teórica, é feita uma referência genérica das metodologias utilizadas na determinação do azoto total, quer a nível de evolução quer a nível de possibilidades actualmente existentes.

Na parte experimental, após uma descrição genérica dos materiais e metodologias empregues na realização de todo o trabalho prático, começa-se por referir a construção dos eléctrodos de configuração convencional, sensíveis ao catião amónio e a avaliação destas unidades determinando os parâmetros gerais das rectas de calibração, o efeito do pH no potencial dos eléctrodos, a repetibilidade do sinal analítico e a reprodutibilidade dos

potenciais, o tempo de resposta e os coeficientes de selectividade potenciométricos relativamente a alguns interferentes.

Seguidamente e com base no sistema sensor utilizado na construção dos eléctrodos convencionais, refere-se a construção dos detectores tubulares sem solução de referência interna e a avaliação destas unidades num sistema FIA de baixa dispersão, comparando as características de funcionamento com as dos correspondentes eléctrodos convencionais.

Numa fase posterior do trabalho, refere-se o desenvolvimento de um sistema de detecção potenciométrico diferencial por colocação sequencial de dois eléctrodos tubulares sensíveis ao amónio, com o objectivo de se aumentar a sensibilidade analítica das determinações. O sistema de detecção assim concebido é posteriormente utilizado no doseamento dos sais de amónio formados na digestão ácida das amostras, após a incorporação na montagem FIA, de uma membrana permeável a gases, com o objectivo de evitar interferências por parte da matriz, cuja composição é no caso dos alimentos, habitualmente complexa.

Num capítulo final e em termos de conclusões globais, referem-se as vantagens da metodologia proposta perante o procedimento tradicional com destilação e titulação.

CAPÍTULO 1

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AZOTO TOTAL

1-DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AZOTO TOTAL

1.1-Importância da determinação em alimentos e águas

A determinação do teor de azoto total nos alimentos tem por objectivo a quantificação do conteúdo proteico total, pelo que o grande interesse desta determinação está relacionado com a importância nutricional que estes compostos desempenham na alimentação.

Com o grande desenvolvimento dos chamados "alimentos processados" que caracterizam a alimentação actual, o conhecimento do valor nutricional assume particular importância uma vez que as características destes produtos podem ser alteradas, quer pelo tratamento a que são submetidos, quer pela qualidade inicial do produto antes de processado, alterações que não são detectadas pela simples observação do alimento.

A designação de azoto total, para além de incluir o azoto proteico, inclui ainda a fracção azotada de outros compostos presentes nos alimentos em pequenas quantidades. No entanto, a determinação do teor de azoto total continua a ser o procedimento mais utilizado na análise dos alimentos que permite a diferenciação das proteínas dos outros grupos de constituintes, nomeadamente os lípidos e os hidratos de carbono. O conteúdo proteico dos alimentos é assim calculado, multiplicando por um factor de conversão apropriado, o teor de azoto total. De um modo geral, é utilizado um factor de 6,25 embora para algumas proteínas de origem vegetal se utilize o factor de conversão 5,7 [1]. Trata-se pois de valores médios atendendo a que a fracção azotada das proteínas pode variar entre 12 a 30% [2].

A quantificação do teor de azoto em águas, tem geralmente, uma função de indicador de poluição, podendo mesmo relacionar-se as diferentes fracções azotadas com os diferentes tipos de poluição. O aumento dos níveis de azoto nos sistemas aquáticos está intimamente relacionado com o crescimento excessivo de algas [3], constituindo pois, um

problema ambiental. Teores elevados de nitratos podem ainda estar na origem de problemas graves para a saúde humana [4-7], o que levou ao estabelecimento de legislação adequada, relativamente às águas de consumo [8].

Nas águas naturais, podem ser identificadas diferentes fracções azotadas, nomeadamente nitritos, nitratos, amónia e a fracção orgânica, sendo as diferentes formas interconvertíveis. Embora os níveis variem com a localização geográfica, geologia e aproveitamento das terras, a fracção mais significativa são os nitratos. Os teores de amónia e nitritos são geralmente muito baixos e raramente excedem os 0,5 mg/L [8,9]. Valores mais altos, resultam geralmente de poluição industrial.

Para além da poluição industrial, a contaminação das águas provém dos esgotos e da exploração agrícola dos solos por lixiviação dos fertilizantes utilizados. Nas últimas décadas, a intensificação das práticas agrícolas, está na origem do aumento dos níveis de nitratos tanto nos rios como nas águas subterrâneas.

1.2-Evolução da metodologia de doseamento

Os métodos inicialmente desenvolvidos para a determinação do teor de azoto total tinham por base a completa conversão das formas nativas em azoto gasoso ou num sal de amónio, envolvendo a parte final da análise, a quantificação rigorosa destes compostos. Com base neste princípio, dois métodos mais importantes foram desenvolvidos e identificados com o nome do autor que esteve na sua origem, inicialmente o método de Dumas [10], e posteriormente, o método de Kjeldahl [11].

O método de Dumas [10], desenvolvido em França em 1831, é um método gasométrico que envolve a combustão completa da amostra misturada com óxido de cobre, a uma temperatura de 700-750°C. Do processo resulta a formação de CO_2 e N_2, sendo este último quantificado volumétricamente após separação do dióxido de carbono.

Algumas modificações foram introduzidas ao procedimento original no sentido de reduzir o tempo de combustão e tentar eliminar algumas interferências, em parte conseguido pela utilização de temperaturas mais altas e pelo uso de outras misturas catalíticas nomeadamente óxido de níquel/níquel metálico [12,13], e óxido de cobalto/cobalto [14,15]. O método é referido como moroso e sujeito a alguns erros na análise de alimentos, sendo necessário proceder à desidratação da amostra antes da análise [1], o que justifica a sua pouca utilização nesta área.

Posteriormente, Varrentrapp [16], desenvolveu uma metodologia que consistia no aquecimento da amostra com soda até ao aparecimento de uma cor avermelhada. Os vapores libertados eram recolhidos numa solução ácida padronizada, com posterior titulação do excesso de ácido. Por sua vez, o químico inglês Wanklyn [17], procedeu à destilação da amónia a partir de amostras com azoto orgânico, por aquecimento destas, na presença de permanganato de potássio, enquanto Dreyfus [18], desenvolveu um tratamento prévio das amostras com ácido sulfúrico, submetendo posteriormente os resíduos ao tratamento de Varrentrapp [16].

Era precisamente esta a situação, quando Kjeldahl [11], após ter passado dois anos a tentar obter um procedimento mais eficiente na quantificação do teor de azoto orgânico, publica o seu método, com sucesso imediato, sendo hoje universalmente

conhecido. Nas experiências realizadas por Kjeldahl, com o objectivo de estudar a conversão dos compostos azotados ao longo das diferentes fases do processo tecnológico da cerveja, depressa se apercebeu de que o método de Dumas [10], embora permitisse um doseamento com uma certa precisão, era demasiado demorado. A utilização, como alternativa, do método mais rápido desenvolvido por Wanklin [17], permitiu-lhe chegar à conclusão de que, não só a formação da amónia era incompleta como os resultados obtidos eram irreprodutíveis. Foi então que Kjeldahl se apercebeu de que a substituição da solução alcalina por uma solução ácida na etapa de oxidação, era provavelmente, mais favorável à formação de amónia. O passo seguinte foi prolongar o tempo de ebulição da amostra em ácido sulfúrico concentrado para destruição completa da matéria orgânica, seguida da oxidação dos produtos resultantes pelo permanganato de potássio. Esta reacção era extremamente violenta, acompanhada de grande libertação de fumos. A amónia formada podia ser posteriormente determinada com precisão depois de destilada na presença de um excesso de hidróxido de sódio.

O método de Kjeldahl apresentava vantagens óbvias. Era mais rápido que o método por combustão e mais preciso que os métodos até então desenvolvidos. Foi de imediato adoptado por um grande número de laboratórios. Na história da química analítica, nenhum outro método foi tão universalmente aceite num período de tempo tão curto como o método de Kjeldahl para a determinação do azoto.

Entre as alterações introduzidas nos anos seguintes à sua primeira publicação, referem-se a utilização de óxido de mercúrio como catalizador [19], e a substituição do permanganato de potássio pelo sulfato de potássio [20], com o objectivo de aumentar a temperatura de ebulição do ácido sulfúrico. Era assim possível obter uma decomposição mais rápida da matéria orgânica e uma conversão mais completa do azoto orgânico em sais de amónio. Outros catalizadores foram adoptados para a digestão ácida das amostras entre os quais se incluem o sulfato de cobre [19,21], selénio [22], óxido de selénio [21,23-25], bem como misturas catalíticas [26-30].

Apesar das modificações que o método de Kjeldahl sofreu ao longo dos seus cem anos de existência, o fundamento manteve-se, e a metodologia continua a ser ainda hoje método de referência para a grande maioria dos produtos alimentares devido à sua grande precisão [31].

Actualmente porém, algumas metodologias alternativas à metodologia de Kjeldahl aparecem referidas na literatura como apresentando algumas vantagens. A mineralização da amostra é assim substituída por outros procedimentos que permitem a decomposição da amostra com maior rapidez. Estas metodologias, para além do azoto orgânico e amoniacal, também quantificam a fracção inorgânica.

O aparecimento recente de equipamento para o doseamento automático do azoto com base numa variação do método de Dumas, tem sido utilizado com sucesso, na análise de alimentos [32-36]. Com tempos de análise de 8 a 10 minutos [32], as amostras são decompostas a cerca de 1000°C na presença de oxigénio, de que resulta uma conversão completa da fracção azotada em azoto elementar (N), posteriormente determinado por condutividade térmica.

O desenvolvimento de novas técnicas instrumentais de análise, tem ainda permitido uma nova abordagem na determinação do azoto total, com base na combustão das amostras. A reacção do óxido nítrico (NO), formado na combustão, com o ozono, dando origem a uma forma activa (NO_2^*), posteriormente quantificada por quimioluminiscência, é uma metodologia utilizada com sucesso por alguns autores na determinação do azoto total em águas [37-43].

Alguns autores [44-53], têm optado pela oxidação de todas as formas de azoto existentes na amostra pelo peroxodissulfato de potássio em meio fortemente alcalino, com pressão e temperaturas altas. No final do processo, todo o azoto se encontra na forma de NO_3^-, podendo este ser doseado por cromatografia iónica [45,46], por potenciometria [44] ou ainda, espectrofotométricamente a 220 nm [47-49,52,53]. O método foi aplicado na análise de águas e considerado como rápido e rigoroso, aparecendo referidos tempos de digestão de 30 minutos a uma temperatura de 121°C [48]. Como alternativa à oxidação térmica com o peroxodissulfato, aparece referida a foto-oxidação, com a conversão de todas as fracções azotadas em nitrato/nitrito [54-59]. A técnica foi inicialmente utilizada por Armstrong [54], na determinação de azoto e fósforo em águas salinas, utilizando peróxido de hidrogénio. Este foi depois substituído pelo peroxodissulfato de potássio, devido à sua maior capacidade oxidativa quando sujeito a radiação ultravioleta intensa. O tempo de irradiação, o pH, o tipo e concentração de compostos orgânicos presentes, concentração de oxigénio e de sais, são alguns dos factores que podem interferir no

processo [57]. Zhang [58], refere um tempo total de uma hora na determinação por foto-oxidação, do azoto total em águas. Este autor, desenvolveu uma metodologia que permitiu uma conversão directa de todas as formas de azoto em nitrito, posteriormente doseado espectrofotomécticamente a 520nm. Com este procedimento, foi eliminada a etapa de redução do nitrato a nitrito. A determinação do azoto total por foto-oxidação, é ainda de fácil automatização por FIA [55,56], com todas as vantagens inerentes, principalmente quando é elevado o número de amostras a analisar.

A determinação do azoto total por activação neutrónica ou protónica, aparecem ainda referidas como possíveis alternativas [1]. Embora caracterizadas como simples, rápidas (cerca de 10 amostras/min), automáticas, com um custo baixo por análise e sem poluição, requerem no entanto, equipamento muito sofisticado e muito caro.

1.3-Doseamento pela metodologia de Kjeldahl

A determinação do teor de azoto pela metodologia de Kjeldahl [11], envolve duas etapas principais. Numa primeira fase, procede-se à digestão das amostras em ácido sulfúrico concentrado, seguindo-se uma segunda etapa que consiste no doseamento quantitativo dos sais de amónio formados.

1.3.1-Digestão da amostra

A digestão da amostra é uma operação muito importante e que requer uma atenção especial. Uma mineralização defeituosa está na origem de resultados menos correctos.

Nesta operação, o azoto orgânico é transformado em azoto mineral sob a forma amoniacal. Verifica-se assim uma acção oxidante do ácido sulfúrico em ebulição sobre a matéria orgânica, na presença de um catalisador, e a redução do azoto orgânico a amoníaco, ficando este retido no meio ácido sob a forma de $(NH_4)_2SO_4$.

Certas formas de azoto orgânico nomeadamente, nucleíco e nicotínico, são dificilmente mineralizadas, pelo que é necessário adaptar o catalizador ao tipo de produto a analisar sendo uma das misturas catalíticas mais utilizada constituída por sulfato de potássio, sulfato de cobre e óxido de mercúrio [1]. A tendência actual é para a substituição do mercúrio, devido à sua toxicidade, podendo utilizar-se como alternativa o selénio, titânio, etc. [1]. Hoje em dia, existem mesmo comercialmente disponíveis, misturas catalíticas que podem ser de grande utilidade.

O tempo necessário à digestão da amostra, tem sido apontado como um dos inconvenientes associado à metodologia. No entanto, existem actualmente possibilidades que permitem uma redução considerável no tempo dispendido com esta operação. A substituição do ácido sulfúrico por uma mistura de acido sulfúrico e ácido fosfórico ou a adição de peróxido de hidrogénio à digestão, é um procedimento referido por alguns autores [1,60,61].

É ainda possível reduzir o tempo de análise pela utilização do bloco de mineralização [1,62-65], que consiste num dispositivo de alumínio aquecido por uma resistência eléctrica colocada na base, com temperatura controlada. O material a digerir é colocado, juntamente com a mistura ácida, num tubo que substitui os tradicionais balões de Kjeldahl, ao qual se adapta um dispositivo que funciona como condensador dos vapores libertados durante o processo que demora aproximadamente uma hora. O aparelho, tem ainda como vantagens, a facilidade de manuseamento e o facto de ocupar pouco espaço.

A digestão da amostra por microondas, é ainda referida como uma boa alternativa, na determinação do teor de azoto em alimentos [61,66-69]. Feinberg [61], faz uma optimização completa do processo para os diferentes tipos de alimentos, de acordo com os teores proteicos, hidratos de carbono e gordura. O processo de digestão é essencialmente desenvolvido em duas fases complementares, a decomposição inicial da matriz orgânica com ácido sulfúrico, sem catalisador, seguida da oxidação com peróxido de hidrogénio. O tempo necessário é função do tipo de matriz, não excedendo no entanto os 45 minutos.

1.3.2-Doseamento dos sais de amónio formados na digestão

1.3.2.1-Doseamento por destilação

A destilação da amónia após alcalinização do meio, é o procedimento mais tradicional para o doseamento dos sais de amónio formados na digestão ácida das amostras. O destilado é recolhido num excesso de solução ácida padronizada, procedendo-se de seguida à titulação do excesso de ácido. A amónia destilada, pode ainda ser recolhida numa solução de ácido bórico e titulada directamente por uma solução ácida. As normas internacionais [31], indicam as condições particulares mais apropriadas a cada produto.

As modificações introduzidas na operação de destilação relativamente ao procedimento inicial, relacionam-se essencialmente, com a origem da energia necessária para a realização da operação. A chama inicialmente utilizada, foi posteriormente

substituída pelas mantas eléctricas e actualmente é muito utilizado o aquecimento por corrente de vapor que permite a destilação da amostra em cerca de 10 minutos [70].

1.3.2.2-Doseamento por colorimetria

O doseamento colorimétrico do amónio directamente no material digerido, é um procedimento alternativo à tradicional operação de destilação/titulação, com a vantagem de ser mais rápido e recorrer a equipamento que normalmente existe no laboratório. Mas o grande interesse despertado pelos métodos colorimétricos prende-se com a sua fácil automatização e o consequente aumento do número de determinações por unidade de tempo que permitem.

A quantificação colorimétrica do amónio directamente no material digerido, pode conseguir-se por diferentes reacções. A reacção de Nessler [71], tem por base a utilização de um reagente específico de iodeto de mercúrio e iodeto de potássio, através do qual se obtem um complexo de cor alaranjada com um máximo de absorvência próximo dos 380nm. O método tem algumas desvantagens, nomeadamente a instabilidade do reagente. Yuen e Pollard [72], estudaram os factores que influenciam a formação do complexo corado, tendo verificado que o tempo de reacção, a quantidade de reagente, a temperatura em que a coloração se desenvolve, a presença de outros iões e o pH da solução, são factores críticos do processo. O método de Nessler pode conduzir a resultados satisfatórios desde que utilizado por pessoas experientes uma vez que é necessário um controlo rigoroso das condições experimentais. É um método muito sensível, permitindo obter valores da ordem dos μg/mL, principalmente quando é aplicado após destilação prévia da amónia [1].

O método colorimétrico baseado na reacção de Berthelot [73], é uma alternativa possível para o doseamento dos sais de amónio formados na digestão ácida das amostras. Este processo envolve a formação de um complexo azul de indofenol que resulta da reacção da amónia com o fenolato de sódio e o hipoclorito de potássio, sendo a intensidade da coloração determinada a 630nm. Para além de evoluir no tempo, a coloração é muito sensível à temperatura e ao pH do meio. O método é também muito

sensível, mas obriga a uma padronização rigorosa das condições experimentais, pelo que se torna vantajosa a automatização do processo, sendo a metodologia pouco utilizada em doseamentos manuais.

A substituição do fenol pelo salicilato é referido por alguns autores como permitindo obter maior sensibilidade [74,75], maior estabilidade [76] e menor toxicidade [77].

Mais recentemente, Devani [78], refere um método baseado na reacção da amónia com um reagente à base de acetilacetona e formaldeído com formação de um composto amarelo, com absorvência característica a 412 nm. O autor procedeu ao estudo das diferentes variáveis experimentais, sendo o método referido como simples rápido e preciso para a determinação de azoto, com uma zona de resposta linear entre 0,5 a 6,0 μg de azoto/mL.

1.3.2.3-Doseamento cromatográfico e polarográfico

Técnicas como a cromatografia e a polarografia, aparecem referidas como procedimentos alternativos que permitem encurtar consideravelmente o tempo necessário à determinação do teor de azoto a partir da digestão ácida das amostras. São assim eliminadas as tradicionais etapas de destilação e titulação. No entanto, um facto a considerar é que estas técnicas requerem a utilização de equipamento mais complexo e nem sempre existente no laboratório.

Jackson [79], refere a utilização da cromatografia de troca iónica na análise de alimentos, com a possibilidade de se poder aplicar a técnica a outros tipos de amostras. Com uma coluna de troca catiónica de poli(estireno-divinilbenzeno) e uma solução diluída de ácido nítrico como eluente, o autor refere um limite de detecção de 15,7 ppb de amónio, com um tempo de retenção próximo dos 7 minutos. Os resultados assim obtidos, quando comparados com os obtidos por destilação, apresentam uma variação entre 5 e 14% em função do tipo de matriz e processo de digestão utilizado.

Fosdick [80], por sua vez, descreve um método polarográfico simples e rápido para a determinação do amónio na digestão ácida de Kjeldahl. Tem por base a reacção do

amónio com o formaldeído em tampão acetato, de que resulta a formação de hexametilenotetramina, quantificada electroquimicamente a -1,04 V. A metodologia foi aplicada à determinação do teor de azoto em leites, pão e caju, numa gama de concentrações entre os 200 e os 2000 ppb de NH_3, com um limite de detecção de 50 ppb e um coeficiente de variação médio de 3,4%. A utilização desta metodologia requer uma manipulação mínima da amostra bem como a quantidade de reagentes necessários.

1.3.2.4-Doseamento por potenciometria

O procedimento tradicional de Kjeldahl para a determinação do teor de azoto, pode ser significativamente simplificado pelo doseamento potenciométrico dos sais de amónio, resultantes da digestão ácida das amostras [81].

A potenciometria com eléctrodos selectivos de iões, é uma técnica que tem despertado interesse crescente nas últimas décadas devido às numerosas vantagens que apresenta quando comparada com outras técnicas de análise instrumental. Associada ao facto de ser uma metodologia não dispendiosa, uma vez que requer equipamento simples, a detecção potenciométrica permite tempos de resposta rápidos para além de doseamentos com elevada sensibilidade num amplo intervalo de concentrações, podendo ser directamente aplicada sem que o seu funcionamento seja afectado pela cor ou turvação das amostras.

O doseamento potenciométrico dos sais de amónio directamente sobre as amostras digeridas, tem sido aplicado com sucesso em diferentes tipos de matrizes, nomeadamente, a produtos carneos [82,83], cereais [83], cerveja [84], vinhos [85], solos [86], fertilizantes [87] e diferentes compostos orgânicos [88], com determinações numa gama de concentrações de 0,1M a 10 μM de azoto, e recuperações da ordem dos 95 a 105% [88].

O eléctrodo habitualmente utilizado neste tipo de doseamento é constituído por uma membrana de características hidrofóbicas, permeável a gases [81]. Após uma forte alcalinização do meio, o gás amoníaco formado difunde através da membrana até se

estabelecer um equilíbrio reversível entre os dois lados da membrana. Nestas condições, verifica-se uma relação directa entre a concentração e o potencial do eléctrodo.

A pressão osmótica no material digerido é muito elevada, pelo que é necessário proceder a uma diluição prévia das amostras. É muito importante o controlo da temperatura, uma vez que a alcalinização do meio está na origem de uma grande libertação de calor. A adição de catalizadores com mercúrio ou cobre exigem ainda a adição de iodo ou EDTA, respectivamente [89].

O desenvolvimento dos sensores de condutor neutro [90], e a imobilização do sensor em películas de PVC [91], permite actualmente, a construção de eléctrodos com boas características de funcionamento, nomeadamente de eléctrodos mais selectivos. Uma importante alteração que tem provado permitir obter unidades bastante económicas, mecânicamente muito estáveis e com tempos de vida mais longos, consiste na eliminação da solução de referência interna, por aplicação directa da membrana de PVC num suporte condutor [92]. Este processo de construção, para além de económico é ainda muito versátil pois permite a adaptação dos eléctrodos a novas configurações, nomeadamente a construção de eléctrodos tubulares. Estas unidades são especificamente desenvolvidas para a utilização em sistemas de análise por injecção em fluxo, possibilitando a automatização do processo analítico de uma forma simples e com todas as vantagens inerentes.

1.4-Bibliografia

[1]-B.Godon e W.Loisel em B.Deymié, J.L.Multon e D.Simon (Ed), *Techniques D`Analyse et de Controle Dans les Industries Agro-Alimentaires*, Vol.4, Techniques et Documentation, (1981) p.187.

[2]-H.A.Lillevik em M.A.Joslyn (Ed.), *Methods in Food Analysis*, Academic Press (1970) p.601.

[3]-K.L.Seip, *Can.J.Fish Aquat.Sci.*, **48,** 2551 (1991).

[4]-A.P.S.Terblanche, *Water SA*, **17,** 77 (1991).

[5]-O.C.Bockman e T.Granli em M.L.Richardson (Ed.), *Chemistry,Agriculture and Environment*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, (1991) p.373.

[6]-P.N.Magee, *Ambio*, 6, 123 (1977).

[7]-J.J. Rademacher, T.B.Young e M.S.Kanarek, *Arch.Environ.Health*, **47,** 292 (1992).

[8]-Decreto Lei nº 74/90, Diário da República, Nº55, I Série, (1990).

[9]-K.Robards, I.D.Mackelvie, R.L.Benson, P.J.Worsfold, N.J.Blundell e H.Casey, *Anal.Chim.Acta*, **287,** 147 (1994).

[10]-J.B.A.Dumas, *Ann.Chim.Phys.*, **47,** 198 (1831).

[11]-J.Kjeldahl, *Z.Anal.Chem*, **22,** 366 (1983).

[12]-R.Belcher e C.E.Spooner, *J.Chem.Soc.*, 313 (1943).

[13]-W.Kirsten, *Mikrochemie ver Mikrochim. Acta*, **39,** 245 (1952).

[14]-M.Vecera e L.Synek, *Chem.Listy*, **51,** 1551 (1957).

[15]-M.Vecera, *Collection Czech.Chem.Commun.*, **26,** 2308 (1961).

[16]-F.Varrentrapp e H. Will, *Ann.Chem.*, **39,** 257 (1841).

[17]-J.A.Wanklyn e A.Gamgee, *J.Chem.Soc.*, **21,** 25 (1868).

[18]-E.Dreyfus, *Bull.Soc.Chim. France*, **40**, 267 (1883).

[19]-H.Wilfarth, *Z.Anal.Chem.*,**24,** 455 (1885).

[20]-G.W.Gunning, *Z.Anal.Chem.*, **28,** 188 (1889).

[21]-M.F.Lauro, *Ind.Eng.Chem.Anal.Ed.*, **11** (1939) 314

[22]-S.M.Patel e S.Sreenivasan, *Ind.Eng.Chem.Anal.Ed.*, **20,** 63 (1948)

[23]-B.Levin, V.G.Abeholzer e T.P.Whitehead, *Analyst*, **75,** 561 (1950)

[24]-G.Middleton e R.E.Stuckey, *J.Pharm.Pharmacol.*, **3,** 829 (1951).

[25]-P.R.W.Baker, *Talanta*, **8,** 57 (1961).

[26]-A.E.Beet, *Fuel*, **11,** 146 (1932).

[27]-S.Jacobs, *Analyst*, **85,** 257 (1960).

[28]-S. Jacobs, *Nature*, **183,** 262 (1959).

[29]-W.Lepper, *Z.Anal.Chem.*, **134,** 248 (1951).

[30]-J.M.Bremner, *J.Agr.Sci.*, **55,** 11 (1960).

[31]-Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC, Arlington, VA, 15th edn., (1990).

[32]-E.Koenig, *Biotech Forum Eur.*, **8,** 25 (1991).

[33]-D.L.Berner e J.Brown, *J.Am.Oil Chem.Soc.*, **71,** 1291 (1994).

[34]-E.Koenig, *Labor Praxis*, **14,** 832 (1990).

[35]-E.Jakob, C.Sievert, S.Sommer e Z.Puhan, *Z.Lebensm.Unters.Forsch.*, **200,** 239 (1995).

[36]-M.Baccanti, P.Magni e J.Theobald, *Lab.Pract.*, **41,** 25 (1992).

[37]-W.M.Snodgrass, *Am.Lab.*, **16,** 138 (1984).

[38]-D.A.Clifford e L.M.McGaughey, *Anal.Chem.*, **54,** 1345 (1982).

[39]-B.M.Jones e C.G,Daughton, *Anal.Chem.*, **57,** 2320 (1985).

[40]-T.Aoki, K.Ito e M.Munemori, *Bunseki Kagaku*, **36,** T100 (1987).

[41]-G.Metzner e L.Nitschke, *Labor Praxis*, **15,** 946 (1991).

[42]-W.Elling, *Gewaresserschutz, Wasser, Abwasser*, **120,** 110 (1991).

[43]-J.Martin, Y.Takchashi e M.Datta, *Am.Lab.*, **27,** 49 (1995).

[44]-M.M.Smart, F.A.Reid e J.R.Jones, *Water Res.*, **15,** 919 (1981).

[45]-K.Takami, K.Ohkawa,Y.Kuge e M.Nakamoto, *Bunseki Kagaku*, **31,** 362 (1982).

[46]-H.L.Medina, M.C.Vargas, J.Marin e D.Pirela, *J.Chrom.A*, **671,** 287 (1994).

[47]-M.Aoyagi, Y.Yasumasa e A.Nishida, *Anal.Sci.*, **5,** 235 (1989).

[48]-A.Otsuki, *Busenki Kagaku*, **30,** 688 (1981).

[49]-M.Goto, S.Murofushi e D.Ishii, *Busenki Kagabu*, **37,** 47 (1988).

[50]-J.Ebina, T.Tsutsui e T.Shirai, *Water Res.*, **17,** 1721 (1983).

[51]-L.Solorzano e J.H.Sharp, *Limnol.Oceanogr.*, **25,** 751 (1980).

[52]-H.Kitamura, H.Ishitani, K.Okawa, Y.Kuge e M.Nakamoto, *Kogai to Taisaku*, **18,** 565 (1982).

[53]-T.Korenaga, X.Zhou, T.Moriwake e S.Shinoda, *Jpn.J.Toxicol. Environ. Health*, **40,** 122 (1994).

[54]-F.A.J.Armstrong, P.M.Williams e J.D.H.Strickland, *Nature*, **211,** 481 (1966).

[55]-I.D.McKelvie, M.Mitri, B.T.Hart, I.C.Hamilton e A.D.Stuart, *Anal.Chim Acta*, **293,** 155 (1994).

[56]-S.Hinkamp e G.Schwedt, *Z.Wasser Abwasswe Forsch.*, **24,** 60 (1991).

[57]-L.Gustafsson, *Talanta*, **31,** 979 (1984).

