

Hugo Miguel Rodrigues Cunha Oliveira

Licenciado em Ciências Farmacêuticas

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 17/08/2005
N.º 3034
Cota

**Desenvolvimento de uma metodologia automática de
fluxo baseada em multi-seringa com pré-concentração
em linha para a determinação de compostos fenólicos**

FFM

OLI

3034

Universidade do Porto

Porto, 2004

Hugo Miguel Rodrigues Cunha Oliveira

Licenciado em Ciências Farmacêuticas

Dissertação de candidatura ao grau de
Mestre apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto

Universidade do Porto

Porto, 2004

Trabalho realizado no serviço de Química – Física
Da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Índice

Agradecimentos	VII
Resumo.....	VIII
Abstract.....	IX
Organização da dissertação	X
1. Introdução	1
1.1. Ocorrência de compostos fenólicos no ambiente	2
1.2. Metodologias utilizadas na determinação de compostos fenólicos.....	3
1.2.1. O método da 4-aminoantipirina	4
1.3. Metodologias automáticas de fluxo com pré-concentração para a determinação de compostos fenólicos.....	7
1.4. Análise por injeção em fluxo baseada em multi-seringa (MSFIA).....	16
1.4.1. Incorporação da pré-concentração em MSFIA.....	19
2. Material e métodos	23
2.1. Reagentes e soluções	24
2.2. Instrumentação	26
2.3. Utilização da resina Amberlite XAD-4.....	27
2.3.1. Redução do tamanho de partícula e armazenamento da resina	27

2.3.2. Preparação das colunas de pré-concentração	28
2.4. Montagens e funcionamento do sistema de fluxo	29
2.5. Estudo das variáveis e avaliação das características de funcionamento do método....	35
3. Resultados e discussão	38
3.1. Implementação da reacção da 4-aminoantipirina em MSFIA	39
3.1.1. Composição e pH do sistema tampão	39
3.1.2. Concentração e pH da solução oxidante	48
3.1.3. Estudo da concentração da 4-aminoantipirina.....	52
3.2. Implementação da etapa de pré-concentração em MSFIA.....	53
3.2.1. Dimensões das partículas da resina Amberlite XAD-4	55
3.2.2. Condições de carregamento da coluna de pré-concentração	57
3.2.3. Dimensões da coluna de pré-concentração	61
3.2.4. Estudo do caudal na etapa de desenvolvimento de cor	65
3.3. Caracterização e avaliação do sistema MSFIA	66
3.3.1. Resposta relativa de diferentes compostos fenólicos	66
3.3.2. Calibração em massa.....	71
3.3.3. Estudo de possíveis interferentes.....	74
3.3.4. Caracterização do sistema e análise de amostras	76
4. Conclusões	80

4.1. Novas contribuições para as metodologias de fluxo	81
4.2. Novas contribuições no âmbito da "Química Verde"	82
Referências.....	87

Agradecimentos

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto pela admissão como aluno do curso de Mestrado Europeu em Química Analítica Ambiental.

Ao Departamento de Química da Universidade de Aberdeen, na pessoa do Professor Doutor Ian Marr, pela excelente experiência que foi o bloco B deste mestrado.

Ao Prof. Doutor José L. F. da Costa Lima, por todo o contributo ao nível pessoal, pedagógico e científico, indispensável para a concretização deste trabalho.

À Doutora Marcela Segundo pela excelente orientação e relacionamento pessoal, além de todo o empenho e dedicação na concretização das diferentes fases deste projecto.

A todos os colegas do curso de Mestrado e de todo o Departamento de Química – Física por toda a ajuda e também pelo excelente ambiente de trabalho que me proporcionaram.

À minha família por todo o apoio que sempre me deram.

A todos os que contribuíram, de alguma forma, para a concretização deste trabalho.

Resumo

O trabalho apresentado nesta dissertação descreve o desenvolvimento de uma metodologia de fluxo baseada em multi-seringa com pré-concentração em linha para a determinação espectrofotométrica de compostos fenólicos, baseada na reacção da 4-aminoantipirina.

A pré-concentração dos analitos foi efectuada em fase sólida, recorrendo à resina Amberlite XAD-4, constituindo, sob o ponto de vista ambiental, uma alternativa à extracção com solventes orgânicos prevista na metodologia de referência e em metodologias de fluxo descritas anteriormente. A retenção e eluição dos compostos fenólicos foram baseadas nas respectivas propriedades ácido-base. Uma vez que se tratam de ácidos fracos, a sua retenção foi possível na forma protonada, utilizando condições ácidas enquanto que a eluição foi conseguida em meio alcalino, que assegurou a ionização dos compostos alvo.

Uma vez que foram observados diferentes perfis de eluição para os vários compostos fenólicos testados, foram estabelecidas curvas de calibração utilizando a área do pico como sinal analítico em vez da respectiva altura. Este facto permitiu a determinação num intervalo dinâmico concentrações, recorrendo a diferentes volumes (0,500 - 6,00 ml), no estabelecimento de curvas de calibração baseadas na massa de fenol carregada na coluna de pré-concentração. Esta estratégia permitiu a determinação entre 0,030 e 3,80 mg l⁻¹, com uma frequência entre 10 a 16 ensaios por hora. Foi ainda possível, sem qualquer modificação da montagem analítica, a determinação em concentrações inferiores a 50 µg l⁻¹ através do uso de um volume fixo de amostra (24,0 ml). A análise de materiais certificados recorrendo à metodologia proposta proporcionou resultados dentro dos limites de aceitação.

Abstract

In the present work, the development of multi-syringe flow injection system with in-line pre-concentration for spectrophotometric determination of total phenolic compounds is described. The proposed methodology is based on the 4-aminoantipyrine reaction.

In line pre-concentration resorting to solid phase extraction using Amberlite XAD-4 resin was implemented, offering an environmentally benign alternative to organic solvent extraction performed in batch procedure and in previously described flow methodologies. Hence, phenolic compounds were retained in the solid phase resin using acidic conditions. The elution was carried out using an alkaline solution, that promoted the ionisation of the retained phenolic compounds and, consequently, their desorption.

Since different elution profiles were obtained for several phenol derivatives, the calibration curves were established using peak area as analytical signal instead of peak height. Moreover, a dynamic calibration range was applied by using a variable sample volume (0.500-6.00 ml) and calibration curves based on the mass of phenol loaded in the pre-concentration column. This strategy allowed determination between 0.030 e 3.80 mg l⁻¹ with a determination frequency of 10-16 h⁻¹. An alternative methodology, based on a fixed sample volume (24.0 ml) was also proposed for determination at concentration levels below 50 µg l⁻¹, without changes in the manifold. The application of the proposed methodology to reference material provided results within the certified acceptance limits.

Organização da dissertação

A presente dissertação encontra-se organizada em quatro capítulos.

No capítulo 1 é referida a ocorrência de compostos fenólicos no ambiente bem como as metodologias existentes para a sua determinação, com particular destaque para reacção da 4-aminoantipirina. É feita também uma revisão das metodologias de fluxo com pré-concentração para a determinação em causa. É ainda apresentada a técnica de fluxo utilizada – MSFIA – bem como as suas aplicações que incorporam etapas de pré-concentração.

O capítulo 2 compreende os aspectos de natureza experimental, descrevendo os procedimentos adoptados na preparação de soluções utilizadas nos processos analíticos, além do equipamento e material laboratorial utilizado nos procedimentos correntes e na concepção da montagem de fluxo. Este capítulo descreve também os parâmetros utilizados na avaliação da metodologia proposta.

No capítulo 3 são apresentados os resultados obtidos durante o desenvolvimento do sistema. Deste modo são discutidas as características da nova metodologia, bem como a aplicação da mesma à análise de amostras de água. São ainda apresentados os resultados da análise de materiais certificados e ensaios de recuperação.

No capítulo 4 são resumidas as características da nova metodologia e estabelecem-se as novas contribuições para as metodologias automáticas em fluxo contínuo bem como para a implementação de processos analíticos ambientalmente mais favoráveis.

1.

INTRODUÇÃO

1.1. Ocorrência de compostos fenólicos no ambiente

Os compostos fenólicos são definidos como derivados hidroxilados do benzeno e do seu núcleo condensado (Vollhardt e Schore, 1994). Segundo Fellenberg (1980), estes compostos constituem um importante grupo de poluentes, podendo ser encontrados nas águas residuais de diferentes ramos da indústria química e petroquímica e da indústria farmacêutica. O mesmo autor referencia um elevado grau de toxicidade para os humanos, para os peixes bem como para outras formas de vida aquática, em virtude da desnaturação das proteínas por parte destes compostos, resultando numa inactivação biológica destas moléculas essenciais à vida.

Os fenóis possuem características organolépticas extremamente intensas, sendo responsáveis pelos desagradáveis odores e sabores que podem aparecer nas águas e peixe de determinadas zonas poluídas. Estes efeitos indesejáveis são causados por concentrações muito baixas destes compostos, na ordem de $1 \mu\text{g l}^{-1}$ (Fellenberg, 1980).

Na classificação proposta por Tebbutt (1998) para os constituintes da água os compostos fenólicos são descritos como "substâncias indesejáveis quando presentes em quantidades excessivas". Este grupo inclui uma ampla variedade de substâncias, das quais algumas podem ser directamente nocivas caso estejam presentes em elevadas concentrações, outras podem produzir sabores e odores indesejáveis enquanto que as restantes podem não causar problemas por si só mas são indicadores de poluição aquática.

1.2. Metodologias utilizadas na determinação de compostos fenólicos

São várias as técnicas analíticas utilizadas para a determinação de compostos fenólicos, nomeadamente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e electrofórese capilar (EC), combinadas com a detecção ultravioleta (UV), por fluorescência, espectroscopia de massa ou electroquímica, sendo que esta última forma de detecção pode ser associada também à cromatografia iónica (IC). Também a cromatografia gasosa (GC), após derivatização dos fenóis, é uma ferramenta utilizada na determinação, recorrendo à detecção por ionização em chama (FID), captura electrónica (ECD), espectroscopia de massa (MS) ou espectroscopia de emissão atómica em plasma induzido por microondas (MIP-AES). Contudo, nenhuma destas técnicas ou combinações de técnicas referenciadas possibilita a análise directa de amostras de água para consumo humano, sendo necessária uma etapa de pré-concentração da amostra para que seja possível a determinação (Rodríguez *et al.*, 2000).

Embora estas técnicas permitam quantificar de uma forma conveniente o conteúdo fenólico de forma total ou individual presente nas águas das mais diversas origens, elas são dispendiosas (elevado custo por análise), além de necessitarem de mão-de-obra altamente especializada. Estes factores explicam a grande aceitação da determinação colorimétrica de compostos fenólicos através da reacção da 4-aminoantipirina, que possibilita um baixo custo por análise e permite determinar as concentrações alvo da legislação em vigor, constituindo, em Portugal, metodologia de referência para a determinação destes compostos em águas doces superficiais destinadas à produção de água para consumo humano e também em águas balneares (Decreto – Lei 236 / 98, 1998; Decreto – Lei 243 / 2001, 2001).

1.2.1. O método da 4-aminoantipirina

A determinação de compostos fenólicos em águas compreende uma reacção colorimétrica que envolve a condensação oxidativa da 4-aminoantipirina com os compostos fenólicos em meio básico (Emerson, 1943), conforme representado na figura 1.1.

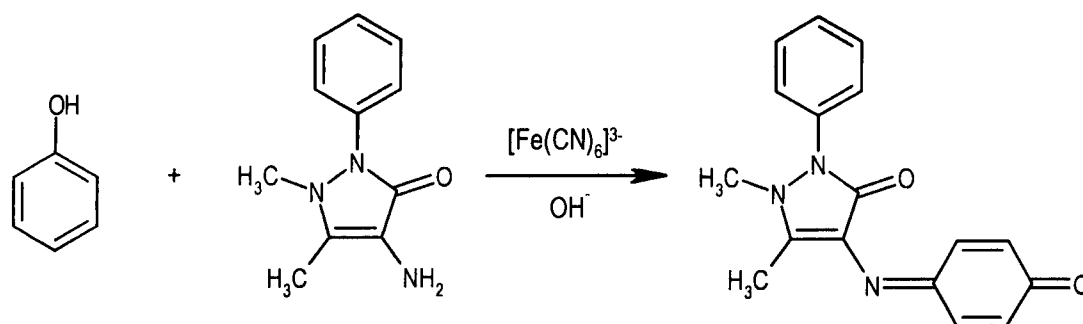


Figura 1.1. Representação da condensação oxidativa do fenol com a 4-aminoantipirina e consequente formação de um derivado corado.

A descoberta desta reacção resultou de observações oriundas de uma reacção semelhante em que estavam envolvidas aminas aromáticas. Porém, a reacção que se desencadeia com os compostos fenólicos pressupõe condições distintas, já que esta condensação das aminas aromáticas com a 4-aminoantipirina necessita de um meio reaccional de carácter ácido (Eisenstaedt, 1938).

Na primeira descrição desta reacção, Emerson (1943) utiliza como agente oxidante o hexacianoferrato(III) de potássio, além do hidrogenocarbonato de potássio para ajustar o pH do meio. São também apresentadas, de uma forma qualitativa, as reactividades de vários compostos fenólicos relativamente ao fenol. Desta forma são características desta reacção:

- a existência de um grupo hidroxilo livre no composto fenólico para que ocorra desenvolvimento de cor;
- a presença de substituintes na posição *para* em relação ao grupo hidroxilo impede a ocorrência da reacção, com as seguintes excepções: halogénios, carboxilo, ácido sulfónico, hidroxilo e metoxilo;
- um grupo nitro na posição *orto* inibe a reacção enquanto que o mesmo grupo na posição *meta* ocasiona uma inibição parcial;
- a ligação da 4-aminoantipirina ao composto fenólico tem lugar na posição *para*.

Estas limitações de ordem química resultam na formação de derivados corados com valores de coeficiente de extinção molar e máximos de absorção a comprimentos de onda distintos, ou mesmo na ausência parcial ou total de reactividade nos casos mencionados anteriormente. Deste modo, o uso desta reacção permite o estabelecimento de um índice de compostos fenólicos na amostra, utilizando o fenol como composto de referência.

O pH e o sistema tampão que servem de suporte à reacção são variáveis essenciais para que a formação do composto corado ocorra de uma forma rápida e suficientemente extensa. O controlo do pH da reacção assume um papel essencial no método, uma vez que esta reacção ocorre entre a 4-aminoantipirina e as aminas aromáticas quando o meio reaccional é ácido (Eisenstaedt, 1938) e com os fenóis quando é básico (Emerson, 1943). Sendo a 4-aminoantipirina uma amina aromática existe o risco de reacção entre moléculas deste composto quando a alcalinidade não é suficiente, com a consequente formação de um derivado corado proveniente do próprio reagente.

Esta metodologia é susceptível, para além das aminas aromáticas, a interferências relacionadas com substâncias redutoras ou oxidantes (Clesceri *et al.*, 1998). Com o objectivo de eliminar os possíveis interferentes não voláteis a metodologia de referência da American Public Health Association (Clesceri *et al.*, 1998) recomenda uma destilação prévia à análise da amostra. Alguns autores debruçaram-se sobre este procedimento prévio à análise uma vez que ele pode condicionar fortemente a determinação.

Norwitz e Keliher (1980) estudaram o efeito da acidez e alcalinidade no processo de destilação com o objectivo de remover as aminas aromáticas e o formaldeído das amostras. Estes autores propõem a destilação em meio ácido fortemente ácido (pH inferior a 2,5) como forma de eliminar convenientemente as aminas aromáticas durante a destilação. Contudo, nesta família de compostos nem todos interferem nas mesmas proporções. A anilina é o principal interferente deste grupo enquanto que as anilinas substituídas na posição *para*, as cloroanilinas e as nitroanilinas apresentam graus de interferência substancialmente inferiores. Quanto ao formaldeído, este tem a capacidade de reagir com o fenol, podendo, dessa forma, diminuir a formação de cor. A destilação não elimina esta substância, sendo proposto, para eliminação de pequenas quantidades deste interferente, um tratamento da amostra com sulfato de amónio e hidróxido de sódio.

Por sua vez, Farino *et al.* (1981) estudaram o comportamento perante o processo de destilação de vários compostos fenólicos, fazendo a sua determinação através método da 4-aminoantipirina. Estes autores avaliaram as recuperações obtidas com e sem destilação prévia à análise concluindo que, em muitos dos compostos analisados, as recuperações

obtidas após destilação apresentavam valores sistematicamente mais baixos, indicativo que a destilação dos derivados fenólicos não é quantitativa.

Outros dos interferentes mais comuns e problemáticos são os sulfuretos, presentes sobretudo nas águas residuais e eliminados também por via da destilação. Gordon (1960) propõe um processo alternativo à destilação para a remoção dos sulfuretos, com o objectivo de eliminar possíveis perdas de compostos fenólicos que possam ocorrer durante essa operação. O procedimento experimental proposto consiste na precipitação desta espécie com nitrato de prata e posterior precipitação do excesso de catião prata com cloreto de sódio. Os resultados analíticos obtidos através deste processo foram superiores aos obtidos através do tratamento da amostra pela destilação. Embora sendo um processo mais rápido, a precipitação dos sulfuretos necessita de um grande consumo de reagentes, além de exigir um procedimento experimental bastante complexo. Actualmente, o processo comum de eliminação destes compostos consiste na acidificação (pH 4) e agitação da amostra, que possibilita a remoção do sulfureto de hidrogénio (H_2S) e do dióxido de enxofre (SO_2), podendo ser complementado pela destilação (Clesceri *et al.*, 1998).

1.3. Metodologias automáticas de fluxo com pré-concentração para a determinação de compostos fenólicos

Estão referenciadas na literatura várias metodologias de fluxo contínuo com pré-concentração em linha para determinação de compostos fenólicos. Foram propostas diversas montagens recorrendo à pré-concentração baseada na extracção em fase sólida e/ou extracção líquido-

líquido. A maior parte dos sistemas propostos é baseada na análise por injeção em fluxo (FIA), existindo também um sistema fundamentado na análise por injeção sequencial (SIA), além de um outro baseado em multi-seringa (MSFIA). Na tabela 1.1 estão descritas as principais características dos diferentes sistemas propostos.

A condensação oxidativa dos compostos fenólicos com a 4-aminoantipirina em meio básico com formação de derivados corados é a metodologia mais utilizada para esta determinação (Frenzel e Krekler, 1995; Zhi *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1997; Erxleben *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2003; Miró e Frenzel, 2004). Foi também utilizada a quimioluminescência para a determinação de compostos fenólicos, através da oxidação destas espécies com ião permanganato em meio ácido (Michalowski *et al.*, 2000).

No que respeita ao sistema de detecção, a espectrofotometria de absorção molecular é utilizada na maior parte dos trabalhos descritos, uma vez que para além da medição das propriedades colorimétricas dos produtos da reacção da 4-aminoantipirina foram propostas outras utilizações das propriedades ópticas dos compostos fenólicos. Rama *et al.* (2003) procederam à análise individual de cada um dos compostos fenólicos estudados baseando a detecção dos mesmos no comprimento de onda de absorção máximo na zona ultravioleta. No caso das determinações de clorofenóis e nitrofenóis (Navarro-Villoslada *et al.*, 1995; Cladera *et al.*, 2000 e Miró *et al.*, 2001) os autores optaram pela análise multicomponente do espectro de absorção molecular. O intervalo de comprimentos de onda utilizado foi de 200 a 430 nm no caso dos clorofenóis (Navarro-Villoslada *et al.*, 1995). Para a análise do 2-, 3- e 4-nitrofenol os intervalos compreendidos entre 320 e 600 nm (Cladera *et al.*, 2000) e entre 290 e 600 nm (Miró *et al.*, 2001) foram os adoptados.

