



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

SISTEMAS DE FLUXO CONTÍNUO BASEADOS EM NOVOS CONCEITOS DE GESTÃO DE FLUIDOS

Marta Filipa Teixeira Ribeiro

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Porto, 2008

Marta Filipa Teixeira Ribeiro

Licenciada em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Porto

Sistemas de fluxo contínuo baseados em novos conceitos de gestão de fluidos

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
para a obtenção do grau de Doutor

Faculdade de Farmácia U.P.

Porto, 2008

**Trabalho realizado no serviço de Química-Física
da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto**

Resumo

No âmbito desta dissertação foram desenvolvidas e avaliadas algumas potencialidades de dois novos conceitos de gestão de fluidos, a multi-impulsão e a reacção em interface única.

No que diz respeito ao conceito de multi-impulsão, a avaliação geral das características de funcionamento foi enquadrada pela determinação espectrofotométrica de buspirona em formulações farmacêuticas. As condições óptimas de ensaio determinaram, neste caso particular, a selecção de uma estratégia de paragem de fluxo.

Foram também avaliadas as potencialidades do fluxo pulsado produzido por actuação das micro-bombas solenóides na obtenção de uma mistura rápida e eficaz aquando do recurso à detecção por quimiluminescência. A eficiência e rapidez da mistura requerida por este tipo de detecção foi testada através do desenvolvimento de um sistema multi-impulsão para a geração em linha de anião peroxinitrito, com posterior avaliação *in vitro*, em sistemas não celulares, do efeito captador dos compostos ácido di-hidrolipóico, ácido lipóico, cisteína, glutathione reduzida, glutathione oxidada, sulindac e sulindac sulfona.

Aproveitando a natureza do fluxo pulsado, foi igualmente avaliada a acção mecânica do mesmo para colocar partículas de reagentes sólidos em suspensão à semelhança do que acontece com os reactores fluidizados correntemente usados a nível industrial. Como aplicação foi seleccionada a determinação espectrofotométrica de zinco em extractos de plantas, utilizando uma resina em suspensão para concentração e separação de zinco por troca iónica.

Ainda no que diz respeito ao conceito de multi-impulsão procurou-se avaliar a possibilidade de existirem outros processos capazes de fornecerem sistemas de fluxo pulsado. A avaliação de um processo alternativo foi efectuada através da utilização de micro-bombas piezoeléctricas, por aplicação à determinação espectrofotométrica de gabapentina em formulações farmacêuticas.

As avaliações iniciais não deixaram dúvidas sobre as potencialidades da multi-impulsão, contudo e considerando a dependência dos resultados em função do controlo do volume de amostra e reagentes introduzidos nas montagens de fluxo, foi ainda desenvolvida e avaliada uma nova estratégia de gestão de fluidos, baseada num conceito de reacção em interface única. A avaliação das potencialidades da estratégia desenvolvida, a qual representa uma inovação relativamente à noção tradicional de análise em fluxo contínuo, uma vez que não implica a inserção de volumes definidos de amostra e reagentes nas montagens, foi efectuada através do desenvolvimento de montagens básicas e do seu estudo através da implementação de diversas reacções com detecção espectrofotométrica.

Abstract

In this work the performance and potentialities of two new fluid management concepts, multi-pumping and single reaction interface were evaluated under distinct analytical conditions.

With respect to multi-pumping concept, the general evaluation of operation characteristics was fitted by the spectrophotometric determination of buspirone in pharmaceutical preparations. The optimal determination conditions motivated the selection and utilisation of a stopped flow based approach.

The potentialities of pulsed flow produced by solenoid micro-pumps were also evaluated in order to obtain a fast and efficient mixing in the chemiluminescence detection. The efficiency and fast mixing required by this type of detection was evaluated in the development of a multi-pumping flow system for the in-line peroxyxynitrite generation with subsequent *in vitro* screening of scavenging activity of selected compounds such as dihydrolipoic acid, lipoic acid, cysteine, reduced glutathione, oxidized glutathione, sulindac and sulindac sulfone.

Taking advantage of the pulsed flow pattern, it was also evaluated the mechanic action of pulsed flow to put solid reagent particles in suspension as it occurs in fluidized reactors commonly used in industry. As an application spectrophotometric determination of zinc in plant digests by using a suspended resin for zinc concentration and separation by ionic exchange was selected.

With respect to the multi-pumping concept, the possibility of using other devices that produce a pulsed flow was evaluated. An alternative process was assessed by using piezoelectric micro-pumps, by application to the spectrophotometric determination of gabapentin in pharmaceutical preparations.

Initial evaluations did not compromise the well-recognised potential of multi-pumping, although and considering the results dependence on sample and reagent volumes inserted in the flow manifolds, a new fluid management strategy based on a single interface reaction could present significant advantages in several analytical circumstances. The potentialities of the developed strategy, which represents an innovation in comparison to the traditional continuous flow analysis since does not requires the insertion of defined sample and reagent volumes in the flow manifolds, was evaluated by the development of basic manifolds, and their study by implementation of several reactions with spectrophotometric detection.