[58]-Y.Zhang e L.Wu, *Analyst*, **111,** 767 (1986).

[59]-G.Randon, *Water Supply*, **6,** 25 (1988).

[60]-L.N.Srikar e R.Chandru, *J.Food Technol.*, **18** (1983) 129.

[61]-M.H.Feinberg, J.I.Ripert e R.M.Mourel, *Anal.Chim.Acta*, **272,** 83 (1993).

[62]-V.R.Smith, *Commun.Soil Sci.Plant Anal.*, **11,** 709 (1980).

[63]-B.T.Croll, T.Tomlinson e C.R.W.Whitfield, *Analyst*, **110,** 861 (1985).

[64]-R.B.Willis, M.E.Montgomery e P.R.Allen, *J.Agric.Food Chem.*, **44,** 1804 (1996).

[65]-R.C.Benedict e R.L.Ellis, *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, **70,** 69 (1987).

[66]-D.Mathe e C.Balas, Proc.104th AOAC, Ann.Int.Meet.Exp., New Orleans, L.A., (1990), p.188.

[67]-H.Matuziewicz e R.E.Sturgeon, *Prog.Anal.Spectrosc.*, **12,** 21 (1989).

[68]-H.M.Kingston e L.B.Jassie, *Introduction to Microwave Sample Preparation*, America Chemical Society, Washington, DC, 1988, Cap.6.

[69]-D.Didenot, *Spectra 2000*, **146,** 44 (1990).

[70]-R.A.Munsinger e R.Mckinney, *Int.Lab.*, **9,** 38 (1982).

[71]-J.Nessler, *J.Chem.Zentr.*, **27,** 529 (1856).

[72]-S.H.Yuen e A.G.Pollard, *J.Sci.Food Agr.*, **3,** 441 (1952).

[73]-M.Berthelot, *Soc.Chim.Paris*, **1,** 284 (1859).

[74]-A.P.Rowland, *Commun.Soil Sci.Plant Anal.*, **14,** 49 (1983).

[75]-W.M.Crooke e W.E.Simpson, *J.Sci.Food Agric.*, **22,** 9 (1971).

[76]-R.A.Sutcliffe e G.A.Jones, *Watter pollut.Control*, 209 (1968).

[77]-C.Nkonge e G.M.Balance, *J.Agric.Food Chem.*,**30,** 416 (1982).

[78]-M.B.Devani, C.J.Shishoo, S.A.Shah e B.N.Suhagia, *J.Assoc .Off.Anal.Chem.*, **72,** 953 (1989).

[79]-P.E.Jackson, J.Krol, A.L.Heckenberg, M.Mientjes e W.Staal, *J.Chrom.*, **546,** 405 (1991).

[80]-L.E.Fosdick e R.K.Pike, *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, **65,** 178 (1982).

[81]-Instruction Manual Ammonia Electrode, Orion Reserch Inc. (1971).

[82]-P.M.Todd, *J.Sci.Food Agric.*, **24,** 488 (1973)

[83]-A.R.Deschrieder e R.Meaux, *Analusis*, **2,** 442 (1973).

[84]-G.K.Buckee, *J.Int.Brewing*, **80,** 291 (1974).

[85]-G.Barroso, C.H.Cisneros, J.L.Hidalgo, P.B.Monasterio e J.António, *Afinidad*, **40,** 41 (1983).

[86]-J.M.Bremner e M.A.Tabatabai, *Comm.Soil Sci.Plant Anal.*, **3,** 159 (1972).

[87]-V.M.Boy e M.Guijosa, *J.Assoc. Off.Anal.Chem.*, **64,** 1096 (1981).

[88]-L.Mo, L.he e X.Hou, *Fenxi Shiyanshi*, **6,** 14 (1987).

[89]-P.L.Bailey, *Analysis With Ion-Selective Electrodes*, Heyden & Son, (1976) p. 163.

[90]-W.Simon, *Sci.Ind.*, **8**,1 (1976).

[91]-G.J.Moody, R.B.Oke e J.D.R.Thomas, *Analyst*, **95**, 910 (1970).

[92]-J.L.F.C.Lima e A.A.S.C.Machado, *Analytical Techniques in Environmental Chemistry*, J.Albaiges (edit.), Volume 2, Pergamon press, Oxford (1982) p.419.

CAPÍTULO 2

ASPECTOS GERAIS DA PARTE EXPERIMENTAL

2-ASPECTOS GERAIS DA PARTE EXPERIMENTAL

De modo a evitar repetições desnecessárias ao longo do trabalho, faz-se neste capítulo uma descrição dos aspectos experimentais que são comuns à construção e à avaliação, quer dos eléctrodos convencionais quer dos detectores tubulares, sensíveis ao amónio, aqui em estudo. Optou-se pela apresentação genérica dos materiais e metodologias usadas, reservando-se para a parte experimental de cada capítulo, as indicações específicas.

2.1-Aparelhagem e eléctrodos

Para a determinação da diferença de potencial entre o eléctrodo de referência e o eléctrodo indicador, foi utilizado um decimilivoltímetro Crison micropH 2002, com a sensibilidade de 0,1mV, ao qual se acoplou um comutador de eléctrodos construído de acordo com o anteriormente descrito [1].

Para as determinações da velocidade de resposta dos eléctrodos convencionais, bem como na análise por injecção em fluxo, ligou-se ao decimilivoltímetro um registador BD 111 Kipp & Zonen.

Todas as determinações com eléctrodos de configuração convencional foram efectuadas em cubas de paredes duplas, por onde circulava água proveniente de um banho termostatado da marca GFL, modelo 5001, que se encontrava regulado para a temperatura de 25 ± 0,2°C.

As soluções nas quais os eléctrodos estavam mergulhados, eram agitadas por intermédio de um agitador magnético da marca Crison, modelo 2038.

As pesagens foram realizadas numa balança da marca Mettler, modelo AE 163, com sensibilidade 0,00001g.

Todas as medidas de potencial foram efectuadas contra um eléctrodo de referência de cloreto de prata/ prata, de dupla junção, da marca Orion, modelo 900029, em

que a solução interna era uma solução saturada de cloreto de potássio e a solução externa era uma solução de cloreto de lítio 0,1M.

Para efectuar as medições de pH, foi utilizado um eléctrodo de vidro da marca Ingold e referência 10/402/3092.

2.2-Material utilizado nas montagens FIA

Nas montagens destinadas à análise por injecção em fluxo contínuo, as soluções eram impulsionadas através de uma bomba peristáltica Gilson modelo Minipuls 2, sendo as amostras introduzidas no sistema por intermédio de uma válvula de injecção rotatória manual, de seis portas, da marca Rheodyne, modelo 5020.

Foram ainda utilizados diversos dispositivos construídos em perspex [2], nomeadamente confluências (Fig.2.2.1), suportes para o eléctrodo de referência (Fig.2.2.2), suportes fixadores dos eléctrodos de configuração tubular (Fig.2.2.3), e também uma unidade de difusão de gases (Fig.2.2.4). Esta era formada por dois blocos em perspex, apresentando cada um deles uma ranhura de modo a formar um canal quando da sobreposição das duas partes. No interior dos dois blocos era colocada uma membrana de politetrafluoroetileno (PTFE), permeável a gases.

Todos os elementos referidos eram ligados entre si através de tubos da marca Omnifit com 0,8mm de diâmetro interno, utilizando para o efeito ligadores e terminais da mesma marca.

Para eliminar o ruído eléctrico provocado pela bomba peristáltica, usou-se um dispositivo denominado de "ligação à terra" (Fig.2.2.5), que consistia num tubo de aço inoxidável de cerca de 0,8mm de diâmetro interno com cerca de 15mm de comprimento, ao qual foi soldado um cabo eléctrico [2].

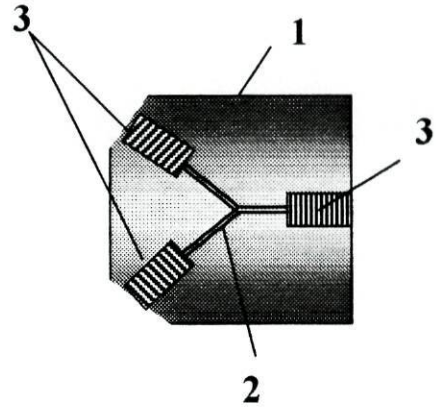

Figura 2.2.1-Confluências: 1-bloco de perspex; 2-canais; 3-roscas de ligação.

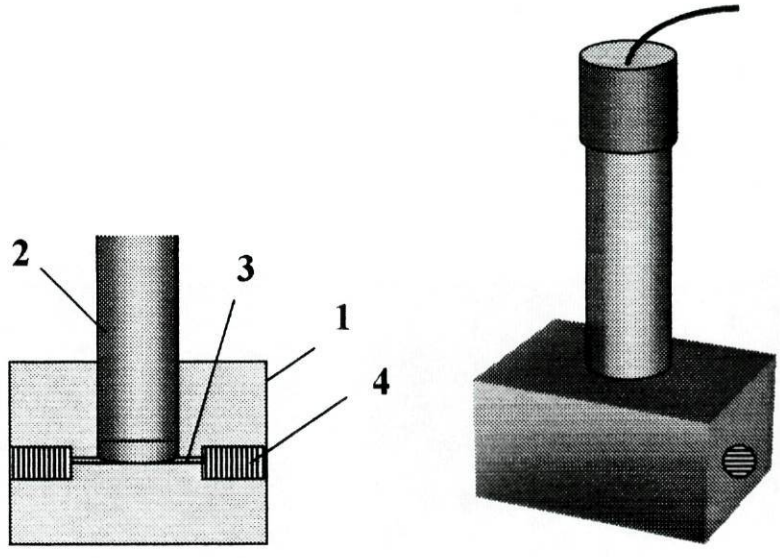

Figura 2.2.2-Suporte para o eléctrodo de referência: 1-bloco de perspex; 2-eléctrodo de referência; 3-canal; 4-ligações de entrada e saída.

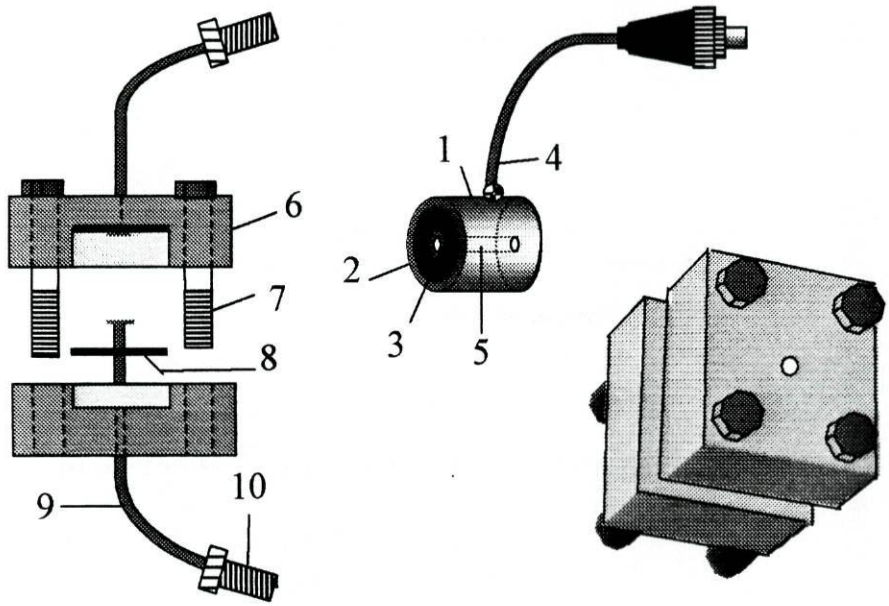

Figura 2.2.3-Suporte fixador dos eléctrodos tubulares: 1-tubo de perspex; 2-cilindro de material condutor (grafite); 3-membrana sensora; 4-cabo eléctrico blindado; 5-orificio central; 6-placa de perspex; 7-parafusos; 8-anel circular em borracha; 9-tubo; 10-roscas de ligação.

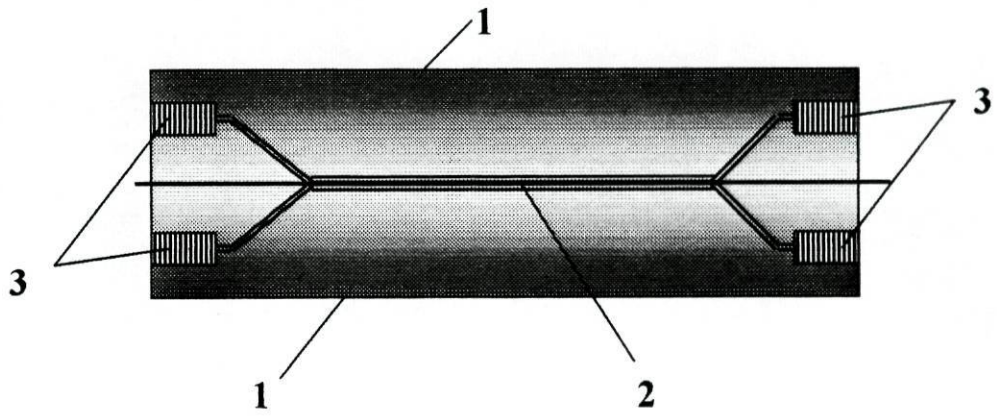

Figura 2.2.4-Unidade de difusão gasosa: 1-Blocos de perspex; 2-membrana; 3-ligações de entrada e saída.

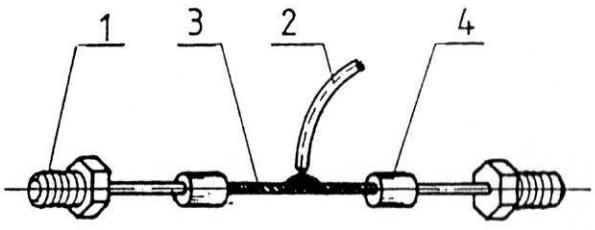

Figura 2.2.5-Eléctrodo de terra: 1-ligações ao sistema de fluxo; 2-cabo blindado; 3-tubo em aço inoxidável; 4-uniões.

2.3-Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados eram de qualidade p.a. ou semelhante sem terem sido submetidos a qualquer purificação adicional.

Para a preparação das soluções aquosas foi utilizada água desionizada com uma condutividade específica inferior a 0,1 μScm^{-1}.

As soluções padrão utilizadas, foram preparadas por diluição sucessiva a partir de uma solução mais concentrada, obtida esta, por pesagem rigorosa de cloreto de amónio sólido.

A solução tampão de Tris.HCl $10^{-2}M$ e pH 7,5 foi obtida por mistura de uma solução de Tris (hidroximetil)aminometano 0,1M com uma solução de igual concentração de HCl, até pH7,5.

Na digestão ácida das amostras foi utilizado como catalisador uma mistura preparada por adição de 10 g de sulfato de potássio, 0,5 g de sulfato de cobre e 0,3 g de selénio. As soluções utilizadas na determinação do teor de azoto pela metodologia de referência, foram preparadas de acordo com o referido em [3-6]

2.4-Construção dos eléctrodos de configuração convencional

Para a construção dos eléctrodos convencionais sem solução de referência interna, seguiu-se um procedimento anteriormente descrito [7,8], em que se utilizava, como suporte para as membranas sensoras uma resina condutora à base de prata, posteriormente substituída por uma mistura de araldite e grafite [9,10], com o objectivo de obter unidades mais económicas.

Trata-se de um processo de construção simples e económico, e que consiste essencialmente em três fases: preparação do corpo do eléctrodo, preparação e aplicação do suporte condutor e preparação e aplicação da membrana sensora.

2.4.1-Preparação do corpo do eléctrodo

Para a preparação do corpo do eléctrodo, utilizou-se tubo de perspex com um diâmetro interno de cerca de 8 mm e 10 mm de diâmetro externo, cortado em pequenos troços com cerca de 10 cm de comprimento (Fig.2.4.1.1-A).

Na parte superior de cada troço, foi fixado um outro tubo com diâmetro interno de cerca de 10 mm e comprimento igual a 2 cm (Fig.2.4.1.1-B) e unidos com o auxílio de clorofórmio que ao dissolver as superfícies de perspex em contacto, provoca, após evaporação, a colagem dos dois tubos. Este segundo tubo tinha por função servir de suporte mantendo os eléctrodos na posição vertical.

No interior do outro extremo, foi adaptado, pelo mesmo processo, um outro tubo de pequenas dimensões (5 mm de diâmetro interno e 8 mm de diâmetro externo) de modo a deixar 1 cm da extremidade inferior do tubo principal (Fig.2.4.1.1-C). Este tinha por função suportar uma placa de cobre na qual foi préviamente soldado, um cabo eléctrico coaxial blindado. Esta estrutura foi introduzida no corpo do eléctrodo e fixada na extremidade superior deste de forma a conferir uma certa solidez à montagem e evitar eventual entrada de líquidos (Fig.2.4.1.1-D). A colagem foi efectuada com cola Araldite (1g de Araldite M com 0,4g de endurecedor HR). À extremidade do cabo condutor era

adaptado um terminal tipo BNC (Fig.2.4.1.1-E), através do qual se estabelecia o contacto com o comutador de eléctrodos.

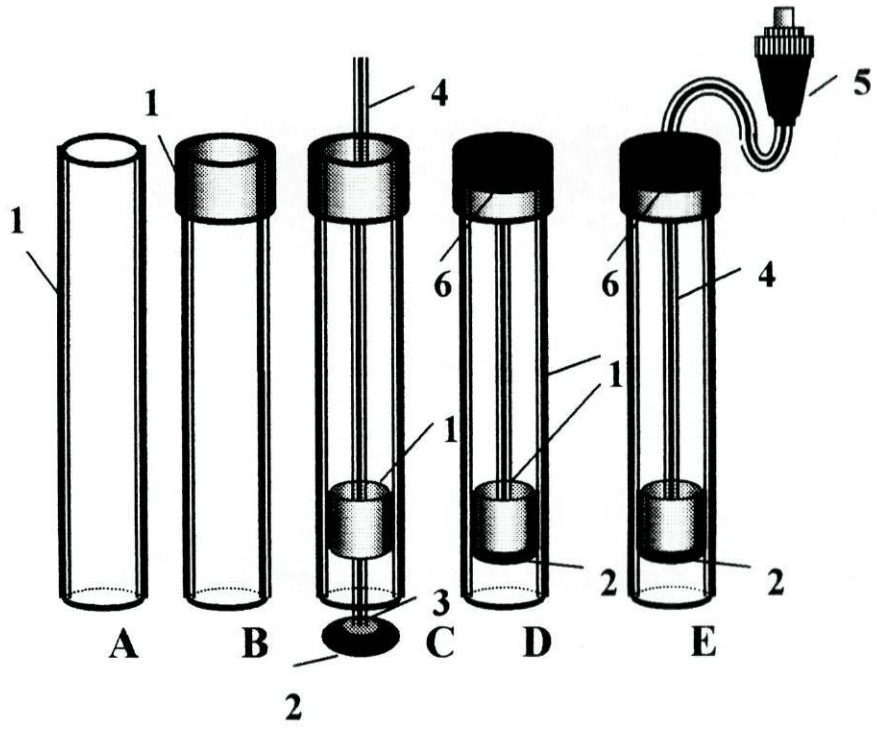

Figura 2.4.1.1-Fases de preparação do corpo dos eléctrodos convencionais: 1-tubo de perspex; 2-placa circular de cobre; 3-solda; 4-cabo eléctrico; 5-adaptador do tipo BNC; 6-cola de araldite.

2.4.2-Preparação e aplicação do suporte condutor no corpo do eléctrodo

O suporte condutor onde posteriormente se colocou a membrana sensora, era constituído por uma resina epoxídica tornada condutora pela adição de pó de grafite. Esta mistura foi aplicada directamente sobre a placa de cobre, desempenhando uma função dupla, para além de servir de suporte físico para a membrana sensora, funcionava também como contacto eléctrico interno.

Para a preparação do suporte condutor, misturou-se, de forma homogénea, 1g de resina epoxídica (Araldite M) com 0,4 g de endurecedor HR, na proporção de 1/0,4 (p/p). Posteriormente, a 0,2 g desta mistura foram adicionados 0,24 g de pó de grafite com granulometria de 50 μm de modo a obter uma pasta homogénea para garantir uma boa condutividade da mistura epoxídica, e de consistência razoável para que pudesse ser facilmente aplicada no corpo dos eléctrodos.

A mistura condutora assim obtida, foi aplicada directamente sobre a placa de cobre (fig.2.4.2.1-A), formando uma camada com cerca de 0,5 cm de altura, tendo-se o cuidado de a fixar rigidamente às paredes do tubo de perspex, com o objectivo de impedir qualquer infiltração posterior de líquidos, quando da utilização das unidades.

Uma vez terminada a aplicação do suporte condutor, as unidades obtidas foram colocadas numa estufa, a cerca de 100°C durante 24 horas, para polimerização e endurecimento da resina.

Por fim, efectuou-se uma cavidade com cerca de 2mm de espessura (fig.2.4.2.1-B), onde posteriormente se depositou a membrana sensora (fig.2.4.2.1-C).

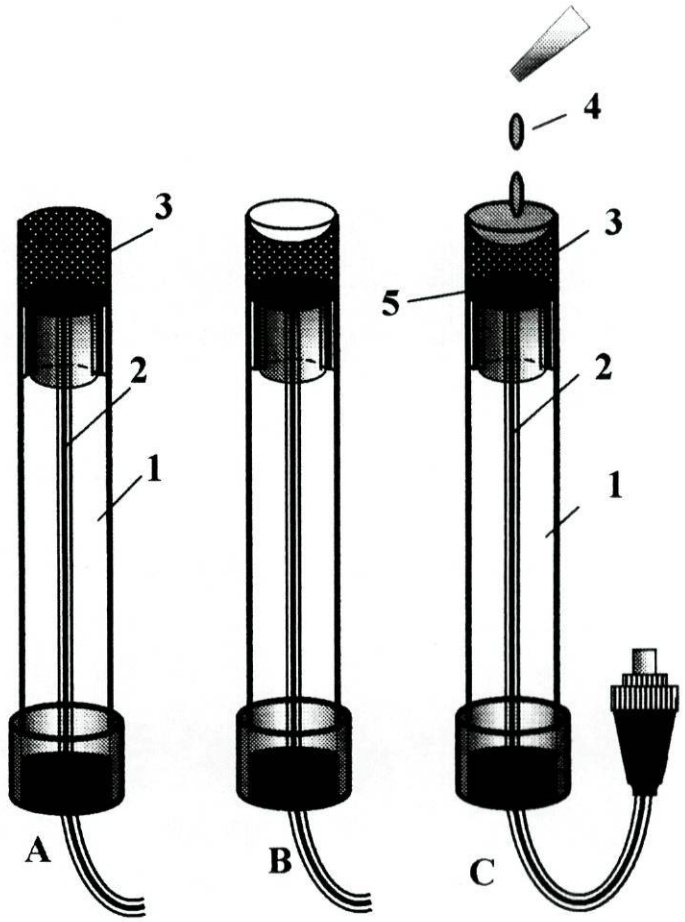

Figura 2.4.2.1-Aplicação do suporte condutor no corpo dos eléctrodos e deposição da membrana sensora: 1-tubo de perspex; 2-cabo condutor; 3-suporte condutor; 4-solução sensora; 5-placa circular de cobre.

2.4.3-Preparação e aplicação da membrana sensora

A membrana sensora foi preparada seguindo o procedimento proposto por Moody e Thomas [11], para a construção de eléctrodos de condutor móvel, imobilizando o sistema sensor em PVC.

O sistema sensor utilizado era formado por uma mistura de nonactin e monactin (ionóforo de amónio -Fluka) em fosfato de tris (2-etilhexil) como solvente mediador plastificante [12], com adição de uma pequena quantidade de tetraquis (4-clorofenil)borato de potássio, com o objectivo de diminuir a resistência eléctrica da membrana [13]. À mistura resultante, foi por fim adicionada uma determinada quantidade de PVC previamente dissolvido em tetrahidrofurano. A membrana sensora ficava assim, com uma composição final de 3,4% de ionóforo, 0,5% de tetraquis (4-clorofenil)borato de potássio, 71,1% de solvente mediador e 25% de PVC (percentagem em massa).

Uma vez obtida a solução sensora, esta era gotejada na cavidade central do suporte condutor do eléctrodo (Fig.2.4.2.1-C), permitindo a evaporação do tetrahidrofurano antes de cada nova aplicação. Este processo foi repetido o número de vezes suficientes para obter uma película com uma espessura aproximada de 1 mm.

Terminada a operação de aplicação da membrana, os eléctrodos foram mantidos na posição vertical invertida durante pelo menos 24 horas para secarem ao ar, após o que foram colocados a condicionar numa solução aquosa do ião principal com uma concentração de 0,01 M.

2.4.4-Recuperação do corpo dos eléctrodos

Quando os eléctrodos perdiam as suas características de resposta, procedia-se à remoção da membrana com o auxílio de um objecto cortante, seguida de raspagem da superfície epoxídica com um material abrasivo e limpeza da mesma com tetrahidrofurano. Esta operação permitia uma nova reutilização do corpo dos eléctrodos.

2.5-Construção dos eléctrodos de configuração tubular

À semelhança da técnica utilizada para obter os eléctrodos convencionais, a construção das unidades tubulares, também se baseou na aplicação da membrana sensora, directamente num suporte condutor. A técnica teve como base um procedimento anteriormente desenvolvido na preparação de um eléctrodo tubular sensível ao ião nitrato [14], ao qual foram posteriormente introduzidas algumas modificações [10,15], nomeadamente a substituição da resina à base de prata por uma resina condutora mais económica, à base de grafite.

A eliminação da solução de referência interna, torna a construção deste tipo de unidades, relativamente simples. O processo envolve essencialmente três fases: a preparação do corpo do módulo sensor tubular, a aplicação do suporte condutor e a preparação e aplicação da membrana sensora.

2.5.1-Preparação do corpo do módulo sensor tubular

Na preparação do corpo do módulo sensor tubular, utilizou-se um tubo de perspex com cerca de 8 mm de diâmetro interno, 10 mm de diâmetro externo e 8 mm de comprimento (Fig.2.5.1.1-A). Neste pequeno cilindro era efectuado um pequeno orifício lateral onde se adaptava um cabo condutor coaxial (Fig.2.5.1.1-B), de modo a ficar encostado à parede interna do tubo, sendo posteriormente fixado pelo próprio material de enchimento do cilindro. Para evitar qualquer contacto entre o condutor interno e o externo, procedia-se ao seu isolamento, aplicando umas gotas de resina epoxídica não condutora de Araldite.

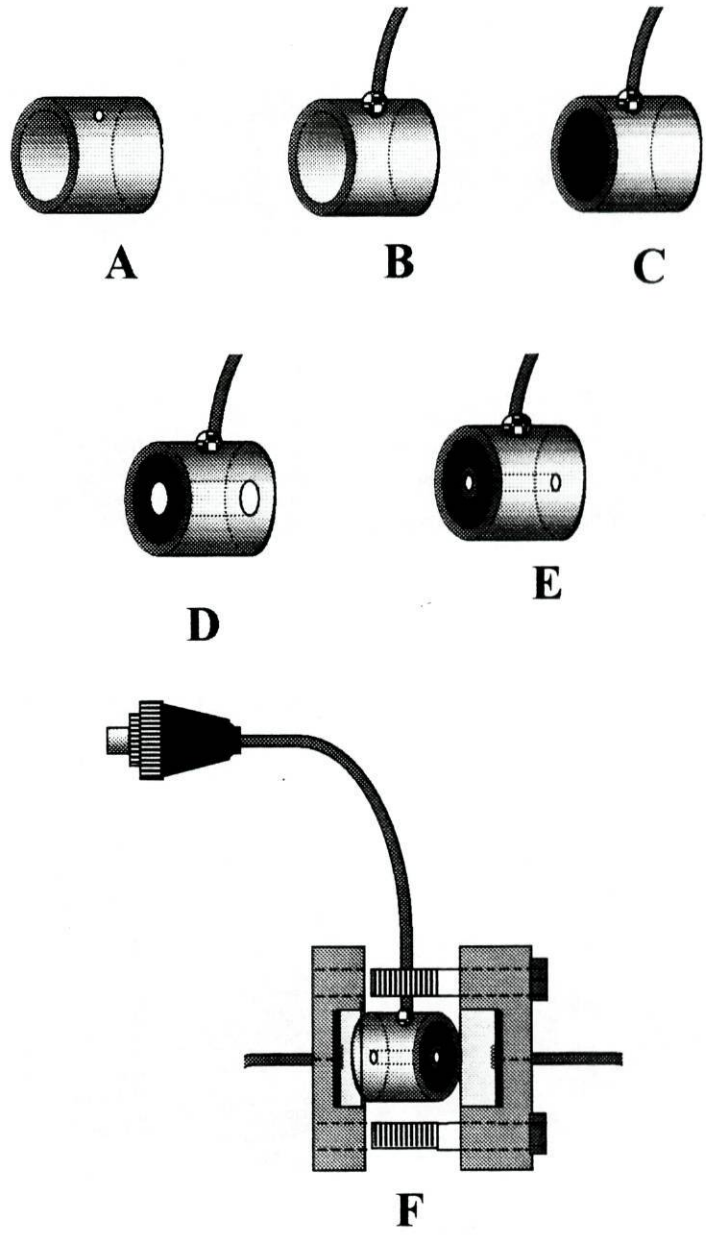

Figura 2.5.1.1-Diferentes fases do processo de construção dos eléctrodos tubulares sensíveis ao amónio.