Tabela 1.1. Quadro resumo das diversas metodologias de fluxo com pré-concentração para determinação de compostos fenólicos.

Análito(s)	Tipo de sistema	Metodologia	Pré-concentração	Intervalo de aplicação	Ritmo de determinação/h ⁻¹	DPR / %	Referência
Clorofenóis	FIA	Análise multicomponente do espectro de absorção molecular entre 200 e 430 nm	Extração em fase sólida recorrendo à resina Amberlite XAD-4	0 - 200 µg l ⁻¹	nd	nd	Navarro-Villoslada et al., 1995
Compostos fenólicos totais	FIA	Quantificação do produto da reacção com a 4-aminoantipirina por EAM	Extração em fase sólida recorrendo à resina Amberlite XAD-4	0,01 - 1 mg l ⁻¹	12	2,4	Song et al., 1997
Compostos fenólicos totais	FIA	Quantificação do produto da reacção com a 4-aminoantipirina por EAM	Extração em fase sólida recorrendo à resina Amberlite XAD-4 e extração líquido-líquido com clorofórmio	0,5 - 60 µg l ⁻¹	8	2,7	Zhi et al., 1996
Compostos fenólicos totais	FIA	Quantificação do produto da reacção com a 4-aminoantipirina por EAM	Extração líquido-líquido com clorofórmio	0,02 - 0,5 mg l ⁻¹	nd	< 5	Frenzel e Krekler, 1995

DPR: desvio padrão relativo; FIA: análise por injeção em fluxo; EAM: espectrofotometria de absorção molecular; nd: não disponível.

Tabela 1.1. Quadro resumo das diversas metodologias de fluxo com pré-concentração para determinação de compostos fenólicos (continuação).

Análito(s)	Tipo de sistema	Metodologia	Pré-concentração	Intervalo de aplicação	Ritmo de determinação/h ⁻¹	DPR / %	Referência
Compostos fenólicos totais	FIA	Quantificação do produto da reacção com a 4-aminoantipirina por EAM	Extração em fase sólida recorrendo à sílica modificada com cadeias de octadecilo	0,02 - 0,50 mg l ⁻¹	nd	< 5	Frenzel e Krekler, 1995
Compostos fenólicos totais	FIA	Oxidação de fencis com permanganato de potássio em meio ácido, seguido de detecção por quimiluminescência	Extração em fase sólida recorrendo à resina Amberlite XAD-4	0,01 - 0,08 mg l ⁻¹	12	0,5	Michalowski et al., 2000
Compostos fenólicos totais	FIA	Quantificação do produto da reacção com a 4-aminoantipirina por EAM	Extração líquido-líquido com cloroformio através de célula cromatomebranar	20 - 200 µg l ⁻¹	nd	nd	Erleben et al., 2001
Compostos fenólicos totais	FC	Quantificação do produto da reacção com a 4-aminoantipirina por EAM	Extração líquido-líquido com etanol após formação de filme em tubo de PTFE	nd	nd	2,1	Jin et al., 2003

DPR: desvio padrão relativo; FIA: análise por injeção em fluxo; FC: fluxo contínuo; EAM: espectrofotometria de absorção molecular; nd: não disponível.

Tabela 1.1. Quadro resumo das diversas metodologias de fluxo com pré-concentração para determinação de compostos fenólicos (continuação).

Análito(s)	Tipo de sistema	Metodologia	Pré-concentração	Intervalo de aplicação	Ritmo de determinação/h ⁻¹	DPR / %	Referência
Compostos fenólicos totais	FIA	Quantificação do produto da reacção com a 4-aminoantipirina por EAM	Extração em fase sólida recorrendo à sílica modificada com cadeias de octadecilo	5 - 500 µg l ⁻¹	nd	2,8	Miró e Frenzel, 2004
Compostos fenólicos individuais (1-naftol, 2-naftol, fenol, 3-4 dimetilfenol, 3,4-diclorofenol)	FIA	Quantificação directa através do máximo de absorção UV por EAM	Extração em fase sólida recorrendo à resina Sephadex QAE-25	entre 0,1 e 100 µg l ⁻¹	19 - 39	≤ 3,2	Rama <i>et al.</i> , 2003
Nitrofenóis (2-, 3- e 4-nitrofenol)	SIA	Análise multicomponente do espectro de absorção molecular entre 320 e 600 nm	Recuperação em NaOH após extração líquido-líquido a partir do filme de 1-clorobutano:1-octanol formado em tubo de PTFE	entre 0,4 e 938 mg l ⁻¹	4	≤ 2,3	Cladera <i>et al.</i> , 2000

FIA: análise por injeção em fluxo; SIA: análise por injeção sequencial; EAM: espectrofotometria de absorção molecular; nd: não disponível.

Tabela 1.1. Quadro resumo das diversas metodologias de fluxo com pré-concentração para determinação de compostos fenólicos (continuação).

Análito(s)	Tipo de sistema	Metodologia	Pré-concentração	Intervalo de aplicação	Ritmo de determinação/h ⁻¹	DPR / %	Referência
Nitrofenóis (2-, 3- e 4-nitrofenol)	MSFIA	Análise multicomponente do espectro de absorção molecular entre 290 e 600 nm	Recuperação em NaOH após extração líquido-líquido a partir do filme de 1-clorobutano:1-octanol formado em tubo de PTFE	entre 0,4 e 110 µmol l ⁻¹	11	≤3,9	Miró <i>et al.</i> , 2001

DPR: desvio padrão relativo; MSFIA: análise por injeção em fluxo em multi-seringa.

A resina macroporosa polimérica Amberlite XAD-4 é o adsorvente de eleição para a retenção de compostos fenólicos (Navarro-Villoslada *et al.*, 1995; Zhi *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1997; Michalowski *et al.*, 2001). Zhi *et al.* (1996) e Navarro-Villoslada *et al.* (1995) incluem, nos seus dispositivos de pré-concentração, a resina Amberlite XAD-4 comercial, embora os primeiros considerem a extracção em fase sólida insuficiente para os objectivos pretendidos (determinação de compostos fenólicos em águas e lixiviados de solos) e associem uma extracção líquido-líquido com clorofórmio ao processo analítico. Com o objectivo de eliminar as extracções com solventes orgânicos, Song *et al.* (1997) e Michalowski *et al.* (2001), utilizaram o adsorvente em partículas de dimensões inferiores às do produto comercial com o intuito de aumentar a área específica total do adsorvente, proporcionando, deste modo, eficiências mais elevadas no processo de pré-concentração.

Frenzel e Krekler (1995) propuseram duas metodologias de fluxo, uma com a concentração das iminas formadas pela reacção dos compostos fenólicos com a 4-aminoantipirina através da extracção com clorofórmio e uma outra baseada na retenção dos produtos reaccionais em sílica modificada com grupos octadecilo, contida numa microcoluna. Neste caso são propostas duas estratégias baseadas na detecção espectrofotométrica. A primeira compreende a eluição dos compostos retidos com metanol e posterior medição do produto corado concentrado enquanto que a segunda pressupõe a medição directa das propriedades colorimétricas dos compostos corados retidos no adsorvente ("optosensing") seguida da passagem de metanol para assegurar a remoção dos mesmos. Este último conceito foi retomado por Miró e Frenzel (2004) que propõem um sensor óptico de configuração microtubular com uma fase adsorvente constituída por gel de sílica contendo grupos octadecilo integrado num sistema de fluxo. Esta metodologia teve como objectivo a

concentração de produtos reaccionais passíveis de determinação espectrofotométrica, sendo aplicada à análise de vários parâmetros analíticos em amostras ambientais, incluindo os compostos fenólicos através da reacção da 4-aminoantipirina. Neste último caso a medição foi efectuada exclusivamente no adsorvente hidrofóbico, sendo os derivados corados eluídos posteriormente com metanol.

Rama *et al.* (2003) descreveram um sistema com princípios semelhantes aos propostos por Frenzel e Krekler (1995) e Miró e Frenzel (2004). Contudo, estes autores propõem uma determinação directa através do máximo de absorção ultravioleta dos diferentes compostos com a retenção temporária dos analitos numa resina de troca aniónica (Sephadex QAE A-25). Para que este fenómeno seja possível os analitos estudados (1-naftol, 2-naftol, fenol, 3,4-dimetilfenol e 3,4-diclorofenol) são transportados por uma solução fortemente alcalina (pH 12) com a força iónica ajustada. Segundo os autores, esta solução transportadora cumpre também a função de eluente, assegurando a limpeza do adsorvente sem necessidade de qualquer etapa analítica ou solvente orgânico adicional e, proporcionando, deste modo, um ritmo de determinação mais elevado.

A extracção líquido-líquido foi utilizada em diversos sistemas como forma de concentrar os analitos (Cladera *et al.*, 2000; Miró *et al.*, 2001) ou os produtos da reacção entre os compostos fenólicos e a 4-aminoantipirina (Frenzel e Krekler, 1995; Zhi *et al.*, 1996; Erxbelen *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2003).

Os trabalhos de Cladera *et al.* (2000) e Miró *et al.* (2001) baseiam-se na pré-concentração dos nitrofenóis (2- 3- e 4-nitrofenol) a partir da formação de um filme de solvente orgânico no interior do sistema de fluxo. A formação deste filme é possível devido à diferença de

velocidade existente entre a fase aquosa e a fase orgânica quando aspiradas sequencialmente através de um tubo de politetrafluoretileno (PTFE). Esta diferença é o resultado de interações hidrofóbicas (Van der Waals) entre o solvente orgânico e a superfície interna das paredes do tubo, resultando na formação de uma fina camada de revestimento no interior do mesmo. Após extracção dos analitos com hidróxido de sódio, esta camada orgânica é retirada com um outro solvente orgânico enquanto que o extracto obtido é analisado directamente através do espectro de absorção molecular. Jin *et al.* (2003) utilizaram uma estratégia semelhante visando a concentração em linha dos compostos corados resultantes da reacção da 4-aminoantipirina. Neste caso, os produtos reaccionais formados eram depositados na superfície interna da tubagem e eluidos posteriormente da mesma com etanol, sendo detectados espectrofotometricamente a 510 nm.

Frenzel e Krekler (1995) e Zhi *et al.* (1996) utilizaram também a extracção líquido-líquido. Nestes casos os produtos resultantes da reacção de desenvolvimento de cor foram misturados com o solvente extractor (clorofórmio) num tubo de extracção incluído na montagem. As duas fases misturadas foram separadas, através das diferentes densidades, num separador de fases membranar. A fase orgânica foi posteriormente conduzida ao detector para medição da respectiva absorvância. Por sua vez, Erxbelen *et al.* (2001) propõem a extracção das iminas formadas pela reacção da 4-aminoantipirina com os fenóis através da utilização de um dispositivo extractor designado célula cromatomembranar. Este dispositivo, constituído por PTFE incluía microporos (0,1 - 0,5 μm) e macroporos (250 - 500 μm), que possibilitavam a passagem selectiva da fase orgânica e aquosa, respectivamente, atendendo a que a pressão capilar dos líquidos polares prevenia a sua penetração nos microporos. Para este caso específico a fase aquosa fluía a um caudal constante enquanto

que a fase orgânica se encontrava estacionária, estabelecendo-se uma partição entre estas. Após a extracção, a fase orgânica era encaminhada para o detector, sendo medida a respectiva absorvância, enquanto que a fase aquosa permanecia parada.

1.4. Análise por injeção em fluxo baseada em multi-seringa (MSFIA)

A análise por injeção em fluxo baseada em multi-seringa (MSFIA), introduzida por Cerdà *et al.* (1999) é uma das mais recentes abordagens às técnicas de gestão de fluidos na área da automatização laboratorial. O seu desenvolvimento procurou juntar a robustez da técnica SIA associada a bombas de pistão, às vantagens da técnica FIA, resultando na eliminação da utilização das bombas peristálticas e consequentemente dos tubos de impulsão. Estes tubos, constituídos por material polimérico, apresentam elevado desgaste quando usados com ácidos e bases concentradas bem como com solventes orgânicos, obrigando a substituições frequentes e também a calibrações periódicas dos sistemas (Cerdà *et al.*, 1999; Miró *et al.*, 2002).

O elemento base desta técnica de fluxo é a bureta multi-seringa, fabricada pela empresa Crison. Trata-se de uma bomba de pistão multi-canal que permite a movimentação simultânea dos êmbolos de quatro seringas, cujas capacidades podem variar entre 0,5 e 25 ml. Todas as seringas estão ligadas a uma barra movimentada pelo motor de uma bureta automática, controlado a partir de um computador através de uma porta série. Junto à saída de cada seringa está acoplada uma válvula solenóide de três vias, enquanto que na extremidade oposta se encontra o êmbolo responsável pelos movimentos de aspiração /

propulsão das soluções. Estas válvulas determinam a ligação das seringas à restante montagem analítica ou ao reservatório das soluções, consoante se encontram na posição "On" ou "Off", independentemente do sentido do movimento assumido pelo êmbolo (aspiração ou propulsão). O diagrama apresentado na figura 1.2 representa esquematicamente a bureta multi-seringa.

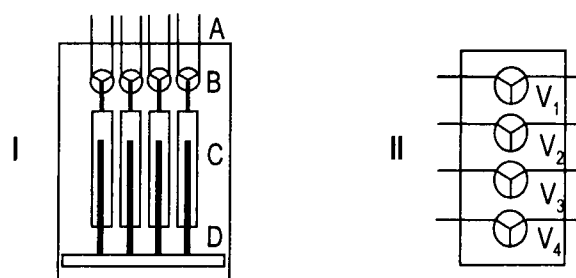


Figura 1.2. Representação esquemática da multi-seringa. I – esquema frontal: A, tubos; B, válvulas solenóides (V_1 - V_4); C, seringas; D, barra condutora dos pistões. II – esquema simplificado.

Outra vantagem deste dispositivo relativamente aos utilizados em outras técnicas de fluxo diz respeito aos materiais que o compõe. As extremidades dos êmbolos bem como os dispositivos de ligação da seringa ao sistema são, tal como as restantes tubagens, constituídas por PTFE, o que permite a utilização de soluções fortemente agressivas bem como de solventes orgânicos, uma vez que os líquidos utilizados contactam exclusivamente com materiais resistentes: o vidro das seringas e o PTFE das tubagens e revestimentos.

A utilização de seringas com diferentes volumes, associada ao número de passos do motor da bureta, possibilita a existência de um largo intervalo de caudais e volumes passíveis de utilização. A esta versatilidade no que respeita aos caudais está associada uma elevada

precisão na dispensa dos volumes de reagentes e amostra seleccionados. As versões mais recentes deste equipamento permitem a existência na montagem analítica de válvulas solenóides adicionais (Cerdà, 2003), possibilitando a criação de uma rede de fluxo onde a gestão de fluidos pode ser efectuada de modo semelhante à descrita para a multi-comutação (Reis *et al.*, 1994).

São várias as vantagens dos sistemas de fluxo baseados em multi-seringa relativamente a outras técnicas de fluxo, nomeadamente à FIA e à SIA. Em MSFIA os consumos de reagente são menores uma vez que estes apenas são introduzidos na rede de fluxo quando são necessários, retornando ao reservatório nas restantes situações, contrariamente ao que ocorre em sistemas FIA onde existe um fluxo constante dos reagentes. Por outro lado a manipulação das soluções pode ocorrer simultaneamente nos quatro canais, o que se poderá traduzir em ritmos de determinação superiores dos sistemas MSFIA relativamente aos seus congéneres SIA (Segundo e Rangel, 2002). Uma vez que os segmentos de amostra e reagentes podem ser enviados simultaneamente através de confluências em forma de T ou Y, existe uma transferência de massa radial facilitada entre as diferentes zonas em contacto. Isto constitui outra vantagem importante relativamente à técnica SIA, em que a transferência de massa é predominantemente axial, traduzindo-se num rendimento superior da reacção química em MSFIA quando são utilizados reactores com as mesmas dimensões (Miró *et al.*, 2002).

A introdução da amostra nos sistemas MSFIA não é feita através de uma das seringas do bloco multi-seringa uma vez que tal procedimento conduziria a uma contaminação entre amostras consecutivas ("carryover", em inglês). Sendo um dos pressupostos das técnicas de

fluxo a inserção repetível do volume de amostra no sistema, duas estratégias distintas podem ser usadas em MSFIA. Uma delas é baseada no volume interno de uma alça de injeção (Albertús *et al.*, 1999) enquanto que no outro caso o volume é definido pela relação tempo / caudal (Albertús *et al.*, 2001).

Actualmente estão publicados cerca de 20 artigos científicos que descrevem diversas aplicações de sistemas baseados em multi-seringa. A maior parte destas publicações abrange determinações de diversos parâmetros de interesse ambiental, geralmente águas naturais ou residuais. As metodologias descritas incorporam os mais diversos meios de detecção: espectrofotometria UV/VIS (Albertús *et al.*, 1999; Segundo *et al.*, 2000; Albertús *et al.*, 2000; Albertús *et al.*, 2001; Miró *et al.*, 2001; Pons *et al.*, 2004), fluorimetria (Armas *et al.*, 2002a; Armas *et al.*, 2002b), potenciometria (Andrade-Eiroa *et al.*, 2002), quimioluminescência (Pizà *et al.*, 2002; Pizà *et al.*, 2004; Morais *et al.*, 2004 e Manera *et al.*, 2004) e espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (Semenova *et al.*, 2002; Semenova *et al.*, 2003).

1.4.1. Incorporação da pré-concentração em MSFIA

A utilização de etapas de pré-concentração em MSFIA foi já aplicada a diferentes determinações, constituindo assunto de uma série de recentes publicações.

Para além do sistema proposto por Miró *et al.* (2001), descrito na secção 1.3, não existe, até ao momento, mais nenhuma referência na literatura no que respeita a sistemas baseados em multi-seringa que utilizem a extracção líquido-líquido como ferramenta de pré-concentração.

Todos os restantes sistemas referenciados na literatura utilizam a extracção em fase sólida para procederem à pré-concentração dos analitos.

Armas *et al.* (2002b) descreveram a determinação espectrofluorimétrica da substância activa anticoagulante varfarina em águas. Nesta metodologia o analito foi retido numa coluna de pré-concentração cuja fase sólida era constituída por gel de sílica com cadeias de octadecilo, sendo posteriormente eluído com sulfóxido de dimetilo contendo monómeros de cloreto de cetiltrimetilamónio. A utilização da pré-concentração em fase sólida permitiu ainda a aplicação da calibração em massa, baseada na relação entre o sinal analítico obtido e a massa de analito que passava na coluna de pré-concentração. Deste modo, a determinação foi possível no intervalo de concentrações compreendido entre 50 ng l⁻¹ e 64 µg l⁻¹, para volumes de amostra compreendidos entre 0,2 e 12 ml.

Morais *et al.* (2004) associaram o conceito da multi-seringa à multicomutação para desenvolver um sensor óptico para determinação do ortofosfato em águas. Para proceder à determinação foi necessária a derivatização do analito. Esta decorreu durante o ciclo analítico e resultou da reacção do ortofosfato com o molibdato de amónio na presença do vanadato, resultando na formação de um heteropoliácido. Este derivado foi posteriormente retido na fase sólida constituída pelo co-polímero N-vinilpirrolidona / divinilbenzeno que se encontrava encerrada na célula de fluxo em forma de espiral, localizada diante da janela de um tubo fotomultiplicador. O composto adsorvido, resultante da derivatização em linha, possui a capacidade de oxidar o luminol entretanto enviado para junto da fase sólida, originando, deste modo, o fenómeno de quimioluminescência responsável pelo sinal analítico. A metodologia

proposta possibilitou a determinação do analito em águas de diversas origens no intervalo de concentrações compreendido entre 5 e 50 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Um sistema baseado em multi-seringa para a determinação do elemento estrôncio na sua forma estável e radioactiva em amostras de interesse ambiental foi proposto por Fajardo *et al.* (2004). Este sistema possibilitou a pré-concentração da amostra em estudo através da retenção do estrôncio numa resina adsorvente comercial específica para o referido elemento. Após a eluição do analito, a fracção eluída foi analisada de duas formas distintas: por espectrometria de emissão atómica em plasma acoplado indutivamente (ICP - AES), para determinação do estrôncio na sua forma estável, ou através de um contador, para determinar a actividade beta da sua forma radioactiva. Embora esta aplicação baseada em multi-seringa não permita a detecção em linha, ela demonstra a potencialidade das metodologias automáticas na análise de materiais perigosos, uma vez que elimina a manipulação da amostra por parte do operador, criando assim uma segurança acrescida na determinação.