Résumé

Les travaux conduisant à l'élaboration de cette dissertation ont permis de développer et d'évaluer les potentialités de deux nouveaux concepts de gestion de fluides, la multi-impulsion et la réaction en interface unique.

En ce qui concerne le concept de multi-impulsion, l'évaluation globale des caractéristiques de fonctionnement a été réalisée par détermination spectrophotométrique de buspirone dans des formulations pharmaceutiques. Dans ce cas particulier, la recherche des conditions optimales d'essai a abouti à la sélection d'une stratégie d'arrêt de flux.

Durant cette étude, il a aussi été évalué la potentialité du flux pulsé obtenu par des micro-bombes solénoïdes et détecté par chimiluminescence à produire un mélange rapide et efficace. La vitesse et l'efficacité du mélange nécessaire à ce type de détection ont été testées en développant un système de multi-impulsion de production en ligne d'anion peroxy-nitrite. En utilisant un système *in vitro* non-cellulaire, cette méthode a permis postérieurement d'étudier l'effet capteur du peroxy-nitrite par l'acide dihydrolipoïque, l'acide lipoïque, la cystéine, le glutathion réduit, le glutathion oxydé, le sulindac et le sulindac sulfoné.

Profitant de la nature du flux pulsé, l'action mécanique de celui-ci a aussi été étudiée pour mettre des particules solides en suspension, à l'image de ce que se passe avec les réacteurs fluidisés couramment utilisés au niveau industriel. Comme application de ce processus, le zinc issu d'extrait de plantes a été déterminé spectrophotométriquement, en utilisant une résine en suspension pour concentrer et séparer le zinc par échange d'ions.

En ce qui concerne le concept de multi-impulsion, l'existence d'autres procédés capables de fournir des systèmes de flux pulsé a été recherchée. L'évaluation d'un système alternatif a été effectuée grâce à l'utilisation de micro-bombes piézo-électriques, en déterminant spectrophotométriquement la gabapentine dans des formulations pharmaceutiques.

Bien que les premières études n'aient pas laissé de doutes sur les potentialités de la multi-impulsion, la dépendance des résultats en fonction du contrôle du volume de l'échantillon et des réactifs introduits dans le système de flux à donner lieu à de nouvelles études qui aboutirent à une nouvelle stratégie de gestion de fluides, basée sur le concept de réaction en interface unique. La stratégie développée représente une innovation relativement à la notion traditionnelle d'analyse en flux continu, une fois que ce nouveau modèle n'implique pas l'insertion de volumes définis d'échantillon et de réactif dans le système. L'évaluation des potentialités de cette nouvelle stratégie a été effectuée grâce au développement de montages simples et de leurs études avec diverses réactions détectées spectrophotométriquement.

Agradecimentos

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por me ter aceite como estudante de doutoramento, e em particular ao serviço de Química-Física, pelos meios disponibilizados para a realização deste trabalho.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, pela bolsa de doutoramento que me foi atribuída no âmbito do programa POCI 2010 e do Fundo Social Europeu, e outros apoios financeiros, sem os quais não teria sido possível realizar este trabalho.

Ao Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima, pela sua supervisão e orientação durante a realização deste trabalho. Agradeço também a disponibilidade, o apoio, o incentivo e o modo amigo como sempre me tratou.

Ao Professor Doutor João Luís Machado dos Santos, pelo apoio e co-orientação deste trabalho. Agradeço também a simpatia e a boa disposição, sempre demonstradas.

A todos os Professores do serviço de Química-Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, em especial ao Professor Doutor Alberto Araújo, pelos lances, livres, foras de jogo, remates à trave...e também pelos golos científicos; à Professora Doutora Conceição Montenegro pela simpatia e apoio; à Professora Doutora Marcela Segundo pela amizade e por aquela força; à Professora Doutora Eduarda Fernandes pelo seu apoio num dos trabalhos desenvolvidos; ao Professor Doutor Rui Lapa pelos Bytes, Kbytes, Mbytes, Gbytes..., e por último, à Professora Doutora Salette Reis pela minha escolha pelo departamento de Química-Física.

Ao Professor Doutor Elias Zagatto, por me ter proporcionado uma estadia muito produtiva no Centro de Energia Nuclear na Agricultura na

Universidade de São Paulo, e o contacto com outras realidades científicas. Agradeço também a hospitalidade e o carinho sempre demonstrados.

A todos os meus amigos “além fronteiras”, pelos muitos e bons momentos passados!!! Um abraço muito especial à Ana Cristi a quem agradeço para além de uma grande amizade tudo o mais enfim.

A todos os meus amigos e colegas do laboratório de Química-Física, por todos os bons momentos que passamos juntos, pela companhia, e por aquele apoio nas horas díficeis. Aquele abraço à Luísa por me ter acompanhado e “aturado” desde o primeiro ao último dia, à Célia (mestrado) por todo o incentivo e força, e à Eunice pela disponibilidade sempre demonstrada.