2.5.2-Preparação e aplicação do suporte condutor no módulo tubular

A composição do material utilizado para a preparação do suporte condutor era idêntica à utilizada na construção dos eléctrodos de configuração convencional (ver 2.4.2). O interior do corpo do módulo sensor tubular era preenchido com a resina epoxídica condutora, tendo o cuidado de garantir uma boa adesão às paredes do tubo e a ausência de fendas, sobretudo na zona central da resina (Fig.2.5.1.1-C).

Após o enchimento das unidades, estas eram colocadas numa estufa a cerca de 100°C à semelhança do que acontecia com as unidades convencionais, para completa secagem da resina. De seguida, procedia-se ao alisamento dos topos do cilindro com papel abrasivo, de modo a conseguirem-se superfícies perfeitamente planas, permitindo assim uma boa adaptação do eléctrodo ao dispositivo de suporte quando inserido no sistema de fluxo. O isolamento da região condutora do eléctrodo tubular era efectuado com uma fina película de resina epoxídica não condutora com o objectivo de evitar o aparecimento de potenciais mistos devido ao eventual contacto dessa parte condutora com a solução que flui através da unidade.

Por fim, efectuava-se um orifício longitudinal, centrado, com cerca de 1mm de diâmetro interno (Fig.2.5.1.1-D), onde posteriormente se aplicava a membrana sensora (Fig.2.5.1.1-E), e adaptava-se um terminal tipo BNC à extremidade livre do cabo (Fig.2.5.1.1-F).

2.5.3-Preparação e aplicação da membrana sensora

Para a preparação da membrana sensora dos eléctrodos tubulares, seguiu-se um procedimento semelhante ao anteriormente indicado para as unidades convencionais (ver 2.4.3), mantendo a mesma composição percentual. A membrana sensora ficava assim, com uma composição final de 3,4% de ionóforo, 0,5% de tetraquis (4-clorofenil)borato de potássio, 71,1% de solvente mediador e 25% de PVC (percentagem em massa).

A deposição da membrana no suporte condutor foi obtida introduzindo no interior do orifício, uma pequena gota de solução sensora que se espalhava pelas paredes internas.

Deixava-se evaporar o solvente e aplicava-se uma nova gota, agora na outra extremidade. Esta operação era repetida várias vezes para garantir a formação de uma película, que revestisse de forma contínua as paredes interiores do orifício e que possuísse uma espessura aproximada de 0,1 mm.

Terminada a deposição da membrana sensora, os eléctrodos eram deixados ao ar, para completa secagem, durante um período não inferior a 12 horas. Posteriormente, quando da sua utilização, era inicialmente efectuado o seu condicionamento, com uma solução 0,01M em ião principal, que fluía lentamente através do orifício.

2.5.4-Inserção dos eléctrodos tubulares no sistema de fluxo

Após a construção dos eléctrodos tubulares, a sua inserção na montagem FIA era efectuada por intermédio de um dispositivo de suporte, constituído por duas placas de perspex sobrepostas, fixadas por parafusos e com cavidades circulares onde encaixava o eléctrodo (Fig. 2.2.3). A essas cavidades eram adaptadas borrachas circulares, com um orifício por onde passava um tubo com um diâmetro equivalente ao do orifício do eléctrodo tubular. As borrachas, permitiam uma melhor fixação das unidades tubulares às placas, evitando-se a perda de solução transportadora.

2.5.5-Recuperação dos módulos tubulares

Sempre que os detectores potenciométricos tubulares acusassem deficiências de funcionamento, à semelhança do que acontecia com as unidades convencionais, também era possível a sua recuperação. Procedia-se então à remoção da membrana com o auxílio de uma pequena broca e posteriormente, fazia-se passar pelo orifício uma certa quantidade de tetrahidrofurano por forma a garantir a limpeza total do suporte condutor do eléctrodo tubular.

Associado à recuperação destas unidades está o sucessivo alargamento do orifício central que, ao aumentar as dimensões, dá origem a uma membrana de maior espessura ou

então a orifícios de dimensões superiores às dos tubos de ligação, limitando assim o número de recuperações possíveis.

2.6-Construção do sistema de detecção potenciométrico diferencial

Para a construção do sistema de detecção diferencial, utilizaram-se dois eléctrodos tubulares sensíveis ao catião amónio, colocados a uma determinada distância entre si e construídos de acordo com o procedimento anteriormente indicado (ver 2.5).

Na montagem assim concebida, os eléctrodos funcionavam alternativamente um como referência do outro, evitando deste modo, a utilização de uma unidade de referência convencional.

A colocação sequencial só foi possível devido à forma tubular que as unidades possuem e ao facto dos seus diâmetros internos serem semelhantes aos dos tubos usados nas ligações, não alterando por isso, as características hidrodinâmicas do fluxo.

2.7-Metodologia utilizada na avaliação dos eléctrodos convencionais

A avaliação das características de funcionamento dos eléctrodos consistiu na determinação de um conjunto de parâmetros definidos pela IUPAC [16], e que permitem concluir da sua utilidade analítica.

Neste trabalho, os eléctrodos de configuração convencional foram avaliados no que se refere às suas características de funcionamento gerais, determinando-se o limite inferior de resposta linear (LIRL), o limite prático de detecção (LPD), o declive da recta de calibração, a velocidade de resposta, a reprodutibilidade dos potenciais, a dependência do valor do potencial dos eléctrodos em função das variações de pH das soluções em que se encontravam mergulhados, e por fim, a extensão das interferências, avaliadas pela determinação dos coeficientes de selectividade potenciométricos.

2.7.1-Avaliação das características de resposta

Os eléctrodos selectivos de iões (ESIs), são sensores electroquímicos cujo potencial é função da actividade de um determinado ião em solução. Numa definição clássica, o funcionamento dos ESIs tem como base o aparecimento de um potencial eléctrico quando uma membrana é colocada entre duas soluções, sendo uma referente à amostra e a outra, uma solução de referência com uma concentração constante do ião em análise. A intensidade deste potencial, vem determinada pela relação das actividades do referido ião nas duas soluções. Dado que a solução de referência interna mantem constante a actividade iónica, o potencial através da membrana é proporcional à actividade do ião na solução de amostra. Como os potenciais de membrana não podem ser medidos directamente, é necessário um eléctrodo de referência externo para estabelecer uma célula electroquímica completa. A resposta do eléctrodo indicador, que se traduz pela diferença de potencial entre o eléctrodo selectivo e o de referência, é função da actividade iónica do

ião principal, e em maior ou menor extensão dos interferentes, traduzindo-se matematicamente pela equação de Nernst-Nikolski:

$$E = const + \frac{2303RT}{Z_A F}\log\left[a_A + K_{A,B}^{pot}(a_B)^{\frac{Z_A}{Z_B}} + K_{A,C}^{pot}(a_C)^{\frac{Z_A}{Z_C}} + \ldots.\right] \quad \textbf{(2.1)}$$

em que **E** representa a diferença de potencial (em mV), **R** a constante dos gases perfeitos e igual a 8,31441 J K^{-1} mol^{-1} , **T** a temperatura absoluta (em graus Kelvin), **F** a constante de Faraday e igual a 9,64846x10^4 C mol^{-1} , a_A , a_B e a_C são respectivamente, a actividade do ião principal (A) e dos interferentes (B e C), $K_{A,B}^{pot}$ e $K_{A,C}^{pot}$ são os coeficientes de selectividade potenciométricos relativamente aos iões B e C, e Z_A , Z_B e Z_C representam números inteiros com sinal e grandeza correspondentes, respectivamente à carga do ião principal (A) e dos interferentes (B e C). O termo "const" inclui o potencial normal do eléctrodo selectivo, o potencial do eléctrodo de referência e o potencial de junção líquida (em mV).

Se em solução, para além do ião principal, não se encontrarem presentes espécies interferentes, então $a_B = a_C = 0$ e a equação toma a seguinte forma simplificada:

$$E = const + \frac{2303RT}{Z_A F}\log a_A \quad \textbf{(2.2)}$$

Além disso, quando a força iónica das soluções se encontra ajustada, (I=const), a actividade do ião principal vem dada pela seguinte expressão:

$a_A = f_A \cdot c_A$

em que $\mathbf{a_A}$ é a actividade do ião principal (A), $\mathbf{c_A}$, representa o valor da sua concentração e $\mathbf{f_A}$, o factor de actividade, que é constante para uma determinada força iónica. Neste caso, a resposta do eléctrodo pode ser expressa em função da concentração (c_A) do ião principal na solução através da seguinte expressão:

$$E = const + \frac{2303RT}{Z_A F} \log c_A \qquad \textbf{(2.3)}$$

em que a parcela "const" passa a incluir mais a componente $\frac{2303RT}{Z_A F} \log f_A$. Assim, dentro de determinada zona de concentrações, a resposta do eléctrodo varia linearmente em função do logaritmo da concentração do ião para o qual ele é sensível de acordo com a expressão (2.3), com um declive positivo ou negativo conforme o eléctrodo é sensível a catião ou anião, respectivamente, e com um valor teórico de 59,16 mV década^{-1} , para iões monovalentes e de 29,58 mV por década, para iões divalentes, quando a temperatura é fixada a 25°C. No entanto, para soluções diluídas, o potencial dos eléctrodos deixa de variar linearmente com a concentração, podendo atingir um valor constante que não é alterado com a variação da concentração do ião principal. Na Figura 2.7.1.1, representa-se uma curva de calibração genérica que corresponde à representação gráfica da variação da diferença de potencial em função do logaritmo da actividade (ou concentração) do ião principal, onde é possível distinguir as três zonas referidas. É na zona de resposta linear do eléctrodo que vulgarmente são executadas as determinações por potenciometria directa.

Os parâmetros de calibração dos eléctrodos são aqueles que se obtêm a partir da curva de calibração como o limite inferior de resposta linear (LIRL), o limite prático de detecção (LPD), o declive da parte linear da curva de calibração e a estabilidade dos potenciais.

Segundo os critérios da IUPAC [16], define-se o limite inferior de resposta linear (LIRL) como o valor de actividade (ou concentração) do ião principal, a partir do qual se deixa de verificar a relação linear entre a diferença de potencial dos eléctrodos indicador e de referência, e o logaritmo da actividade (ou concentração) do ião principal (fig.2.7.1.1). O limite prático de detecção é definido como o valor de actividade (ou concentração) do ião principal no ponto de intersecção das extrapolações das partes lineares da curva de calibração.

Estes limites dependem de vários factores, como sejam as condições experimentais (composição das soluções e velocidade de agitação) e o tempo de vida das unidades, pelo que apenas têm significado como ordem de grandeza. Para a sua

determinação procedeu-se à calibração dos eléctrodos utilizando o método da adição de quantidade conhecida. Após prévia lavagem com água desionizada, dos eléctrodos que se encontravam a condicionar numa solução aquosa de ião principal, e secagem dos mesmos com papel absorvente, estes eram introduzidos conjuntamente com um eléctrodo de referência, num volume conhecido de uma solução ajustadora de força iónica que se encontrava em homogeneização contínua. Seguidamente, eram adicionados pequenos volumes de uma solução concentrada de ião principal, registando-se, para cada adição e após estabilização dos eléctrodos, o correspondente valor de potencial. Com os valores obtidos, procedeu-se ao traçado da curva de calibração representando os valores da diferença de potencial em função do logaritmo da concentração do ião principal, obtendo-se uma curva semelhante à representada na Fig.2.7.1.1 e a partir da qual se determinava o limite inferior de resposta linear e o limite prático de detecção, seguindo os critérios estabelecidos pela IUPAC [16].

Através do tratamento estatístico dos pares de valores "logaritmo da concentração / diferença de potencial", por regressão linear de y em x, obtiveram-se as equações através das quais se deduziu o declive correspondente à zona de resposta linear dos eléctrodos e o respectivo coeficiente de correlação quadrático.

Para o estudo da reprodutibilidade dos potenciais ao longo de um dia de trabalho, foram efectuadas várias calibrações, determinando a variação de potencial registados.

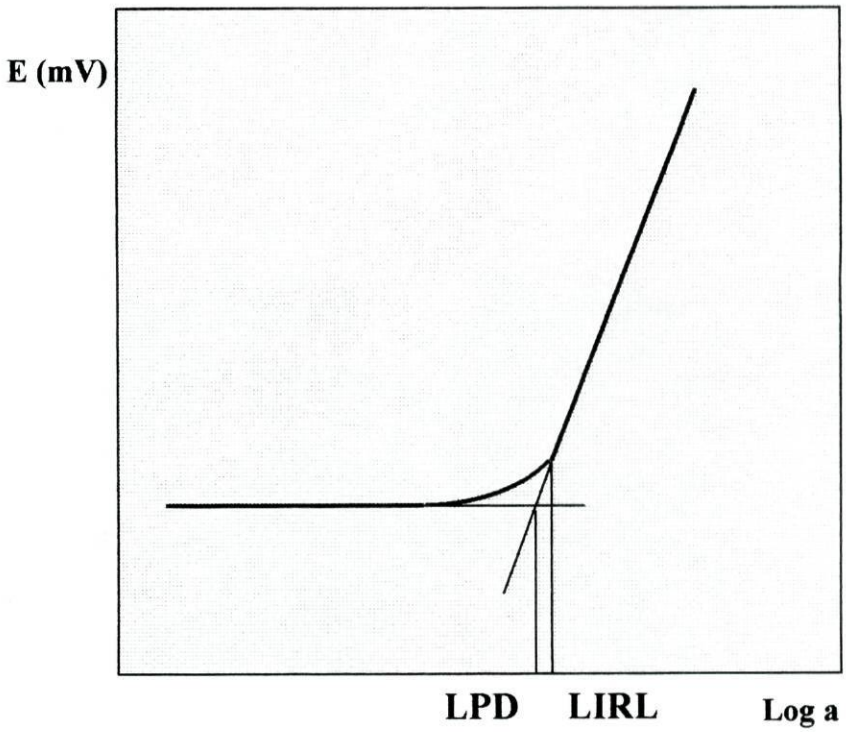

Figura 2.7.1.1-Curva de calibração típica para eléctrodos sensíveis a espécies catiónicas. Determinação gráfica do limite inferior de resposta linear (LIRL) e do limite prático de detecção (LPD), sugerido pela IUPAC [16].

2.7.2-Determinação do tempo de resposta

O tempo de resposta prático dos eléctrodos, é o tempo que medeia entre o instante em que o eléctrodo selectivo e o eléctrodo de referência são colocados em contacto com a solução (ou o instante em que a concentração do ião principal é alterada), e o momento em que a diferença de potencial entre os dois eléctrodos é igual ao seu estado estacionário mais ou menos 1mV [16].

Esta característica dos eléctrodos, traduz mais especificamente a resposta de toda a célula electroquímica do que propriamente a velocidade de resposta intrínseca da membrana, uma vez que certos factores como o volume e composição da solução inicial, a rapidez de agitação e o tempo de vida dos eléctrodos, têm influência na avaliação deste parâmetro. Esta limitação tem no entanto, muito interesse prático já que nas aplicações analíticas concretas, é sempre a velocidade de resposta de toda a montagem que condiciona o ritmo a que as determinações podem ser executadas.

Para a determinação do tempo de resposta dos eléctrodos convencionais, ligou-se o decimilivoltímetro a um registador, de forma a obter um registo contínuo das variações do potencial quando se alterava a concentração do ião principal na solução. Assim, os eléctrodos selectivos e de referência foram mergulhados num volume tão reduzido quanto possível, de uma solução de concentração em ião principal próxima do limite inferior de resposta linear (10^{-5}M), e com o auxílio de pipetas de volume regulável, adicionaram -se de forma rápida, volumes pequenos de uma solução mais concentrada, por forma a duplicar aproximadamente, o valor da concentração do ião principal.

2.7.3-Avaliação da influência do pH na resposta dos eléctrodos.

Uma vez que os eléctrodos poderão vir a ser utilizados em amostras com valores de pH muito diferentes, interessa saber para que intervalo de valores a resposta não é alterada, com a variação deste parâmetro.

A influência do pH na resposta dos eléctrodos, foi estudada determinando as variações de potencial das unidades quando, na solução em que decorria o ensaio, se procedia a alterações de pH, por adição de uma base ou de um ácido concentrados.

Para a realização deste ensaio, recorreu-se a um comutador que permitiu a utilização em conjunto de três eléctrodos selectivos e do eléctrodo de pH. Começou-se por calibrar (em valores de potencial) o eléctrodo de pH utilizando soluções tampão comerciais com pH de 9,0 , 7,0 e 4.0 unidades. Após a calibração, os eléctrodos foram introduzidos num volume elevado de solução (aproximadamente de 200 mL) que continha o ião principal numa concentração de 10^{-2}M e com um valor de pH inicial de 5,4 unidades. Procedeu-se inicialmente, à adição de pequenos volumes de uma solução concentrada de base forte (LiOH), até obter um valor de pH próximo de 10 unidades, registando-se para cada adição de base, os valores de potencial correspondentes a cada um dos eléctrodos. Posteriormente, procedeu-se à adição de pequenos volumes de ácido (HCl) até um valor próximo de pH 2, registando-se igualmente para cada adição, os valores de potencial.

A utilização de um volume elevado para a realização do ensaio, tinha como objectivo minimizar a variação de volume e assegurar assim, que as eventuais alterações de potencial dos eléctrodos selectivos, resultassem exclusivamente da alteração do valor de pH da solução e não da alteração do volume.

A escolha da composição da solução alcalina teve por base o valor obtido para os coeficientes de selectividade potenciométricos dos catiões que a constituíam, verificando-se ser o catião Lítio o menos interferente.

2.7.4-Determinação dos coeficientes de selectividade potenciométricos

O potencial dos eléctrodos selectivos de iões, como referido anteriormente e expresso pela equação de Nernst-Nikolski, depende não só da concentração do ião principal, mas também, de outros iões presentes, sendo o maior ou menor grau de interferência quantificado pelo coeficiente de selectividade potenciométrico (K^{pot}). Este parâmetro, é uma medida da capacidade que um eléctrodo selectivo tem para distinguir um determinado ião de outros, existentes na mesma solução. Quanto menor for o seu valor,

maior é a preferência do eléctrodo pelo ião principal relativamente ao interferente e consequentemente, é menor a extensão da interferência.

Na determinação dos coeficientes de selectividade potenciométricos, os valores encontrados dependem muito das condições experimentais em que são obtidos, nomeadamente, da concentração do ião principal e do interferente, do estado físico da membrana, do tempo de vida das unidades e do método utilizado para a sua quantificação. Por esta razão, os valores obtidos devem ser tomados como uma ordem de grandeza que permitirá condicionar as condições experimentais em que o eléctrodo será utilizado.

Os valores dos coeficientes de selectividade potenciométricos são geralmente obtidos recorrendo ao método das soluções misturadas ou ao método das soluções separadas [16]. Embora o primeiro seja considerado como aquele que corresponde a condições experimentais mais próximas das reais, tem associada maior carga experimental, além de que sendo o valor encontrado para este parâmetro apenas uma indicação da ordem de grandeza, este não é significativamente alterado quando o ião principal e interferente possuem a mesma carga [17].

Assim, procedeu-se à determinação dos coeficientes de selectividade potenciométricos pelo método das soluções separadas. O procedimento seguido consistiu na realização de ensaios de calibração em soluções puras do ião principal e calibrações em soluções puras, com a mesma concentração das anteriores, de ião interferente.

Na calibração com soluções puras de ião principal, o valor da diferença de potencial é dado pela equação de Nernst-Nicolski já anteriormente referida:

$$E_1 = const + \frac{2303RT}{Z_A F}\log a_A \qquad \textbf{(2.2)}$$

Por sua vez, quando as calibrações são realizadas em soluções contendo apenas o ião interferente (B), a resposta do eléctrodo pode ser traduzida por:

$$E_2 = const + \frac{2303RT}{Z_A F}\log\left[K_{A,B}^{pot}(a_B)^{\frac{Z_A}{Z_B}}\right] \qquad \textbf{(2.5)}$$

Subtraindo, membro a membro as equações (2.2) e (2.5), teremos:

$$E_2 - E_1 = \frac{2303RT}{Z_A F}\left[\log K_{A,B}^{pot} + \frac{Z_A}{Z_B}\log(a_B) - \log(a_A)\right] \qquad \textbf{(2.6)}$$

Sendo a actividade do ião interferente igual à do ião principal, a expressão pode ser simplificada:

$$\frac{E_2 - E_1}{2303RT/Z_A F} = \log\left(K_{A,B}^{pot}\right) + \left(\frac{Z_A}{Z_B} - 1\right)\log(a_A) \qquad \textbf{(2.7)}$$

A partir da qual se pode calcular o coeficiente de selectividade potenciométrico de acordo com:

$$\log\left(K_{A,B}^{pot}\right) = \frac{E_2 - E_1}{2303RT/Z_A F} + \left(1 - \frac{Z_A}{Z_B}\right)\log(a_A) \qquad \textbf{(2.8)}$$

Quando a carga do ião principal e interferente são iguais, a expressão anterior pode ainda ser simplificada, tomando o seguinte aspecto:

$$\log\left(K_{A,B}^{pot}\right) = \frac{E_2 - E_1}{2303RT/Z_A F} \qquad \textbf{(2.9)}$$

É importante conhecer o valor, ainda que relativo, deste parâmetro para os eléctrodos, de modo a poder fazer-se uma previsão segura das eventuais implicações analíticas.

Neste trabalho, aplicou-se o método das soluções separadas para a determinação dos coeficientes de selectividade potenciométricos em relação a alguns catiões nomeadamente, potássio, sódio e lítio, tendo por objectivo a escolha da solução ajustadora de força iónica a utilizar. Estes catiões, por terem muita semelhança com o catião amónio,

são provavelmente interferentes a considerar. A determinação dos coeficientes de selectividade potenciométricos relativamente a outras espécies não foi necessária, pelo facto de se ter utilizado uma membrana permeável a gases para eliminar as interferências de matriz.

Para avaliar a extensão das interferências relativamente ao sódio, potássio e lítio, recorreu-se à expressão (2.9), substituindo o valor do declive teórico pelo valor prático obtido na calibração dos eléctrodos.

A determinação dos coeficientes de selectividade potenciométricos, foi sempre efectuada calculando a média de dois ensaios realizados com pelo menos dois eléctrodos diferentes em cada ensaio. Entre cada determinação, os eléctrodos eram sujeitos a um condicionamento com agitação, numa solução de ião principal e eram calibrados.

2.8-Metodologia utilizada na avaliação dos detectores tubulares

Contrariamente ao que sucede com os eléctrodos selectivos convencionais, não existe uma metodologia definida para a avaliação das características de funcionamento dos detectores potenciométricos destinados a serem incorporados em montagens FIA.

Assim, procurou-se utilizar uma metodologia de avaliação, o mais parecida possível com a que foi usada no estudo dos eléctrodos convencionais, adaptando-a às condições de fluxo contínuo.

Para tal, utilizou-se um sistema FIA de baixa dispersão, para que fosse irrelevante a diluição das amostras injectadas, determinando-se para os detectores tubulares construídos, o limite inferior de resposta linear, o limite prático de detecção, o declive, a repetibilidade do sinal analítico e a reprodutibilidade dos potenciais ao longo de um dia de trabalho, a influência do pH na resposta dos eléctrodos e os coeficientes de selectividade potenciométricos

2.8.1-Estabelecimento do sistema FIA

No estabelecimento da montagem FIA de baixa dispersão (Fig.2.8.1.1), procurou-se que a resposta dos detectores tubulares fosse o mais próximo possível da resposta correspondente ao estado estacionário, para que as características de funcionamento destas unidades sejam comparáveis com as dos respectivos eléctrodos convencionais. Para isso, foi necessário proceder ao estudo da influência que os parâmetros da montagem (volume de injecção, caudal da solução transportadora e distância ao detector) exerciam na resposta do detector.

O estudo de optimização foi realizado injectando no sistema FIA soluções com diferentes concentrações de ião principal e comparando o sinal analítico com o correspondente ao do estado estacionário tomado como referência e obtido injectando no sistema um volume elevado (1000 μL) de uma solução de ião principal.

A escolha do volume de injecção, da velocidade do transportador e da distância ao detector, foram seleccionados de modo a garantir que a resposta do detector naquelas

condições, não fosse inferior a cerca de 95% do sinal analítico correspondente ao estado estacionário.

Uma vez estabelecida a montagem FIA de baixa dispersão, procedeu-se de seguida à avaliação das características de resposta dos detectores tubulares.

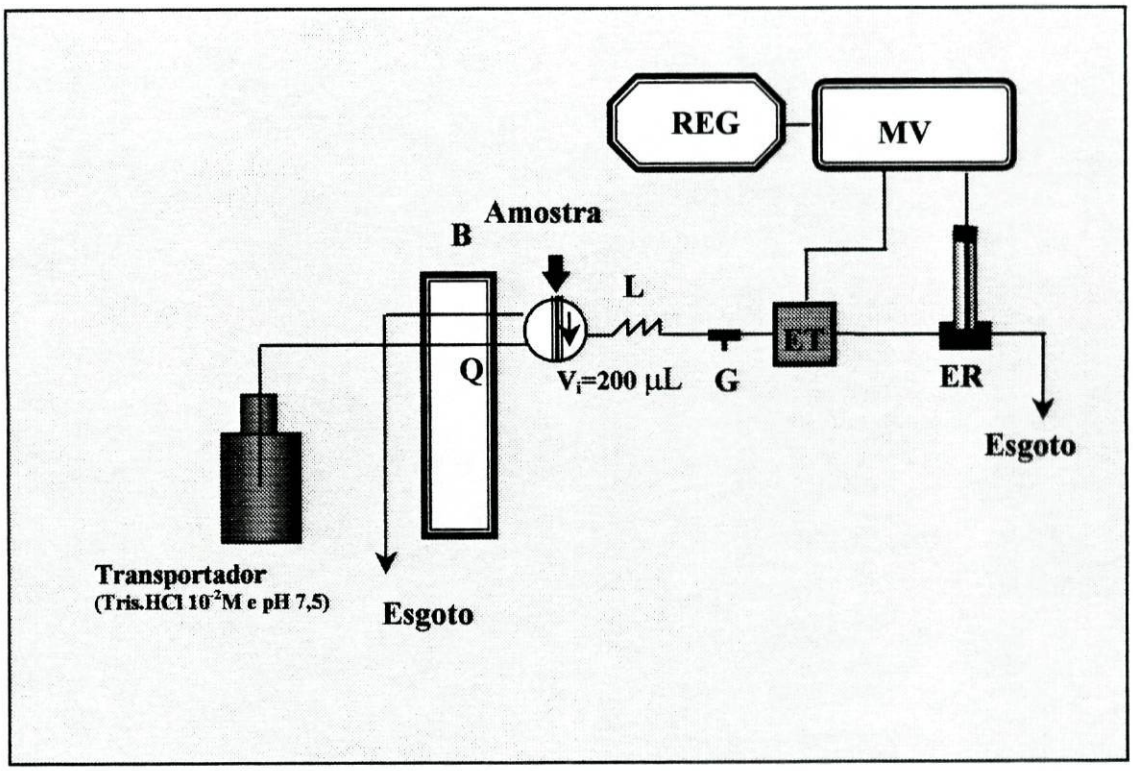

Figura 2.8.1.1-Sistema FIA de baixa dispersão utilizado na avaliação das características gerais de funcionamento dos eléctrodos tubulares: B-bomba peristáltica; Q-caudal da solução transportadora (5,1mL/min); Vi-volume de injecção; ET-eléctrodo tubular; ER-eléctrodo de referência; G-eléctrodo de ligação à terra; MV-decimilivoltímetro; REG-registador; L-distância ao detector (20 cm)

2.8.2-Avaliação das características de resposta

Para a determinação das características de resposta, e à semelhança do estudo efectuado para as unidades convencionais, procedeu-se ao traçado das curvas de calibração. Para isso, introduziram-se (geralmente em duplicado) no sistema de fluxo, soluções com concentrações crescentes de ião principal, e a partir do diagrama dos sinais FIA obtido, traçou-se a respectiva curva de calibração onde a altura do sinal analítico era relacionada com o logaritmo da concentração do ião principal na solução.

Para a determinação do limite inferior de resposta linear e limite prático de detecção, utilizou-se o processo de cálculo anteriormente referido na avaliação dos eléctrodos convencionais (ver 2.7.1).

Para a determinação da repetibilidade do sinal analítico, procedeu-se a injecções repetidas de uma mesma solução com determinada concentração de ião principal. A operação foi repetida para vários níveis de concentração, sendo o número de injecções no mínimo, igual a 10, calculando-se o desvio padrão das alturas de pico obtidas.

A reprodutibilidade dos potenciais ao longo de um dia de trabalho, foi avaliada efectuando diferentes calibrações e determinando a variação dos valores de potencial obtidos.

2.8.3-Determinação do ritmo de amostragem

Na impossibilidade de adaptar para as condições de fluxo, a metodologia seguida na avaliação do tempo de resposta dos eléctrodos convencionais, optou-se por fazer a avaliação da velocidade de resposta da montagem FIA e daí deduzir o ritmo de amostragem que era possível atingir-se com os detectores tubulares.