Pons *et al.* (2004) apresentaram um sistema automatizado para determinação espectrofotométrica do catião ferro (III), após reacção de desenvolvimento de cor entre o ferro (III) e o tiocianato de amónio. A quantidade total de ferro pode ser determinada após oxidação do catião ferro (II), recorrendo à adição em linha de peróxido de hidrogénio. Este sistema possui a capacidade de decidir qual a melhor estratégia para quantificar o analito, podendo, consoante os casos, proceder à análise directa da amostra ou determinar a execução de uma etapa de pré-concentração através da retenção do ferro num adsorvente polimérico constituído por cadeias de estireno-divinilbenzeno com ligações cruzadas entre si às quais se encontram ligadas cadeias de ácido iminodiacético, responsáveis pelo processo de adsorção.

A versatilidade do sistema torna possível a determinação utilizando um intervalo alargado de volumes de amostra. Deste modo, com a etapa de pré-concentração, foi possível determinar massas de ferro (III) compreendidas entre 0,019 e 4 μg , contidas em volumes de amostra compreendidos entre 1,5 e 30 ml. A amostra pôde ainda ser analisada directamente, sem recurso à etapa de pré-concentração, no caso de possuir uma concentração de analito entre 0,1 e 20 mg l^{-1} .

Estes trabalhos evidenciam as mais valias introduzidas pela incorporação da operação de pré-concentração em sistemas MSFIA. Desta forma, sendo objecto do presente trabalho o desenvolvimento de uma metodologia automática para a determinação de compostos fenólicos em águas, a associação MSFIA – pré-concentração demonstra ser adequada ao fim pretendido.

2.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes e soluções

Na preparação de soluções foi utilizada água desionizada com resistividade superior a 18 M Ω cm, obtida a partir de um sistema Milli Q (Millipore). Todos os reagentes usados eram de qualidade analítica ou equivalente, não tendo sido realizado qualquer tratamento de purificação adicional.

O material de vidro utilizado na preparação de soluções de concentração rigorosa era de classe A ou equivalente, convenientemente lavado.

Todas as pesagens de reagentes sólidos foram efectuadas numa balança analítica (modelo AG 285, Mettler Toledo).

As soluções tampão utilizadas neste trabalho foram obtidas por dissolução de ácido bórico (Merck), hidrogenocarbonato de sódio (Merck) e / ou cloreto de amónio (Merck) em água. O ajuste do pH destas soluções foi efectuado pela adição de uma solução de hidróxido de sódio (Merck) de concentração aproximada de 5 mol l⁻¹, obtida pela dissolução deste composto em água.

A solução de 4-aminoantipirina (Sigma) 0,500 g l⁻¹ foi preparada, diariamente, pela dissolução do reagente na solução tampão previamente ajustada a pH 8,0. Quanto ao agente oxidante, hexacianoferrato(III) de potássio, a solução utilizada, com uma concentração de 1,50 g l⁻¹, foi preparada semanalmente, através da dissolução do sal em água.

A solução transportadora, também utilizada para regeneração da coluna de pré-concentração foi obtida por diluição de uma solução comercial concentrada (d = 1,18, 37 % m/m, Panreac), resultando numa solução de ácido clorídrico com a concentração de 0,010 mol l⁻¹. A eluição

da coluna foi efectuada por uma solução de hidróxido de sódio com uma concentração de 0,10 mol l⁻¹.

As soluções padrão de fenol (Sigma) foram obtidas, diariamente, por diluição rigorosa em ácido clorídrico 0,010 mol l⁻¹ a partir de uma solução mãe do mesmo composto com a concentração de 1,000 g l⁻¹, obtida através da pesagem do composto e respectiva dissolução em água. A frequência da preparação da solução mãe padrão foi semanal. Este mesmo procedimento foi seguido quando foram efectuadas curvas de calibração com os seguintes compostos fenólicos: 2-clorofenol (Aldrich), 3-clorofenol (Aldrich), 1-naftol (Aldrich), 2-nitrofenol (Aldrich), o-cresol (Aldrich) e m-cresol (Fluka). A dissolução do 1-naftol em água foi efectuada a partir de uma dissolução prévia do sólido em algumas gotas de uma solução de hidróxido de sódio com uma concentração aproximada de 5 mol l⁻¹.

Para a avaliação de potenciais interferentes foram utilizadas soluções padrão de fenol com uma concentração de 0,500 mg l⁻¹ que incluíam, além do fenol, a espécie potencialmente interferente em concentrações até 750 mg l⁻¹. Estas soluções foram preparadas a partir de uma solução inicial da espécie interferente com uma concentração de 1000 mg l⁻¹, obtidas pela dissolução em água de sulfito de sódio (Merck), nitrito de sódio (Riedel-de-Haën), sulfureto de sódio (Riedel-de-Haën), hipoclorito de sódio (Aldrich) e anilina (Fluka).

O ajuste do pH das amostras (pH 2,0) foi efectuada através da adição de uma solução de ácido clorídrico comercial concentrada (d = 1,18; 37 % m/m, Panreac).

As amostras certificadas usadas (RTC – QCI-043-2 e LGC – QCI-760) foram fornecidas por LGC Promochem.

2.2. Instrumentação

Como dispositivo de gestão de fluidos foi utilizada uma multiseringa da marca Crison (modelo BU 4S) com quatro seringas (Microliter, Hamilton), com capacidades de 5,00 e 10,00 ml. As seringas são de vidro e incluem êmbolos e ligadores em PTFE. O movimento completo do êmbolo da seringa corresponde a 5000 passos, sendo que o volume correspondente a cada passo depende da seringa utilizada. Um conjunto de quatro válvulas solenóides de três vias (modelo 161T031, NResearch) assegurou uma completa selecção dos fluidos no sistema.

Como sistema de detecção foi usado um espectrofotómetro UV/Vis Jenway, modelo 6300, equipado com uma célula de fluxo Hellma (178.710-QS) com um volume de 80 µl e percurso óptico de 1 cm.

O registo dos sinais analíticos foi efectuado, em papel, através de um registador (BD 111, Kipp and Zonen). Foi efectuada também a aquisição do sinal analítico através da conversão do sinal analógico do espectrofotómetro recorrendo a uma placa PCL-818L (Advantec).

O controlo do equipamento englobado na montagem foi efectuado a partir de um computador, através da porta de comunicação RS 232. O software utilizado foi desenvolvido em Microsoft Quick Basic 4.5, permitindo um controlo, por parte do utilizador, dos dispositivos (sentido e velocidade de deslocamento do pistão da multiseringa e posição das válvulas solenóides), assim como a aquisição do sinal analítico.

As ligações entre os diferentes dispositivos da montagem foram asseguradas por tubos constituídos por PTFE (Omnifit) com um diâmetro interno de 0,8 mm, exceptuando o tubo de

armazenamento em que foi usado tubo de 1,6 mm de diâmetro interno. Os tubos de reacção (TR1 e TR2 na figura 2.1) apresentavam uma geometria helicoidal (com um diâmetro de hélice de 1 cm). Foram também utilizadas confluências de metacrilato em forma de Y.

A introdução da resina adsorvente na montagem foi possibilitada através do empacotamento das partículas numa coluna cilíndrica de metacrilato. A retenção das partículas no interior da coluna foi proporcionada por filtros da marca MoBiTec (ref. #2235), com um diâmetro de poro de 35 μm . Aos topos foram enroscados dois adaptadores que permitiam a ligação à restante montagem. No decorrer da parte experimental foram usadas colunas com diferentes comprimentos (1,5 a 5,0 cm) e diferentes diâmetros internos (2,0 a 4,0 mm) para proceder ao estudo das dimensões mais adequadas da peça para a montagem analítica em desenvolvimento.

Todas as medições de pH foram efectuadas através de um milivoltímetro (GLP 22, Crison), equipado com um eléctrodo combinado de vidro (52-02, Crison).

2.3. Utilização da resina Amberlite XAD-4

2.3.1. Redução do tamanho de partícula e armazenamento da resina

Uma porção de resina foi lavada com água e seca, em cápsula de porcelana, numa estufa a 100 °C durante 48 horas. Após este processo procedeu-se à trituração em almofariz de porcelana e tamisação recorrendo a tamises padronizados com aberturas de malha de 355, 250 e 125 μm e agitador mecânico próprio (modelo A200, Retsch), obtendo-se quatro grupos

de partículas consoante o respectivo tamanho. Desta forma, foram obtidas partículas com as seguintes dimensões: menores que 125 μm , entre 125 e 250 μm , entre 250 e 355 μm e maiores que 355 μm .

A resina foi armazenada, em suspensão, numa solução salina composta por cloreto de sódio e o carbonato de sódio com concentrações de 50 g l⁻¹ e 1 g l⁻¹ respectivamente (BDH, 1981).

2.3.2. Preparação das colunas de pré-concentração

Uma porção de resina foi transferida da solução de armazenamento para um outro recipiente onde foi preparada uma suspensão das partículas utilizando água e algumas gotas de etanol. Esta suspensão foi aspirada para o interior da cavidade tubular da coluna recorrendo ao auxílio de uma bomba peristáltica (Minipuls 2, Gilson), sendo esta operação efectuada de uma forma lenta e contínua de modo a garantir um correcto empacotamento das partículas. Após o enchimento da coluna a resina foi lavada com as seguintes soluções: água-metanol (2:1), metanol, água, ácido clorídrico 0,010 mol l⁻¹, hidróxido de sódio 0,10 mol l⁻¹ e água. Este procedimento de lavagem, proposto por Song *et al.* (1997), tem como objectivo a completa remoção de impurezas eventualmente existentes na resina. Depois deste tratamento, a coluna com o respectivo adsorvente encontrava-se pronta para uso na montagem.

2.4. Montagens e funcionamento do sistema de fluxo

Durante o desenvolvimento da metodologia automática proposta foram utilizadas duas montagens analíticas distintas. A primeira, representada na figura 2.1A possuía uma alça de injeção das soluções padrão com um volume de 100 μ l, não incluindo a coluna de pré-concentração. Este desenho visou o estudo dos parâmetros da reacção química envolvida na quantificação dos analitos tais como a composição da solução tampão, a concentração e o pH dos reagentes além das respostas relativas de vários compostos fenólicos em relação ao fenol sem pré-concentração.

A figura 2.1B representa a montagem final que inclui a coluna de pré-concentração. Utilizando esta configuração foram avaliados todos os parâmetros que envolviam esta etapa do ciclo analítico tais como as dimensões das partículas adsorventes, as dimensões da própria coluna, e as condições de carregamento da amostra / solução padrão.

Os ciclos analíticos utilizados neste trabalho encontram-se representados nas tabelas 2.1, 2.2 e 2.3. A tabela 2.1 representa o ciclo analítico utilizado na montagem representada pela figura 2.1A, que não contém a coluna de pré-concentração. Este ciclo compreende três etapas: após o enchimento parcial das seringas (etapa 1) procedeu-se ao enchimento da alça de injeção (etapa 2). Seguidamente, por inversão do sentido do fluxo, ocorre a adição dos reagentes e solução tampão à amostra e, finalmente, a detecção do produto reaccional formado com a aquisição do respectivo sinal analítico (etapa 3).

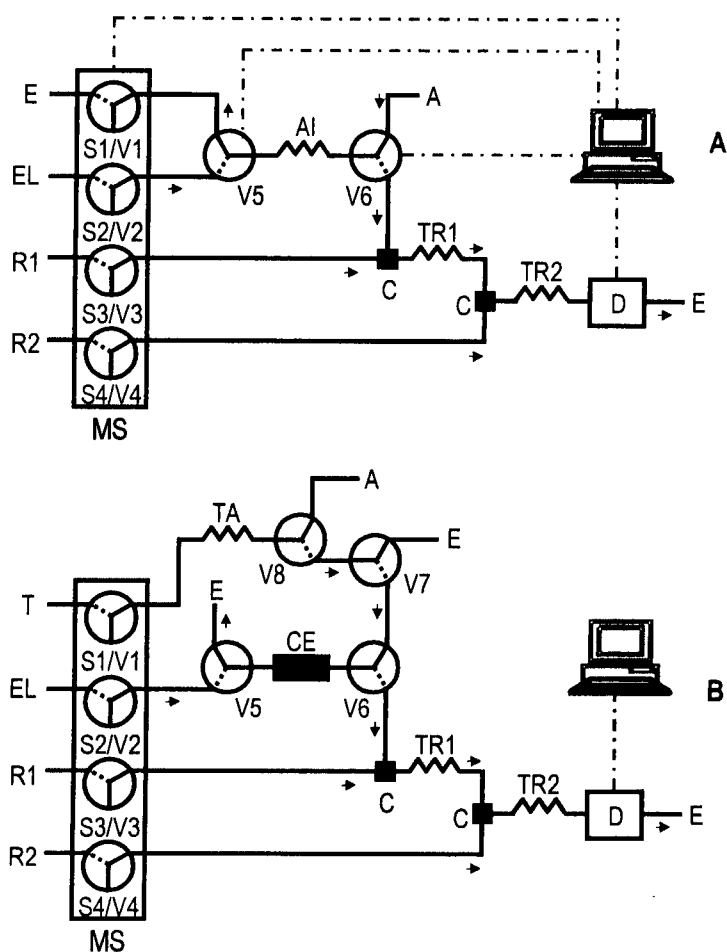


Figura 2.1. Representação esquemática das montagens analíticas utilizadas para a determinação de compostos fenólicos sem (A) e com (B) pré-concentração em linha. MS: multi-seringa, S_i : seringa, V_i : válvula solenóide na posição "ON" (traço contínuo) ou "OFF" (tracejado), D: espectrofotómetro ($\lambda = 510 \text{ nm}$), C: confluência, TR_i : tubo de reacção ($t_{TR1} = 40 \text{ cm}$ e $t_{TR2} = 100 \text{ cm}$), Al: alça de injeção, CE: coluna de pré-concentração, TA: tubo de armazenamento ($t_{TA} = 230 \text{ cm}$), EL: hidróxido de sódio $0,10 \text{ mol l}^{-1}$, T: ácido clorídrico $0,010 \text{ mol l}^{-1}$, R1: 4-aminoantipirina $0,50 \text{ g l}^{-1}$ em ácido bórico $0,124 \text{ mol l}^{-1}$ a pH 8,0, R2: hexacianoferrato(III) de potássio $1,50 \text{ g l}^{-1}$, A: amostra, E: esgoto. Por uma questão de simplicidade da representação a ligação da multi-seringa e das válvulas adicionais ao computador foram omitidas no esquema B.

O ciclo analítico adoptado para a pré-concentração e determinação dos compostos fenólicos (tabela 2.2) inclui seis etapas. Após o enchimento parcial das seringas (etapa 1), um determinado volume de amostra, compreendido entre 0,500 e 6,00 ml, foi aspirado para o tubo de armazenamento (etapa 2). Depois da inversão do sentido do fluxo e comutação das válvulas apropriadas, a amostra foi enviada através da coluna de pré-concentração, preenchida com o adsorvente (etapa 3). Durante esta etapa a retenção do analito e a remoção da matriz foram executadas sequencialmente, uma vez que a passagem do volume de amostra pela coluna de pré-concentração foi seguida pela passagem de 2,60 ml de ácido clorídrico. Após um novo enchimento das seringas (etapa 4), as espécies retidas na coluna foram eluídas por intermédio da solução de hidróxido de sódio e conduzidas ao tubo de reacção 1 (TR1). Neste ponto ocorre a mistura com a 4-aminoantipirina em solução tampão e, posteriormente, com o agente oxidante (hexacianoferrato(III) de potássio) no tubo de reacção 2 (TR2), sendo efectuada, de seguida, a detecção dos produtos reaccionais formados (etapa 5). Finalmente foi enviada através da coluna a solução de ácido clorídrico para assegurar a remoção do hidróxido de sódio remanescente (etapa 6), estando, deste modo o sistema preparado para um novo ciclo analítico.

Para volumes de amostra superiores a 6,00 ml, foi necessário recorrer às operações descritas na tabela 2.3. Desta forma, as etapas A-D foram realizadas o número de vezes necessárias antes de executar as instruções analíticas da tabela 2.2. Por exemplo, para um volume de amostra de 20,0 ml foi necessário executar o ciclo que compreende as etapas A-D três vezes (3 x 6,00 ml) e substituir o valor X da tabela 2.2 por 2000 µl.

Tabela 2.1. Ciclo analítico utilizado nas experiências sem pré-concentração da amostra. Os volumes indicados correspondem à seringa 1 (10,0 ml). "1" e "0" representam as posições "On" e "Off" das válvulas solenóides, respectivamente.

Etapa	Descrição	Posição das válvulas de comutação								Tempo / s	Caudal / ml min ⁻¹	
		1	2	3	4	5	6	7	8			
1	Enchimento das seringas	0	0	0	0	0	0	0	0	1500	6,0	15,0
2	Enchimento da alça de injeção	1	0	0	0	1	1	0	0	1000	12,0	5,0
3	Injeção da amostra (NaOH como transportador), adição dos reagentes (4-AAP em tampão e K ₃ [Fe(CN) ₆]), formação do composto corado, detecção e aquisição do sinal analítico	0	1	1	1	0	0	0	0	2500	30,0	5,0

Tabela 2.2. Ciclo analítico utilizado na determinação de compostos fenólicos em águas com pré-concentração da amostra. Os volumes indicados correspondem à seringa 1 (10,0 ml). "1" e "0" representam as posições "On" e "Off" das válvulas solenóides, respectivamente. O volume X pode assumir qualquer valor inteiro entre 500 e 6000 μl .

Posição das válvulas de comutação

Etapa	Descrição	1	2	3	4	5	6	7	8	Volume / μl	Tempo / s	Caudal / ml min^{-1}
1	Enchimento das seringas	0	0	0	0	0	0	0	0	2600	10,4	15,0
2	Aspiração da amostra para o tubo de armazenamento	1	0	0	0	0	0	0	1	X	X / 83,3	5,0
3	Envio da amostra através da coluna de pré-concentração	1	0	0	0	1	1	0	0	2600 + X	> 31,2	5,0
4	Reenchimento das seringas	0	0	0	0	0	0	0	0	8000	32,0	15,0
5	Eluição do analito retido (NaOH), adição dos reagentes (4-AAP em tampão e $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), formação do composto corado, detecção e aquisição do sinal analítico	0	1	1	1	0	0	0	0	5500	66,0	5,0
6	Regeneração da coluna	1	0	0	0	1	1	0	0	2500	30,0	5,0

Tabela 2.3. Etapas executadas antes do ciclo analítico para efectuar a pré-concentração de volumes de amostra superiores a 6,00 ml. Os volumes indicados correspondem à seringa 1 (10,0 ml). "1" e "0" representam as posições "On" e "Off" das válvulas solenóides, respectivamente.