Assim, introduziram-se no sistema, soluções de ião principal com diferentes concentrações e calculou-se o tempo que, após o registo do sinal analítico, a resposta do detector demorava a atingir um potencial estável, correspondente ao da linha de base.

2.8.4-Avaliação da influência do pH na resposta dos detectores tubulares

Na avaliação deste parâmetro, utilizou-se o sistema FIA de baixa dispersão anteriormente referido (Fig.2.8.1.1), no qual foi necessário fazer algumas adaptações [18]. A montagem resultante encontra-se representada na Fig. 2.8.4.1.

Num volume de cerca de 200 mL, de uma solução de ião principal, introduziu-se um eléctrodo de pH previamente calibrado. A esta solução foram adicionados pequenos volumes de uma solução concentrada de um ácido forte ou de uma base forte. Após homogeneização e estabilização do eléctrodo de pH, registava-se o seu potencial, e procedia-se à injecção dessa solução no sistema FIA.

Com os valores obtidos, procedeu-se à representação gráfica do diagrama de Reilley, colocando em abcissas os valores de pH calculados e em ordenadas, os valores de altura dos picos dos sinais analíticos correspondentes.

No decorrer desta avaliação, é importante que o volume de solução na qual se procede à alteração de pH, seja mantido constante. Para isso opta-se por utilizar um volume grande de solução e proceder a uma recirculação da mesma (Fig.2.8.4.1). Deste modo, a única variação de volume ocorrida, correspondia ao volume de cada injecção efectuada (200 μL) e aos reduzidos volumes de ácido ou base adicionados, considerando-se por isso desprezável.

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

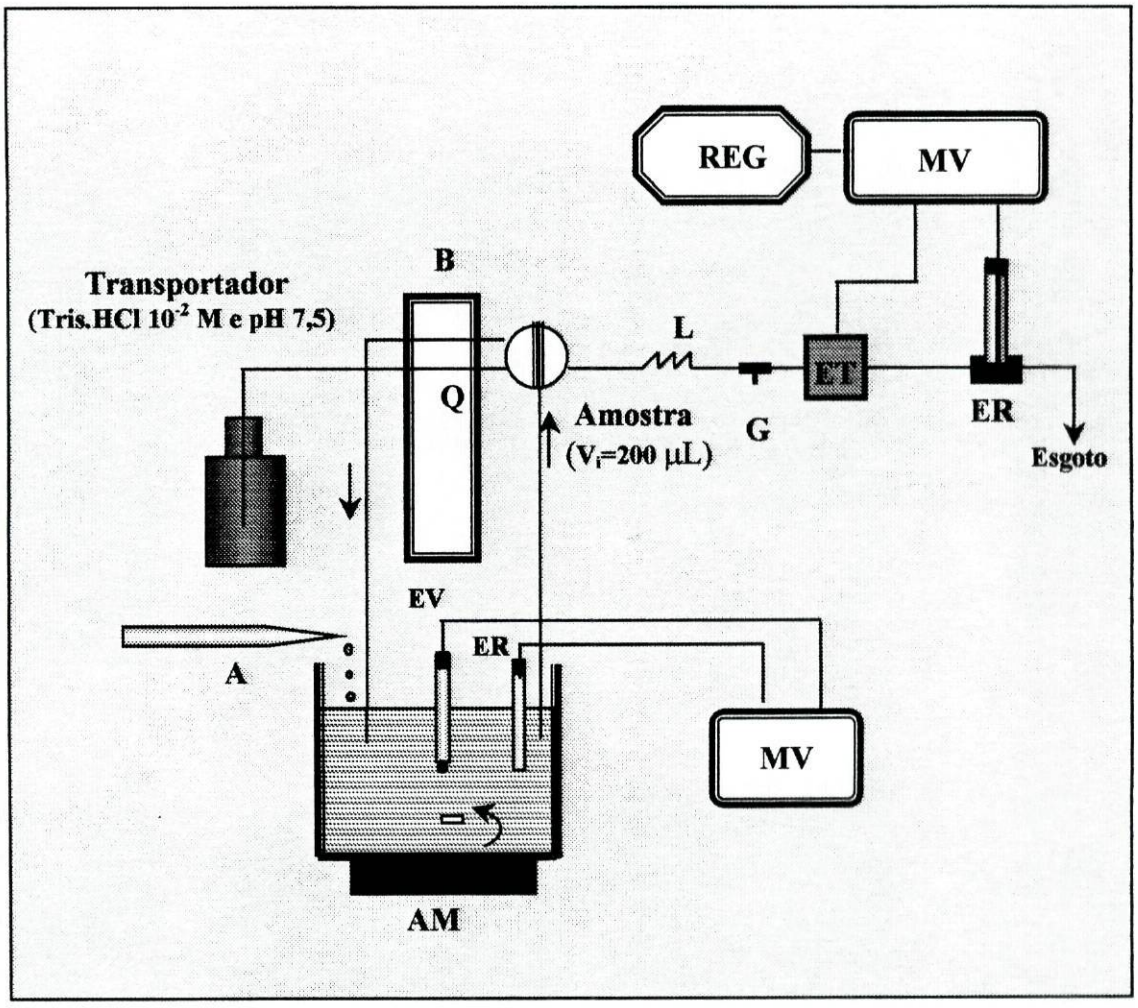

Figura 2.8.4.1-Sistema FIA utilizado no estudo da influência do pH nos valores de potencial dos detectores tubulares: B-bomba peristáltica; Q-caudal da solução transportadora (5,1 mL/min); Vi-volume de injecção; ET-eléctrodo tubular; ER-eléctrodo de referência; EV-eléctrodo de vidro; G-eléctrodo de ligação a terra; MV-decimilivoltímetro; REG-registador; AM-agitador magnético; A-adição de ácido ou base; L-distância ao detector (20 cm).

2.8.5-Determinação dos coeficientes de selectividade potenciométricos

Para a determinação dos coeficientes de selectividade potenciométricos em condições de fluxo, recorreu-se ao método das soluções separadas tentando criar condições experimentais semelhantes às usadas na determinação da selectividade dos eléctrodos convencionais. O procedimento seguido consistiu na injecção de soluções de concentração crescente de ião principal, correspondentes à zona de resposta linear do eléctrodo, a que se seguiu a injecção de amostras, de igual concentração, mas de ião interferente. Para o cálculo dos valores dos K^{pot} utilizou-se a equação (2.9), anteriormente deduzida (ver 2.7.4):

$$\log\left(K_{A,B}^{pot}\right) = \frac{E_2 - E_1}{2303RT/Z_A F} \qquad \textbf{(2.9)}$$

em que os valores de E_1 e E_2 correspondem ao valor médio das alturas dos sinais analíticos correspondentes a três injecções da mesma solução.

Tal como na determinação da selectividade dos eléctrodos convencionais, determinaram-se os coeficientes de selectividade potenciométricos relativamente ao potássio, sódio e lítio.

2.9-Metodologia utilizada na avaliação do sistema de detecção diferencial

Para a avaliação das características de resposta do sistema de detecção diferencial, utilizou-se a montagem FIA da Fig.2.9.1.1.

Como referido anteriormente (ver 2.6), o sistema de detecção diferencial, foi estabelecido colocando sequencialmente dois eléctrodos tubulares sensíveis ao catião amónio, a uma determinada distância entre si. A colocação sequencial dos eléctrodos, implicou a optimização de alguns parâmetros da montagem FIA de baixa dispersão anteriormente referida (ver 2.8.1), no sentido de se conseguirem sinais com uma altura máxima e calibrações com um máximo de sensibilidade (mV/dec.).

Assim, começou-se por optimizar os parâmetros que definem a montagem FIA e só posteriormente se procedeu a uma caracterização mais completa do funcionamento do sistema de detecção. Este foi avaliado no que diz respeito às suas características de resposta mais gerais, determinando o limite inferior de resposta linear, o declive da curva de calibração, a repetibilidade do sinal analítico e a reprodutibilidade dos potenciais ao longo de um dia de trabalho.

2.9.1-Optimização da montagem FIA

Para a optimização do sistema de detecção diferencial, procedeu-se ao estudo da influência de alguns parâmetros da montagem, na resposta do detector, nomeadamente, da distância entre os dois eléctrodos e da velocidade do fluxo transportador.

Fixando o volume de injecção e a velocidade do fluxo transportador, alterou-se a distância entre eléctrodos e estudou-se a sua influência na resposta do sistema de detecção sequencial, nomeadamente na altura do sinal analítico e no declive da recta de calibração. Para isso, introduziram-se na montagem FIA soluções com diferentes concentrações de ião principal, registando-se para cada uma a altura do respectivo sinal analítico, que resultava da soma do sinal ascendente e do sinal descendente. O valor obtido era depois relacionado graficamente com o logaritmo da concentração da solução. Este procedimento foi repetido

para cada uma das distâncias ensaiadas, optando-se por aquela que permitiu obter dois sinais analíticos (um ascendente e o outro descendente) com alturas semelhantes e uma maior sensibilidade analítica associada a um bom ritmo de amostragem.

Posteriormente, fixou-se o volume de injecção e a distância entre eléctrodos e estudou-se a influência da velocidade do transportador, registando-se igualmente a sua influência no sinal analítico do detector.

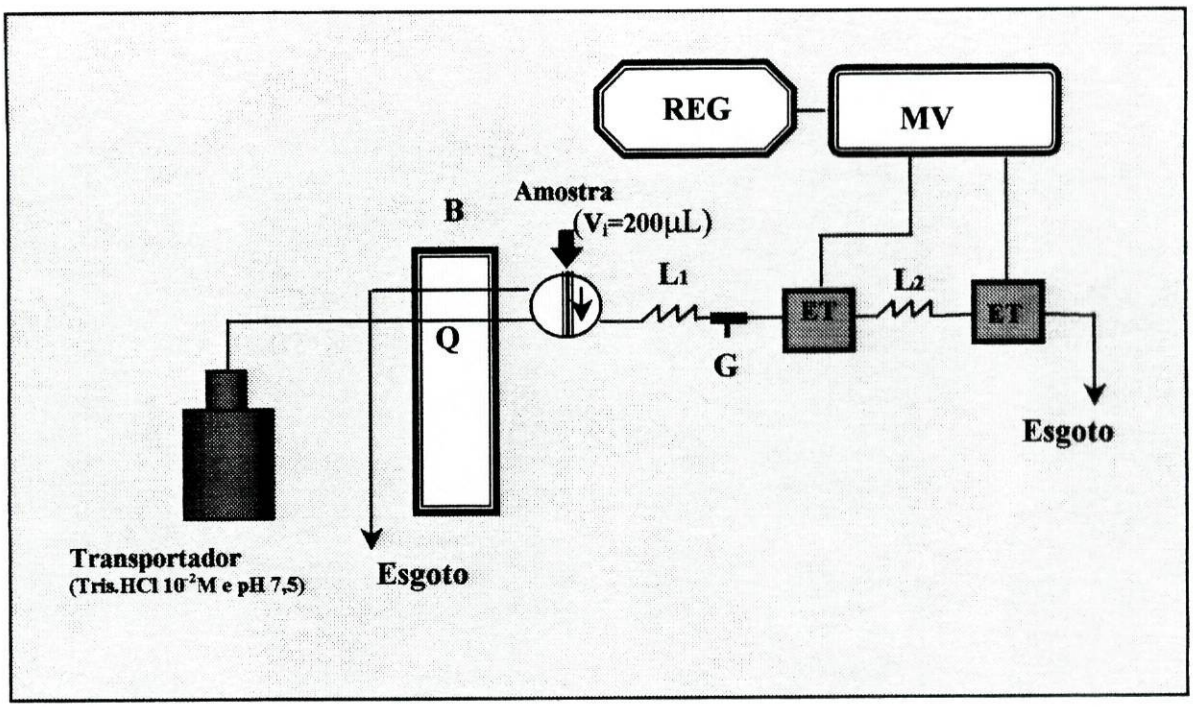

Figura 2.9.1.1-Sistema FIA utilizado na avaliação das características de resposta do sistema de detecção potenciométrico diferencial: B-bomba peristáltica; Q-caudal do fluxo transportador (5,8 mL/min); Vi-volume de injecção; ET-eléctrodo tubular; G-eléctrodo de ligação a terra; MV-decimilivoltímetro; REG-registador; L_1-distância ao detector (20 cm); L_2-distância entre eléctrodos (101 cm).

2.9.2-Avaliação das características de resposta

Optimizados os parâmetros da montagem FIA, procedeu-se a uma caracterização mais completa do sistema de detecção diferencial. Assim, determinou-se o limite inferior de resposta linear, o limite prático de detecção, o declive da curva de calibração, a repetibilidade do sinal analítico e a estabilidade dos potenciais ao longo de um dia de trabalho. O procedimento seguido foi semelhante ao utilizado na determinação destas mesmas características, quando da avaliação dos detectores tubulares no sistema FIA de baixa dispersão, conjuntamente com um eléctrodo de referência convencional (ver 2.8).

2.10-Metodologia de referência para a determinação do teor de azoto nas amostras

No sentido de avaliar a qualidade dos resultados obtidos com a utilização do sistema de detecção desenvolvido, procedeu-se à determinação do teor de azoto total em amostras reais. Os valores obtidos foram posteriormente comparados com os resultantes da aplicação da metodologia de referência, sendo esta baseada na técnica de Kjeldahl [3-6].

2.10.1-Resumo do processo

Na determinação do teor de azoto total pela metodologia de referência, as amostras foram inicialmente sujeitas a uma digestão ácida para destruição da matéria orgânica por oxidação com ácido sulfúrico concentrado na presença de uma mistura catalizadora. Nestas condições, o azoto orgânico originava sais de amónio que, por alcalinização posterior do meio, eram transformados em amoníaco, o qual era destilado e recolhido num determinado volume de solução ácida de concentração conhecida. Por fim, procedia-se à titulação do excesso de ácido com uma solução alcalina de igual concentração [4-6], ou à titulação do amoníaco combinado [3].

2.10.2-Procedimento analítico

O estudo incidiu na análise de um conjunto de produtos alimentares de características muito diferentes, e de algumas águas residuais. Com esta escolha diversificada de amostras, pretendeu-se obter uma gama alargada de concentrações, desde os valores mais altos (da ordem dos g %p/p) e por norma variáveis, que caracterizam os alimentos, até valores bastante mais baixos que aparecem nas águas residuais (da ordem dos mg/L).

No que se refere aos alimentos, a metodologia de referência não se encontra definida de uma forma específica para cada um deles, pelo que foi necessário agrupa-los de

acordo com a maior ou menor semelhança entre eles, e aplicar as respectivas Normas Portuguesas definidas para cada grupo.

Assim, seguiu-se a metodologia proposta na NP-1612 [3], para a determinação do teor de azoto total nos produtos carneos seleccionados para este trabalho (mortadela, fiambre, chourição, whiscas, hamburguer, salsicha fresca e salsicha de lata). Para os produtos derivados dos cereais (nestum, cerelac, bolacha integral e pizza), tomou-se como referência a metodologia proposta na NP-1996 [4]. Para os produtos derivados do cacau (cacau em pó, chocolate e mousse de chocolate), seguiu-se a respectiva norma NP-3598 [5].

Para a determinação do teor de azoto total nas águas residuais seguiu-se a metodologia proposta em [6].

Para a digestão dos diferentes alimentos, procedeu-se inicialmente a uma trituração fina destes para uma homogeneização perfeita da amostra. Posteriormente, foi retirada uma toma de dois gramas rigorosamente pesados e introduzidos num balão de Kjeldahl de 800 mL de capacidade, adicionando-se 25 mL de ácido sulfúrico concentrado e a mistura catalizadora. A preparação assim obtida foi submetida a aquecimento lento, de início e depois mais rápido, até destruição completa da matéria orgânica.

Para a digestão das águas, seguiu-se um procedimento muito semelhante, sendo o volume de amostra utilizado, função da carga poluente que cada uma apresentava. A este volume eram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e a mistura catalítica utilizada na digestão dos alimentos.

Terminada a digestão ácida, o material era recolhido num volume de 100 mL e diluído com água. Daqui, eram retirados 75 mL para destilação sendo o restante volume utilizado para fazer a determinação do azoto total por FIA utilizando em cada injecção cerca de 200 μL.

O facto de se utilizar o mesmo material digerido como ponto de partida na aplicação dos dois métodos de análise, permitia assegurar as mesmas condições experimentais na realização da operação de digestão, e evitar assim, possíveis fontes de erro na comparação final dos resultados.

2.11-Bibliografia

[1]-M.A.R.P.Barros, J.L.F.C.Lima e A.A.S.C.Machado, *Port.Electrochim.Acta*, **1**, 277, (1983).

[2]-S.Alegret, J. Alonso; J. Bartroli, A.A.S.C.Machado, J.L.F.C.Lima e J.M.Paulis, *Quim.Anal.*, **6**, 278, (1987).

[3]-Determinação do teor de Azoto total em carnes, derivados e produtos carneos, NP-1612 (1979).

[4]-Determinação do teor de proteína bruta em cereais e leguminosas, NP-1996 (1982)

[5]-Determinação do teor de azoto total e de proteína bruta no cacau e derivados, pNP-3598.

[6]-StandarMethods for Examination of Water and Wastewater, 18th ED. (1992).

[7]-J.L.F.C.Lima e A.A.S.C.Machado, *Analytical Techniques in Environmental Chemistry*, J Albaiges (edit), volume 2, Pergamon Press, Oxford, (1982),pag.419.

[8]-J.L.F.C.Lima e A.A.S.C.Machado, *Analyst*, **111**, 799 (1986).

[9]-R.A.S.Lapa, J.L.F.C.Lima e A.M.R.Silva, *Il Farmaco*, **45**, 901 (1990).

[10]-M.C.B.S.Montenegro, *Construção, Avaliação e Utilização de Eléctrodos Selectivos de Iões para Espécies Orgânicas com Interesse Farmaceutico*. Dissertação para Doutoramento na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (1991).

[11]-G.J.Moody, R.B.Oke e J.D.R.Thomas, *Analyst*,**95**, 910 (1970).

[12]-R.P.Scholer e W.Simon, *Chimia*, **24**, 372 (1970).

[13]-T.Buhrer, H.Peter e W,Simon, *Pflugers*, **412**, 359 (1988).

[14]-S.Alegret, J. Alonso; J. Bartroli, J.M.Paulis, J.L.F.C.Lima e A.A.S.C.Machado, *Anal.Chim.Acta*, **164**,147 (1984).

[15]-M.N.M.P.Alçada, *Construção e Avaliação de Eléctrodos Selectivos de Iões para Determinação de Alcaloides em Formulações Farmaceuticas*. Dissertação para Doutoramento na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (1995).

[16]-International Union of Pure and Applied Chemystry, Analytical Chemestry Division, Commission on Analytical Nomenclature, Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes, *Pure Appl.Chem.*, **66**, 2527 (1994).

[17]-G.J.Moody e J.D.R.Thomas, *Selective Ion-Sensitive Electrodes*, Merrow Technical Library, Watford, England (1971), pag.15.

[18]-S.Alegret, J. Alonso; J. Bartroli, A.A.S.C.Machado, J.L.F.C.Lima e J.M.Paulis, *Anal.Lett.*, **18**, 2291 (1985).

CAPÍTULO 3

ELÉCTRODOS SELECTIVOS SENSÍVEIS AO AMÓNIO

3-ELÉCTRODOS SELECTIVOS SENSÍVEIS AO AMÓNIO

3.1-Introdução

Os eléctrodos em estudo neste capítulo, foram construídos sem solução de referência interna [1] e com uma membrana sensora de condutor neutro, obtida pela imobilização de um ionóforo de amónio numa membrana de PVC.

O termo ionóforo é usado para descrever ligantes que selectivamente se associam a iões. Tipicamente, são moléculas macrocíclicas com um ião ligado numa cavidade de dimensões bem definidas e a sua selectividade está baseada na relação entre as dimensões do ião com o local de ligação. Os ésteres de coroa [2], constituem a classe mais conhecida de ionóforos, porém outros tipos de moléculas de ocorrência sintética ou natural, agem como tal. De acordo com Simon [3], verifica-se que antibióticos macrotetrólitos como o nonactin [4], apresentam grande selectividade relativamente ao catião amónio, podendo ser usados em determinações potenciométricas. Actualmente, está já generalizada a sua utilização em eléctrodos para a determinação do catião amónio [5-14].

Caracterizados por apresentarem grande selectividade para o NH_4^+, na presença de muitos outros catiões [15], os eléctrodos com este tipo de membrana sensora, sofrem no entanto, interferências por parte de alguns metais alcalinos nomeadamente pelo potássio, dadas as semelhanças entre os dois catiões [9,10,14]. Esta limitação, pode condicionar a utilização directa destas unidades em determinadas matrizes.

O estudo desenvolvido neste capítulo, teve por objectivo proceder a uma caracterização pormenorizada dos eléctrodos assim construídos, seguindo as recomendações da IUPAC [16], com vista ao desenvolvimento posterior das correspondentes unidades tubulares, para o doseamento de forma automática, do catião amónio.

3.2-Parte experimental

3.2.1-Aparelhagem e eléctrodos

Em todas as determinações efectuadas com os eléctrodos convencionais, utilizou-se a aparelhagem previamente especificada no Cap.2. Usou-se como referência um eléctrodo de cloreto de prata/prata, de dupla junção, com cloreto de lítio 0,1M no compartimento exterior.

Os eléctrodos selectivos sensíveis ao catião amónio, foram construídos sem solução de referência interna, depositando directamente a membrana sensora num suporte condutor com base de grafite, como anteriormente referido (ver 2.4).

3.2.2-Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados encontram-se especificados no Cap.2

As soluções padrão de cloreto de amónio foram preparadas por diluição em água de uma solução mais concentrada sendo esta obtida por pesagem rigorosa do respectivo sólido.

3.2.3-Preparação do sistema sensor

Na preparação da membrana dos eléctrodos convencionais sensíveis ao amónio, (Tabela 3.2.3.1), a mistura sensora foi obtida dissolvendo 0,0199 g de ionóforo de amónio (mistura de nonactin e monactin) e 0,0027 g de tetraquis (4-clorofenil)borato, em 0,4214g de fosfato de tris (2-etilhexil). À mistura assim obtida, adicionaram-se posteriormente 0,1485 g de PVC previamente dissolvido em cerca de 6 ml de tetrahidrofurano.

A mistura sensora obtida, foi depositada no suporte condutor dos eléctrodos, seguindo o procedimento referido em 2.4.3. As unidades foram deixadas a secar durante

pelo menos um dia, sendo depois condicionados numa solução aquosa de cloreto de amónio 10^{-2} M, e mantidos nela sempre que não estavam a ser utilizados.

Tabela 3.2.3.1-Composição relativa (percentagem em massa) dos diferentes componentes utilizados na preparação da membrana sensora dos eléctrodos selectivos de configuração convencional sensíveis ao amónio.

Componentes utilizados	**Composição relativa (% m/m)**
Ionóforo de amónio	3,4
Tetraquis(4-clorofenil) borato de potássio	0,5
Fosfato de tris (2-etilhexil)	71,1
Cloreto de polivinilo (PVC)	25

3.3-Resultados e discussão

3.3.1-Características de resposta

Para a avaliação das características gerais de funcionamento dos eléctrodos de configuração convencional, procedeu-se ao traçado das curvas de calibração, num intervalo de concentrações aproximadamente entre $5x10^{-6}$ e $1x10^{-2}$ M, em cloreto de amónio. A calibração dos eléctrodos foi efectuada para diferentes valores de pH (5,1; 7,5 e 9,9), apresentando-se na Fig. 3.3.1.1, as respectivas curvas de calibração. Na Tabela 3.3.1.1, mostram-se os valores médios obtidos para os parâmetros de calibração.

Pela análise dos resultados, verifica-se que a calibração dos eléctrodos em Tris.HCl com pH 5,1 conduz a uma redução da zona de resposta linear de aproximadamente uma década. O limite inferior de resposta linear é de $3,91x10^{-4}$M para calibrações efectuadas a pH 5,1 e de $5,96x10^{-5}$ M para calibrações efectuadas a pH 7,5 e 9,9, verificando-se assim uma certa interferência por parte do protão.

Relativamente aos declives obtidos para as diferentes calibrações, a resposta super-nerstiana que as unidades apresentaram quando calibradas a pH 9,9, deve-se ao facto da concentração real ser inferior ao valor teórico, uma vez que, para estes valores de pH, já uma grande parte do amónio se transformou em amoníaco não sendo pois lido pelo eléctrodo. Por sua vez, obteve-se um valor idêntico ao teórico (59 mV/dec), quando as calibrações foram efectuadas em tampão de Tris. HCl a pH 5,1.

Perante os resultados obtidos, optou-se pela utilização da solução tampão de Tris.HCl 10^{-2}M e pH 7,5 para a realização dos restantes ensaios. Esta escolha teve por base o facto de, nestas condições experimentais, os eléctrodos permitirem uma zona de resposta linear mais alargada e embora se verifique um ligeiro decréscimo na sensibilidade, o valor obtido é semelhante ao referido por outros autores [6,7,13].

Uma vez escolhida a solução de Tris .HCl que permitia um funcionamento mais adequado dos eléctrodos, procedeu-se de seguida a uma caracterização mais completa

destas unidades, representando-se na Tabela 3.3.1.2, algumas das características determinadas.

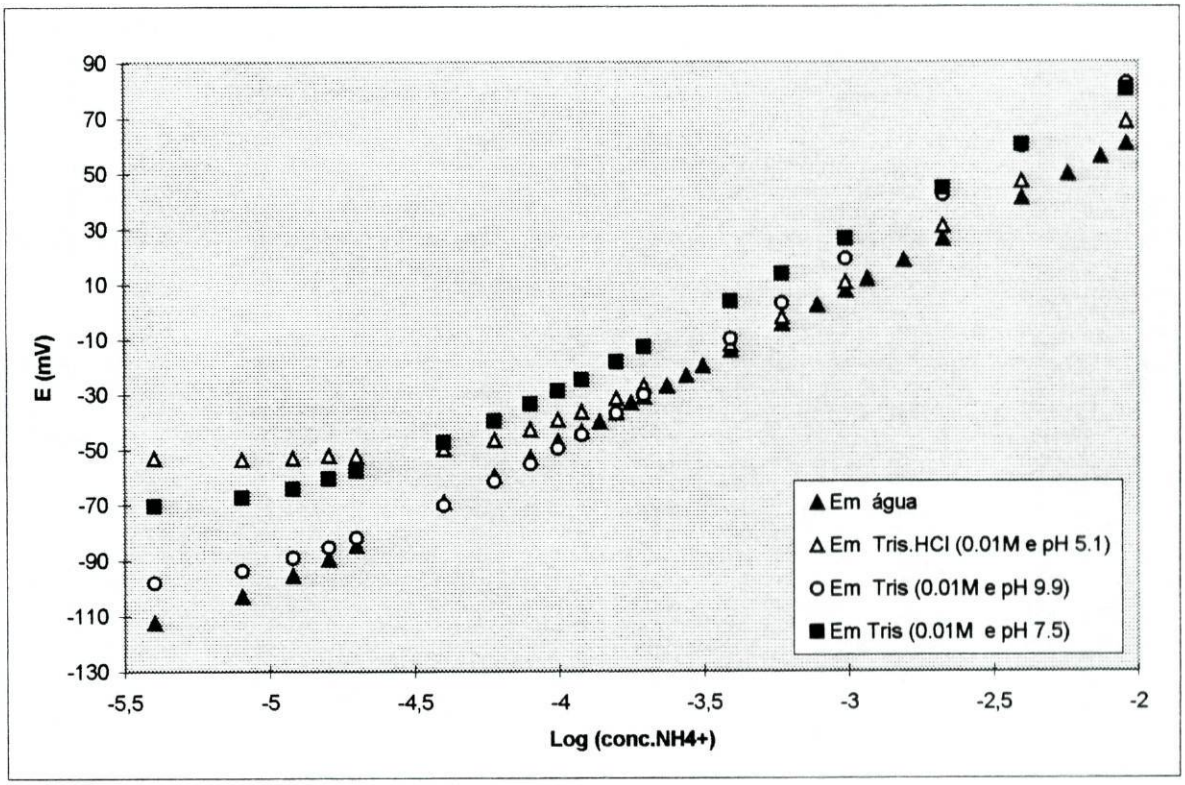

Figura 3.3.1.1-Curvas de calibração dos eléctrodos selectivos sensíveis ao amónio, efectuadas em tampão de Tris.HCl para diferentes valores de pH.

Tabela 3.3.1.1-Alguns parâmetros referentes à calibração dos eléctrodos convencionais sensíveis ao amónio, obtidos em tampão de Tris.HCl com diferentes valores de pH [a].

PARÂMETROS DE CALIBRAÇÃO	**CALIBRAÇÕES EFECTUADAS EM:**			
	Água	Tris.HCl (10^{-2}M/pH5,1)	Tris.HCl (10^{-2}M/pH7,5)	Tris (10^{-2}M/pH9,9)
L.I.R.L. [b] (M)	$1,6x10^{-5}$	$3,91x10^{-4}$	$5,96x10^{-5}$	$5,96x10^{-5}$
DECLIVE (mV / dec.conc.)	55,0±0,2	59,2±0,3	54,8±0,6	67,7±0,5

[a] Valores referentes a um ensaio com quatro eléctrodos. [b] Limite inferior de resposta linear.