Etapa	Descrição	Posição das válvulas de comutação								Volume / μ l	Tempo / s	Caudal / ml min ⁻¹
		1	2	3	4	5	6	7	8			
A	Enchimento das seringas	0	0	0	0	0	0	0	0	2000	8,0	15,0
B	Aspiração da amostra para o tubo de armazenamento	1	0	0	0	0	0	0	1	6000	72,0	5,0
C	Envio da amostra através da coluna de pré - concentração	1	0	0	0	1	1	0	0	6000	72,0	5,0
D	Envio do restante contido do tubo de armazenamento para o esgoto para prevenir a contaminação entre diferentes alíquotas de amostra	1	0	0	0	0	0	1	0	2000	24,0	6,0

2.5. Estudo das variáveis e avaliação das características de funcionamento do método

A selecção dos valores mais adequados para as variáveis em estudo em cada montagem foi efectuada pelo método univariante, que consiste em variar, num determinado intervalo, o parâmetro a estudar, sendo os restantes mantidos fixos. As escolhas foram efectuadas através da avaliação de algumas características da metodologia, nomeadamente o aumento da sensibilidade e do ritmo de amostragem e a diminuição do limite de detecção.

Foram utilizados como sinais analíticos a altura do pico, valor máximo de absorvância registado a partir do sinal transiente originado pela passagem do segmento do produto de reacção corado no detector, e a respectiva área, definida como a área total sob a curva do mesmo sinal. A área do pico foi calculada após tratamento dos dados obtidos nas aplicações informáticas Microsoft Excel 2002 e Origin 6.1.

O traçado das curvas de calibração foi efectuado utilizando a altura ou área de pico em função das concentrações das soluções padrão ou da massa de fenol que passa na fase sólida extractora.

As concentrações das amostras foram obtidas por interpolação nas curvas de calibração, previamente estabelecidas, do sinal analítico obtido na análise de cada amostra. Nos casos em que a curva de calibração correspondia à relação sinal analítico vs. massa de fenol a concentração resultou da divisão do valor obtido por interpolação pelo volume de amostra que foi introduzido no sistema. Foram efectuadas doze injeções consecutivas da mesma amostra, sendo calculada a concentração média obtida e o respectivo desvio padrão. A

repetibilidade da metodologia desenvolvida foi avaliada recorrendo ao desvio padrão relativo (DPR) ($n = 12$).

A avaliação da exactidão da metodologia proposta foi efectuada pela análise de materiais certificados. Os resultados obtidos pela análise das amostras certificadas no sistema proposto foram comparados com os resultados inter-laboratoriais que acompanhavam estes materiais, obtidos através de metodologia de referência (EPA 420.1).

Com o objectivo de avaliar os efeitos de matriz no procedimento proposto foram efectuados ensaios de recuperação, utilizando água da torneira e água mineral. O procedimento consistiu em adicionar pequenas quantidades de uma solução padrão concentrada de fenol às amostras de modo a obter dois níveis diferentes de concentrações. Após essa adição as amostras foram processadas no sistema. A percentagem de recuperação foi calculada através da razão entre o valor de concentração obtido pela análise segundo a metodologia proposta e o valor teórico originado após a adição.

O limite de detecção foi definido como a concentração (C_{LD}) resultante da menor medição (Y_{LD}) que pode ser efectuada, com razoável certeza, para um determinado procedimento analítico (IUPAC, 1976). O valor de Y_{LD} é obtido através da equação $Y_{LD} = Y_B + 3 S_B$, onde Y_B corresponde à média de dez medições do sinal analítico do branco e S_B ao desvio padrão dessas mesmas medições. As medições do branco foram efectuadas pela injeção no sistema de uma solução com a mesma composição das soluções padrão com excepção do fenol. A concentração mínima detectável (C_{LD}) foi calculada por interpolação na curva de calibração, tida como constante para baixas concentrações (Miller e Miller, 1993), do valor de Y_{LD} .

O ritmo de determinação, expresso como o número de determinações por hora, foi definida pelo período de tempo que engloba todas as etapas da sequência analítica, resultando na soma do tempo necessário à execução de cada etapa do ciclo analítico, acrescido do tempo necessário para a comunicação de instruções entre o computador e os restantes dispositivos do sistema.

3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Implementação da reacção da 4-aminoantipirina em MSFIA

Foram efectuados estudos sobre as variáveis que condicionam a reacção colorimétrica da 4-aminoantipirina no sistema MSFIA, nomeadamente no que respeita ao sistema tampão usado e respectivo pH, assim como a concentração dos reagentes.

3.1.1. Composição e pH do sistema tampão

O sistema tampão e respectivo pH que servem de suporte à reacção são variáveis essenciais para que a formação do composto corado ocorra de uma forma rápida e suficientemente extensa.

Emerson (1943) abordou a questão da alcalinidade do meio reaccional sem contudo especificar qualquer patamar necessário à ocorrência da reacção. Deste modo, vários autores sugeriram diferentes intervalos de pH e sistemas tampão adequados para o desenvolvimento de cor. Gottlieb e Marsh (1946), na implementação de um método para análise de fungicidas fenólicos, propuseram a utilização de carbonato de sódio num intervalo de valores de pH compreendido entre 10,4 e 10,6. Ochinsky (1960) estudou três sistemas tampão distintos (borato, fosfato e carbonato) num intervalo de valores do pH compreendido entre 7,7 e 11,5. Os resultados obtidos por este autor revelaram que o máximo de formação de cor é conseguido no intervalo de valores de pH situado entre 9 e 10,7. Este autor referiu ainda que quando o valor de pH é menor que 8, independentemente do tampão utilizado, assiste-se a uma marcada auto-oxidação da 4-aminoantipirina com formação de um composto vermelho. A independência dos resultados obtidos em relação ao sistema tampão

utilizado foi reportada também por Svobodová e Gasparic (1970), que propuseram como condição necessária à ocorrência da reacção a existência de uma capacidade tampão que assegure um intervalo de pH entre 7,5 e 9,5. Estes autores alertaram ainda para a alcalinidade excessiva que eventualmente possa estar presente no meio reaccional. Quando isto acontece assiste-se a uma degradação dos produtos reaccionais formados com consequências directas nos valores de absorvância medidos. Ettinger *et al.* (1951) utilizaram uma solução concentrada de amoníaco para efectuar o ajuste de pH para um valor de $10,0 \pm 0,2$, valor este que, segundo os autores, possibilitou a obtenção de baixas absorvâncias para os ensaios em branco ao mesmo tempo que minimizou o risco da ocorrência de interferências, nomeadamente por parte de aminas aromáticas.

Faust e Mikulewickz (1967a) apresentaram uma revisão bibliográfica sobre os vários factores que influenciam a reacção, estabelecendo o pH, o tampão utilizado e o tipo de substituição do composto fenólico como os factores mais importantes a considerar para a ocorrência da reacção. Estes autores propuseram a utilização de pH 8, atendendo ao facto de que alguns compostos, como o 2,4-diclorofenol, não produzem qualquer cor a pH $10,0 \pm 0,2$, sendo contudo capazes de o fazer quando este valor diminui para $7,9 \pm 0,1$. É referenciado ainda o tampão composto por hidróxido de amónio e fosfato como aquele que proporcionou a melhor estabilidade ao sistema reaccional. Estas condições foram aplicadas experimentalmente pelos mesmos autores para a avaliação dos valores de absorvidade, a um comprimento de onda de 500 nm, de vários derivados fenólicos a pH 8 e a pH 10 (Faust e Mikulewickz, 1967b). Os resultados obtidos mostraram valores do parâmetro em estudo sistematicamente superiores quando é utilizado o pH 8. As razões apresentadas para justificar tal observação prendem-se com o aumento do carácter electrofílico da 4-aminoantipirina. Faust e Anderson

(1968) realizaram um estudo comparativo entre o método proposto Faust e Mikulewickz (1967b) e um outro método que utilizava uma solução tampão composta por hidróxido de amónio e cloreto de amónio a pH $10,0 \pm 0,2$ analisando diversas amostras de águas superficiais. Os valores de concentração obtidos foram, mais uma vez, sistematicamente superiores quando a reacção foi conduzida a pH 8.

Na aplicação desta reacção química em sistemas de fluxo é usado o tampão combinado obtido pela dissolução em água de hidrogenocarbonato de sódio e ácido bórico e ajuste de pH a valores iguais ou próximos de 10,0 (Moller e Martin, 1988; Frenzel *et al.*, 1992; Frenzel e Krekler, 1995; Lupetti *et al.*, 2004, Miró e Frenzel, 2004). Este valor de pH permite a obtenção de baixos valores de absorvância nos ensaios de branco e um menor risco de interferências (por parte das aminas aromáticas), além de manter a sensibilidade em valores compatíveis com a determinação em questão.

Perante uma diversidade tão grande de dados encontrados na literatura tornou-se necessária uma abordagem experimental à questão do controlo do pH que permitisse encontrar as condições mais favoráveis para a aplicação desta reacção no sistema de fluxo proposto.

Neste sistema, o pH final, que condicionará a reacção, é resultado da mistura entre três soluções com distintas características em relação ao carácter ácido-base: uma solução fortemente alcalina (transportador / eluente da coluna), uma solução tampão (onde está dissolvida a 4-aminoantipirina) e uma solução aquosa (oxidante).

Para os estudos que tiveram por fim a definição do valor de pH e a composição da solução tampão a utilizar, a concentração dos reagentes utilizada foi de $1,00 \text{ g l}^{-1}$ tanto para a 4-aminoantipirina, em solução tampão, como para o hexacianoferrato(III) de potássio, em

solução aquosa. Foram estabelecidas curvas de calibração mediante a injeção de 100 µl de soluções padrão aquosas de fenol com concentrações compreendidas entre 1,00 e 20,0 mg l⁻¹. O transportador do analito foi uma solução de hidróxido de sódio 0,10 mol l⁻¹, reagente este que, quando contacta com a 4-aminoantipirina em tampão, provoca um aumento do valor do pH, proporcionando uma alcalinidade adequada à condensação oxidativa dos reagentes com analito, com a consequente formação do composto corado. Avaliaram-se as sensibilidades obtidas, através dos declives das curvas de calibração (UA mg⁻¹ l, em que UA significa unidades de absorvância), em função das variáveis experimentais em estudo (pH, tipo e concentração da solução tampão). Foi igualmente medido o valor de pH do efluente.

A primeira solução tampão utilizada era constituída por carbonato-borato, obtida por dissolução de 5,2 g de hidrogenocarbonato de sódio e 5,8 g de ácido bórico em 1000 ml de água (Frenzel *et al.*, 1992; Frenzel e Krekler, 1995), ajustada a valores de pH entre 7,0 e 10,0. Os resultados obtidos (figura 3.1) demonstraram que, para valores de pH compreendidos entre 7,0 e 9,0 (valores de pH do efluente compreendidos entre 9,55 e 10,80), a sensibilidade se manteve praticamente inalterada. O mesmo não aconteceu a pH 10,0, onde esta diminuiu acentuadamente, provavelmente devido ao valor de pH elevado do efluente (11,35). O valor de pH seleccionado para as experiências seguintes foi de 8,0 uma vez que, nestas condições, o pH do esgoto apresentou um valor de pH próximo de 10,0.

Com o objectivo de conhecer qual a capacidade e tipo de tampão que proporcionava a melhor sensibilidade efectuou-se um estudo em que foram utilizadas duas soluções tampão: a primeira, semelhante à usada na experiência anterior, preparada com hidrogenocarbonato de sódio e ácido bórico (proporção molar 1:1,53), e uma segunda, obtida através da

dissolução do cloreto de amônio em água. O estudo foi realizado num intervalo de concentrações compreendido entre 0,0302 e 0,755 mol l⁻¹, correspondente a um quinto e cinco vezes o valor de concentração utilizado na experiência anterior. Todas as soluções foram ajustadas a pH 8,0.

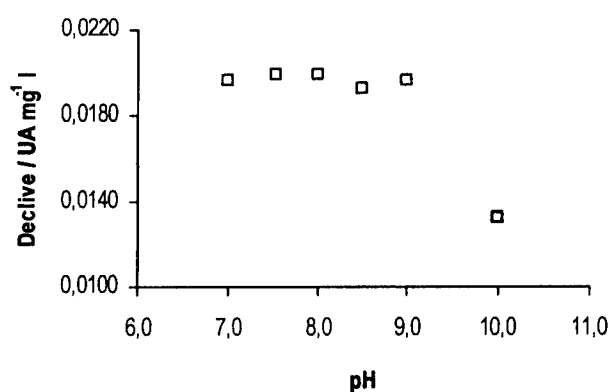


Figura 3.1. Resultados obtidos para diferentes valores de pH, no intervalo compreendido entre 7,0 e 10,0, na solução tampão composta por 0,062 mol l⁻¹ de hidrogenocarbonato de sódio e 0,095 mol l⁻¹ de ácido bórico.

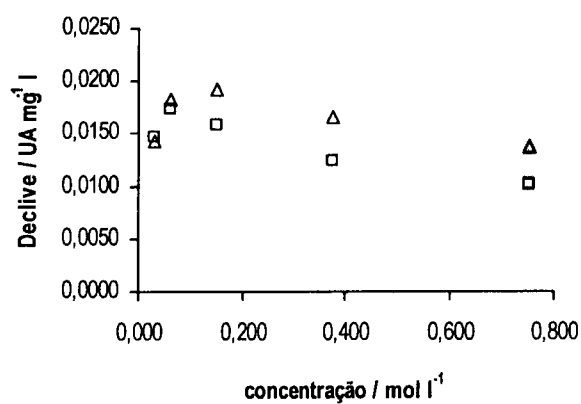


Figura 3.2. Resultados obtidos para o uso da solução tampão combinada carbonato-borato (Δ) e para o tampão amônio (□) no intervalo de concentrações compreendido entre 0,0302 e 0,755 mol l⁻¹.

Os resultados obtidos (figura 3.2) mostram que os valores de sensibilidade foram sempre superiores com o sistema tampão combinado carbonato-borato, com excepção para a concentração mais baixa, na qual as sensibilidades foram equivalentes. No que respeita aos valores de pH do efluente, estes foram semelhantes, em cada concentração, para os dois tipos de soluções tampão (diferenças inferiores a 0,30 unidades de pH). Contudo, para as duas concentrações mais baixas estudadas estes valores foram superiores a 11,35. Para as restantes três concentrações testadas o pH do efluente compreendeu valores entre 8,50 e 9,60. Estes resultados são contrários aos obtidos por Song *et al.* (1997), uma vez que estes autores reportam a obtenção de sinais analíticos superiores com a utilização do sistema tampão amónio-amoniaco, relativamente aos obtidos com o sistema carbonato-borato.

A existência de duas zonas distintas em que decorre o efeito tampão por parte do sistema combinado carbonato-borato ($pK_a(\text{H}_3\text{BO}_3) = 9,24$ e $pK_a(\text{HCO}_3^-) = 10,32$) comparativamente ao sistema cloreto de amónio-amoniaco ($pK_a(\text{NH}_4^+) = 9,24$), que possui apenas o par $\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$ em solução, pode explicar a maior capacidade por parte do sistema combinado para suportar as variações de concentração introduzidas nesta avaliação experimental.

Com o objectivo de avaliar individualmente as características de cada sistema tampão no estabelecimento das condições reaccionais mais adequadas, além de verificar a necessidade de capacidade tampão em dois intervalos distintos de pH, foi introduzida uma nova abordagem a esta questão. Desta forma, foram preparadas soluções tampão com apenas um dos pares ácido-base, visando o estabelecimento da composição química (espécie e concentração) que proporcionasse a máxima sensibilidade. A planificação experimental envolveu o cálculo teórico aproximado da concentração de solução tampão necessária para

que, partindo de um pH inicial de 8,0, fossem atingidos determinados valores de pH final (após a mistura de todos os reagentes no sistema de fluxo). Estes cálculos partiram de uma série de considerações prévias: os valores de pH foram calculados através da fórmula

$$pH = pKa + \log \frac{b}{a}$$

em que *b* corresponde à concentração da partícula básica, *a* à

concentração da partícula ácida e pKa ao valor desta constante para o par ácido-base conjugada em questão; assumindo que as condições de validade são verificadas (Laboratório de Química da Faculdade de Ciências, 1968). Foram consideradas as diluições sofridas pela solução ao longo do seu percurso no sistema de fluxo e os valores de pH final foram seleccionados de acordo com o pKa de cada sistema tampão. As concentrações calculadas em função do pH desejado estão representadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Concentrações dos diferentes sistemas tampão estudados obtidas através de cálculos teóricos, em função do pH final desejado.

Sistema tampão	pKa	pH final	Concentração / mol l ⁻¹
H ₃ BO ₃ / [B(OH) ₄] ⁻	9,24	9,00	0,290
		9,50	0,164
		10,00	0,124
NH ₄ ⁺ / NH ₃	9,24	9,00	0,290
		9,50	0,164
		10,00	0,124
HCO ₃ ⁻ / CO ₃ ²⁻	10,32	9,50	0,766
		10,00	0,110
		10,50	0,068

Foram preparadas as várias soluções tampão e estabelecidas as respectivas curvas de calibração. Os valores dos declives obtidos, correspondentes a cada solução testada, bem como os valores de pH medidos à saída do sistema, estão representados na figura 3.3.

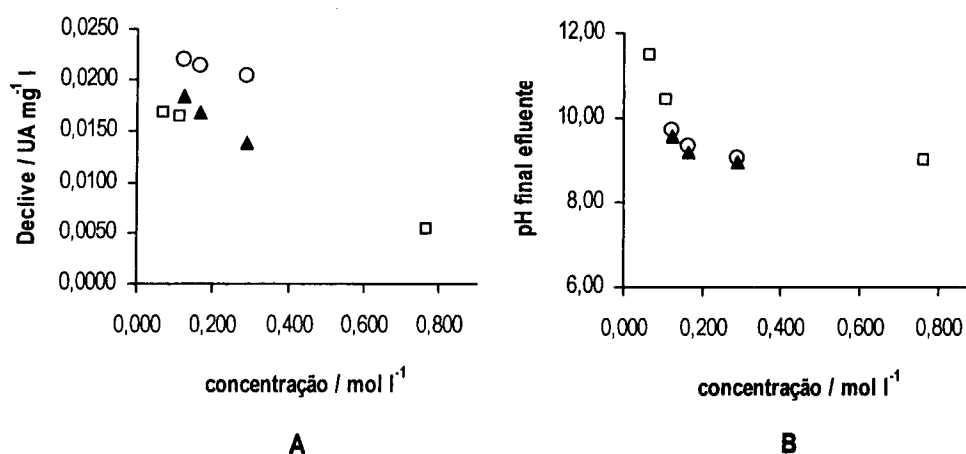


Figura 3.3. Declives obtidos (A) e valores de pH medidos à saída do sistema (B) para as várias concentrações das diferentes soluções tampão: $\text{H}_3\text{BO}_3 / [\text{B}(\text{OH})_4]^-$ (○), $\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$ (▲) e $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$ (□).

Através da análise dos resultados representados na figura 3.3A verificamos que a solução tampão obtida pela dissolução do ácido bórico, com uma concentração de 0,124 mol l⁻¹ proporcionou a melhor sensibilidade (0,0220 UA mg⁻¹ l), inclusive superior à do tampão combinado carbonato-borato utilizado até então (0,0195 UA mg⁻¹ l). No que respeita aos valores de pH medidos à saída do sistema (figura 3.3B) verifica-se que a soluções preparadas a partir do catião amónio e do ácido bórico, com valores de pKa semelhantes e utilizadas nas mesmas concentrações, apresentam valores muito próximos entre si e também bastante próximos aos previstos. Contudo, o sistema tampão borato demonstrou sempre um desempenho superior no que respeita aos valores de sensibilidade obtidos. Por sua vez, os

valores de pH medidos após a utilização da solução tampão preparada a partir do hidrogenocarbonato de sódio foram sempre mais distantes dos previstos relativamente aos outros sistemas tampão avaliados, o que também se reflectiu nos valores de declive obtidos.

Seguidamente foram preparadas soluções de concentrações decrescentes de ácido bórico com valores de 0,124; 0,110 e 0,100 mol l⁻¹. Foram igualmente preparadas, em simultâneo, soluções de cloreto de amónio com concentrações semelhantes. Todas as soluções tampão preparadas foram ajustadas a pH 8,0. Este estudo comparativo com o sistema tampão amónio-amoniaco procurou confirmar o comportamento relativo dos dois sistemas tampão que revelaram os melhores resultados na experiência anterior num intervalo de concentrações mais baixa, que não tinha sido ainda testado. Os resultados obtidos (figura 3.4) vão de encontro aos anteriores, confirmando a solução de ácido bórico 0,124 mol l⁻¹ como aquela que proporcionou o valor mais elevado de sensibilidade, ao mesmo tempo que possuía uma capacidade tampão compatível com a manutenção da mesma na eventualidade da ocorrência de ligeiras modificações do valor de pH, uma vez que, mesmo em concentrações mais baixas (0,110 mol l⁻¹) foi capaz de assegurar sinais analíticos constantes. Contudo, para a solução com concentração de 0,100 mol l⁻¹ verificou-se uma diminuição acentuada na sensibilidade, provocada por uma alcalinidade excessiva, resultante de uma capacidade tampão insuficiente. Deste modo, a solução de ácido bórico com concentração de 0,124 mol l⁻¹, foi seleccionada para a execução das restantes experiências.

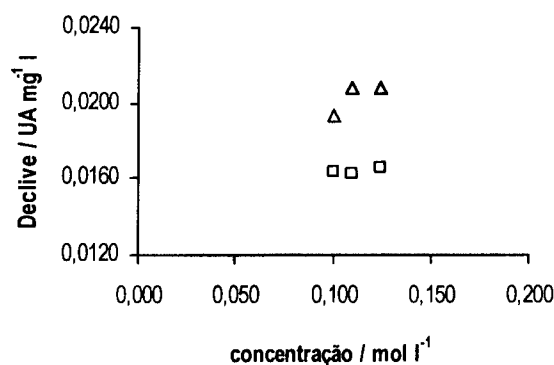


Figura 3.4. Resultados obtidos para o estudo dos sistemas tampão constituídos pelos pares ácido-base conjugada ácido bórico-borato (Δ) e amônio-amoniaco (\square) no intervalo de concentrações compreendido entre 0,100 e 0,124 mol l⁻¹.

3.1.2. Concentração e pH da solução oxidante

O fenómeno oxidativo na reacção escolhida para a determinação de compostos fenólicos assume uma importância especial uma vez que ocorre em condições muito específicas de alcalinidade. Por esta razão vários autores propuseram o uso de soluções oxidantes alcalinizadas, com um valor de pH igual a 11 (Moller e Martin, 1988; Frenzel *et al.*, 1992; Frenzel e Krekler, 1995; Song *et al.*, 1997; Miró e Frenzel, 2004).

O papel do pH da solução oxidante na sensibilidade foi avaliado de duas formas distintas: através da utilização do hexacianoferrato(III) de potássio em solução tampão (carbonato-borato) e em solução aquosa alcalina (pH 11,0). Em ambos os casos foram estabelecidas comparações com o uso do mesmo reagente em solução aquosa.

Na primeira experiência, o hexacianoferrato(III) de potássio foi introduzido no sistema numa solução de tampão combinado carbonato-borato, cuja concentração total era de 0,15 mol l⁻¹, preparada conforme descrito na secção 3.1.1. Foram preparadas soluções cujos valores de pH eram de 8,0; 9,0 e 10,0. A 4-aminoantipirina foi dissolvida na mesma solução tampão, com o mesmo valor de pH. A concentração de ambos os reagentes nas respectivas soluções foi 1,00 g l⁻¹. A representação gráfica da figura 3.5 apresenta os valores do declive (UA mg⁻¹ l) obtidos através do estabelecimento de curvas de calibração, utilizando as diferentes soluções. Pela análise do gráfico conclui-se que a utilização do hexacianoferrato(III) de potássio em solução tampão não apresenta vantagens comparativamente à solução aquosa, para qualquer dos valores de pH testados.

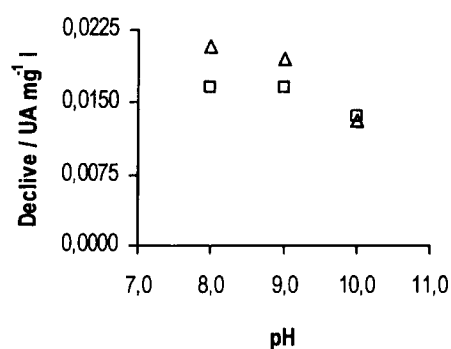


Figura 3.5. Valores de sensibilidade obtidos recorrendo à utilização da solução oxidante (hexacianoferrato(III) de potássio) em meio tamponado (solução tampão carbonato-borato) (□) e em meio aquoso (Δ), para os valores de pH inicial de 8,0, 9,0 e 10,0.

Numa segunda experiência o agente oxidante foi introduzido no sistema de fluxo através de uma solução aquosa alcalina (pH 11,0). Para que o efeito desta corrente alcalina fosse avaliado de uma forma mais abrangente, foi testada a sua influência em diferentes capacidades tampão. Para tal, este estudo foi efectuado utilizando o sistema tampão

combinado carbonato-borato e o sistema tampão amônio-amoniaco com concentrações compreendidas entre 0,0311 e 0,779 mol l⁻¹, contendo também a 4-aminoantipirina. As concentrações de 4-aminoantipirina e de hexacianoferrato(III) de potássio foram semelhantes às utilizadas na experiência anterior. Os resultados obtidos estão representados nas figuras 3.6 e 3.7.

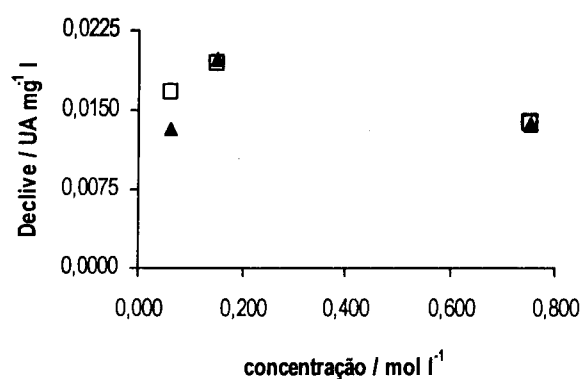


Figura 3.6. Valores de sensibilidade obtidos recorrendo à utilização da solução oxidante em meio aquoso (□) e em meio aquoso alcalinizado (▲), utilizando diferentes concentrações da solução tampão combinada carbonato-borato.

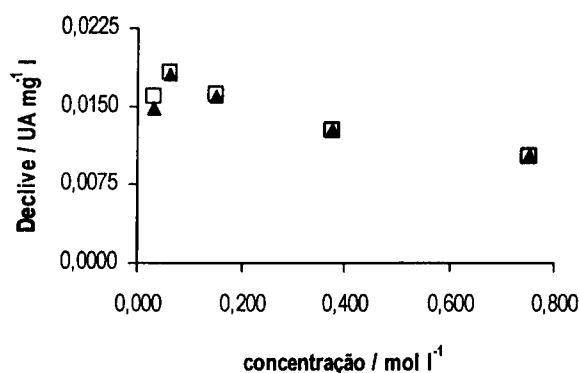


Figura 3.7. Valores de sensibilidade obtidos recorrendo à utilização da solução oxidante em meio aquoso (□) e em meio aquoso alcalinizado (▲), utilizando diferentes concentrações da solução tampão obtida pela dissolução do cloreto de amônio.

Verificou-se que, perante os resultados obtidos (figuras 3.6 e 3.7), para as diferentes capacidades e tipos de solução tampão avaliadas, a utilização de uma solução de hexacianoferrato(III) de potássio alcalinizada não representava qualquer vantagem sob o ponto de vista analítico, uma vez que não se observou qualquer incremento nos sinais analíticos com conseqüente reflexo na sensibilidade. Desta forma, foi adoptada, para a prossecução das experiências, a utilização do agente oxidante em solução aquosa.

Tendo como ponto de partida as condições experimentais estabelecidas nos estudos descritos nas secções anteriores no que diz respeito às soluções utilizadas no sistema (4-aminoantipirina 1,00 g l⁻¹ em tampão borato 0,124 mol l⁻¹ a pH 8,0 e hexacianoferrato(III) de potássio 1,00 g l⁻¹ em solução aquosa) foi estudada a concentração de oxidante com o objectivo de incrementar a sensibilidade. O estudo foi efectuado num intervalo de concentrações entre 0,0100 e 2,12 g l⁻¹, concluindo-se que o valor de 1,50 g l⁻¹ correspondia à concentração mínima que proporcionou a maior sensibilidade, sendo por isso utilizado nas experiências posteriores (figura 3.8).

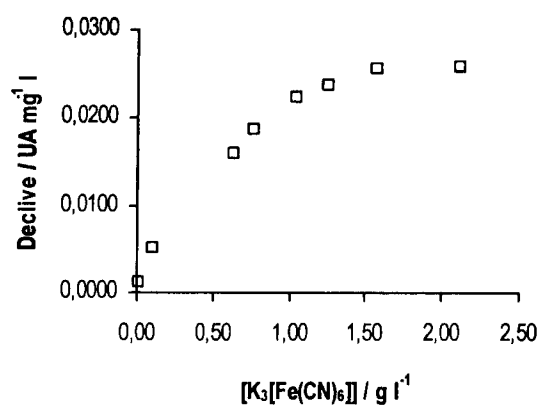


Figura 3.8. Resultados obtidos com a utilização de diferentes concentrações de hexacianoferrato(III) de potássio, num intervalo compreendido entre 0,100 e 2,12 g l⁻¹.

3.1.3. Estudo da concentração da solução de 4-aminoantipirina

Um estudo semelhante ao descrito na secção anterior (3.1.2) foi executado com a finalidade de determinar a concentração mais adequada da 4-aminoantipirina para a metodologia desenvolvida. Foram estudadas concentrações de 4-aminoantipirina num intervalo compreendido entre 0,0500 e 2,00 g l⁻¹. A representação gráfica dos resultados obtidos (figura 3.9), apresenta a concentração de 0,500 g l⁻¹ como aquela que proporciona sensibilidades mais elevadas, sendo esta a concentração eleita para uso nas experiências posteriores.

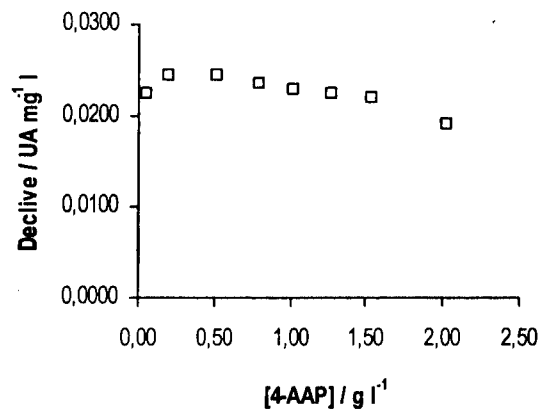


Figura 3.9. Resultados obtidos através do estabelecimento de curvas de calibração utilizando diferentes concentrações de 4-aminoantipirina dissolvida numa solução de ácido bórico 0,124 mol l⁻¹. Nesta experiência foi utilizada uma solução de hexacianoferrato(III) de potássio com uma concentração de 1,50 g l⁻¹.

3.2. Implementação da etapa de pré-concentração em MSFIA

A necessidade de determinar concentrações vestigiais de compostos fenólicos em águas de diversas origens conduziu à implementação de etapas analíticas que tiveram como objectivo o aumento da sensibilidade e a diminuição do limite de detecção do método da 4-aminoantipirina. A metodologia de referência da American Public Health Association (Clesceri *et al.*, 1998), baseada nesta reacção química, propõe a concentração dos produtos reaccionais em clorofórmio para que seja possível a determinação num intervalo de concentrações entre 0,01 e 0,1 mg l⁻¹. No presente trabalho a concentração prévia dos analitos é realizada através da extracção em fase sólida, que compreende a utilização de substâncias adsorventes com capacidade de retenção dos analitos.

Esta estratégia foi adoptada no desenvolvimento deste sistema MSFIA, através da utilização da resina Amberlite XAD-4. Esta resina é um adsorvente polimérico, constituído por cadeias de estireno e divinilbenzeno, com ligações cruzadas entre si. Trata-se de uma resina não iónica, cujas propriedades adsorptivas derivam da sua estrutura macroreticular que compreende duas fases contínuas, uma de natureza polimérica e uma outra de natureza porosa (Rohm Haas, 2003). Esta estrutura possibilita uma excelente estabilidade a nível físico, químico, térmico e hidráulico, além de uma grande área de superfície por unidade de massa, sendo adequada para a retenção de compostos orgânicos com polaridade reduzida, características em que se enquadram os compostos fenólicos.

O uso desta resina como adsorvente de compostos fenólicos está amplamente descrito na literatura. Vera-Avila *et al.* (1999) apresentam um estudo exaustivo sobre as variáveis físicas e químicas que condicionam o fenómeno, estabelecendo as principais condições para

assegurar a remoção do fenol em solução aquosa. Por sua vez Ku e Lee (2000) descrevem o comportamento de adsorção dos compostos fenólicos na resina Amberlite XAD-4. Estes autores reportam também a influência do coeficiente de partição octanol / água dos diferentes compostos fenólicos na sua retenção bem como o pH da solução onde se encontram. Deste modo, é descrita uma correlação empírica positiva entre a constante de partição (valor da razão entre a concentração de composto fenólico que está adsorvido e a concentração do mesmo composto que permanece em solução sob a forma não ionizada) e o coeficiente de partição octanol / água (constante característica de cada composto e que define a hidrofobicidade relativa de cada molécula). O valor do pH do meio assume especial importância atendendo ao facto de que este valor proporciona a ocorrência dos compostos fenólicos na sua forma ionizada ou protonada (não ionizada), condicionando a sua retenção na resina hidrofóbica.

A utilização deste adsorvente como elemento de pré-concentração em linha de compostos fenólicos em sistemas de fluxo é proposta por Zhi *et al.* (1996) e Song *et al.* (1997), embora os primeiros autores associem uma extracção líquido-líquido com clorofórmio dos produtos da reacção de desenvolvimento de cor, posterior à extracção em fase sólida dos analitos.

No presente sistema multi-seringa, a adsorção / eluição dos compostos fenólicos na resina Amberlite XAD-4 baseia-se na diferente hidrofobicidade apresentada pelos compostos fenólicos consoante estes se encontrem na sua forma iónica ou não-iónica, uma vez que se tratam de ácidos fracos, passíveis de sofrerem dissociação, dependendo esta do equilíbrio ácido-base em solução. A presença de uma ou outra forma depende do pKa de cada composto bem como do pH da solução onde se encontram. Deste modo, a adsorção dos

compostos é assegurada pela presença de um valor de pH ácido (pH 2), aquando da passagem do analito junto do adsorvente estando os compostos na forma não iónica. Por sua vez a eluição do composto é provocada pela passagem de uma corrente fortemente alcalina (pH \approx 13) através do adsorvente para que o analito retido assuma a forma iónica, resultando numa afinidade reduzida pela fase sólida. Este procedimento, inicialmente proposto por Song *et al.* (1997) e estudado por Vera-Avila *et al.* (1999), permite melhorar o desempenho do método da 4-aminoantipirina sem recorrer ao uso de solventes orgânicos.

3.2.1. Dimensões das partículas da resina Amberlite XAD-4

Embora a capacidade de retenção de compostos fenólicos por parte da resina Amberlite XAD-4 comercial seja maior do que outros adsorventes da mesma família (Amberlite XAD-2, XAD-7, XAD-8) (Zhi *et al.*, 1996), o seu desempenho não é o melhor quando se deseja que fenómeno ocorra quantitativamente e num curto intervalo de tempo. Para incrementar o rendimento do processo Song *et al.* (1997) recorreram, com sucesso, ao uso de partículas de menor dimensão, sendo esta estratégia sugerida também por Vera-Avila *et al.* (1999).

O procedimento que resultou na redução do tamanho de partícula encontra-se descrito na secção 2.3.1. Foram construídas colunas de pré-concentração, utilizando tubo de impulsão, com 3,00 cm de comprimento e 2,54 mm de diâmetro interno, sendo as extremidades encerradas com lã de vidro. Neste estudo, o carregamento e eluição da coluna foram executados no mesmo sentido. Este tipo de colunas e a utilização do mesmo sentido para a manipulação da coluna foram abandonados posteriormente devido às pressões elevadas que criavam no sistema. Desta forma, e com o objectivo de resolver este problema foram

aplicadas, em simultâneo, duas estratégias distintas: a primeira procurou encontrar materiais menos deformáveis que o tubo de impulsão, que suportassem as pressões criadas pela compactação continuada das partículas enquanto que, a segunda, visou a criação de um processo de descompactação das próprias partículas durante o ciclo analítico, evitando-se, desta forma, sobrepressões dos fluidos no sistema. Estas estratégias traduziram-se pela utilização de colunas de metacrilato, mais rígidas, cujas extremidades estavam encerradas por filtros porosos e pela eluição do analitos no sentido contrário ao da etapa de adsorção dos mesmos.

Experimentalmente, este estudo consistiu no estabelecimento de curvas de calibração com quatro colunas distintas, cada uma contendo resina pertencente a um dos quatro grupos obtidos após o processo de redução do tamanho (menores que 125 μm , entre 125 e 250 μm , entre 250 e 355 μm e maiores que 355 μm). O volume total de carregamento da coluna foi de 4,00 ml, constituído por 1,00 ml solução padrão e 3,00 ml de solução transportadora ($\text{HCl } 0,010 \text{ mol l}^{-1}$) a um caudal de 2,0 ml min^{-1} . Os resultados (figura 3.10) demonstraram um incremento do sinal analítico com a diminuição do tamanho das partículas adsorventes. A razão de tal facto prende-se com o aumento da superfície adsorvente total, resultante da presença de partículas de menores dimensões.

Embora as partículas com pequenas dimensões permitam as sensibilidades mais elevadas, elas proporcionam um aumento considerável da pressão no interior do sistema devido ao seu elevado grau de compactação, resultando na colmatação dos dispositivos de pré-concentração. Esta razão inviabilizou a utilização de partículas de Amberlite XAD-4 com dimensões inferiores a 120 μm em metodologias de fluxo descritas anteriormente que

utilizam esta resina como adsorvente, como a proposta por Song *et al.* (1997). No presente trabalho, após a introdução das estratégias descritas anteriormente, foi possível a utilização de partículas de Amberlite XAD-4 com dimensões inferiores a 125 μm sem comprometer o correcto funcionamento do sistema MSFIA.

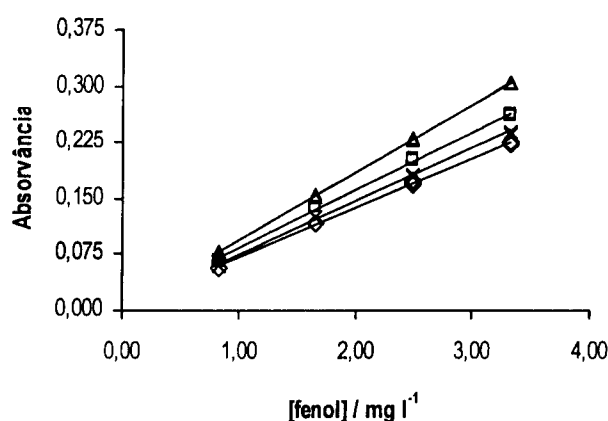


Figura 3.10. Curvas de calibração obtidas para diferentes tamanhos de partícula da resina Amberlite XAD-4. Tamanhos de partícula: maiores que 355 μm (\diamond), entre 355 e 250 μm (x), entre 250 e 125 μm (\square) e menores que 125 μm (Δ).