Tabela 3.3.1.2-Características de resposta dos eléctrodos convencionais sensíveis ao amónio.

CARACTERÍSTICAS	ELÉCTRODOS CONVENCIONAIS
L.I.R.L (M) [(a)].	$5{,}96\times10^{-5}$
L.P.D (M) [(b)]	$1{,}8\times10^{-5}$
Declive (mV/decada)	55±0,2
Reprodutibilidade (mV/dia)	±1,4
Patamar de pH operacional	5,0-8,5
Tempo de resposta (s)	5

[(a)]Limite inferior de resposta linear. [(b)] Limite prático de detecção.

3.3.2-Tempo de resposta dos eléctrodos

Para a avaliação do tempo prático de resposta dos eléctrodos, procedeu-se ao registo das variações de potencial, quando se duplicava aproximadamente a concentração de amónio nas soluções onde as unidades se encontravam imersas (ver 2.7.2). O ensaio foi efectuado em Tris.HCl 10^{-2}M e pH 7,5, para uma gama de concentrações em catião amónio, compreendida entre $1{,}98x10^{-5}$ e $1{,}1x10^{-2}$ M.

Na Fig. 3.3.2.1, apresenta-se o diagrama obtido na avaliação deste parâmetro, verificando-se que os eléctrodos atingiam um potencial estável em cerca de 5 segundos. Mesmo para as concentrações mais baixas, a resposta era instantânea e os eléctrodos rapidamente atingiam um potencial estável.

A rapidez de resposta associada ao tipo de sensor utilizado, foi já verificada por outros autores, aparecendo referidos na literatura valores entre 2 a 20 segundos [9,10,13,14].

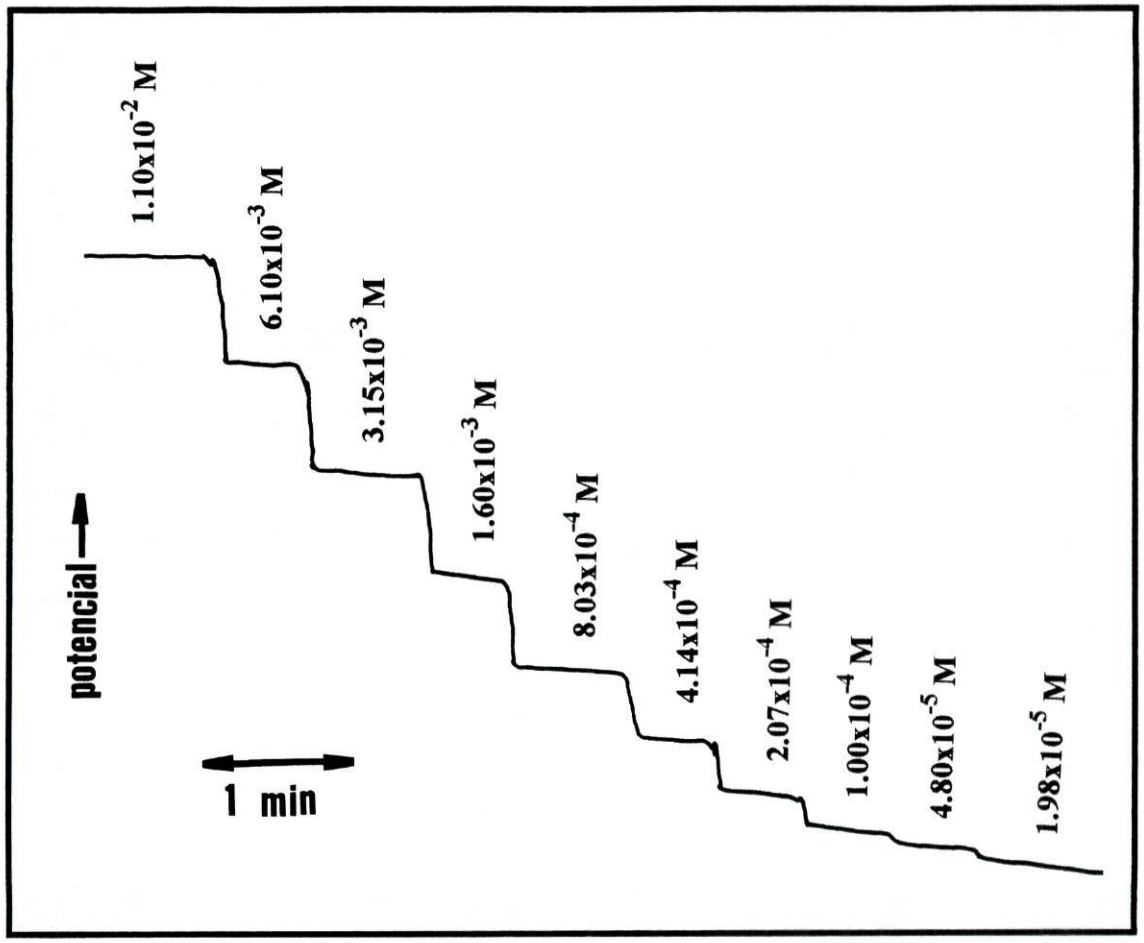

Figura 3.3.2.1-Tempo prático de resposta dos eléctrodos convencionais sensíveis ao amónio. Ensaio realizado em Tris.HCl 10^{-2}M e pH 7,5.

3.3.3-Efeito do pH no valor do potencial dos eléctrodos

Para a avaliação da influência do pH no valor do potencial dos eléctrodos, procedeu-se à elaboração dos diagramas de Reilley (Fig. 3.3.3.1), seguindo a metodologia descrita no Cap. 2 (ver 2.7.3). O ensaio foi realizado utilizando uma solução de cloreto de amónio 10^{-2} M, e as alterações de pH desta solução foram efectuadas recorrendo à adição de soluções concentradas de hidróxido de lítio e de ácido clorídrico.

Na Fig. 3.3.3.1, apresentam-se os diagramas obtidos com três eléctrodos, verificando-se que no intervalo de pH 4,5 e 8,5 unidades, o potencial praticamente não sofre alterações, podendo pois adoptar-se este intervalo como patamar operacional.

Para valores de pH acima de 8,5 unidades, ocorre uma diminuição nítida de potencial. Para este facto contribui em grande parte a transformação do catião amónio em amoníaco. O aumento de potencial para valores de pH inferiores a 5 unidades, pode ser atribuído a uma interferência por parte do protão do ácido utilizado.

Intervalos de pH mais amplos aparecem referidos na literatura [14], provavelmente devido à utilização de diferentes plastificantes, uma vez que estes têm influência na maior ou menor selectividade dos eléctrodos quando na presença de outros catiões.

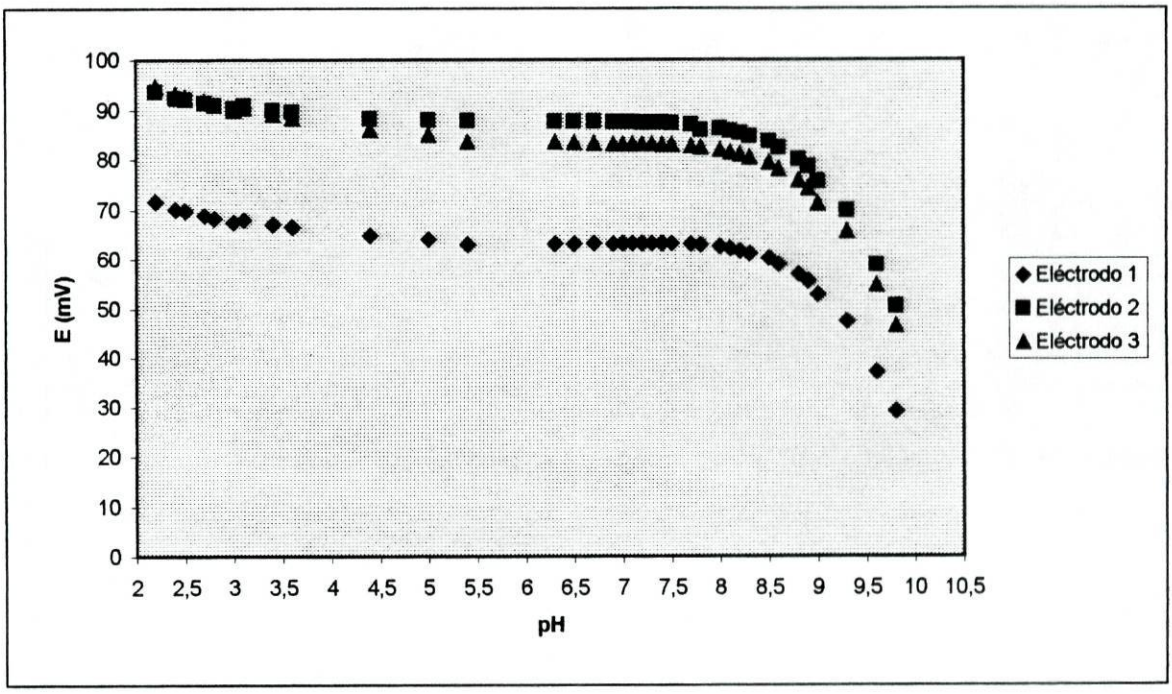

Figura 3.3.3.1-Diagramas da variação do potencial dos eléctrodos com o pH das soluções. Ensaios efectuados para uma concentração de ião principal igual a 10^{-2} M.

3.3.4-Coeficientes de selectividade potenciométricos

Para avaliar a extensão da interferência que vários catiões metálicos têm no tipo de membrana sensora utilizada neste trabalho, procedeu-se à determinação dos coeficientes de selectividade potenciométricos relativamente ao sódio, potássio e lítio.

Nesta avaliação, os ensaios foram efectuados pelo método das soluções separadas (ver 2.7.4), e a extensão da interferência foi estudada para três níveis de concentração.

Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 3.3.4.1, podendo concluir-se que relativamente aos catiões em estudo, o potássio é de entre os três, aquele que mais pode interferir com o tipo de membrana sensora utilizada, como já verificado por diferentes autores em estudos anteriores [9,10,14]. Este decréscimo de selectividade dos eléctrodos sensíveis ao amónio perante o catião potássio deve-se à grande semelhança entre estes dois iões, que para além de possuirem a mesma carga, têm um tamanho muito aproximado.

Tabela 3.3.4.1-Coeficientes de selectividade potenciométricos para os eléctrodos selectivos sensíveis ao amónio.[a)]

INTERFERENTES	CONCENTRAÇÃO (M)		
	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Potássio	-0,49±0,17	-0,81±0,04	-0,84±0,08
Sódio	-0,50±0,11	-1,66±0,07	-2,15±0,10
Lítio	-0,95±0,32	-1,76±0,1	-2,03±0,09

[a)] Valores correspondentes à média e desvio padrão de seis valores obtidos com três eléctrodos em dois ensaios.

3.4-Conclusões

Os resultados obtidos na avaliação dos eléctrodos selectivos sensíveis ao catião amónio construídos sem solução de referência interna e com o sensor imobilizado em PVC, permitem concluir que estas unidades apresentam características de funcionamento adequadas, possibilitando assim, a construção dos respectivos eléctrodos tubulares e o desenvolvimento de uma metodologia de análise por injecção em fluxo para a determinação automática do catião amónio.

Das características de resposta obtidas para as unidades, salienta-se a rapidez de resposta, que é um factor muito importante quando se pretendem realizar análises em condições de fluxo.

Os resultados obtidos encontram-se de acordo com os referidos na literatura para o mesmo tipo de sensor, quando utilizado em condições idênticas, nomeadamente quando imobilizado em membranas de PVC.

Além das boas características de funcionamento que os eléctrodos apresentaram, é também de realçar a facilidade de construção e manuseamento das unidades devido à eliminação da solução de referência interna. Esta técnica de construção é ainda económica, uma vez que requer uma quantidade mínima de sensor e permite uma fácil remoção e substituição da membrana sensora, quando esta começa a perder características.

3.5-Bibliografia

[1]-R.A.S.Lapa, J.L.F.C.Lima e A.M.R.Silva, *Il Farmaco,* **45**,901 (1990).

[2]-N.L.Allinger, M.P.Cava, D.C. De Jough, C.R.Johnson, N.Lebel e C.L.Steven, *Química Orgânica*, Ed.Guanabara Dois S.A.,R.Janeiro, 2ª Ed. Pag.411 (1978).

[3]-W.Simon, *Sci.Ind.*, 8, 1 (1976).

[4]-W.E.Morf, Studies in Analytical Chemistry-2, Elsevier Pub. Co.,N.York, Cap.XII (1981).

[5]-Y.M.Fraticelli e M.E.Meyerhoff, *Anal.Chem.*, **53**, 168 (1981)

[6]-S.Alegret, J.Alonso, J.Bartroli e E.M.Fabregas, *Analyst*, **114**, 1443 (1989).

[7]-H.Shen, T.J:Cardwell e R.W.Cattrall, *Analyst*, **122**, 89 (1997).

[8]-M.E.Meyerhoff, *Anal.Chem.*, **52**, 1532 (1980)

[9]-O.G.Davies, G.J.Moody e J.D.R.Thomas, *Analyst*, **113**, 497 (1988).

[10]-T.Buhrer, H.Peter e W.Simon, *Pflugers Arch*, **412** ,359 (1988).

[11]-B.O.Palsson, B.Q.Shen, M.E.Meyerhoff e M.Trajanowicz, *Analyst*, **118**, 1361 (1993).

[12]-A.Cerdà, M.T. Oms, R.Forteza e V.Cerdà, *Anal.Chim.Acta.*, **311**, 165 (1995).

[13]-M.C.B.S.M.Montenegro, *Relatório sobre a construção e avaliação de eléctrodos selectivos a catião amónio*, (Trabalho não publicado).

[14]-M.S.Ghauri e J.D.R.Thomas, *Analyst*, **119**,2323, (1994).

[15]-Ionophores for Ion Selective Electrode and Optodes, Fluka, Buchs,(1991).

[16]-International Union of Pure and Applied Chemystry, Analytical Chemestry Division, Commission on Analytical Nomenclature, Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes, *Pure Appl.Chem.*, **66**, 2527 (1994).

CAPÍTULO 4

DETECTORES POTENCIOMÉTRICOS TUBULARES SENSÍVEIS AO AMÓNIO

4-DETECTORES POTENCIOMÉTRICOS TUBULARES SENSÍVEIS AO AMÓNIO

4.1-Introdução

A detecção potenciométrica em sistemas de análise por injecção em fluxo, não é uma técnica nova [1-4], no entanto, só recentemente começou a despertar grande interesse na área analítica. A utilização de eléctrodos de configuração convencional em arranjos em cascata [2,3,5,6], nas montagens FIA inicialmente propostas, estavam na origem de inúmeros problemas mecânicos que tornavam o seu uso limitado ou impossível em determinações analíticas de rotina.

Abandonada já a utilização dos eléctrodos convencionais nas montagens FIA, tem-se optado pela construção de detectores potenciométricos tubulares especificamente concebidos para a incorporação em sistemas de fluxo contínuo. Para o desenvolvimento das unidades tubulares, contribuiu em muito a técnica de imobilização dos sistemas sensores em películas de PVC [10-12].

Os eléctrodos tubulares ao permitirem uma fixação rígida nas montagens FIA, eliminando totalmente os problemas mecânicos verificados quando da utilização das unidades convencionais. Pelo facto de possuírem uma configuração semelhante à da tubagem utilizada na montagem, não alteram as características hidrodinâmicas do fluxo. A detecção potenciométrica deixa assim de ser um processo de fim de linha, podendo a amostra ser encaminhada para outro sistema de detecção, semelhante ou diferente, tornando viável e de uma forma simples, a realização de determinações multiparamétricas sequenciais [7,8] ou de análises com maior sensibilidade [9].

Alguns trabalhos com eléctrodos tubulares sensíveis ao catião amónio, aparecem referidos na literatura, com aplicação nas mais diversas áreas [13-17]. Inicialmente, os eléctrodos tubulares sensíveis ao amónio eram construídos com solução de referência interna [13,14], de que resultavam montagens FIA algo complexas do ponto de vista

mecânico. Os trabalhos mais recentes mostram uma preferência pela utilização de eléctrodos tubulares sem solução de referência interna [15-17], com o sistema sensor imobilizado em PVC e directamente depositado num suporte condutor. A utilização de eléctrodos tubulares sem solução de referência interna é vantajosa, para além da facilidade de construção e manuseamento das unidades tubulares, estas apresentam ainda um tempo de vida útil maior, uma vez que só ocorre perda de sensor da membrana para a solução externa. Esta característica é tanto mais importante quando estão em causa reagentes dispendiosos.

Os bons resultados obtidos com os eléctrodos de configuração convencional sensíveis ao amónio, avaliados no Cap.3, permitiram a construção dos correspondentes eléctrodos tubulares, para a determinação por FIA do catião amónio. O trabalho desenvolvido neste capítulo teve assim, por objectivo estudar o comportamento em condições de fluxo, da membrana sensora anteriormente utilizada em condições estáticas. A qualidade dos resultados obtidos foi avaliada por comparação com os correspondentes eléctrodos convencionais.

O estudo efectuado neste capítulo, relativamente ao comportamento dos eléctrodos tubulares, teve em vista o desenvolvimento posterior de um sistema de detecção potenciométrico diferencial com sensibilidade acrescida, para a determinação por FIA, do catião amónio.

4.2-Parte experimental

4.2.1-Aparelhagem e eléctrodos

Para as medidas de potencial efectuadas, utilizou-se a aparelhagem descrita anteriormente (ver 2.1) e para todas as medidas foi utilizado um eléctrodo de referência de cloreto de prata/ prata, com dupla junção, sendo a solução externa constituída por cloreto de lítio 0,1M.

Os eléctrodos tubulares utilizados na detecção potenciométrica do amónio foram construídos sem solução de referência interna de acordo com o procedimento indicado anteriormente (ver 2.5).

4.2.2-Reagentes e soluções

As soluções padrão utilizadas na calibração dos eléctrodos, foram obtidas por diluição sucessiva em Tris.HCl 10^{-2} M e pH 7,5, a partir de uma solução mais concentrada, sendo esta por sua vez , obtida por pesagem rigorosa de cloreto de amónio.

Como solução transportadora utilizou-se uma solução de Tris.HCl 10^{-2} M e pH 7,5, à qual foi adicionada uma concentração de ião principal igual a 10^{-6}M, com o objectivo de permitir uma melhor estabilização da linha de base e também prolongar o tempo de vida útil das unidades.

4.2.3-Preparação do sistema sensor

A mistura sensora utilizada na preparação das membranas dos eléctrodos tubulares possuía uma composição idêntica à utilizada na construção dos correspondentes eléctrodos convencionais (3,4% de ionóforo de amónio, 0,5% de tetraquis (4-clorofenil)borato de potássio, 71,1% de solvente mediador e 25% de PVC-valores

expressos em percentagem em massa), tendo sido obtida seguindo a metodologia descrita anteriormente em 2.4.3

Com a mistura sensora indicada procedeu-se ao enchimento dos eléctrodos tubulares conforme o indicado em 2.5.3. Os eléctrodos depois de secos, foram condicionados, fazendo fluir durante algumas horas e com um caudal muito reduzido, (cerca de 0,5 mL/min), uma solução aquosa de cloreto de amónio a 10^{-2} M. Após esta operação, os eléctrodos ficaram prontos a serem utilizados a qualquer instante.

4.2.4-Montagem FIA de baixa dispersão

Para avaliar as características de funcionamento dos detectores tubulares, estabeleceu-se uma montagem FIA de baixa dispersão (Fig. 4.2.4.1), que reproduzisse o mais possível as condições experimentais utilizadas na avaliação dos eléctrodos de configuração convencional. Para isso, foi necessário proceder a uma prévia optimização da montagem de modo a estudar a influência de algumas variáveis do sistema na dispersão das amostras, nomeadamente do volume de injecção (Fig. 4.2.4.2), do caudal (Fig. 4.2.4.3), e da distância ao detector (Fig. 4.2.4.4). O estudo efectuado permitiu concluir que, para um volume de injecção de 200 μL, transportado num fluxo de 5,1 mL/min através de um tubo com cerca de 20 cm de comprimento até atingir o detector, se obtinha um sinal analítico superior a 95% do valor correspondente ao estado estacionário, tomado como referência e que correspondia à injecção no sistema, de um volume de 1000 μL de amostra.

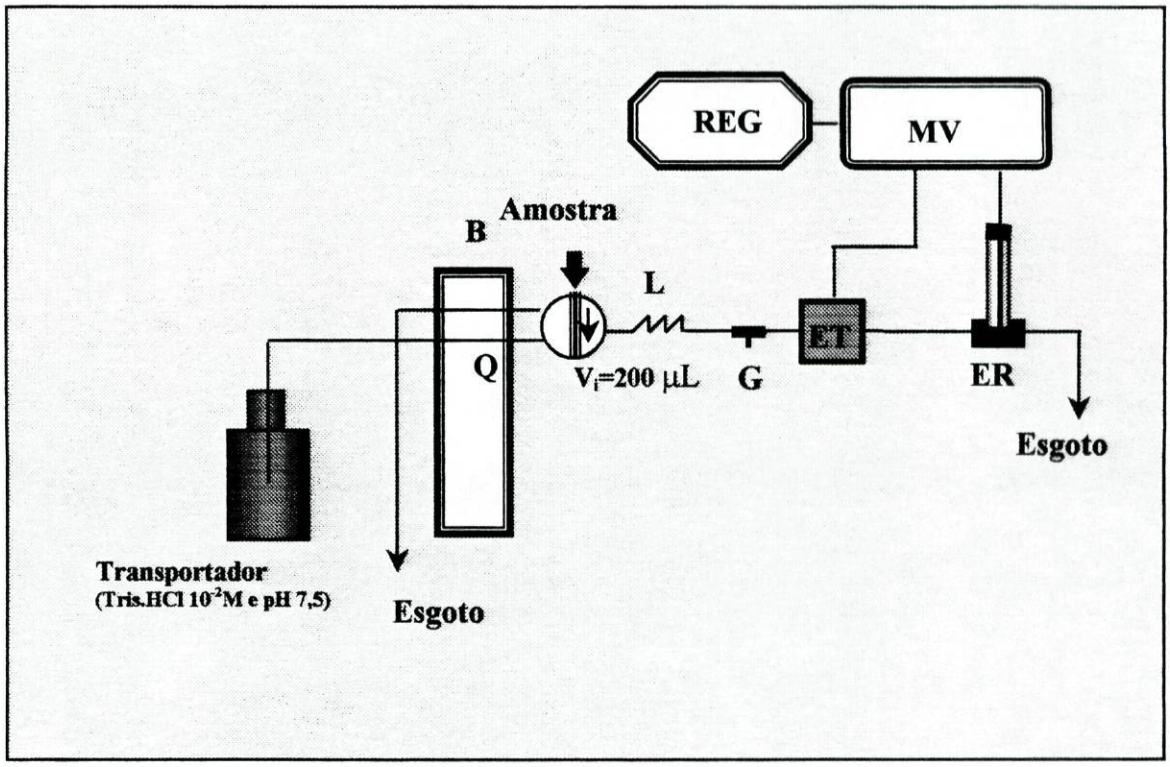

Figura 4.2.4.1-Montagem FIA de baixa dispersão utilizada na avaliação das características de resposta dos detectores tubulares sensíveis ao amónio. B-bomba peristáltica; Q-caudal da solução transportadora (5,1 mL/min); Vi-volume de injecção; ET-eléctrodo tubular; ER-eléctrodo de referência; G-eléctrodo de ligação a terra; MV-milivoltímetro; REG-registador; L-distância ao detector (20 cm).

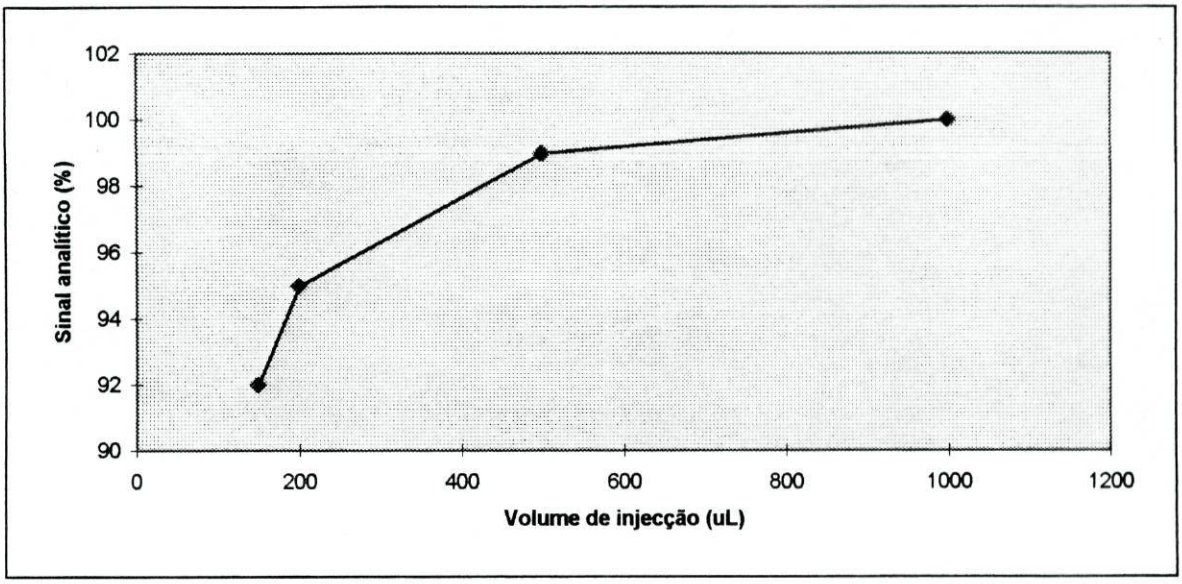

Figura 4.2.4.2-Curva representativa de variação do sinal analítico (% relativa) em função do volume de injecção.

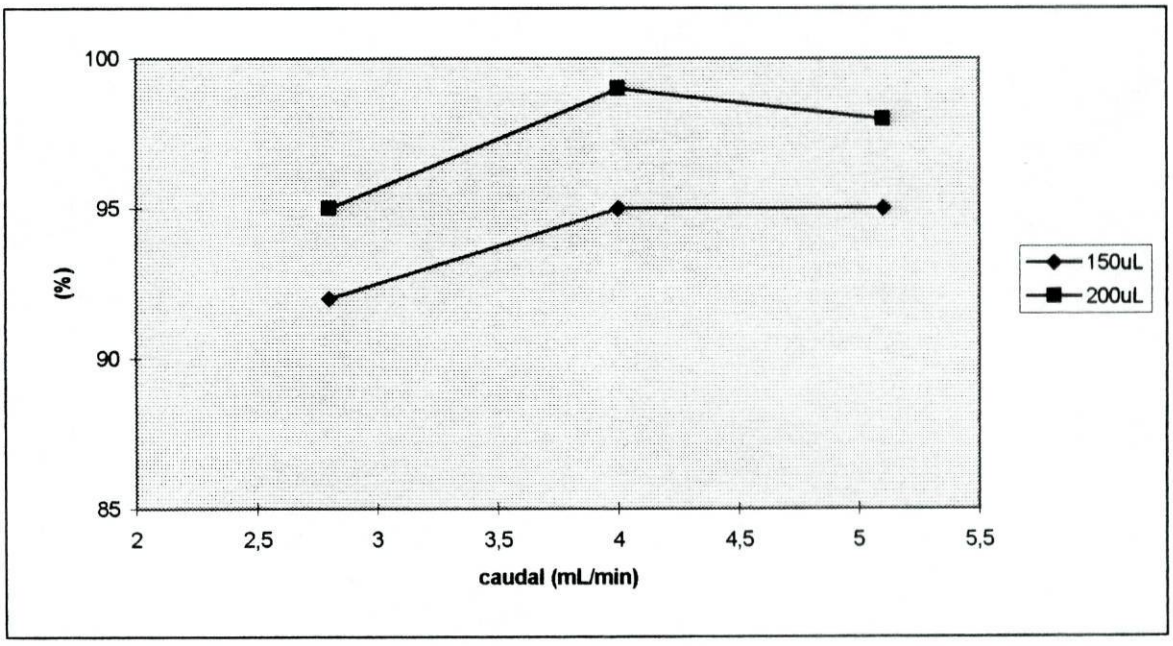

Figura 4.2.4.3-Curvas representativas da variação do sinal analítico (%relativa) em função do caudal, para volumes de injecção diferentes.