3.2.2. Condições de carregamento da coluna de pré-concentração

Para o estabelecimento das condições mais adequadas para o carregamento dos analitos na coluna de pré-concentração foram avaliadas duas variáveis: o caudal de passagem da amostra / solução padrão na coluna de pré-concentração e o volume de transportador necessário à remoção da matriz da amostra e à lavagem das tubagens de ligação entre os diferentes dispositivos. Nesta experiência foi utilizada uma coluna de metacrilato com 3,0 cm de comprimento e 3,0 mm de diâmetro interno.

No processo de extracção em fase sólida de compostos com algum grau de polaridade, como é o caso do fenol, utilizando a resina adsorvente Amberlite XAD-4, os caudais utilizados assumem especial importância na obtenção de resultados repetíveis e de boas recuperações (Vera-Avila *et al.*, 1999). Esta variável foi estudada por Zhi *et al.* (1996) e Song *et al.* (1997) na utilização desta mesma resina. Os primeiros, utilizando a resina na sua forma comercial, verificaram que, no intervalo de caudais compreendido entre 2,0 e 4,8 ml min⁻¹, não existiam diferenças significativas entre os sinais analíticos obtidos, adoptando o caudal mais elevado para assegurar um maior ritmo de determinação. Por sua vez Song *et al.* (1997), utilizando partículas adsorventes entre 125 e 177 µm, utilizaram um caudal de 1,8 ml min⁻¹ para efectuar o carregamento de 4,4 ml de amostra. Perante dados tão díspares encontrados na literatura efectuou-se um estudo em que se procurou avaliar qual o caudal mais adequado ao carregamento da coluna. As condições experimentais no que respeita aos volumes de solução padrão e solução transportadora foram as mesmas utilizadas na experiência anterior. Foi utilizada uma solução padrão de fenol com uma concentração de 0,441 mg l⁻¹ e caudais entre 1,0 e 8,0 ml min⁻¹. A figura 3.11 representa, graficamente, os sinais analíticos obtidos em função dos caudais de carregamento da coluna utilizados.

Estes resultados demonstram que no intervalo de caudais compreendidos entre 1,0 e 5,0 ml min⁻¹ não existem variações significativas no sinal analítico obtido. O mesmo não acontece com os caudais superiores a 5,0 ml min⁻¹, em que observa uma tendência para a diminuição do sinal analítico. Atendendo a estes resultados o caudal de 5,0 ml min⁻¹ foi escolhido, uma vez que possibilitou minimizar o tempo gasto na etapa de carregamento da coluna, proporcionando maiores ritmos de determinação sem qualquer perda de sensibilidade.

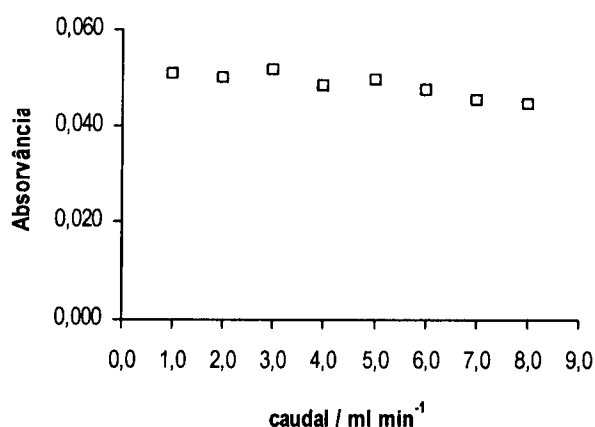


Figura 3.11. Influência do caudal de carregamento da coluna no sinal analítico obtido após a pré-concentração de 1,00 ml de solução padrão de fenol com uma concentração de 0,441 mg l⁻¹.

Outra condição essencial a um desempenho analítico correcto por parte do sistema de fluxo é que seja assegurada uma completa remoção dos resíduos das diferentes soluções padrão / amostras que possam ficar retidos nas tubagens e na própria coluna de pré-concentração, de modo a que sejam prevenidas contaminações entre as diferentes soluções sujeitas ao procedimento analítico.

Com a finalidade de encontrar as condições mais adequadas ao carregamento da coluna, no que respeita à ausência de contaminações entre diferentes soluções utilizadas, foram avaliados os sinais analíticos obtidos pela pré-concentração de 5,00 ml de uma solução padrão de fenol com uma concentração de 0,441 mg l⁻¹ e por 1,00 ml de uma solução padrão do mesmo composto com uma concentração de 2,21 mg l⁻¹, utilizando diferentes volumes de solução transportadora (HCl 0,010 mol l⁻¹), num intervalo compreendido entre 0,0 e 25,0 ml.

Para as condições experimentais avaliadas, verificou-se que, com o aumento do volume de ácido clorídrico que passa pela coluna de pré-concentração além da solução padrão, o sinal

analítico diminui (figura 3.12). Este comportamento só não é verificado nos dois primeiros pontos experimentais (de ambas as soluções utilizadas) representados na figura 3.12. O sinal analítico obtido na experiência em que apenas o volume correspondente à amostra é enviado para a coluna (0,00 ml de HCl 0,010 mol l⁻¹) foi inferior ao seguinte porque, neste caso, parte da solução padrão aspirada permaneceu nas tubagens de ligação, não sendo por isso carregada na coluna. Com a existência de um volume extraordinário de transportador (segundo ponto experimental da figura 3.12), que permitiu a passagem de todo o segmento de solução na coluna de pré-concentração, assistiu-se a um aumento do sinal analítico.

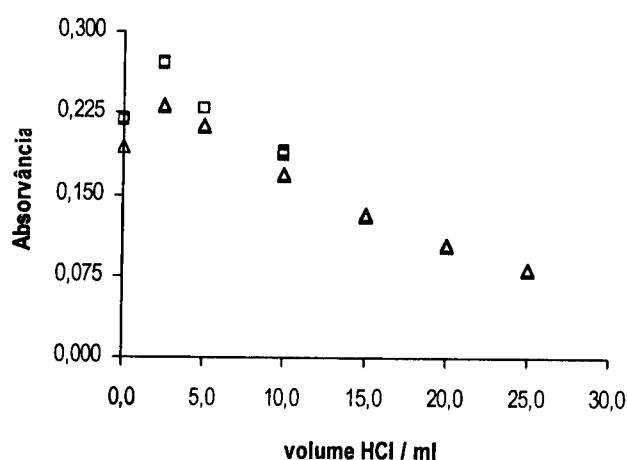


Figura 3.12. Influência do volume de solução transportadora (HCl 0,010 mol l⁻¹) no sinal analítico obtido pela injeção de 1,00 ml de solução padrão de fenol 2,21 mg l⁻¹ (□) e 5,00 ml de solução padrão de fenol de 0,441 mg l⁻¹ (Δ).

Atendendo aos resultados experimentais obtidos, tornou-se necessário que o volume de solução transportadora fosse o mínimo possível, desde que fosse assegurada a remoção completa da amostra / solução padrão em análise do sistema no final de cada ciclo analítico. Deste modo, o volume de transportador utilizado correspondeu a um volume teórico de quatro

vezes o volume existente nas tubagens de ligação, no interior das válvulas solenóides e na coluna de pré-concentração, sendo por isso variável de acordo com a coluna utilizada (Marshall e Van Staden, 1992).

3.2.3. Dimensões da coluna de pré-concentração

As dimensões da coluna de pré-concentração influenciam o desempenho analítico do sistema já que condicionam algumas variáveis inerentes ao fenómeno de adsorção / eluição, tais como: quantidade de partículas adsorventes presente (capacidade total de retenção), volume máximo de amostra que pode ser carregado de uma forma quantitativa e a dispersão do segmento de amostra obtido após a eluição dos analitos. Foram avaliadas diversas colunas com dimensões compreendidas entre 1,5 e 3,0 cm de comprimento e 2,0 a 5,0 mm de diâmetro interno, através do estabelecimento de curvas de calibração com 1,00 ml de soluções padrão de fenol com concentrações compreendidas entre 0,23 e 2,30 mg l⁻¹. O volume de solução transportadora utilizado foi ajustado de acordo com o volume da coluna utilizada. Os resultados obtidos estão representados na tabela 3.2 e figura 3.13, onde se verifica um claro aumento da sensibilidade com a diminuição do volume da coluna.

A experiência seguinte teve como objectivo a implementação da calibração em massa, em que é estabelecida a relação entre o sinal analítico e a massa do analito que é carregada na coluna de pré-concentração. Este conceito possibilita o estabelecimento de curvas de calibração com um só padrão, sendo os diferentes pontos experimentais obtidos a partir da variação do volume de solução aspirada que, na metodologia proposta, pode ser determinado

Tabela 3.2. Parâmetros das curvas de calibração obtidas para as diferentes colunas testadas.

Coluna				
Comprimento / cm	Diâmetro Interno / mm	Volume / μ l	Declive / UA mg^{-1} l	Ordenada na Origem
1,5	5,0	294	0,1108	0,002
3,0	2,0	94,2	0,1349	0,001
3,0	3,0	212	0,1175	-0,002
5,0	3,0	353	0,1079	0,001
5,0	4,0	628	0,0943	0,000

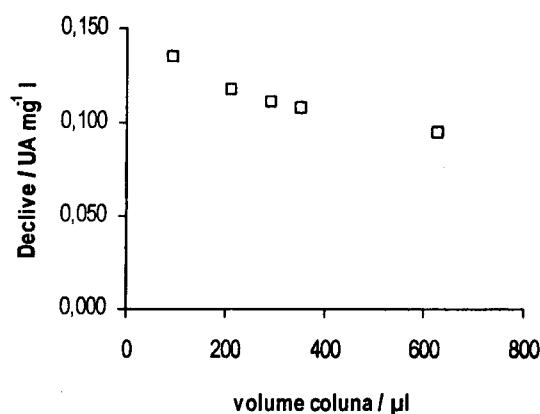


Figura 3.13. Influência do volume da coluna na sensibilidade da metodologia. Curvas de calibração obtidas com 1,00 ml de soluções padrão de fenol com concentrações compreendidas entre 0,23 e 2,30 mg l^{-1} .

através da relação caudal / tempo, sem necessidade de modificar fisicamente a montagem analítica (Armas *et al.*, 2002b). No que respeita à análise de amostras a aplicação desta estratégia de calibração permite a existência de um intervalo dinâmico de determinação,

dependente do volume de amostra que sofre o processo de pré-concentração. No que respeita à sua aplicação, a calibração em massa compreende a existência de uma independência do sinal analítico obtido em relação ao volume de solução que é carregado na coluna de pré-concentração e que contém a massa de analito a analisar.

Para a aplicação deste conceito foi necessária a escolha de uma coluna de pré-concentração que, simultaneamente, proporcionasse uma elevada sensibilidade e permitisse a manutenção do sinal analítico quando massas semelhantes dos analitos eram introduzidas em volumes distintos de solução. Desta forma, foram efectuadas experiências para comparar os sinais analíticos obtidos pela injeção de massas equivalentes de fenol presentes em diferentes volumes de solução. Foram efectuados dois ensaios semelhantes utilizando colunas de pré-concentração com as seguintes dimensões (comprimento x diâmetro interno): 3,0 cm x 2,0 mm e 5,0 cm x 3,0 mm. Os sinais analíticos resultantes da experiência foram comparados com os obtidos através do carregamento da coluna de pré-concentração com massas equivalentes de fenol contidas em 0,500 ml de solução, sendo calculada a respectiva percentagem relativa. Os resultados obtidos nesta experiência são apresentados nas tabelas 3.3 e 3.4.

Para volumes compreendidos entre 0,500 e 3,00 ml o desvio relativo do sinal analítico foi inferior a cinco por cento em ambas as colunas utilizadas. Quando se superaram esses volumes, a coluna com 5,0 cm de comprimento e 3,0 mm de diâmetro interno apresentou um desempenho superior no que respeita ao objectivo da implementação da calibração em massa, uma vez que a tendência decrescente do sinal analítico é menor.

Tabela 3.3. Percentagem relativa dos sinais analíticos obtidos pela injeção de uma determinada massa de fenol, compreendida entre 0,230 e 2,30 μg , num volume de 0,500 ml e num determinado volume variável compreendido entre 0,500 e 5,00 ml, utilizando uma coluna de pré-concentração com 3,0 cm de comprimento e 2,0 mm de diâmetro interno.

Vol. sol. padrão / ml	Massa fenol / μg	Sinal analítico / %
0,500	0,230	100
1,00	0,460	99,1
2,00	0,920	97,5
3,00	1,38	97,6
4,00	1,84	92,1
5,00	2,30	85,3

Tabela 3.4. Percentagem relativa dos sinais analíticos obtidos pela injeção de uma determinada massa de fenol, compreendida entre 0,227 e 2,27 μg , num volume de 0,500 ml e num determinado volume variável compreendido entre 0,500 e 5,00 ml, utilizando uma coluna de pré-concentração com 5,0 cm de comprimento e 3,0 mm de diâmetro interno.

Vol. sol. padrão / ml	Massa fenol / μg	Sinal analítico / %
0,500	0,227	100
1,00	0,455	98,3
2,00	0,910	97,3
3,00	1,36	95,2
4,00	1,82	94,7
5,00	2,27	92,9

De acordo com as avaliações efectuadas e procurando uma solução de compromisso entre a sensibilidade e a capacidade de pré-concentração quantitativa utilizando diferentes volumes

de solução, a coluna cuja cavidade tubular possui 5,0 cm de comprimento e 3,0 mm de diâmetro interno foi escolhida para os estudos seguintes.

3.2.4. Estudo do caudal na etapa de desenvolvimento de cor

Com o objectivo de diminuir o tempo necessário à execução do ciclo analítico, que se traduz num aumento do ritmo de determinação, foram avaliados os caudais utilizados na mistura da amostra com os reagentes e respectiva formação dos derivados corados. Para tal, foram estabelecidas curvas de calibração através da injeção directa de 100 μl de soluções padrão de fenol, num intervalo de concentrações entre 1,00 e 20,0 mg l^{-1} , na ausência da etapa de pré-concentração, fazendo variar o caudal de envio das três seringas que contém o eluente da coluna (NaOH), o reagente de desenvolvimento de cor (4-aminoantipirina) e o reagente oxidante (hexacianoferrato(III) de potássio). Foi estudado o intervalo de caudais compreendido entre 1,5 e 3,0 ml min^{-1} por seringa, o que corresponde a um intervalo entre 4,5 e 9,0 ml min^{-1} no que concerne ao caudal total que passa na célula de fluxo. Os resultados obtidos estão representados na figura 3.14.

Atendendo aos resultados apresentados na figura 3.14 verifica-se que existe um ligeiro aumento da sensibilidade para os caudais mais elevados que foram testados (2,5 e 3,0 ml min^{-1}), o que permite concluir que é possível um aumento do ritmo de determinação através do aumento do caudal da etapa de eluição e reacção na metodologia proposta sem comprometer a sensibilidade da mesma. Deste modo, foi seleccionado o caudal de 2,5 ml min^{-1} por seringa para as restantes experiências como solução de compromisso, uma vez que possibilitou uma determinação mais rápida (o caudal utilizado até então era de 1,5 ml min^{-1}

por seringa), reduzindo o risco da existência de sobrepressões no sistema com a coluna de pré-concentração.

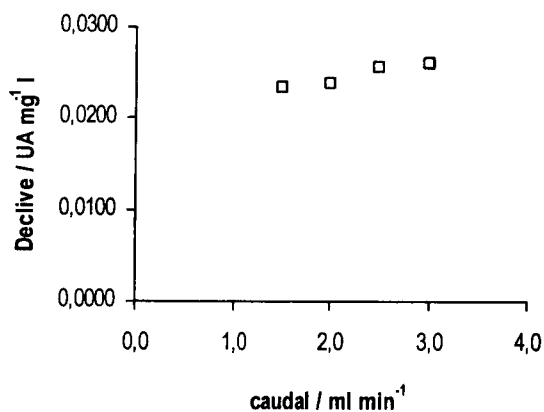


Figura 3.14. Declives obtidos pelo estabelecimento de curvas de calibração em que a etapa de mistura de reagentes e reacção química foi efectuada a diversos caudais, num intervalo compreendido entre 1,5 e 3,0 ml min⁻¹ em cada uma das três seringas que contém o eluente e os reagentes de desenvolvimento de cor e oxidante.

3.3. Caracterização e avaliação do sistema MSFIA

3.3.1. Resposta relativa de diferentes compostos fenólicos

Atendendo ao facto de a determinação em estudo ter como objectivo a quantificação de compostos fenólicos totais existiu a necessidade de aferir sobre a retenção efectiva dos diferentes derivados. Como a condensação oxidativa da 4-aminoantipirina com os compostos fenólicos proporciona respostas reaccionais distintas consoante as características químicas dos compostos fenólicos alvo da reacção não é possível estabelecer uma comparação directa entre os sinais obtidos após a etapa de pré-concentração. Deste modo, foi necessário avaliar a resposta relativa em relação ao fenol de alguns dos mais representativos compostos fenólicos: 2-clorofenol, 3-clorofenol, 1-naftol, 2-nitrofenol, *o*-cresol e *m*-cresol. A experiência

consistiu no estabelecimento de curvas de calibração na presença e na ausência da etapa de pré-concentração.

A avaliação das reactividades relativas dos diferentes compostos fenólicos na metodologia em estudo foi efectuada através do estabelecimento de curvas de calibração sem pré-concentração, através da injeção no sistema de 100 µl de soluções padrão dos diferentes compostos fenólicos. Os parâmetros das curvas de calibração obtidas, utilizando como sinal analítico a altura do pico e a área do pico, estão representados na tabela 3.5.

Tabela 3.5. Parâmetros das curvas de calibração sem pré-concentração obtidas pela injeção de 100 µl de soluções padrão dos vários compostos fenólicos em estudo, utilizando a altura e área do sinal transiente registado.

Composto	Altura do pico		Área do pico	
	declive / UA mmol ⁻¹ l	ordenada na origem	declive / UA s mmol ⁻¹ l	ordenada na origem
fenol	2,402	0,006	13,08	0,00
3-clorofenol	2,464	0,006	14,26	0,02
2-clorofenol	3,095	0,007	17,02	0,01
m-cresol	1,820	0,006	10,11	0,01
o-cresol	2,048	0,006	10,98	0,01
1-naftol	1,723	0,006	10,13	-0,01
2-nitrofenol	0,527	0,005	2,190	0,01

Foi executada uma segunda experiência submetendo os diferentes compostos fenólicos à etapa de pré-concentração. A coluna foi carregada com um volume total de 3,60 ml, em que

1,00 ml correspondeu ao volume de solução padrão e o restante a solução transportadora (HCl 0,010 mol l⁻¹). O caudal utilizado nesta operação foi de 5,0 ml min⁻¹. Na tabela 3.6 estão representados os parâmetros das curvas de calibração obtidas.

Tabela 3.6. Parâmetros das curvas de calibração obtidas pela pré-concentração de 1,00 ml de soluções padrão dos vários compostos fenólicos em estudo, utilizando a altura e área do sinal transiente registado.

Composto	Altura do pico		Área do pico	
	declive / UA mmol ⁻¹ l	ordenada na origem	declive / UA s mmol ⁻¹ l	ordenada na origem
fenol	12,35	0,004	104,1	0,07
3-clorofenol	8,504	0,002	106,3	0,23
2-clorofenol	13,45	-0,001	135,8	-0,10
m-cresol	7,243	0,001	83,32	-0,01
o-cresol	7,361	-0,005	87,87	-0,06
1-naftol	5,387	-0,014	74,67	-0,25
2-nitrofenol	2,562	0,004	15,80	0,01

Através dos dados obtidos com o estabelecimento das curvas de calibração com e sem pré-concentração foram calculadas as respostas percentuais relativamente ao fenol, numa base de equivalência molar, dos compostos em estudo (tabela 3.7).

Atendendo às respostas percentuais da tabela 3.7 verificou-se que as reactividades relativas com e sem pré-concentração do analito apresentam valores distintos consoante o sinal analítico utilizado (altura ou área do pico). Para a altura do pico as percentagens relativas

obtidas com a pré-concentração dos analitos foram inferiores às obtidas no caso da ausência desta etapa analítica. Tal não aconteceu quando o sinal analítico utilizado para efectuar a comparação foi a área do pico. Tal situação decorre das diferentes formas de pico obtidas para os diferentes compostos quando a análise é efectuada com pré-concentração dos analitos. Na figura 3.15 é possível visualizar os diferentes perfis dos sinais transientes obtidos para alguns dos compostos fenólicos estudados, nomeadamente no que respeita à forma do pico e ao tempo em que ocorre o máximo de absorção.

Tabela 3.7. Resposta relativa ao fenol obtida para os diferentes compostos fenólicos, traduzida pela razão entre os declives das curvas de calibração obtidas. Também são apresentados os valores do coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) (Hansch *et al.*, 1995) para os diferentes compostos.

Composto	Kow	Resposta sem pré-concentração		Resposta com pré-concentração	
		Altura do pico	Área do pico	Altura do pico	Área do pico
fenol	1,46	100	100	100	100
3-clorofenol	2,50	103	109	68,8	102
2-clorofenol	2,15	129	130	109	131
m-cresol	1,96	75,7	77,3	58,7	80,1
o-cresol	1,95	85,3	84,0	59,6	84,4
1-naftol	2,95	71,7	77,4	43,6	71,7
2-nitrofenol	1,79	21,9	16,7	20,7	15,2

Estas diferenças acentuadas no que respeita à forma dos picos obtidos devem-se às diferentes afinidades dos compostos pela resina Amberlite XAD-4. Tratando-se de uma resina adsorvente com propriedades hidrofóbicas, os compostos com coeficientes de partição

octanol-água (K_{ow}) mais elevados resistem mais à eluição por parte da solução de hidróxido de sódio, o que se traduz no perfil do sinal analítico, aparecendo os picos com uma cauda longa e uma altura menor (figura 3.15). Esta hipótese é confirmada pela diferença entre as reactividades relativas obtidas a partir a altura do pico (tabela 3.7), uma vez que os compostos mais hidrofóbicos (2-clorofenol, 3-clorofenol, 1-naftol) apresentam as maiores diferenças de resposta relativa sem e com pré-concentração. O contrário também é demonstrado pelos resultados da mesma tabela, uma vez que o 2-nitrofenol, que possui um valor de coeficiente de partição octanol-água próximo ao do fenol, apresentou uma reactividade relativa semelhante com e sem pré-concentração quer considerando a altura ou a área do pico, conforme demonstrado na figura 3.15.

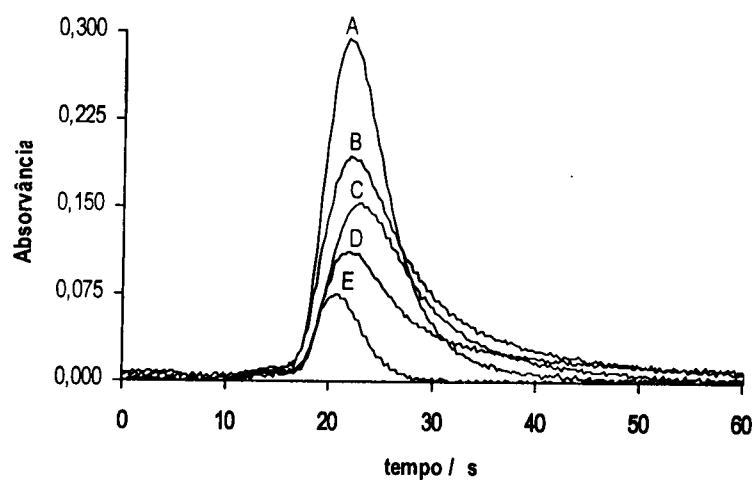


Figura 3.15. Perfis dos picos obtidos com diferentes compostos fenólicos: A – fenol (233 mmol l^{-1}), B – 3-clorofenol (227 mmol l^{-1}), C – o-cresol (213 mmol l^{-1}), D – 1-naftol (238 mmol l^{-1}), E – 2-nitrofenol (293 mmol l^{-1}).

As diferentes formas dos picos registados para cada composto inviabilizou a utilização da altura máxima dos mesmos como sinal analítico. Com o objectivo de solucionar este

problema foi adoptado como sinal analítico a área do pico obtido no final de cada ciclo analítico, sendo esta independente dos perfis de eluição dos diferentes compostos e, simultaneamente, proporcional à concentração dos analitos estudados, de acordo com os resultados apresentados nas tabelas 3.5, 3.6 e 3.7. Deste modo, a utilização da área do pico como sinal analítico possibilitou a existência de uma resposta analítica independente da etapa de pré-concentração.

3.3.2. Calibração em massa

Para implementar este tipo de calibração foi necessário estabelecer o intervalo de volumes em que a área do pico era constante para uma determinada massa de fenol. Foram desenvolvidas experiências que compreenderam a definição do intervalo de volumes para o estabelecimento das curvas de calibração e a utilização da área do pico como sinal analítico.

Na primeira fase de experiências avaliou-se o sinal analítico correspondente a duas massas de fenol (2,00 µg e 0,500 µg) contidas em diferentes volumes de solução num intervalo compreendido entre 1,68 e 21,1 ml. O carregamento da coluna foi processado da seguinte forma: para volumes de amostra compreendidos entre 1,68 e 6,74 ml, foi também enviado pela coluna um volume de 2,60 ml de solução transportadora para além do volume de amostra. Quando foram utilizados volumes de amostra entre 10,5 e 21,0 ml os carregamentos foram divididos, ou seja, o volume total foi carregado em várias etapas consecutivas, em porções de 5,00 ml com excepção do volume remanescente cuja etapa de carregamento foi semelhante à usada no intervalo de volumes referido anteriormente. Entre cada volume de 5,00 ml de solução padrão foram intercalados 2,00 ml de transportador que eram enviados

para o esgoto sem passar pela coluna, de modo a evitar a contaminação cruzada entre amostras consecutivas. Os resultados obtidos demonstram uma diminuição acentuada da absorvância máxima com o aumento do volume de solução (figura 3.16).

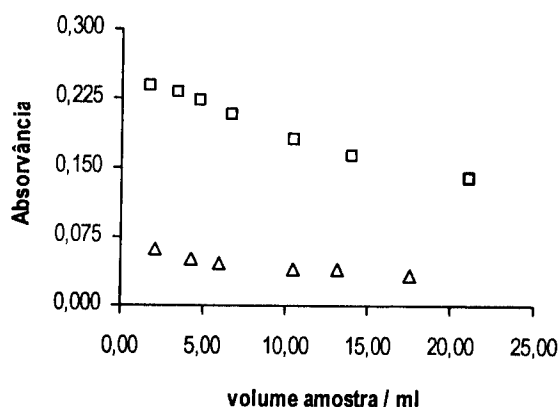


Figura 3.16. Alturas de pico obtidas pela injeção de 2,00 µg (□) e 0,500 µg (Δ) de fenol em diferentes volumes de solução, compreendidos entre 1,68 e 21,1 ml.

Perante estes primeiros resultados verificou-se que não era possível utilizar um intervalo tão alargado de volumes. Foi efectuado um segundo estudo avaliando um intervalo mais restrito. Foram estabelecidas curvas de calibração relacionando a altura e a área do pico com a massa de fenol carregada na coluna de pré-concentração, através da injeção destas num volume fixo de 1,00 ml e em volumes variáveis de solução no intervalo compreendido entre 0,500 e 6,00 ml. Na figura 3.17 representam-se graficamente as curvas de calibração obtidas, enquanto que, na tabela 3.8 é possível observar os valores de altura e área do pico para duas das massas de fenol enviadas através da coluna em diferentes volumes de solução.

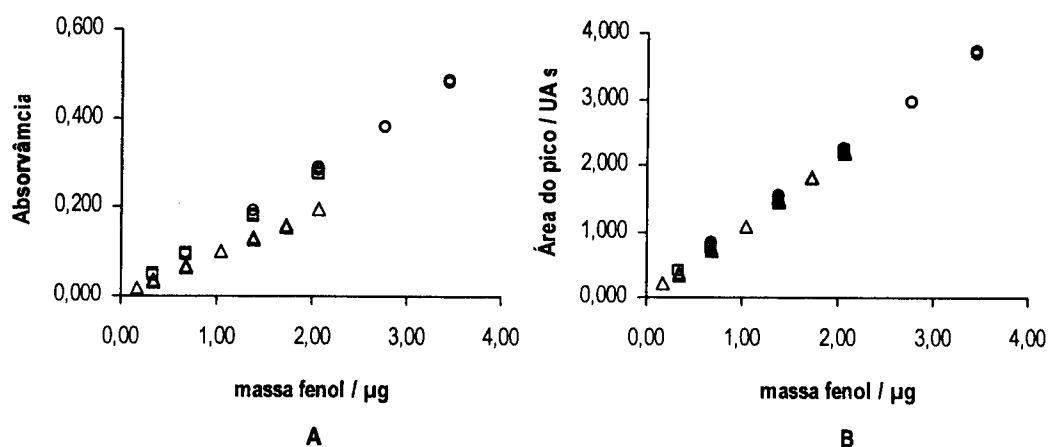


Figura 3.17. Curvas de calibração obtidas pelo carregamento na coluna de pré-concentração de massas de fenol compreendidas entre 0,157 e 3,45 µg contidas num volume fixo de 1,00 ml (○) e em volumes variáveis, nos intervalos 0,500-3,00 (□) e 0,500-6,00 ml (△).

Tabela 3.8. Alturas e áreas dos picos obtidos pelo carregamento na coluna de pré-concentração de 1,25 µg e 1,88 µg de fenol em diferentes volumes de solução.

Massa fenol / µg	Volume / ml	Sinal analítico	
		Altura do pico	Área do pico
1,25	1,00	0,153±0,003	1,35±0,01
	2,00	0,158±0,003	1,41±0,02
	4,00	0,141±0,001	1,42±0,02
1,88	1,00	0,229±0,002	2,02±0,01
	3,00	0,231±0,002	2,05±0,03
	6,00	0,205±0,001	2,08±0,02

Os resultados representados na figura 3.17 e na tabela 3.8 demonstram que a utilização da área do pico como sinal analítico apresenta vantagens no que respeita à equivalência dos sinais obtidos com o carregamento da mesma massa de fenol contida em diferentes volumes

de solução. Para os intervalos de massa de fenol (0,157 - 1,88 μg) e volumes de solução (0,500 - 6,00 ml) estudados existe uma proporcionalidade entre a área de pico e a massa de fenol, facto este que não acontece se o sinal analítico for a altura do pico. Deste modo, o intervalo de volumes compreendido entre 0,500 e 6,00 ml foi adoptado para o estabelecimento de curvas de calibração que relacionam a área do pico com a massa de fenol que é carregada na coluna de pré-concentração.

3.3.3. Estudo de possíveis interferentes

Atendendo às considerações efectuadas sobre os interferentes na reacção da 4-aminoantipirina (secção 1.2.1), verifica-se que a metodologia de fluxo desenvolvida apresenta vantagens no que respeita à eliminação de possíveis interferentes. No método proposto as amostras são previamente acidificadas a pH 2, o que impede a adsorção das aminas aromáticas, uma vez que se tratam de bases fracas e estão na forma ionizada a este valor de pH e, simultaneamente, permite a eliminação de sulfuretos sob a forma de sulfureto de hidrogénio. Porém este tratamento prévio pode não ser suficiente no caso das amostras apresentarem forte turbidez ou cor, devendo-se recorrer, nestes casos, à destilação.

Com o objectivo de identificar e avaliar potenciais interferentes na metodologia desenvolvida foi efectuado um estudo experimental em que as substâncias a testar foram adicionadas a uma solução de fenol com uma concentração de 0,500 mg l⁻¹. Foram consideradas interferentes as espécies que provocaram um desvio relativo superior a cinco por cento no valor do sinal analítico (área do pico). Foram analisadas as seguintes espécies: sulfito, nitrito, sulfureto, anilina e hipoclorito (tabela 3.9). O anião sulfito não revelou qualquer interferência

nas concentrações testadas. Todas as restantes espécies revelaram-se potencialmente interferentes, com limites de tolerância variados. O anião nitrito e a anilina apresentaram um limite de tolerância de 50,0 mg l⁻¹, enquanto que para o anião sulfureto este foi de 5,00 mg l⁻¹. A espécie potencialmente mais interferente que foi testada foi anião hipoclorito, cujo limite máximo de tolerância não ultrapassou a concentração de 1,00 mg l⁻¹.

Tabela 3.9. Resultados obtidos no estudo de substâncias potencialmente interferentes na determinação de compostos fenólicos.

Substância adicionada	Concentração da substância adicionada / mg l ⁻¹	Desvio relativo / %
Sulfito	50,0	0,9
	100	0,1
	250	0,6
	750	4,9
Nitrito	50,0	-2,7
	100	-7,3
	250	-9,9
Sulfureto	5,00	4,4
	10,0	8,1
	25,0	-23,9
Anilina	50,0	1,5
	100	10,6
	250	27,7
	500	53,8
Hipoclorito	1,00	4,8
	2,00	9,9
	3,00	65,2

3.3.4. Caracterização do sistema e análise de amostras

A tabela 3.10 apresenta as características do sistema para as diferentes condições de calibração utilizadas. Foram executadas curvas de calibração recorrendo a um volume de amostra fixo de 1,00 e 24,0 ml, através da utilização de padrões com concentrações variáveis de fenol. Também foi possível o estabelecimento de curvas de calibração utilizando apenas uma solução padrão, através da aplicação de um intervalo dinâmico de volumes compreendido entre 0,500 e 6,00 ml, que possibilitou a obtenção dos sinais analíticos correspondentes a diferentes massas de fenol carregadas na coluna. A utilização da calibração em massa permite não só uma maior simplicidade na obtenção de curvas de calibração mas também uma versatilidade acrescida na determinação de compostos fenólicos nas amostras de água, uma vez que possibilita a injeção do volume mais adequado de amostra para efectuar a análise.

Todas as curvas de calibração foram obtidas por injeções em triplicado das soluções padrão utilizadas. A metodologia desenvolvida possibilita o estabelecimento das diferentes curvas de calibração sem qualquer modificação da montagem analítica, tornando possíveis as determinações num intervalo alargado de concentrações. A utilização de grandes volumes de amostra (24,0 ml) permitiu atingir limites de detecção suficientemente baixos para que fosse possível determinar concentrações na ordem dos $\mu\text{g l}^{-1}$. A precisão foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR). Os valores obtidos, compreendidos entre 1,1 e 3,5 %, indicam uma boa repetibilidade por parte do método.

Para avaliar a exactidão da metodologia proposta foram analisadas amostras certificadas de compostos fenólicos. Os valores certificados e os resultados obtidos por interpolação do sinal

analítico (área do pico) das amostras na respectiva curva de calibração encontram-se na tabela 3.11.

Tabela 3.10. Características analíticas da metodologia de fluxo desenvolvida.

	Volume de amostra ou solução padrão / ml		
	1,00	0,500 - 6,00	24,0
Limite de detecção/mg l ⁻¹	0,07	0,009	0,002
Ritmo de determinação/h ⁻¹	15	10 - 16	4
Intervalo de concentrações/mg l ⁻¹	0,500 - 3,00	0,027 - 3,80	0,010-0,280
DPR/% (n = 12)	1,1	3,5	2,4
Curva de calibração*	1,055 (±0,006) m _{fe} ⁺ +0,04 (±0,02)	1,104 (±0,006) m _{fe} ⁺ + 0,022 (±0,007)	0,096 (±0,006) m _{fe} ⁺ + 0,00 (±0,02)

*Unidades do declive: UA s µg⁻¹. m_{fe}: massa de fenol / µg.

Tabela 3.11. Resultados obtidos na análise de amostras certificadas.

Amostra	Volume	Compostos fenólicos totais / mg l ⁻¹		
		Valor certificado	Limites de aceitação	Valor obtido
RTC – QCI-043-2	0,500	5,01 ± 0,76	2,73 - 7,28	5,26 ± 0,06
LGC – QCI-760	3,00	0,223 ± 0,002	0,098 - 0,197	0,144 ± 0,005
LGC – QCI-760	24,0	0,223 ± 0,002	0,098 - 0,197	0,167 ± 0,004

Comparando os resultados obtidos com os valores certificados verifica-se que estes se encontram dentro dos limites de aceitação, estabelecidos através de análises inter-laboratoriais segundo metodologias de referência para os analitos em questão. No caso da amostra LGC-QCI-760 o valor certificado ($0,223 \text{ mg l}^{-1}$) é significativamente mais elevado que o valor médio ($0,148 \text{ mg l}^{-1}$) estabelecido pelos limites de aceitação. Por um lado, o valor certificado para os compostos em questão foi estabelecido através de outra metodologia, a cromatografia líquida de alta eficiência. Por outro lado, a amostra em questão inclui na sua composição 2,4-dinitrofenol e 2,4-diclorofenol, compostos estes que são substituídos na sua posição *para*, estando por isso inibidos total ou parcialmente de reagir com a 4-aminoantipirina, não possuindo, por esse motivo, a capacidade de originar produtos reaccionais corados. A composição qualitativa desta amostra completa-se com o fenol e 2-clorofenol.

Tendo como objectivo a avaliação de possíveis efeitos de matriz foram efectuados ensaios de recuperação utilizando água mineral e água da torneira. Foram adicionadas pequenas quantidades de fenol às matrizes em questão e foi calculada a percentagem de recuperação (tabela 3.12). O fenol adicionado correspondeu ao conteúdo total das amostras uma vez que a injeção destas matrizes revelou um sinal analítico semelhante ao branco.

As percentagens de recuperação encontradas evidenciam a ausência de efeitos de matriz tanto por parte da água mineral como da água da torneira. Os valores de recuperação mais distantes de cem por cento (água da torneira $0,499 \text{ mg l}^{-1}$ (83,1%) e $0,020 \text{ mg l}^{-1}$ (113,1%)) justificam-se devido ao facto de os valores da áreas dos picos obtidos serem reduzidas,

repercutindo-se este facto nas concentrações calculadas após interpolação do sinal analítico na respectiva curva de calibração.

Tabela 3.12. Resultados obtidos nos ensaios de recuperação.

Matriz	Volume	Concentração em fenol / mg l ⁻¹		
		Adicionado	Obtido	Recuperação / %
Água torneira	0,500	0,499	0,415 ± 0,023	83,1
Água mineral	0,500	0,498	0,495 ± 0,009	99,4
Água torneira	3,00	0,499	0,499 ± 0,004	100,1
Água mineral	3,00	0,498	0,514 ± 0,002	103,1
Água torneira	24,0	0,020	0,023 ± 0,002	113,1

4.

CONCLUSÕES

4.1. Novas contribuições para as metodologias de fluxo

No desenvolvimento do trabalho apresentado nesta dissertação foi possível adoptar a mesma configuração do sistema para efectuar a pré-concentração de diferentes volumes de amostra. Deste modo, foram estabelecidas curvas de calibração com a utilização de uma única solução padrão, através da utilização de diferentes volumes de solução proporcionando um intervalo dinâmico de concentrações. Esta estratégia permitiu ainda a escolha, dentro do intervalo 0,5 - 6,00 ml, do volume mais apropriado para efectuar a determinação. A versatilidade do sistema proposto possibilitou ainda a utilização, quando necessário e sem qualquer modificação da montagem analítica, de volumes de amostra superiores (24,0 ml) para que a determinação fosse possível em amostras com concentrações inferiores a 50 µg l⁻¹ de fenol.