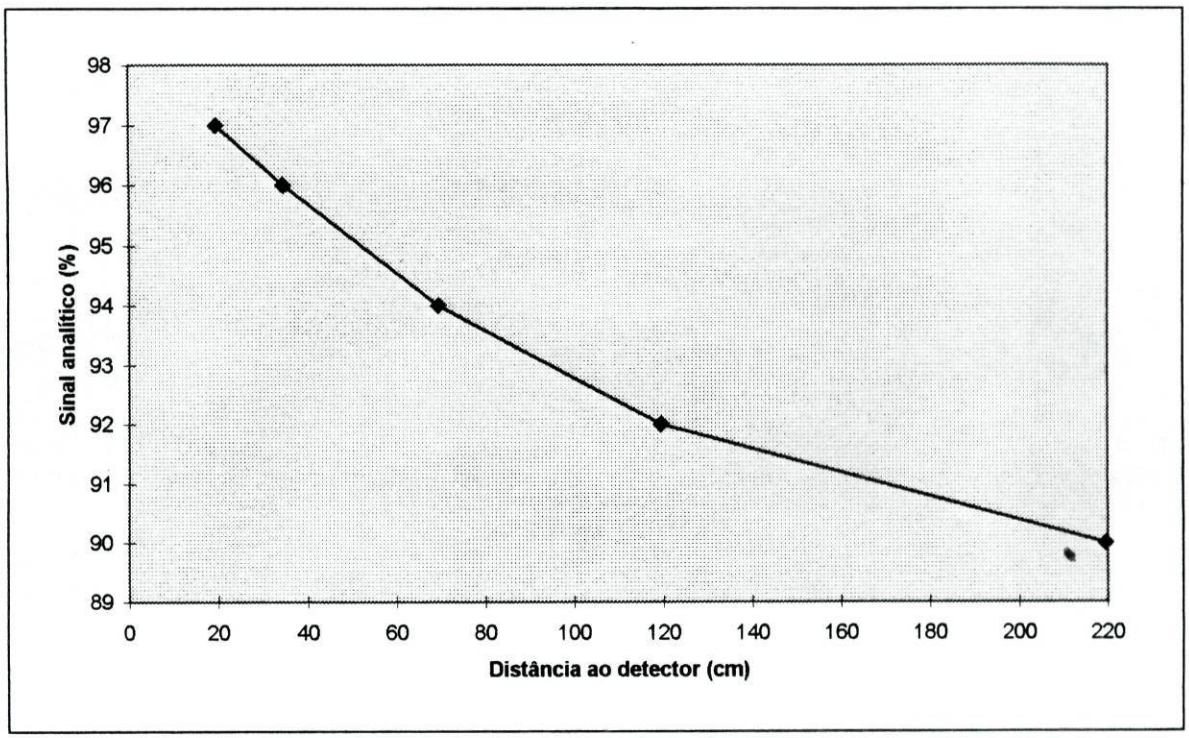

Figura 4.2.4.4-Curva representativa da variação do sinal analítico (%relativa) em função da distância ao detector, quando eram injectados 200 μL de uma solução de cloreto de amónio 10^{-2}M, num caudal de 5,1 mL/min.

4.3-Resultados e discussão

Uma vez estabelecidas as condições de baixa dispersão para FIA (Fig. 4.2.4.1), procedeu-se à avaliação das características de resposta dos detectores tubulares determinando-se as características de resposta gerais como o limite inferior de resposta linear, o limite prático de detecção, o declive da recta de calibração, a repetibilidade e a reprodutibilidade do sinal analítico, o ritmo de amostragem e posteriormente a influência do pH no potencial dos eléctrodos e os coeficientes de selectividade potenciométricos.

4.3.1-Características de resposta dos detectores tubulares

Para a avaliação das características de resposta dos detectores tubulares sensíveis ao amónio, procedeu-se à injecção sucessiva, no sistema FIA de baixa dispersão, de soluções de cloreto de amónio com concentrações variáveis entre 10^{-5} a 10^{-2}M. Como transportador, foi utilizada uma solução de Tris.HCl a 10^{-2} M e pH 7,5, contendo ião principal (cloreto de amónio) em concentração igual a 10^{-6}M, com o objectivo de estabilizar o potencial correspondente à linha de base e diminuir a extensão da solubilização da membrana. Como a presença de ião principal na solução transportadora, condiciona o valor do limite inferior de resposta linear do detector, optou-se por adicionar uma concentração inferior ao valor correspondente ao limite inferior de resposta linear obtido para os correspondentes eléctrodos de configuração convencional.

Com o registo dos sinais analíticos obtidos (Fig. 4.3.1.1), traçaram-se as correspondentes curvas de calibração e determinaram-se os parâmetros de calibração para os eléctrodos tubulares. Os resultados indicam-se na Tabela 4.3.1.1. onde se incluem igualmente, para efeitos de comparação, os valores dos correspondentes eléctrodos convencionais.

A comparação dos resultados obtidos, permitiram concluir que, quando os eléctrodos tubulares sensíveis ao amónio são avaliados em condições de fluxo que reproduzem as condições experimentais usadas para a avaliação dos eléctrodos convencionais, as características de resposta mantêm-se muito semelhantes.

Salienta-se o ritmo de amostragem obtido (117 amostra /h), que é uma consequência da rapidez de resposta que caracterizava os eléctrodos convencionais.

Para avaliar a repetibilidade da resposta dos detectores tubulares, efectuaram-se injecções sucessivas (n ≥10) de soluções de cloreto de amónio a diferentes concentrações, 10^{-4}, 10^{-3} e 10^{-2}M, verificando-se uma variação do sinal não superior a ±1mV (Tab.4.3.1.1). Na Fig. 4.3.1.2, apresenta-se o registo dos sinais analíticos obtidos para um dos eléctrodos tubulares sensíveis ao amónio.

A reprodutibilidade dos potenciais ao longo de um dia de trabalho foi avaliada executando duas ou mais calibrações, não seguidas, dos detectores tubulares, verificando-se um desvio não superior a ±1mV (Tabela 4.3.1.1).

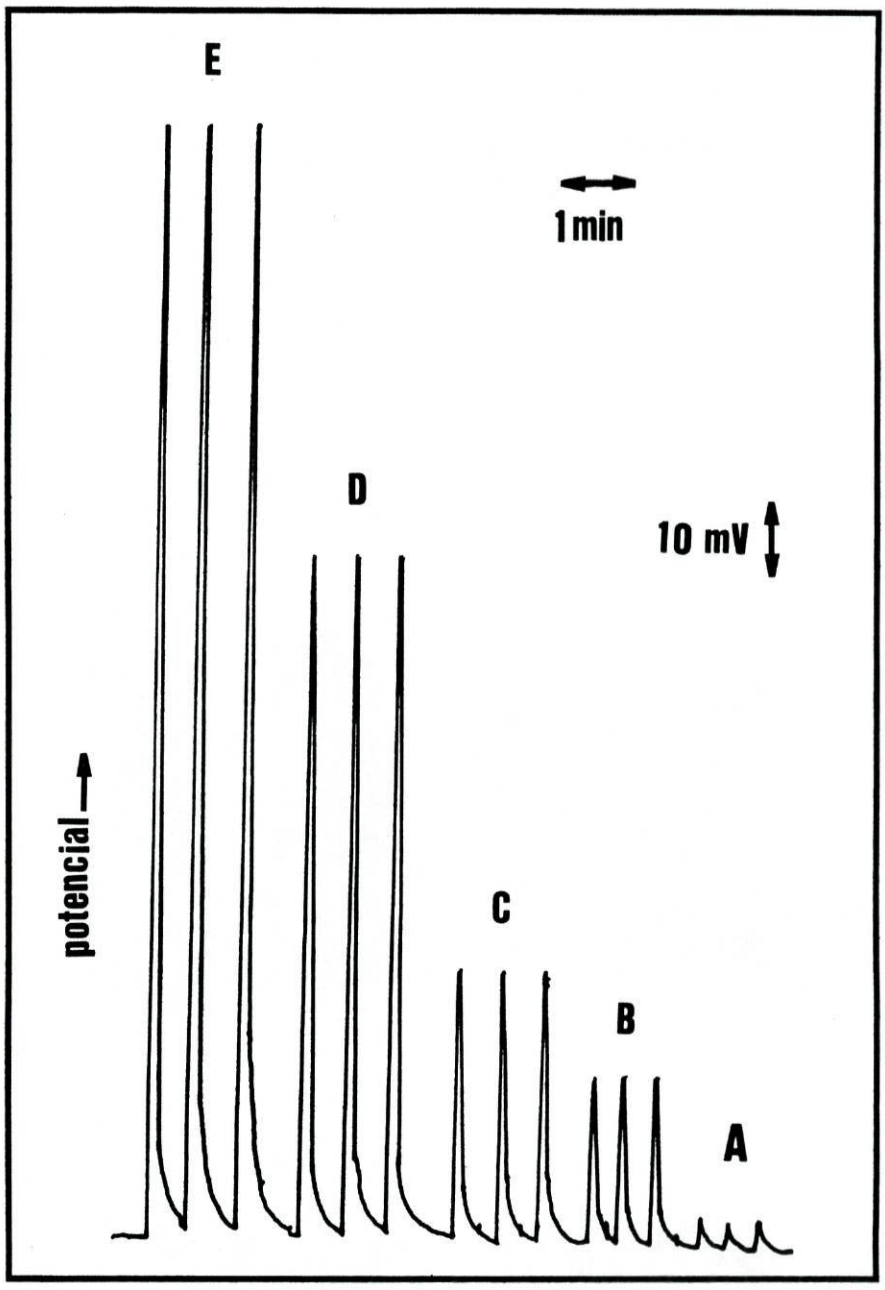

Figura 4.3.1.1-Registo de uma calibração do detector tubular obtida em sistema FIA de baixa dispersão; **A**(10^{-5}M), **B**($5x10^{-5}$M), **C**(10^{-4}M), **D**(10^{-3}M), **E** (10^{-2}M).

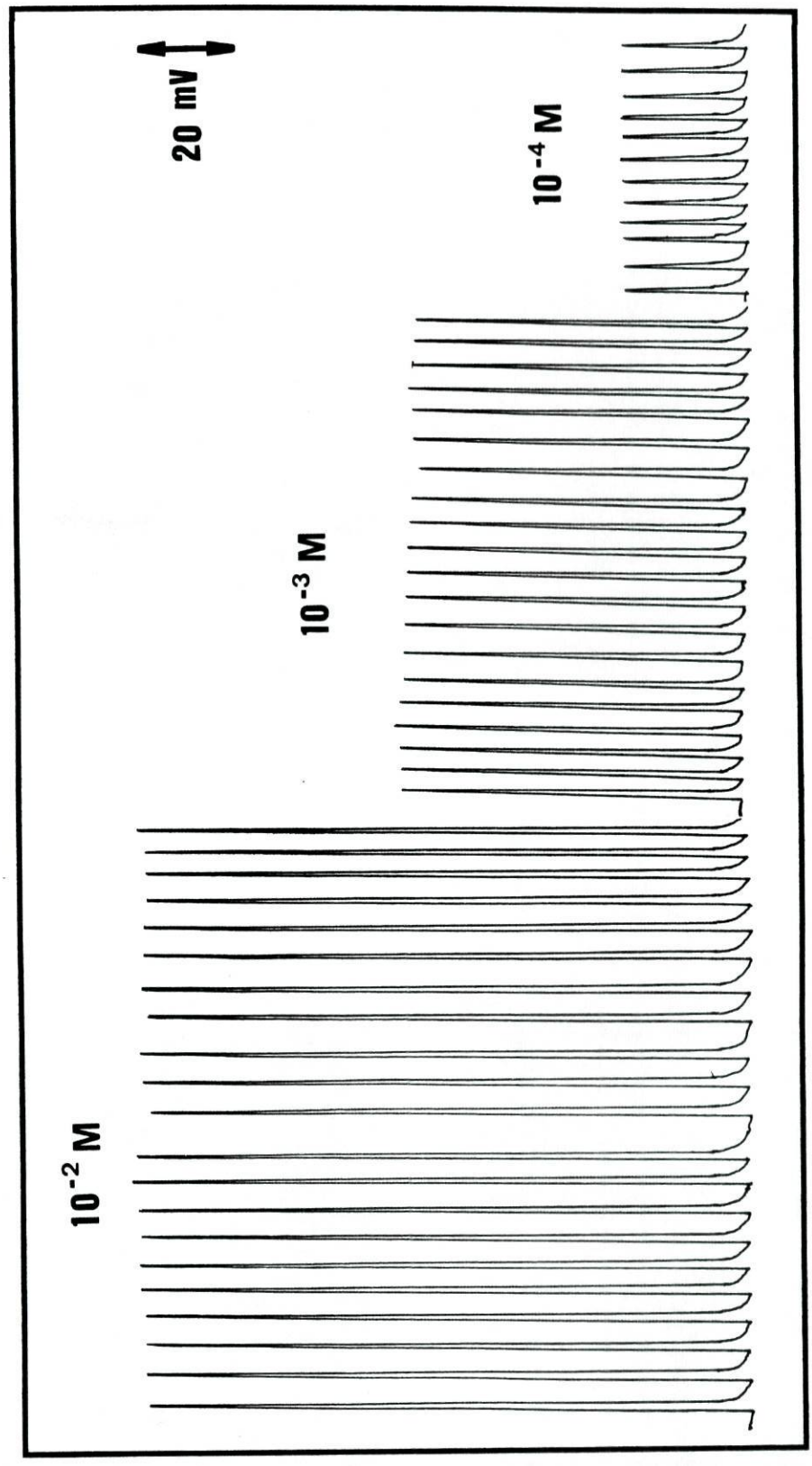

Figura 4.3.1.2-Registoda repetibilidade do sinal analítico dos detectores tubulares sensíveis ao amónio.

Tabela 4.3.1.1-Características de resposta dos detectores potenciométricos tubulares sensíveis ao amónio obtidos em sistema FIA de baixa dispersão e dos correspondentes eléctrodos convencionais.

CARACTERÍSTICAS		DETECTORES TUBULARES [a]	ELÉCTRODOS CONVENCIONAIS
L.I.R.L.[b] (M)		$5x10^{-5}$	$1,6x10^{-5}$
L.P.D[c] (M)		$2x10^{-5}$	$1,8x10^{-5}$
Declive (mV/decada)		55±0,6	55±0,2
Repetibilidade (mV)	10^{-2}M	1,0	
	10^{-3}M	0,6	
	10^{-4}M	0,4	
Reprodutibilidade (mV/dia)		±1	±1,4
Patamar de pH operacional[d]		5-9	4,5-8,5
Ritmo de amostragem (amostras/hora)		117	
Tempo de resposta (s)			5

[a]Valores obtidos com pelo menos dois eléctrodos. [b]Limite inferior de resposta linear. [c]Limite prático de detecção. [d]Ensaios efectuados em soluções de cloreto de amónio com a concentração igual a 10^{-2}M.

4.3.2-Efeito do pH no potencial dos detectores tubulares

A avaliação da variação do potencial dos detectores tubulares com o pH das soluções foi efectuada injectando sucessivamente uma solução de cloreto de amónio com a concentração fixada a 10^{-2}M e variando os seus valores de pH como descrito em 2.8.4.

Este estudo foi realizado na montagem FIA referida anteriormente (Fig. 2.8.4.1), e as alterações de pH foram conseguidas utilizando soluções concentradas de hidróxido de sódio e ácido sulfúrico.

Os resultados obtidos nestas condições, permitiram concluir que não existe alteração significativa dos potenciais, quando o pH variava entre 5 e 9 unidades (Fig. 4.3.2.1). Os valores encontrados são semelhantes aos obtidos com os eléctrodos de configuração convencional quando sujeitos a uma avaliação deste género (Tabela 4.3.1.1).

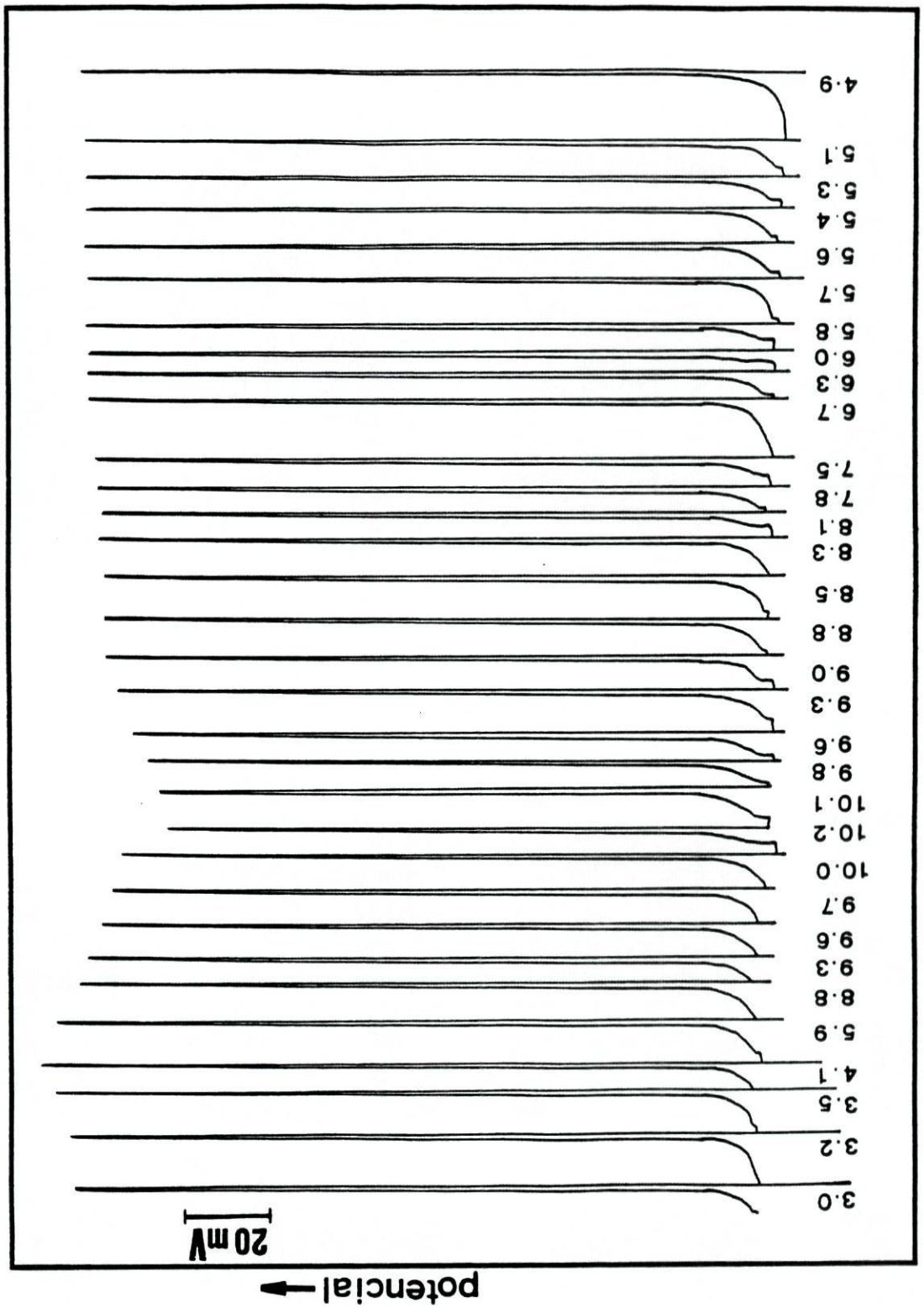

Figura 4.3.2.1-Registo da variação do potencial dos detectores tubulares sensíveis ao amónio, em função do pH de uma solução de cloreto de amónio de concentração igual a 10^{-2} M.

4.3.3-Coeficientes de selectividade potenciométricos

Para a determinação dos coeficientes de selectividade potenciométricos dos detectores tubulares relativamente a alguns catiões, seguiu-se um processo que se procurou que fosse tão semelhante quanto possível, ao método das soluções separadas, usado na determinação das interferências com eléctrodos convencionais. A avaliação deste parâmetro foi assim efectuada injectando sucessivamente soluções padrão de cloreto de amónio com as concentrações de 10^{-4}, 10^{-3} e 10^{-2} M, calculando os coeficientes de selectividade potenciométricos como indicado em 2.8.5.

Na Tabela 4.3.3.1, apresentam-se os valores obtidos, comparados com os encontrados para os respectivos eléctrodos convencionais. Atendendo a que os coeficientes de selectividade potenciométricos dependem das condições experimentais usadas na sua determinação, pode admitir-se que o grau de interferência encontrado para as condições de fluxo foi semelhante ao obtido quando da avaliação estática dos eléctrodos convencionais, continuando a verificar-se uma maior interferência por parte do catião potássio.

Tabela 4.3.3.1-Coeficientes de selectividade potenciométricos (log K^{pot}) para os eléctrodos tubulares sensíveis ao amónio e dos correspondentes eléctrodos convencionais.

INTERFERENTES	ELÉCTRODOS TUBULARES[(a)]			ELÉCTRODOS CONVENCIONAIS		
	Concentração (M)			Concentração (M)		
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Potássio	-0,90±0,08	-0,69±0,1	-0,28±0,09	-0,84±0,08	-0,81±0,04	-0,49±0,17
Sódio	-1,95±0,05	-1,26±0,14	-0,48±0,06	-2,15±0,10	-1,66±0,07	-0,50±0,11
Lítio	-1,52±0,07	-1,07±0,17	-0,44±0,12	-2,03±0,09	-1,76±0,1	-0,95±0,32

[(a)] Valores referentes a dois ensaios com dois eléctrodos.

4.4-Conclusões

A técnica de aplicação da membrana sensora directamente no suporte condutor permitindo a eliminação da solução de referência interna, tornou o processo de construção e manuseamento dos eléctrodos tubulares relativamente simples.

Por outro lado, foi possível verificar no trabalho desenvolvido neste capítulo que, quando os eléctrodos tubulares, são avaliados em sistemas de fluxo de baixa dispersão, apresentam características em tudo muito semelhantes às obtidas com as correspondentes unidades convencionais. É ainda de salientar o elevado ritmo de amostragem obtido e que resulta da rapidez de resposta que caracteriza os eléctrodos.

As boas características de funcionamento apresentadas pelos eléctrodos tubulares, tornam assim viável a automatização da determinação potenciométrica do amónio e também o desenvolvimento do sistema de detecção potenciométrico diferencial.

4.5-Bibliografia

[1]-Zs.Fecher, G.Nagy, K.Toth e E.Pungor, *Anal.Chim.Acta*, **98**, 193 (1978).

[2]-J.Ruzicka, E.H.Hansen e E.A.Zagatto, *Anal.Chim.Acta*, **88**, 1 (1977).

[3]-E.H.Hansen, F.G.Groser e J.Ruzicka, *Analyst* (London), **102**, 714 (1977).

[4]-**J**.Ruzicka, E.H.Hansen, *Anal.Chim.Acta*, **99**, 37 (1978).

[5]-E.H.Hansen, A.K.Ggose e J.Ruzicka, *Analyst*, **102**, 705 (1977).

[6]-E.H.Hansen, J.Ruzicka e A.K.Ggose, *Anal.Chim.Acta*, **100**, 151 (1978).

[7]-I.M.P.L.V.O.Ferreira, J.L.F.C.Lima e A.O.S.S.Rangel, *Rev.Port.Farm.*, **45**, 24 (1995).

[8]-S.Jun, J.L.F.C.Lima e M.C.B.M.Montenegro, *J.Trace Elem.Elect.Health Dis.*, **8**, 93 (1994).

[9]-C.M.Couto, J.L.F.C.Lima e M.C.B.S.M.Montenegro, *Anal.Sci.*, **13**, 1 (1997).

[10]-G.J.Moody, R.B.Oke e J.D.R.Thomas, *Analyst*, **95**, 910 (1970).

[11]-G.H.Griffiths, G.J.Moody e J.D.R.Thomas, *Analyst*, **97**, 420 (1972).

[12]-**J**.E.W.Davies, G.J.Moody e J.D.R.Thomas, *Analyst*, **97**, 87 (1972).

[13]-Y.M.Fraticelli e M.E.Meyerhoff, *Anal.Chem.*, **53**, 992 (1981).

[14]-M.E.Meyerhoff e Y.M.Fraticelli, *Anal.Lett.*, **14**, 415 (1981).

[15]-S.Alegret, J.Alonso, J.Bartroli e E.M.Fabregas, *Analyst*, **114**, 1443 (1989).

[16]-L.R.Júnior, G.O.Neto, J.L.F.C.Lima e M.C.B.S.M.Montenegro, *Química Nova*, **19**, 549 (1996).

[17]-A.M.R.Ferreira, J.L.F.C.Lima e A.O.S.S.Rangel, *Aust.Soil Res.*, **34**, 503 (1996)

[18]-R.E.Reinsfelder e F.A.Schultz, *Anal.Chem.Acta*, **65**, 425 (1973).

CAPÍTULO 5

DESENVOLVIMENTO DE UMA MONTAGEM FIA COM DETECÇÃO POTENCIOMÉTRICA DIFERENCIAL

5-DESENVOLVIMENTO DE UMA MONTAGEM FIA COM DETECÇÃO POTENCIOMÉTRICA DIFERENCIAL

5.1-Introdução

Neste capítulo, descreve-se o desenvolvimento de uma montagem FIA com detecção potenciométrica diferencial que permite a determinação do catião amónio com um aumento da sensibilidade analítica, e consequentemente da precisão dos resultados.

Em FIA, o aumento da sensibilidade analítica associada à detecção potenciométrica, pode ser conseguida por diferentes procedimentos. Uma possibilidade, consiste na utilização, em conjunto com o eléctrodo de referência, de várias membranas sensoras iguais e colocadas sequencialmente no sistema de fluxo [1]. A utilização de um dispositivo electrónico apropriado permite a soma dos potenciais associados a cada uma das membranas.

Alguns autores porém, têm optado pela eliminação do eléctrodo de referência das montagens FIA, recorrendo a um sistema de detecção diferencial em que o potencial do eléctrodo selectivo é determinado relativamente a outro eléctrodo selectivo igual ao primeiro e colocado sequencialmente no sistema de fluxo [1-4]. O valor da sensibilidade analítica assim conseguido, é, teoricamente, duplicado.

Os trabalhos desenvolvidos nesta área, utilizam essencialmente eléctrodos selectivos convencionais, facto que certamente tem associadas algumas desvantagens. Os eléctrodos tubulares sem solução de referência interna, reúnem as características ideais para serem usados em sistemas de fluxo com detecção potenciométrica, e em particular, quando o processo de detecção é sequencial, como recentemente demonstrado com a utilização de eléctrodos tubulares de membrana cristalina [1]. Os detectores tubulares, permitem uma fixação rígida ao sistema, eliminando assim qualquer problema de origem mecânica. Pelo facto de possuírem uma estrutura tubular com o diâmetro interno semelhante ao dos tubos usados nas montagens FIA, não alteram as características

hidrodinâmicas do fluxo, permitindo que a amostra chegue ao segundo detector com uma alteração mínima no perfil de concentrações.

Aproveitando as vantagens inerentes à utilização sequencial dos eléctrodos tubulares em sistemas de fluxo, procurou-se estabelecer neste capítulo, uma montagem FIA pra a determinação do catião amónio com um acréscimo significativo da sensibilidade analítica. Assim, construiu-se um sistema de detecção potenciométrico baseado na incorporação sequencial de dois eléctrodos tubulares sensíveis ao amónio, funcionando alternativamente, um como referência do outro. Para além de um aumento de sensibilidade, o sistema de detecção caracterizava-se pela ausência de um eléctrodo de referência comercial, tornando-se por isso mais económico.

5.2-Parte experimental

5.2.1-Aparelhagem utilizada

As determinações de potencial foram efectuadas recorrendo à aparelhagem especificada anteriormente (ver 2.1).

5.2.2-Reagentes e soluções

Em todas as determinações efectuadas na optimização e avaliação do sistema de detecção diferencial, utilizaram-se os reagentes previamente especificados no Cap.2.

As soluções padrão de cloreto de amónio foram preparadas por diluição sucessiva a partir de uma solução mais concentrada, em tampão de Tris.HCl 10^{-2}M e pH 7,5

Como solução transportadora foi igualmente utilizada uma solução de Tris.HCl 10^{-2}M e pH 7,5.

5.2.3-Sistema de detecção

Para o estabelecimento do sistema de detecção diferencial, usaram-se dois eléctrodos tubulares iguais, sensíveis ao amónio e colocados sequencialmente a uma determinada distância entre si. Nestas condições, cada uma das unidades funcionava alternativamente como referência da outra.

Os eléctrodos tubulares foram construídos sem solução de referência interna de acordo com o procedimento referido anteriormente em 2.5.

Para a preparação das membranas destas unidades, utilizou-se uma mistura sensora com uma composição idêntica à utilizada nos eléctrodos convencionais e posteriormente na preparação dos eléctrodos tubulares avaliados na montagem FIA de baixa dispersão (3,4% de ionóforo de amónio, 0,5% de tetraquis (4-clorofenil)borato de

potássio, 71,1% de solvente mediador e 25% de PVC- valores expressos em percentagem em massa).

5.2.4-Montagem FIA utilizada

Para a avaliação do sistema de detecção potenciométrico diferencial, utilizou-se a montagem FIA representada na Fig. 5.2.4.1, após a optimização de algumas variáveis, nomeadamente, da distância entre eléctrodos e do caudal do fluxo transportador (Tabela 5.2.4.1), com o objectivo de se conseguirem sinais analíticos reprodutíveis e calibrações com um máximo de sensibilidade, a um ritmo de amostragem razoável.

Na optimização da montagem, começou-se por estudar a distância a deixar entre eléctrodos. Para isso, fixou-se o volume de injecção (200 μL) e o caudal do transportador (5,8 mL), e fez-se variar a distância entre eléctrodos (Tabela 5.2.4.1). Verificou-se que, para se obterem dois sinais analíticos individualizados, um crescente e o outro decrescente, com alturas semelhantes, era necessário que a distância entre as duas unidades fosse suficiente para permitir que, quando a amostra atingisse o segundo eléctrodo, já o primeiro deveria registar um sinal analítico correspondente à linha de base. Contudo, o aumento da distância estava limitado pelo grau de diluição da amostra quando atinge o segundo eléctrodo, resultando numa diminuição da intensidade do sinal (Tabela 5.2.4.1), e também pelo decréscimo do ritmo de amostragem. Optou-se assim por uma distância de 101 cm, uma vez que permitiu obter uma melhor definição de picos e um máximo de sensibilidade.

Uma vez que o caudal tem influência na dispersão da amostra, procedeu-se igualmente à optimização deste parâmetro (Tabela 5.2.4.1), fixando agora, a distância entre eléctrodos (101 cm) e o volume de injecção (200 μL). Verificou-se que o encurtamento do tempo de passagem da amostra pelo sistema de detecção, conduzia a um decréscimo do sinal analítico do sistema de detecção e em particular, da resposta do segundo eléctrodo.

Assim, com o estudo de optimização efectuado verificou-se que a sensibilidade do sistema de detecção sequencial era máxima, quando a distância entre eléctrodos era cerca

de 101 cm e o caudal de 5,8 mL/min, sempre que se injectava um volume de amostra de 200 μL.

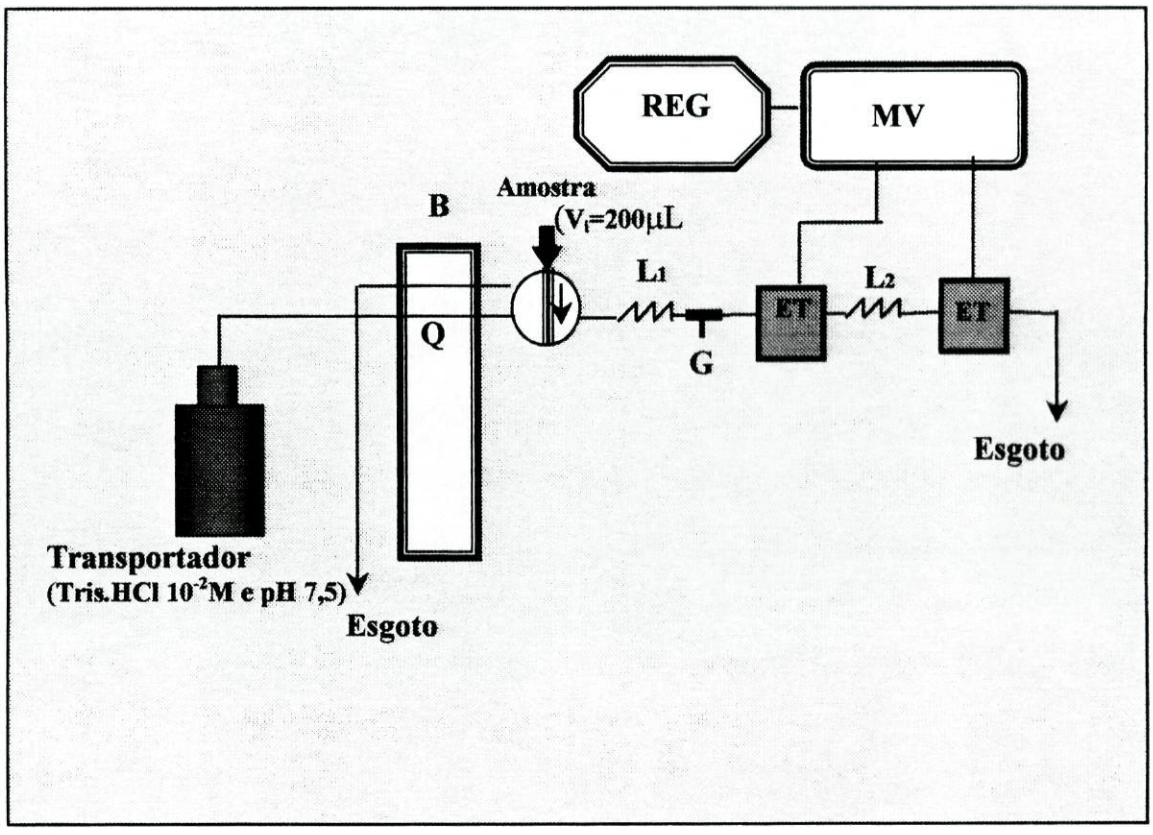

Figura 5.2.4.1-Montagem FIA utilizada na avaliação das características de resposta do sistema de detecção potenciométrico diferencial: B-bomba peristáltica; Q-caudal do fluxo transportador (5,8 mL/min); Vi-volume de injecção; ET-eléctrodo tubular; G-eléctrodo de ligação a terra; MV-decimilivoltímetro; REG-registador; L_1-distância ao detector (20 cm); L_2-distância entre eléctrodos (101 cm).

Tabela 5.2.4.1-Estudo da influência de alguns parâmetros da montagem nas características de resposta do sistema de detecção diferencial.

DISTÂNCIA ENTRE ELÉCTRODOS (cm)	**Sensibilidade** (mV/dec.)	**Sinal analítico** [b] (cm)			**Ritmo de amostragem** (amostras/h)
		Pico ascendente	**Pico descendente**	**Pico completo**	
28	68	6,6	4,0	10,6	105
63	80	7,2	4,7	11,9	89
101	88	7,5	4,9	12,4	80
143	86	7,6	4,5	12,1	73
209	82	7,5	3,9	11,4	58
CAUDAL (mL/min)					
2.9	90	7,9	5,8	13,7	43
5.8	90	7,7	4,9	12,6	80
8.6	86	7,6	4,0	11,6	94
10.5	84	7,5	3,5	11,0	115

[b] Valores correspondentes à injecção de uma solução de cloreto de amónio 10^{-3}M.

5.3-Resultados e discussão

Após a optimização do sistema de detecção diferencial, procedeu-se a uma avaliação mais pormenorizada das características de resposta do mesmo. Para isso, determinou-se, após a calibração do sistema de detecção (Fig. 5.3.1), o limite inferior de resposta linear (LIRL), o declive da zona linear e o ritmo de amostragem. Procedeu-se ainda à determinação da repetibilidade do sinal analítico cujo registo se apresenta na Fig. 5.3.2, bem como à avaliação da estabilidade da resposta do sistema de detecção, ao longo de um dia de trabalho. Não nos pareceu necessário nesta fase do trabalho proceder à determinação dos coeficientes de selectividade potenciométricos, atendendo a que na análise das amostras, será utilizada uma membrana permeável a gases, com o objectivo de eliminar as interferências da matriz. Também não se procedeu ao estudo da influência do pH na resposta do detector uma vez que trabalhos anteriormente desenvolvidos referem não haver alterações significativas do patamar operacional de pH quando os eléctrodos são avaliados num sistema diferencial [1].

Os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 5.3.1, onde se incluem igualmente, para efeitos de comparação, os valores obtidos para os mesmos parâmetros com os eléctrodos tubulares quando avaliados individualmente, num sistema FIA de baixa dispersão.

De entre as características de resposta avaliadas, destaca-se o aumento significativo da sensibilidade analítica. Contudo, registou-se, como era de esperar, um decréscimo do ritmo de amostragem que passou de um valor de cerca de 120 amostras/h para 80 amostras/h, uma vez que, no caso do sistema de detecção sequencial o sinal analítico corresponde à soma da resposta dada por cada um dos eléctrodos tubulares que o constituem. Este facto pode igualmente justificar a ligeira perda verificada, quer a nível da repetibilidade do sinal analítico, quer na estabilidade dos potenciais ao longo de um dia de trabalho.

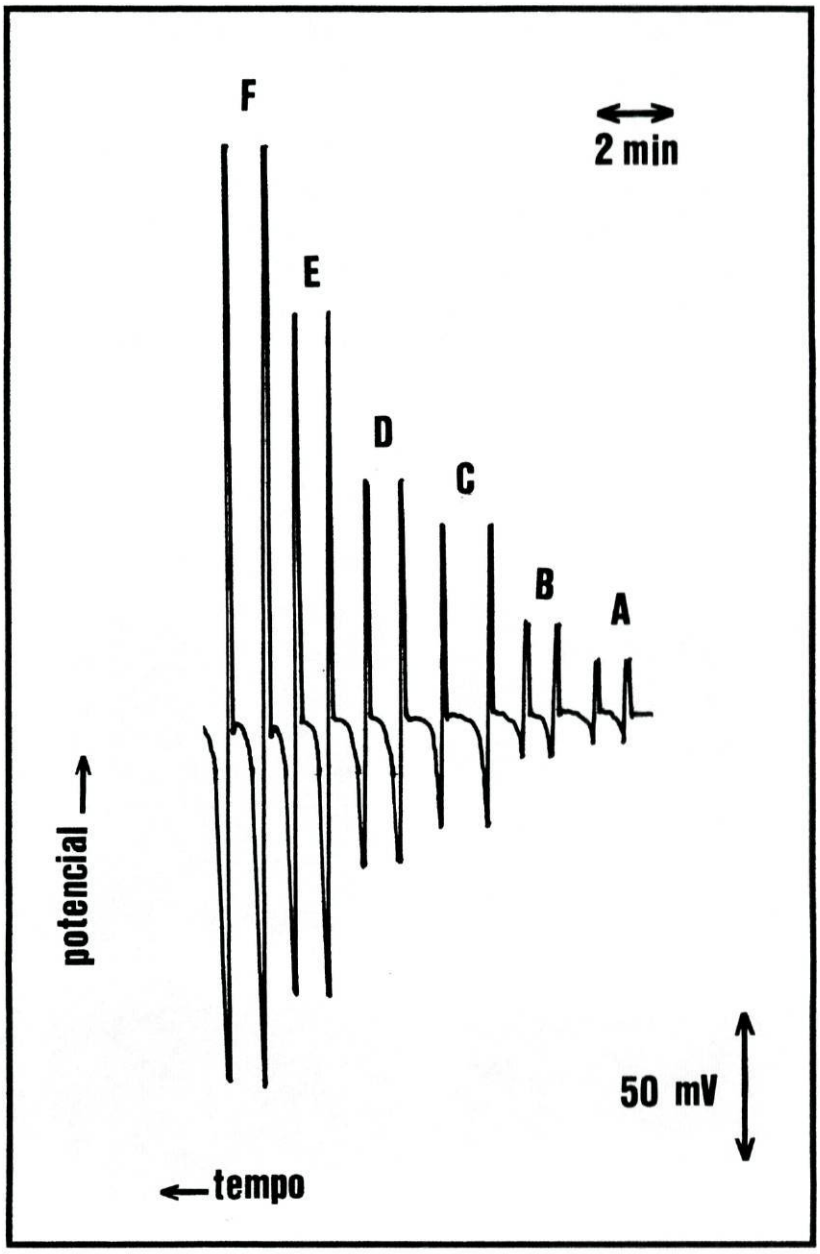

Figura 5.3.1-Registo de uma calibração do sistema de detecção potenciométrico diferencial. **A**($5x10^{-5}$M); **B**(10^{-4}M); **C**($5x10^{-4}$M); **D**(10^{-3}M); **E**(10^{-2}M); **F**(10^{-1}M).

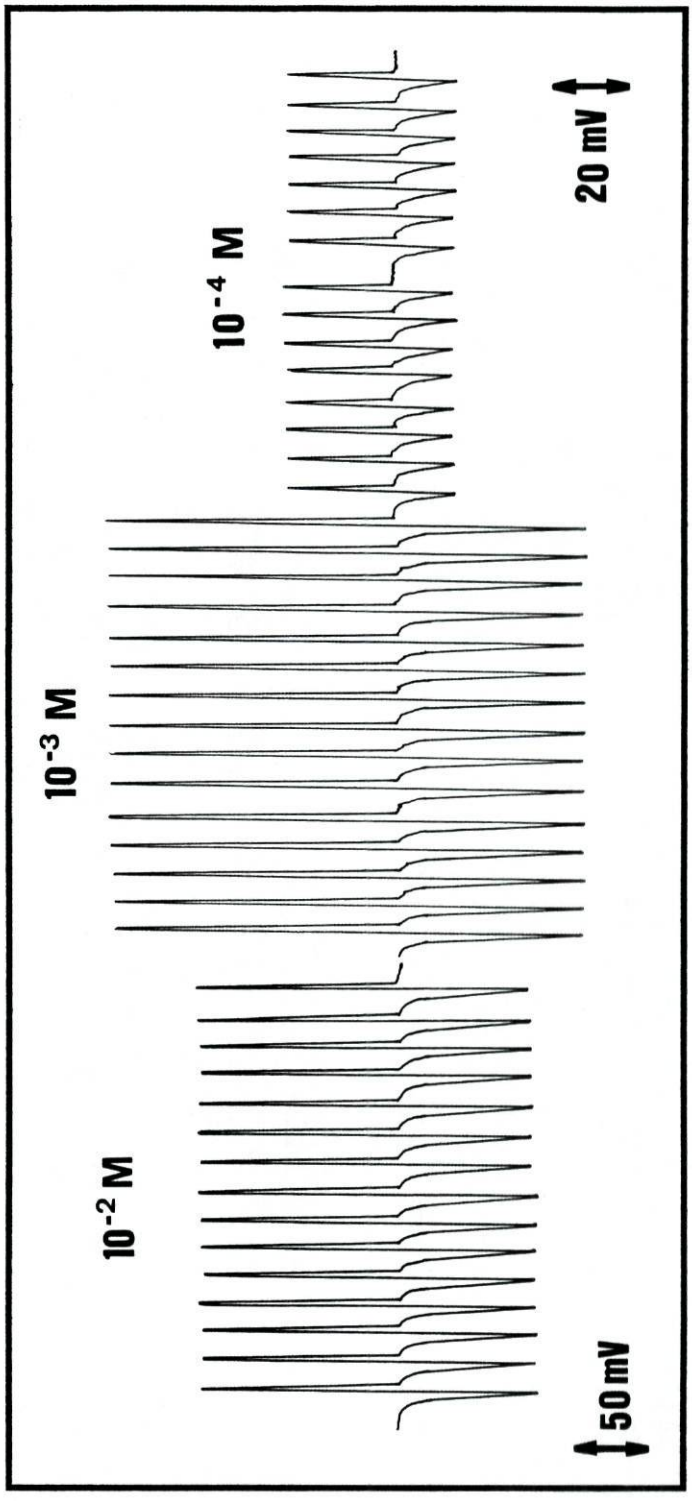

Figura 5.3.2-Registo da repetibilidade do sinal analítico do sistema de detecção potenciométrico diferencial.

Tabela 5.3.1-Características de resposta do sistema de detecção diferencial, e dos detectores tubulares quando avaliados individualmente num sistema FIA de baixa dispersão.[a]

CARACTERÍSTICAS DE RESPOSTA		SISTEMA DE DETECÇÃO DIFERENCIAL	DETECTORES TUBULARES
L.I.R.L.[b] (M)		10^{-4}	$5x10^{-5}$
Declive (mV/decada)		90±2	55±0,6
Coeficiente de correlação		0,9992	0,9998
Repetibilidade (mV)	10^{-2} M	±1,4	±1,0
	10^{-3} M	±0,7	±0,6
	10^{-4} M	±0,6	±0,4
Reprodutibilidade (mV/dia)		±1,9	±1
Ritmo de amostragem (amostras/hora)		80	117

[a] Valores médios de pelo menos dois ensaios com duas unidades de cada tipo.

[b] Limite inferior de resposta linear.

5.4-Conclusões

Aproveitando as vantagens inerentes à utilização dos eléctrodos tubulares sem solução de referência interna, nomeadamente a facilidade de construção, a robustez das montagens FIA que os integram, bem como o facto de não alterarem as características hidrodinâmicas do fluxo, foi possível desenvolver neste capítulo um sistema de detecção potenciométrico sequencial que permitiu a determinação do amónio com maior sensibilidade analítica.

Verificou-se ainda que para além do acréscimo significativo da sensibilidade, as restantes características gerais de funcionamento dos dois eléctrodos tubulares quando inseridos num arranjo diferencial, não sofreram alterações significativas relativamente ao funcionamento individual de cada unidade.

O sistema de detecção que não utilizava um eléctrodo de referência convencional, permitiu o desenvolvimento de uma montagem FIA simples e económica, com características adequadas ao doseamento do teor de azoto nas amostras, com grande precisão.

5.5-Bibliografia

[1]-C.M.C.Couto, J.L.F.C.Lima e M.C.B.M.Montenegro, Anal.Sci., 13,1 (1997).

[2]-W.Frenzel, Analyst, 113, 1039 (1988).

[3]-K.Cammann,Fresenius`Z. Anal.Chem., 329, 691 (1988).

[4]-M.Trajanovicz, Anal.Chim.Acta, 114, 293 (1980).

CAPÍTULO 6

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AZOTO TOTAL EM ALIMENTOS E ÁGUAS

6-DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AZOTO TOTAL EM ALIMENTOS E ÁGUAS

6.1-Introdução

A determinação do teor de azoto total em alimentos e águas, é habitualmente efectuada recorrendo ao procedimento tradicional de Kjeldahl [1,2]. Embora caracterizada por originar bons resultados, esta metodologia envolve no entanto, um conjunto de operações analíticas morosas de que resulta uma análise demorada e pouco recomendável em análises de rotina laboratorial. Qualquer tentativa de tornar o processo mais rápido e rigoroso, é desejável e importante sob o ponto de vista do controlo químico numa indústria alimentar.

O interesse em automatizar a etapa analítica na determinação do teor de azoto, não é recente [3-5]. No entanto, factores como a concentração variável de ácido após a digestão das amostras, a presença de iões metálicos e a turvação das amostras, podem interferir na determinação do amónio directamente no material digerido [5,6].

A incorporação de uma unidade de difusão gasosa em sistemas de análise por injecção em fluxo (FIA), foi uma prática utilizada por alguns autores [7-12], como uma forma adequada de eliminar as interferências de matriz. Este procedimento foi utilizado com sucesso na determinação de amónio directamente em águas [7,8] e na determinação de azoto a partir da digestão ácida das amostras, nomeadamente em solos [9,10], tecidos vegetais [11,12] e fertilizantes [12]. A técnica tem por base a transformação dos sais de amónio em gás amoníaco, por alcalinização do meio. O gás formado difunde-se através da membrana e é recolhido num fluxo aceitador com um valor de pH apropriado que permite a sua conversão novamente em catião amónio, sendo este posteriormente doseado por espectrofotometria [8,10], condutimetria [8,11,12] ou potenciometria [7,9]. A detecção potenciométrica é vantajosa, quando comparada com os outros processos de detecção. Para este facto contribuem a sua especificidade, a possibilidade de se realizarem

determinações com sensibilidade constante numa gama variada de concentrações e ainda pelo facto de recorrer a equipamento não dispendioso e de fácil utilização em procedimentos de rotina.

A introdução da etapa de difusão, nos sistemas automáticos de análise, provoca uma diluição das amostras em extensão variada e que depende do nível de concentração a medir. Resulta como consequência uma diminuição da intensidade dos sinais analíticos e também da sensibilidade analítica. Este facto pode ser ultrapassado utilizando um sistema de detecção potenciométrico diferencial uma vez que permite determinações com sensibilidade acrescida.

Tendo em conta que não existem trabalhos desenvolvidos neste âmbito, aplicados à área alimentar, sector onde a determinação do teor de azoto assume grande importância na caracterização nutricional dos alimentos, propõe-se neste capítulo, adaptar o sistema FIA com detecção potenciométrica diferencial desenvolvido no capítulo anterior, para a determinação do teor de azoto total em alimentos e águas, a partir da digestão ácida das amostras.

6.2-Parte experimental

6.2.1-Aparelhagem utilizada

Para as determinações de potencial efectuadas na optimização da montagem FIA bem como posteriormente na quantificação do teor de azoto nas amostras, utilizou-se o tipo de aparelhagem especificado no Cap.2.

Para a destilação das amostras, quando se procedeu à determinação do teor de azoto pela metodologia de referência, foi utilizado um sistema de destilação corrente.

6.2.2-Reagentes e soluções

Em todas as determinações efectuadas, usaram-se os reagentes cuja qualidade foi previamente especificados no Cap.2.

As soluções padrão de cloreto de amónio, foram preparadas por diluição sucessiva em água, a partir de uma solução mais concentrada, sendo esta obtida por pesagem rigorosa do respectivo componente sólido.

Como fluxo aceitador do gás amoníaco que difundia através da membrana permeável a gases, foi utilizada uma solução de Tris.HCl 10^{-2}M e pH 7,5 e para alcalinização das amostras no interior da montagem FIA, usou-se uma solução de NaOH 1,4 M.

As soluções utilizadas na determinação do teor de azoto total pela metodologia de referência, foram preparadas de acordo com o referido nas respectivas normas [13-16].

6.2.3-Montagem FIA utilizada

Para a determinação por FIA do teor de azoto total, após a digestão ácida das amostras, e por forma a eliminar qualquer interferência de matriz que tratando-se de alimentos é bastante complexa, foi necessário estabelecer uma montagem FIA que incorporasse uma unidade de difusão gasosa. Este procedimento conduz no entanto, a uma diluição das amostras em extensão variável e que depende do nível de concentração a medir. Resulta como consequência uma diminuição da intensidade dos sinais analíticos e uma perda considerável da sensibilidade analítica, como se pode observar na Tabela 6.2.3.1. Justifica-se assim a utilização do sistema de detecção potenciométrico diferencial desenvolvido no capítulo anterior, uma vez que permite efectuar determinações com maior sensibilidade.

Foi assim desenvolvida a montagem FIA representada na Fig. 6.2.3.1, onde as amostras após a digestão ácida eram injectadas num fluxo transportador de água (Q3) e alcalinizadas no percurso (L1) com uma solução de hidróxido de sódio (Q2), cuja adição era efectuada através da confluência (X). O gás amoníaco formado, atravessava a membrana e era recolhido num fluxo aceitador (Q1) de Tris.HCl 10^{-2}M e pH 7,5, que promovia novamente a sua passagem a amónio, sendo este detectado potenciométricamente.

A incorporação da unidade de difusão gasosa implicou a optimização de alguns parâmetros da montagem FIA directamente relacionados com o processo de difusão, nomeadamente, a área útil de transferência gasosa, o caudal do fluxo transportador e aceitador e ainda das condições de alcalinização (comprimento do reactor). Todo este processo de optimização foi efectuado utilizando apenas um detector tubular.

Assim, começou-se por ensaiar unidades de difusão com diferentes áreas úteis, apresentando-se na Tabela 6.2.3.2, os resultados obtidos. Do estudo efectuado, verificou-se existir uma relação directa entre o aumento da área de difusão e a quantidade de gás que passava a membrana, e que estas condições se reflectiam na sensibilidade analítica que se obtinha. Quando era utilizada a unidade de difusão de menores dimensões, os sinais correspondentes às concentrações mais altas ficavam comprometidos, dando origem a calibrações com um declive bastante mais baixo. Das unidades estudadas, foi escolhida a

de maior área útil, com um comprimento de 10 cm e uma largura de 3 mm, uma vez que era a que permitia obter melhores resultados. Apesar da sensibilidade obtida nestas condições ser ainda baixa, optou-se por não ensaiar unidades de maiores dimensões, pois para além de se reflectir no ritmo de amostragem, do ponto de vista prático tornava-se mais difícil conseguir uma colocação correcta da membrana no interior do suporte.

Procedeu-se de seguida à optimização dos caudais do fluxo transportador (Q2+Q3) e do fluxo aceitador (Q1), na tentativa de melhorar a sensibilidade analítica (Tabela 6.2.3.3). Verificou-se ser necessário utilizar caudais muito reduzidos de modo a favorecer uma melhor transferência gasosa, ficando assim condicionado o ritmo de amostragem. A passagem de gás através da membrana era ainda favorecida por um aumento do fluxo transportador relativamente ao fluxo aceitador. No entanto, a este aumento de Q2+Q3 relativamente a Q1 estava associado um decréscimo no tempo de vida da membrana devido à sobrepressão a que era sujeita. Por outro lado, verificou-se que os piores resultados obtidos em termos de sinal analítico e sensibilidade, correspondiam à utilização de um fluxo aceitador superior ao fluxo transportador, devido à grande dispersão da amostra nestas condições. Atendendo aos resultados obtidos, optou-se por um fluxo transportador de 1,4 mL/min (Q2=Q3=0,7 mL/min) e um fluxo aceitador (Q1) de 0,7 mL/min.

Por fim, procedeu-se à optimização do comprimento do reactor (L1), tendo em conta que durante este trajecto a amostra deveria sofrer a alcalinização necessária para a transformação completa dos sais de amónio em gás amoníaco (Tabela 6.2.3.4). Verificou-se que um comprimento de cerca de 20 cm era suficiente para promover uma boa alcalinização da amostra. A utilização de um reactor maior originava maior dispersão da amostra, com uma perda do sinal analítico, embora se tenha obtido um valor semelhante para a sensibilidade.

Optimizados os parâmetros que directamente condicionavam a transferência gasosa através da membrana, o detector tubular foi substituído pelo sistema de detecção diferencial, e procedeu-se de seguida à optimização da distância a deixar entre eléctrodos (Tabela 6.2.3.5). Optou-se novamente por uma distância de 101 cm uma vez que um valor superior não trazia uma melhoria significativa da sensibilidade e estava associado a um decréscimo do ritmo de amostragem. Uma distância inferior, embora permitisse um ritmo

de amostragem superior, não era suficiente para permitir uma boa individualização do pico ascendente e descendente reflectindo-se numa redução do sinal analítico associado a uma perda significativa de sensibilidade.

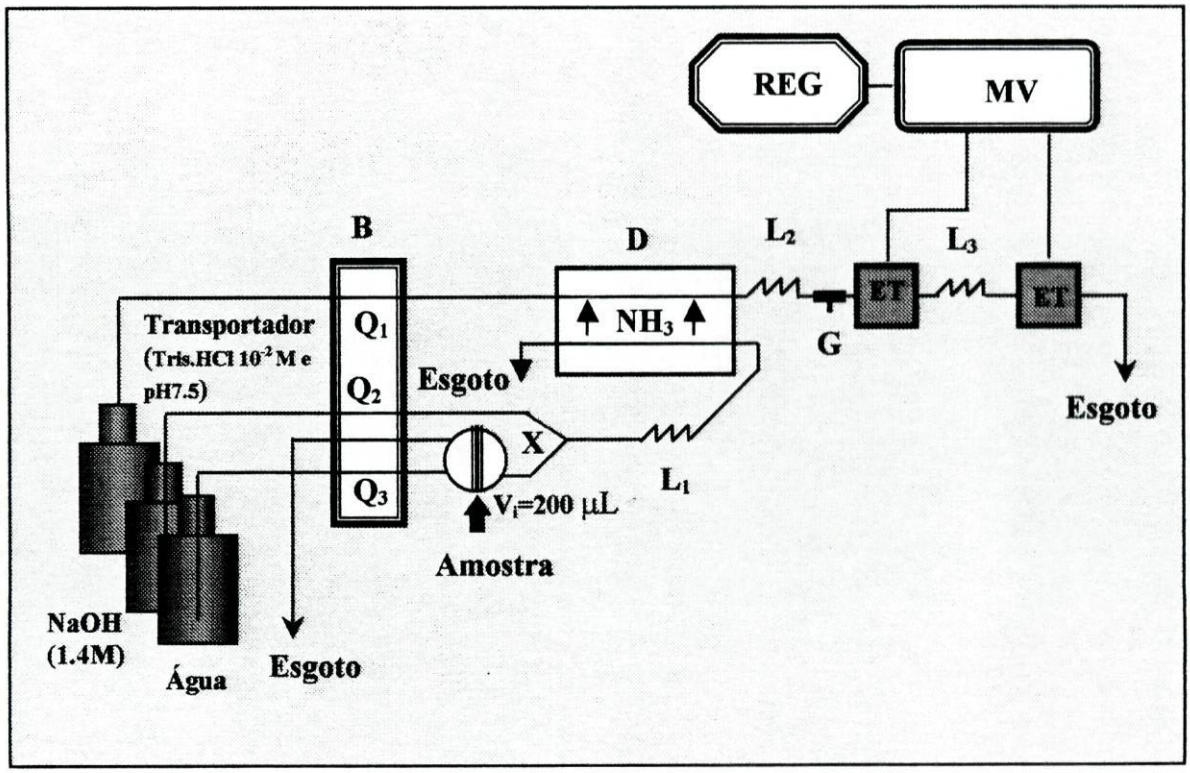

Figura 6.2.3.1-Montagem FIA utilizada na análise das amostras; B-bomba peristáltica; Qi-caudal (Q1=Q2=Q3=0,7 mL/min); X-Confluência; Vi-volume de injecção; ET-eléctrodo tubular; G-eléctrodo de ligação a terra; D-unidade de difusão gasosa; MV-decimilivoltímetro; REG-registador; L_1-distância entre a confluência e a unidade de difusão gasosa (20 cm); L_2-distância entre a unidade de difusão gasosa e o detector (10 cm); L_3-distância entre eléctrodos (101cm).)