Foi também possível neste trabalho, pela primeira vez, a utilização de partículas de resina Amberlite XAD-4 de reduzidas dimensões (menores que 125 µm). Embora estas partículas tenham já sido referenciadas como aquelas que proporcionavam melhores eficiências no processo extractivo, a sua utilização foi sempre inviabilizada pelas elevadas pressões criadas nos sistemas. Através da utilização de materiais rígidos (metacrilato) nas colunas de pré-concentração e da aplicação de sentidos inversos de fluxo nas etapas de carregamento e eluição dos analitos, tornou-se possível a execução da etapa de pré-concentração de uma forma mais rápida e eficiente.

4.2. Novas contribuições no âmbito da “Química Verde”

Um dos doze princípios da “Química Verde” enuncia a “análise para a prevenção da poluição em tempo real” (Anastas e Warner, 1998; Lancaster, 2002). É neste contexto que as técnicas de fluxo se podem assumir como ferramentas de grande utilidade, uma vez que tornam possível a monitorização de parâmetros de interesse ambiental e, simultaneamente, possibilitam a implementação de processos analíticos menos agressivos para o ambiente, promovendo o desenvolvimento de novas metodologias em que não sejam utilizados ou produzidos compostos tóxicos, bem como através da redução do consumo de reagentes e da produção de efluentes.

Atendendo ao facto de que se tratam de técnicas automáticas, este facto pode, por si só, constituir um motivo de interesse para os processos químicos “verdes”. Tal situação deve-se às características inerentes aos processos automáticos: a manipulação de soluções é automática e limitada ao sistema; existe uma redução da produção de resíduos relacionados com os materiais utilizados na manipulação como luvas, frascos, pipetas e outros produtos descartáveis; além de ser diminuída a possibilidade de derramamento de soluções e, conseqüentemente, existir um menor risco de exposição a potenciais perigos por parte dos operadores.

As potencialidades das técnicas de fluxo na aplicação da “Química Verde” foram abordadas recentemente por Rocha *et al.* (2001). Segundo estes autores, além da minimização da produção de resíduos referenciada anteriormente, existem outro tipo de medidas que podem ser implementadas recorrendo às metodologias baseadas neste tipo de sistemas. São exemplos dessas medidas a procura de procedimentos analíticos que não utilizem reagentes

(como a utilização de processos de separação com detectores universais como a radiação ultravioleta e o desenvolvimento de sensores e biosensores), a substituição de reagentes perigosos, a reciclagem dos resíduos gerados durante os processos e sua posterior reutilização (nomeadamente no que respeita a solventes orgânicos) além do tratamento de resíduos em linha (recorrendo a reacções químicas ou fotoquímicas que transformem os compostos perigosos em derivados com toxicidade diminuída ou ausente).

Foi neste contexto que o presente trabalho foi desenvolvido, procurando a determinação de compostos fenólicos em baixas concentrações mas também que esse processo fosse executado de forma a minimizar o impacto ambiental da análise, evitando a utilização de solventes orgânicos e procurando reduzir o consumo de reagentes e a produção de efluentes.

A tabela 4.1 apresenta os consumos de reagentes e solventes orgânicos por determinação para o sistema proposto, para a metodologia de referência da American Public Health Association (Clesceri *et al.*, 1998) e para diferentes metodologias de fluxo com pré-concentração.

Através dos dados da tabela 4.1 verificamos que a metodologia proposta consegue uma redução da quantidade de reagentes utilizada cerca de 50 vezes relativamente à metodologia de referência. Quando a comparação é efectuada com outras metodologias de fluxo com pré-concentração, verifica-se que os consumos são semelhantes aos do sistema proposto por Song *et al.* (1997), cujos valores são os mais reduzidos de todas as metodologias propostas.

Tabela 4.1. Consumos de reagentes e solventes orgânicos por determinação para o sistema proposto, para a metodologia de referência da American Public Health Association (Clesceri *et al.*, 1998) e para um conjunto de metodologias de fluxo com pré-concentração referenciadas na literatura.

Reagente / solvente	Sistema proposto	Referência			
		Clesceri et al., 1998	Zhi <i>et al.</i> , 1996	Song <i>et al.</i> , 1997	Erxbelen et al., 2001
4-AAP / mg	1,38	60	30	1,1	1,25
K ₃ [Fe(CN) ₆] / mg	4,13	240	--	2,2	23,5
K ₂ S ₂ O ₈ / mg	--	--	300	--	--
Clorofórmio / ml	0	25	4,1	0	1,2

A tabela 4.1 referencia apenas os reagentes directamente envolvidos na produção dos derivados corados resultantes da condensação oxidativa dos compostos fenólicos com a 4-aminoantipirina, não estando referenciados os reagentes que constituem as soluções tampão, devendo-se tal situação à enorme diversidade de sistemas utilizados. Contudo, este aspecto não foi negligenciado neste trabalho uma vez que foram estudados pormenorizadamente vários sistemas tampão também com objectivo de reduzir o consumo destes reagentes, substituindo-se o sistema tampão combinado carbonato-borato, utilizado habitualmente em sistemas de fluxo, por uma solução tampão borato 0,124 mol l⁻¹. Deste modo, conseguiu-se um menor gasto de reagente e, simultaneamente, um incremento na sensibilidade do processo.

Outro aspecto importante resulta do facto da metodologia proposta, ao contrário da metodologia de referência e de alguns sistemas de fluxo propostos, não utilizar qualquer solvente orgânico, resultando numa determinação ambientalmente mais favorável.

A tabela 4.2 representa o volume de efluente gerado para a metodologia de referência (Clesceri *et al.*, 1998) e para os sistemas referenciados na tabela 4.1. Por sua vez, na tabela 4.3 estão representados os volumes de efluente produzidos pelo sistema proposto quando são utilizados diferentes volumes de amostra. Em ambos os casos os valores referem-se a uma determinação.

Tabela 4.2. Efluente gerado por determinação para a metodologia de referência da American Public Health Association (Clesceri *et al.*, 1998) e para um conjunto de metodologias de fluxo com pré-concentração referenciadas na literatura.

	Referência			
	Clesceri <i>et al.</i> , 1998	Zhi <i>et al.</i> , 1996	Song <i>et al.</i> , 1997	Erxebelen <i>et al.</i> , 2001
Efluente total / ml	553	69	20,2	3,4

Tabela 4.3. Efluente gerado por determinação para o sistema proposto utilizando diferentes volumes de amostra.

	Volume de amostra / ml		
	0,5	6,00	24,0
Efluente total / ml	13,9	19,4	43,4

Os valores apresentados nas tabelas 4.2 e 4.3 demonstram que a metodologia proposta apresenta uma produção de resíduos bastante inferior à metodologia de referência. Embora esta produção esteja directamente associada ao volume de amostra utilizado para a determinação, mesmo para o maior volume de amostra utilizado (24 ml) o volume gerado representa apenas 8% do valor referente à metodologia de referência. Utilizando como termo de comparação as várias metodologias de fluxo referenciadas verifica-se que, tal como para o consumo de reagentes, o sistema proposto, para um volume de amostra de 6,00 ml, produz uma quantidade de efluente semelhante à do sistema proposto por Song *et al.* (1997). Somente o sistema proposto por Erleben *et al.* (2001) produz uma quantidade de resíduos inferior ao sistema apresentado no presente trabalho. Porém, esse sistema recorre à utilização de clorofórmio, produzindo resíduos contaminados com solvente orgânico.

REFERÊNCIAS

- Albertús, F., Horstkotte, B., Cladera, A. e Cerdà, V. 1999. A robust multisyringe system for process flow analysis. Part I. On-line dilution and single point titration of protolytes. *Analyst* 124: 1373-1381.
- Albertús, F., Cladera, A. e Cerdà, V. 2000. A robust multisyringe system for process flow analysis. Part II. A multi-commuted injection system applied to the photometric determination of free acidity and iron(III) in metallurgical solutions. *Analyst* 125: 2364-2371.
- Albertús, F., Cladera, A., Becerra, E. e Cerdà, V. 2001. A robust multisyringe system for process flow analysis. Part III. Time based injection applied to the spectrophotometric determination of nickel (II) and iron speciation. *Analyst* 126: 903-910.
- Anastas, P. C. e Warner, J. C. 1998. *Green Chemistry, theory and practice*. Oxford University Press, New York.
- Andrade-Eiroa, A., Erustes, J. A., Forteza R., Cerdà, V. e Lima J. L. F. C. 2002. Determination of chloride by multisyringe flow injection analysis and sequential injection analysis with potentiometric detection. *Analytica Chimica Acta* 467: 25-33.
- Armas, G., Miró, M., Cladera, A., Estela, J. M. e Cerdà, V. 2002a. Time-based multisyringe flow injection system for the spectrofluorimetric determination of aluminium. *Analytica Chimica Acta* 455: 149-157.
- Armas, G., Miró, M., Estela, J. M. e Cerdà, V. 2002b. Multisyringe flow injection spectrofluorimetric determination of warfarin at trace levels with on-line solid-phase preconcentration. *Analytica Chimica Acta* 467: 13-23.

- BDH. 1981. *Ion exchange resins*. 6^a ed., BDH Chemicals Ltd., Poole.
- Cerdà, V., Estela, J. M., Forteza, R., Cladera, A., Becerra, E., Altimira, P. e Sitjar, P. 1999. Flow techniques in water analysis. *Talanta* 50: 695-705.
- Cerdà V. 2003. Multisyringe flow injection analysis, a young and promising flow technique. *Journal of Flow Injection Analysis* 20: 203-206.
- Cladera, A., Miró, M., Estela, J. M. e Cerdà, V. 2000. Multicomponent sequential injection analysis determination of nitro-phenols in waters by on-line liquid-liquid extraction and pre-concentration. *Analytica Chimica Acta* 421: 155-166.
- Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. e Eaton, A. D. (Editores) 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20^a ed., American Public Health Association, Washington, secção 5530.
- Decreto-Lei nº 236/98. 1998. *Diário da República Portuguesa* 176 I A: 3675-3722.
- Decreto-Lei nº 243/2001. 2001. *Diário da República Portuguesa* 206 I A: 5754-5765.
- Eisenstaedt, E. 1938. The condensation of aminoantipyrine with aromatic amines in the presence of oxidizing agents. *Journal of Organic Chemistry* 3: 153-164.
- Emerson, E. 1943. The condensation of aminoantipyrine. II. A new color test for phenolic compounds. *Journal of Organic Chemistry* 8: 417-428.
- Erxleben, H., Simon, J., Moskvín, L. N. e Nikitina, T. G. 2001. Photometric determination of phenol with a flow-injection analyser that includes a cromatomembrane-cell for sample

- preconcentration by liquid-liquid solvent extraction. *Journal of Flow Injection Analysis* 18 (1): 39-42.
- Ettinger, M. B., Ruchhoft, C. C. e Lishka, R. J. 1951. Sensitive 4-aminoantipyrine method for phenolic compounds. *Analytical Chemistry* 23: 1783-1788.
- Fajardo, Y., Gómez, E., Mas, F., Garcias, F., Cerdà, V. e Casas, M. 2004. Multisyringe flow injection analysis of stable and radioactive strontium in samples of environmental interest. *Applied Radiation and Isotopes* 61: 273-277.
- Farino, J., Norwitz, G., Boyko, W. J. e Keliher, P. N. 1981. Study of the behaviour of various phenolic compounds in the 4-aminoantipyrine and ultraviolet-ratio spectrophotometric methods without and with distillation. *Talanta* 28: 705-708.
- Faust, S. D. e Mikulewickz, E. W. 1967a. Factors influencing the condensation of 4-aminoantipyrine with derivatives of hidroxybenzene – I. A critique. *Water Research* 1: 405-418.
- Faust, S. D. e Mikulewickz, E. W. 1967b. Factors influencing the condensation of 4-aminoantipyrine with derivatives of hidroxybenzene – II. Influence of hydronium ion concentration on absorptivity. *Water Research* 1: 509-522.
- Faust, S. D. e Anderson, P. W. 1968. Factors influencing the condensation of 4-aminoantipyrine with derivatives of hidroxybenzene – III. A study of phenol content in surface waters. *Water Research* 2: 515-525.

- Fellenberg, G. 1980. *Introdução aos problemas da poluição ambiental*. E.P.U. – Springer – EDUSP, São Paulo.
- Frenzel, W., Oleksy-Frenzel, J. e Moller, J. 1992. Spectrophotometric determination of phenolic compounds by flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta* 261: 253-259.
- Frenzel, W. e Krekler, S. 1995. Spectrophotometric determination of total phenolics by solvent extraction and sorbent extraction optosensing using flow injection methodology. *Analytica Chimica Acta* 310: 437-446.
- Gordon, G. E. 1960. Colorimetric determination of phenolic materials in refinery waste waters. *Analytical Chemistry* 32: 1325-1326.
- Gottlieb, S. e Marsh, P. B. 1946. Quantitative determination of phenolic fungicides. *Analytical Chemistry* 18: 16-19.
- Hansch, C., Leo, A. e Hoekman, D. 1995. *Exploring QSAR – Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*. American Chemical Society, Washington.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). 1976. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis – II. Data interpretation. *Analytical Chemistry* 48: 2294-2296.
- Jin, G., Iburaim, A., Itagaki, M. e Watanabe, K. 2003. On-line concentration method using teflon filter tube for spectrophotometric determination of trace amounts of phenols [em japonês]. *Bunseki Kagaku* 52: 171-177.
- Klimundova, J., Forteza, R. e Cerdà, V. 2003. A multisyringe flow injection system coupled

- with gas diffusion cell for ammonium determination. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 83: 233-246.
- Ku, Y. e Lee, K-C. 2000. Removal of phenols from aqueous solution by XAD-4 resin. *Journal of Hazardous Materials* B80: 59-68.
- Laboratório de Química da Faculdade de Ciências. 1968. Cálculo de pH de soluções aquosas. Centro Universitário do Porto, Porto.
- Lancaster, M. 2002. *Green Chemistry: an introductory text*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Lupetti, K. O., Rocha, F. R. P. e Fatibello F^o, O. 2004. An improved flow system for phenols determination exploiting multicommutation and long pathlength spectrophotometry. *Talanta* 62: 462-467.
- Manera, M., Miró, M., Estela, J. M. e Cerdà, V. 2004. A multisyringe flow injection system with immobilized glucose oxidase based on homogeneous chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta* 508: 23-30.
- Marshall, G. D. e Van Staden, J. F. 1992. Operational parameters affecting zone penetration in sequential injection analysis. *Process Control and Quality* 3: 251-261.
- Michalowski, J., Halaburda, P. e Kojlo, A. 2000. Determination of phenols in natural waters with a flow-analysis method and chemiluminescence detection. *Analytical Letters* 33 (7): 1373-1386.
- Miller, J. C. e Miller, J. N. 1993. *Statistics for Analytical Chemistry*, 3^a ed. Ellis Horwood,

Chichester.

Miró, M., Cladera, A., Estela, J. M. e Cerdà, V. 2001. Dual wetting-film multi-syringe flow injection analysis extraction. Application to the simultaneous determination of nitrophenols. *Analytica Chimica Acta* 438: 103-116.

Miró, M., Estela, J. M. e Cerdà V. 2002. Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications. *Trends in Analytical Chemistry* 21: 199-210.

Miró, M. e Frenzel, W. 2004. A critical examination of sorbent extraction pre-concentration with spectrophotometric sensing in flowing systems. *Talanta* 61: 290-301.

Moller, J. e Martin, M. 1988. Determination of phenol in water by flow injection analysis. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie* 329: 728-731.

Morais, I. P. A., Miró, M., Manera, M., Estela, J. M., Cerdà, V., Souto, M. R. S. e Rangel, A. O. S. S. 2004. Flow-through solid-phase based optical sensor for the multisyringe flow injection trace determination of orthophosphate in waters with chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta* 506: 17-24.

Navarro-Villoslada, F., Pérez-Arribas, L. V., León-Gonzales, M. E., e Polo-Díez, L. M. 1995. Preconcentration and flow-injection multivariate determination of priority pollutant chlorophenols. *Analytica Chimica Acta* 308: 238-245.

Norwitz, G. e Keliher, P. N. 1980. Effect of acidity and alkalinity on the distillation of phenol: interference of aromatic amines and formaldehyde with the 4-aminoantipyrine spectrophotometric method for phenol. *Analytica Chimica Acta* 119: 99-111.

- Ochynski, F. W. 1960. The absorptiometric determination of phenol. *Analyst* 85: 278-281.
- Pizà, N., Miró, M., Armas, G., Estela, J. M. e Cerdà, V. 2002. Implementation of chemiluminescence detection in the multisyringe flow injection technique. *Analytica Chimica Acta* 467: 155-166.
- Pizà, N., Miró, M., Estela, J. M. e Cerdà, V. 2004. Automated enzymatic assays in a renewable fashion using the multisyringe flow injection scheme with soluble enzymes. *Analytical Chemistry* 76: 773-780.
- Pons, C., Forteza, R. e Cerdà, V. 2004. Expert multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron using chelating disks in water samples. *Analytica Chimica Acta* 524: 79-88.
- Rama, M. J. R., Ruiz Medina, A. e Molina Díaz, A. 2003. A simple and straightforward procedure for monitoring phenol compounds in water by using UV solid phase transduction integrated in a continuous flow system. *Microchimica Acta* 141: 143-148.
- Reis, B. F., Giné, M. F., Zagatto, E. A. G., Lima, J. L. F. C. e Lapa, R. A. 1994. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. *Analytica Chimica Acta* 293: 129.
- Rohm and Haas. 2003. Amberlite XAD-4 – Product data sheet. Rohm and Haas Company, Philadelphia.
- Rocha, F. R. P., Nóbrega, J. A. e Fatibello F^o, O. 2001. Flow analysis strategies to greener analytical chemistry. An overview. *Green Chemistry* 3: 216-220.

- Rodríguez, I., Llompart, M. P. e Cela, R. 2000. Solid-phase extraction of phenols. *Journal of Chromatography A* 885: 291-304.
- Segundo, M. A., Rangel, A. O. S. S., Cladera, A. e Cerdà, V. 2000. Multisyringe flow system: determination of sulfur dioxide in wines. *Analyst* 125: 1501-1505.
- Segundo, M. A. e Rangel, A. O. S. S. 2002. Flow analysis: a critical view of its evolution and perspectives. *Journal of Flow Injection Analysis* 19: 3-8.
- Semenova, N. V., Leal, L. O., Forteza, R. e Cerdà, V. 2002. Multisyringe flow-injection system for total inorganic arsenic determination by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 455: 277-285.
- Semenova, N. V., Leal, L. O., Forteza, R. e Cerdà, V. 2003. Multisyringe flow-injection system for total inorganic selenium determination by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 486: 217-225.
- Song, W., Zhi, Z. e Wang, L. 1997. Amberlite XAD resin solid phase extraction coupled on-line to a flow injection approach for the rapid enrichment and determination of phenols in water and waste waters. *Talanta* 44: 1423-1433.
- Svobodová, D. e Gasparic, J. 1970. Investigation of the colour reaction of phenols with 4-aminoantipyrine. *Mikrochimica Acta* 1: 384-390.
- Tebbutt, T. H. Y. 1998. *Principles of water quality control*. 5ª ed., Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Vera-Avila, L. E., Gallego-Perez, J. L. e Camacho-Frias, E. 1999. Frontal analysis of aqueous

phenol in Amberlite XAD-4 columns. Implications and design of solid-phase extraction systems. *Talanta* 50: 509-526.

Vollhardt, K. P. C. e Schore, N. E. 1994. *Organic Chemistry*. 2ª ed., W. H. Freeman and Company, New York.

Zhi, Z., Ríos, A. e Valcárcel, M. 1996. Continuous-flow method for the determination of phenols at low levels in water and soil leachates using solid-phase extraction for simultaneous preconcentration and separation. *Analyst* 121: 1-6.