Tabela 6.2.3.1-Comparação de alguns parâmetros de calibração quando o mesmo eléctrodo tubular é avaliado num sistema FIA **com** e **sem** unidade de difusão gasosa.

SISTEMA FIA COM UNIDADE DE DIFUSÃO GASOSA						**SISTEMA FIA SEM UNIDADE DE DIFUSÃO GASOSA** (Caudal = 5,8 mL/min)		
Caudal (mL/min)	**Área de permuta** Compri-mento (cm)	Largura (mm)	**LIRL** (moles/L)	**Declive** (mV/dec.)	**R**	**LIRL** (moles/L)	**Declive** (mV/dec.)	**R**
Tris.HCl = 2,7 H_2O + NaOH =2,4	14	2	$5x10^{-4}$	43,4	0,9994	$5x10^{-4}$	56,2	0,9998
	7	2	$5x10^{-4}$	42,6	0,9986			
	3,5	2	$5x10^{-4}$	40,7	0,9974			

(LIRL) Limite inferior de resposta linear; **(R)** Coeficiente de correlação linear

Tabela 6.2.3.2-Optimização da área util de difusão gasosa.

MEMBRANA			LIRL	DECLIVE	R	SINAL ANALÍTICO (cm)	
Comprimento (cm)	Largura (mm)	Profundidade (mm)	(moles/L)	(mV/dec)		10^{-2} M	$5x10^{-4}$M
7	2	0,25	$5x10^{-4}$	45,9	0,9998	10,5	4,5
10	3	0,25	$5x10^{-4}$	49,4	0,9999	11,1	4,7
14	2	0,25	$5x10^{-4}$	47,8	0,9999	11,6	5,4

(LIRL) Limite inferior de resposta linear; **(R)** Coeficiente de correlação linear.

Tabela 6.2.3.3-Estudo da influência do caudal na resposta do detector.

CAUDAL (mL/min)			LIRL	DECLIVE	R	SINAL ANALÍTICO (cm)		RITMO DE AMOSTRAGEM
Fluxo receptor	Fluxo dador H_2O	Fluxo dador NaOH	(moles/L)	(mV/dec)		10^{-2} M	$5x10^{-4}$M	(amostras/h)
1,4	0,7	0,7 **1,4**	$5x10^{-4}$	49,8	0,9996	9,5	4,45	35-40
1,4	1,1	0,7 **1,8**	$5x10^{-4}$	51,5	0,9996	9,25	4,0	35-40
0,7	1,1	0,7 **1,8**	$5x10^{-4}$	52,7	0,9995	9,8	4,5	35-40
0,7	0,7	0,7 **1,4**	$5x10^{-4}$	52,1	0,9997	9,75	4,5	35-40
2,3	0,7	0,7 **1,4**	$5x10^{-4}$	48,8	0,9994	8,5	3,5	40-45

(LIRL) Limite inferior de resposta linear; **(R)** Coeficiente de correlação linear.

Tabela 6.2.3.4-Optimização do comprimento do reactor.

REACTOR (cm)	LIRL (moles/L)	DECLIVE (mV/dec)	R	SINAL ANALÍTICO (cm)	
				10^{-2} M	$5x10^{-4}$M
20	$5x10^{-4}$	51,5	0,9999	10,25	3,5
50	$5x10^{-4}$	51,8	0,9994	9,85	3,0

(LIRL) Limite inferior de resposta linear; **(R)** Coeficiente de correlação linear.

Tabela 6.2.3.5-Optimização da distância entre eléctrodos após a incorporação da unidade de difusão gasosa na montagem FIA com detecção potenciométrico diferencial.

DISTÂNCIA ENTRE ELÉCTRODOS (cm)	LIRL	DECLIVE	R	SINAL ANALÍTICO (cm)		RITMO DE AMOSTRAGEM
	(moles/L)	(mV/dec)		10^{-2} M	$5x10^{-4}$M	(amostras/h)
40	$5x10^{-4}$	80,0	0,9999	16,4	6,0	40
101	$5x10^{-4}$	98,4	0,9999	19,3	6,4	30
202	$5x10^{-4}$	98,6	0,9996	19,4	6,6	19

6.2.4-Preparação das amostras para o doseamento potenciométrico

Para a determinação por FIA, do teor de azoto total, e à semelhança do que acontece com a metodologia de referência, as amostras em estudo, foram previamente sujeitas a uma digestão ácida. Tratando-se de uma operação comum aos dois métodos, esta foi realizada em conjunto e nas condições referidas anteriormente no Cap.2 (ver 2.10.2). Este procedimento teve por objectivo eliminar possíveis fontes de erro na comparação dos resultados finais, obtidos pelos dois métodos.

O material digerido foi diluído a um volume rigoroso de 100 mL, dos quais se retiraram posteriormente 75 mL para destilação de acordo com a metodologia de referência. Do restante volume foram retiradas as quantidades necessária para a injecção no sistema FIA.

Antes da injecção das amostras, procedeu-se a uma prévia diluição das mesmas, para que fosse possível obter, no interior da montagem, a transformação quantitativa dos sais de amónio formados na digestão, em gás amoníaco, sem que fosse necessário recorrer a uma solução para alcalinização demasiado concentrada. Os factores de diluição das amostras foram definidos tendo em consideração quer a concentração de azoto quer a concentração de ácido. Se por um lado a diluição devia ser suficiente para garantir uma perfeita alcalinização da amostra no interior do sistema, por outro lado não podia ser excessiva para que a concentração não fosse inferior ao limite inferior de resposta linear.

Na análise das águas, como o teor de azoto destas, é por norma, bastante mais baixo do que nos alimentos, uma diluição das amostras poderia originar concentrações inferiores à gama de valores correspondentes à zona linear. Por outro lado, a injecção sem diluição prévia, exigia a utilização de soluções alcalinas muito concentradas que se verificou estarem na origem da formação de uma grande quantidade de pequenas bolhas, de que resultava uma diminuição acentuada da repetibilidade do sinal analítico. Optou-se então, por utilizar o método da adição [17] e utilizar a montagem FIA desenvolvida para a análise dos alimentos.

6.3-Resultados e discussão

6.3.1-Características de resposta do sistema de detecção após a incorporação da membrana.

Com a montagem FIA optimizada, procedeu-se a uma avaliação mais completa das características de resposta do sistema de detecção potenciométrico diferencial, após a incorporação da unidade de difusão gasosa. Assim, utilizando a montagem FIA representada na Fig.6.2.3.1, determinou-se o limite inferior de resposta linear, o declive da parte linear da curva de calibração, a repetibilidade do sinal analítico e o ritmo de amostragem.

Os resultados obtidos para os diferentes parâmetros estão representados na Tabela 6.3.1.1, onde, para efeitos de comparação, se apresentam também os valores obtidos anteriormente para os mesmos parâmetros quando se avaliou o sistema de detecção sequencial sem a incorporação da membrana difusora na montagem.

Comparando os resultados obtidos para as duas situações, verifica-se uma diminuição considerável no ritmo de amostragem que passou de cerca de 80 para 30 amostras/h, quando se incorpora a unidade de difusão gasosa no sistema. Este facto deve-se à grande diferença de caudais utilizados em cada situação. A incorporação da membrana na montagem FIA, piora ligeiramente os valores obtidos para a repetibilidade do sinal analítico, que não excede no entanto ±2mV. Verifica-se ainda uma subida do limite inferior de resposta linear que passa de 10^{-4} para $5x10^{-4}$ M e uma dispersão maior no que se refere aos valores encontrados para a sensibilidade (±5), mantendo-se no entanto, o valor médio em 90mV/dec.

Tabela 6.3.1.1-Características de resposta do sistema de detecção sequencial **antes** e **depois** da incorporação na montagem FIA, da unidade de difusão gasosa.

CARACTERÍSTICAS DE RESPOSTA		SISTEMA DE DETECÇÃO DIFERENCIAL	
		Com membrana incorporada na montagem FIA	Sem membrana incorporada na montagem FIA
L.I.R.L[a] (M)		$5x10^{-4}$	10^{-4}
Declive (mV/decada) [b]		90±5	90±2
Repetibilidade (mV)	10^{-2} M	±2,0	±1,4
	10^{-3} M	±1,1	±0,7
Ritmo de amostragem (amostras/hora)		30	80

[a] Limite inferior de resposta linear

[b] Média referente a um mínimo de cinco calibrações.

6.3.2-Determinação por FIA do teor de azoto das amostras

Utilizando a montagem FIA com detecção potenciométrica diferencial e membrana permeável a gases, representada na Fig. 6.2.3.1, procedeu-se ao doseamento do teor de azoto total das amostras, a partir da digestão ácida destas.

Apresenta-se na Fig.6.3.2.1, o registo obtido quando da injecção no sistema FIA, de alguns padrões e algumas amostras de alimentos, e na Tabela 6.3.2.1, indicam-se os teores de azoto total obtidos. Indicam-se igualmente para efeitos de comparação os resultados obtidos na análise dos alimentos pela metodologia de referência.

Relativamente à análise das águas, representa-se na Fig. 6.3.2.2, o registo dos sinais analíticos obtidos, e na Tabela 6.3.2.2, os valores encontrados para o teor de azoto total.

A qualidade dos resultados obtidos na determinação do teor de azoto por FIA ($\mathbf{C_F}$), foi avaliada por comparação com os valores resultantes da metodologia de referência ($\mathbf{C_R}$). Comparando os resultados obtidos pelos dois métodos pode concluir-se existir uma boa concordância entre eles. O traçado da recta de regressão linear (Fig. 6.3.2.3), conduziu a uma relação ($\mathbf{C_F}$) = -0,0649 + 1,0586 ($\mathbf{C_R}$), com um desvio parão de ±0,12.

O tratamento estatístico dos dados, permitiu ainda concluir que a diferença entre os resultados obtidos pelos dois métodos não foi significativa a um nível de probabilidade de 0,05 (t =1,1; gl=16; Teste **t,** amostras relacionadas, hipótese bilateral).

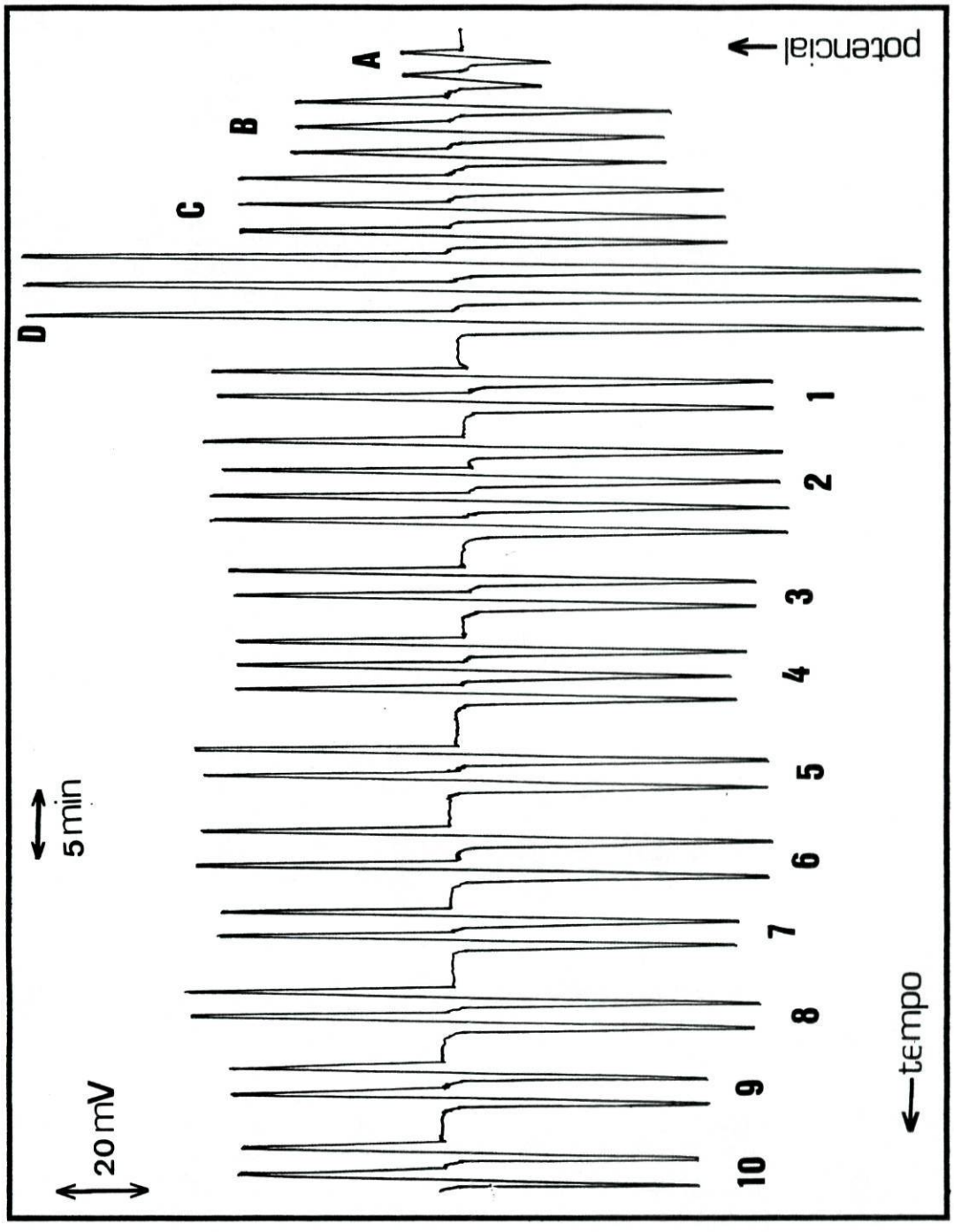

Figura 6.3.2.1-Registo obtido na injecção no sistema FIA de algumas amostras de alimentos. Padrões: **A**(10^{-4}M); **B**($5x10^{-4}$M); **C**(10^{-3}M); **D**(10^{-2}M). Amostras: **1** e **2**-Pizza(dil.25); **3** e **4**-Chourição(dil.50); **5** e **6**-Hamburguer(dil.25); **7**-Salsicha fresca(dil.25); **8**-Salsicha fresca(dil.20); **9** e **10**-Chocolate(dil.20).

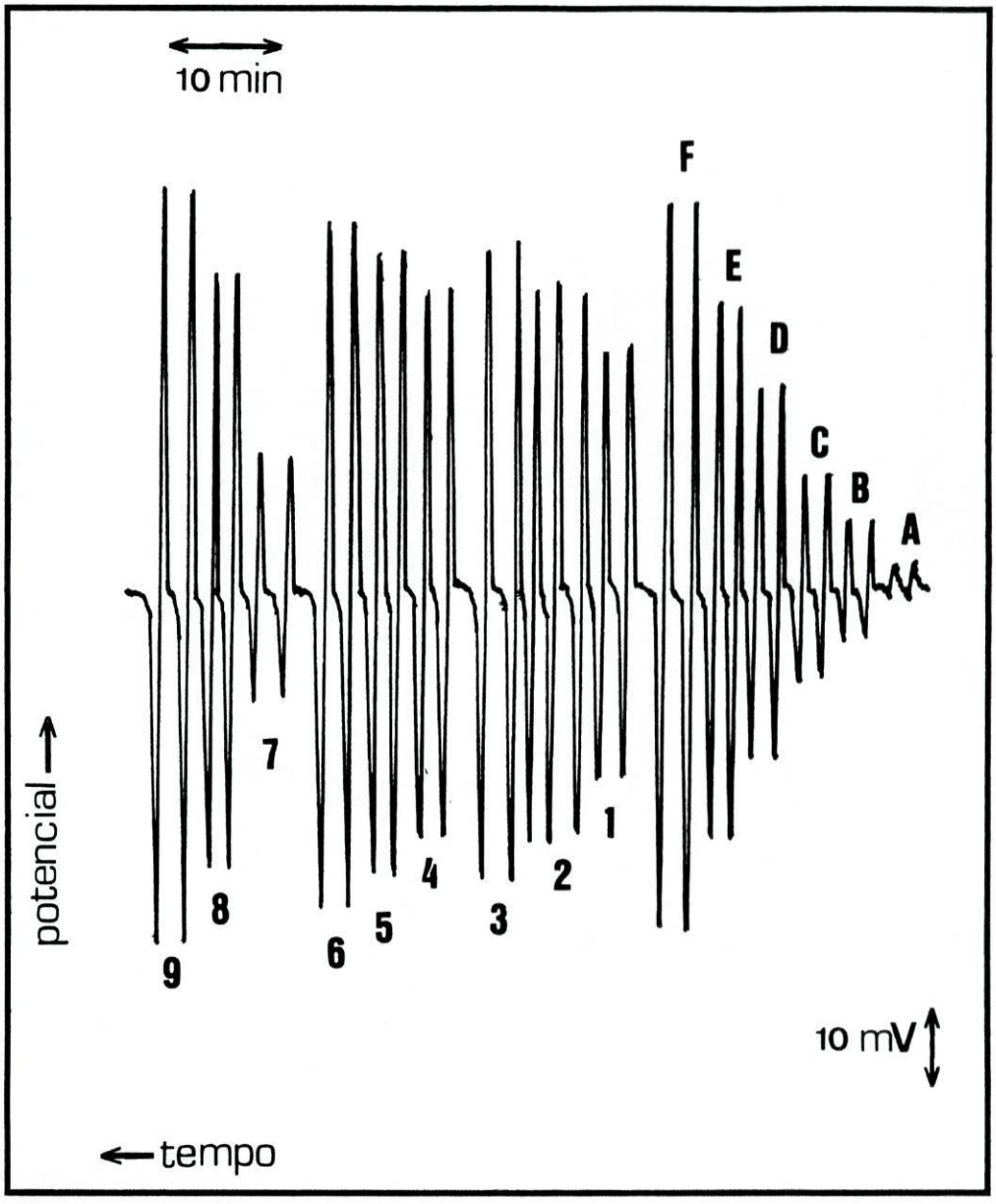

Figura 6.3.2.2-Registo obtido na injecção das águas residuais no sistema FIA. Padrões: **A**(10^{-5}M); **B**($5x10^{-5}$M); **C**(10^{-4}M); **D**($2,5x10^{-4}$M); **E**($5x10^{-4}$M);**F**(10^{-3}M). Amostras: **1**-Água I(dil.5); **4**-Água II(dil.5); **7**-Água III(dil.4); **2, 5 e 8**-Águas adicionadas com 50µL de uma solução de cloreto de amónio 0,1M; **3**, **6** e **9**-Águas adicionadas com 100µL (sol. Cloreto de amónio 0,1M).

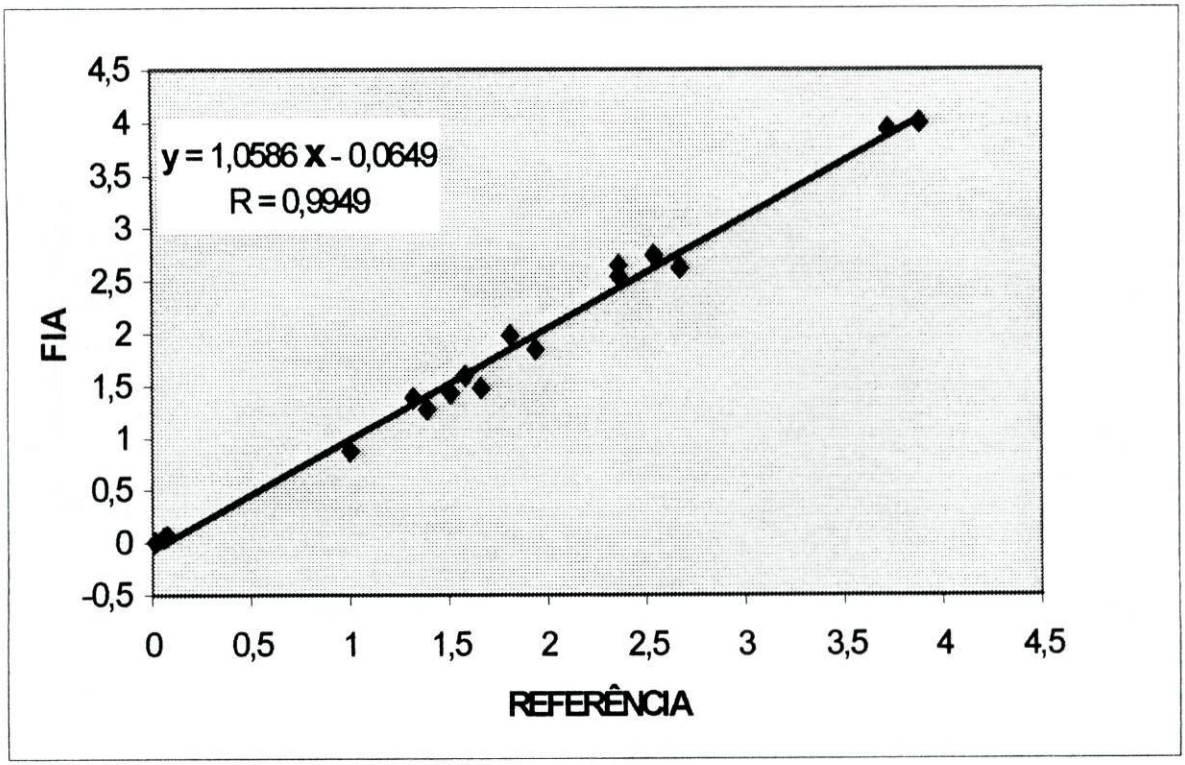

Figura 6.3.2.3-Comparação dos resultados obtidos na análise das amostras por FIA e pela metodologia de referência.

Tabela 6.3.2.1-Resultados obtidos na determinação do teor de azoto total por FIA com detecção potenciométrica diferencial e pelo método de referência, na análise dos alimentos.

IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS		AZOTO TOTAL[a] (%p/p)	
		FIA	REFERÊNCIA
1	Cerelac	2,54	2,36
2	Nestum	1,43	1,51
3	Bolacha integral	1,39	1,32
4	Pizza	2,65	2,36
5	Fiambre	2,62	2,67
6	Salsicha (em lata)	1,60	1,58
7	Salsicha fresca	1,98	1,81
8	Mortadela	1,85	1,94
9	Chourição	3,94	3,72
10	Hamburguer (congelado)	2,74	2,54
11	Whiskas	1,48	1,66
12	Cacau	4,00	3,88
13	Mousse de chocolate	0,88	1,00
14	Chocolate	1,28	1,39

[a] Valores médios de dois ensaios para cada amostra.

Tabela 6.3.2.2-Resultados obtidos na determinação do teor de azoto total por FIA com detecção potenciométrica diferencial e pelo método de referência, na análise das águas residuais.

IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	**AZOTO TOTAL (mg/L)**	
	FIA	**REFERÊNCIA**
Água I	55,2	57,1
Água II	82,6	71,7
Água III	15,8	16,0

6.4-Conclusões

O sistema FIA desenvolvido, permitiu a determinação directa do teor de azoto total em águas e alimentos, a partir da digestão ácida das amostras. A eliminação das etapas de destilação e titulação incluídas no procedimento tradicional, traduziu-se assim numa economia de tempo.

A metodologia proposta, favoreceu ainda o aumento da sensibilidade das determinações ao utilizar um sistema de detecção potenciométrico diferencial. Esta característica tornou possível a utilização da mesma montagem FIA na determinação do teor de azoto quer nos alimentos onde os teores são por norma altos e variáveis, quer nas águas residuais, por norma muito mais baixos.

Os resultados obtidos, demonstram existir uma boa concordância entre o método FIA proposto e a metodologia de referência, pelo que o procedimento desenvolvido pode considerar-se uma boa alternativa para a determinação do teor de azoto total, permitindo doseamentos mais rápidos e precisos, com a vantagem de ser uma técnica simples e económica para aplicação em análises de rotina e por isso acessível a qualquer laboratório de controlo de qualidade.

6.5-Bibliografia

[1]-Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC, Arlington, VA, 15th edn. (1990).

[2]-Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 18th ED. (1992).

[3]-G.K.Buckee, *J.Inst.Brew*, **80**,291 (1974).

[4]-R..J. Stevens, *Water Res.* **10**, 171, (1976).

[5]-P.L.Searle, *Analyst*, **109**, 549 (1984).

[6]-L.J.Sun, Z.Gao, L.Li e Z.Fang, *Turang Tongbao*, **5**, 38 (1981).

[7]-S.Alegret, J. Alonso, J.Bartroli e E.M.Fabregas, *Analyst*, **114**,1443 (1989).

[8]-A.Cerdà, M.T.Oms; R.Forteza e V.Cerdà, *Anal.Chim.Acta*, **311**, 165 (1995).

[9]-A.M.R.Ferreira, J.L.F.C.Lima e A.O.S.S.Rangel, *Aust.J.Soil Res.*, **34**, 503 (1996).

[10]-L.Sun, L.Li e Z.Fang, *Turang Tongbao*, **17**, 37 (1986).

[11]-R.M.Carlson, *Anal.Chem*, **50**, 1528 (1978).

[12]-C.Pasquini e L.C.Faria, *Anal.Chim.Acta*, **193**, 19 (1987).

[13]-Determinação do teor de Azoto total em carnes, derivados e produtos carneos, NP-1612 (1979).

[14]-Determinação do teor de proteína bruta em cereais e leguminosas, NP-1996 (1982)

[15]-Determinação do teor de azoto total e de proteína bruta no cacau e derivados, pNP-3598.

[16]-Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 18th ED. (1992).

[17]-A.Evans, *Potentiometry and Ion Selective Electrodes*, John Wiley & Sons, London.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES GLOBAIS

7-CONCLUSÕES GLOBAIS

Nesta Dissertação, apresentou-se o desenvolvimento de um sistema de análise por injecção em fluxo com detecção potenciométrica diferencial, para a determinação do teor de azoto total em águas e alimentos, a partir da digestão ácida das amostras. O trabalho desenvolvido envolveu várias etapas, nomeadamente, a construção e avaliação dos eléctrodos sensíveis ao catião amónio, desenvolvimento do sistema de detecção diferencial e a adaptação deste à análise de amostras reais. Neste capítulo resumem-se as conclusões que se consideram ser de índole geral do trabalho desenvolvido.

A construção de eléctrodos sem solução de referência interna e com o sensor imobilizado em PVC, permitiu que fossem desenvolvidas unidades sensíveis ao catião amónio com boas características de funcionamento. O processo de construção utilizado era simples, económico e versátil, pois permitiu adaptar os eléctrodos assim desenvolvidos, a uma configuração tubular, para a incorporação num sistema de análise por injecção em fluxo.

Os eléctrodos tubulares assim construídos, apresentaram características de funcionamento em tudo muito semelhantes às obtidas com os correspondentes eléctrodos convencionais. A sua configuração tubular, permitiu uma fixação rígida ao sistema de fluxo, tornando assim viável a automatização da determinação potenciométrica do catião amónio, recorrendo a um sistema FIA simples.

As boas características de funcionamento dos eléctrodos tubulares construídos, associado ao facto de que a configuração tubular não altera as características hidrodinâmicas do fluxo, tornaram possível o desenvolvimento de um sistema de detecção potenciométrico diferencial, colocando sequencialmente e a uma determinada distância entre si, dois eléctrodos tubulares sensíveis ao amónio. Este arranjo diferencial, em que cada um dos eléctrodos funcionava alternativamente como referência do outro, permitiu obter um acréscimo significativo da sensibilidade analítica na determinação potenciométrica do amónio. Verificou-se ainda que as restantes características de resposta

do sistema de detecção diferencial, não sofreram alterações significativas relativamente ao funcionamento individual de cada eléctrodo.

Aproveitando as vantagens da utilização do sistema de detecção diferencial na determinação do catião amónio, nomeadamente o aumento da sensibilidade analítica e consequentemente, da precisão dos resultados, foi possível desenvolver uma montagem FIA para a determinação do teor de azoto em águas e alimentos a partir dos sais de amónio formados na digestão ácida das amostras. Com este procedimento, foi possível eliminar as etapas de destilação e titulação incluídas na metodologia de referência o que se traduziu por uma economia de tempo. Os resultados obtidos na análise das amostras, demonstraram existir uma boa concordância entre o método FIA proposto e a metodologia de referência. O procedimento desenvolvido pode assim considerar-se, como uma boa alternativa para a determinação do teor de azoto, pois permite analisar um maior número de amostras com uma qualidade comparável em termos de resultados.

Relativamente à utilização por alguns autores de outras técnicas analíticas em trabalhos anteriormente desenvolvidos neste âmbito, verifica-se que a detecção potenciométrica apresenta algumas vantagens. Permite efectuar determinações com elevada sensibilidade numa gama alargada de concentrações, utiliza reagentes mais económicos e recorre a equipamento mais simples, menos dispendioso e por norma, existente em laboratório.

A metodologia aqui desenvolvida permitiu obter bons resultados, na análise de alimentos com uma composição muito diversificada, quer em termos de matriz quer no que se refere aos teores de azoto, recorrendo a uma montagem FIA simples e económica, caracterizada por um consumo reduzido de reagentes.

Com o trabalho desenvolvido, pretendeu-se de algum modo contribuir para a grande procura actual por procedimentos de análise mais rápidos e económicos. Ficou assim demonstrada a possibilidade de automatizar o doseamento do teor de azoto, nomeadamente, na área alimentar, onde são muito limitados ou mesmo inexistentes os trabalhos anteriormente desenvolvidos com este objectivo.