À D. Belmira e à menina Nelucha (D. Manuela), pela simpatia e pelo apoio naquelas pequenas coisas que no dia à dia se tornam imprescindíveis.

A todos os meus amigos... por todo o apoio, incentivo e força. Um abraço especial ao Bruno Sarmiento pela sua amizade incondicional e pelas leituras profissionais que fez deste trabalho.

Por fim, aos meus Pais, por todas as razões do mundo e muito em especial, por eles.

Índice

Capítulo 1	1-1
1. Introdução geral	
1.1. Métodos automáticos de análise	1-2
1.1.1. Métodos descontínuos	1-4
1.1.2. Métodos robotizados	1-4
1.1.3. Métodos de fluxo contínuo	1-5
1.2. Análise por injeção em fluxo (FIA)	1-7
1.3. Análise por injeção sequencial (SIA)	1-11
1.4. Multicomutação (MCFA)	1-16
1.5. Multi-seringa (MSFIA)	1-19
1.6. Novas estratégias de gestão de fluidos	1-22
1.6.1. Aspectos gerais	1-22
1.6.2. Multi-impulsão (MPFS)	1-24
1.6.3. Interface única (SIFA)	1-37
1.7. Referências bibliográficas	1-42
 Capítulo 2	 2-1
2. Aspectos gerais da parte experimental	
2.1. Introdução	2-2
2.2. Reagentes e soluções	2-2
2.3. Componentes dos sistemas de fluxo	2-3
2.3.1. Dispositivos de propulsão e inserção	2-3
2.3.1.1. Micro-bombas solenóides	2-3
2.3.1.2. Micro-bombas piezoeléctricas	2-5
2.3.1.3. Buretas automáticas	2-7
2.3.2. Dispositivos comutadores	2-8
2.3.3. Tubagem e outros componentes da montagem	2-9
2.3.4. Sistemas de detecção	2-10
2.3.5. Controlo informático dos sistemas	2-11
2.3.5.1. Aparelhagem	2-11
2.3.5.2. Software	2-12
2.4. Instrumentação adicional	2-12
2.5. Desenvolvimento e optimização das montagens de fluxo	2-13

2.6. Tratamento estatístico dos resultados	2-14
2.7. Referências bibliográficas	2-17

Capítulo 3 **3-1**

3. Sistemas de fluxo multi-impulsão. Determinação espectrofotométrica de buspirona em formulações farmacêuticas usando uma estratégia de paragem de fluxo

3.1. Introdução	3-2
3.2. Parte experimental	3-5
3.2.1. Reagentes e soluções	3-5
3.2.2. Equipamento	3-5
3.2.3. Montagem de fluxo	3-6
3.2.4. Método de referência	3-9
3.3. Resultados e discussão	3-10
3.3.1. Ensaio preliminares por procedimentos discretos	3-10
3.3.2. Desenvolvimento e optimização do sistema de fluxo	3-12
3.3.3. Avaliação de interferentes	3-22
3.3.4. Análise de formulações farmacêuticas	3-22
3.4. Conclusões	3-24
3.5. Referências bibliográficas	3-26

Capítulo 4 **4-1**

4. Sistemas de fluxo multi-impulsão. Avaliação da actividade captadora do anião peroxinitrito com detecção por quimiluminescência

4.1. Introdução	4-2
4.2. Parte experimental	4-7
4.2.1. Reagentes e soluções	4-7
4.2.2. Equipamento	4-8
4.2.3. Montagem de fluxo	4-9
4.3. Resultados e discussão	4-12
4.3.1. Optimização dos parâmetros físicos	4-13
4.3.2. Optimização dos parâmetros químicos	4-18
4.3.3. Avaliação da capacidade de captação do anião peroxinitrito	4-21
4.4. Conclusões	4-29

4.5. Referências bibliográficas	4-31
---------------------------------	------

Capítulo 5 **5-1**

5. Sistemas de fluxo multi-impulsão. Determinação espectrofotométrica de zinco em plantas com concentração em reator fluidizado

5.1. Introdução	5-2
5.2. Parte experimental	5-5
5.2.1. Reagentes e soluções	5-5
5.2.2. Equipamento	5-6
5.2.3. Montagem de fluxo	5-7
5.2.4. Método de referência	5-11
5.3. Resultados e discussão	5-13
5.3.1. Ensaio preliminares	5-13
5.3.2. Desenvolvimento e optimização do sistema de fluxo	5-14
5.3.2.1. Optimização das condições de fluidização	5-15
5.3.2.2. Optimização da etapa de concentração, etapa de eluição e da reacção espectrofotométrica do catião zinco com o reagente zincon	5-17
5.3.3. Análise de extractos de plantas	5-29
5.4. Conclusões	5-31
5.5. Referências bibliográficas	5-33

Capítulo 6 **6-1**

6. Sistemas de fluxo multi-impulsão. Determinação espectrofotométrica de gabapentina em formulações farmacêuticas usando micro-bombas piezoeléctricas

6.1. Introdução	6-2
6.2. Parte experimental	6-5
6.2.1. Reagentes e soluções	6-5
6.2.2. Equipamento	6-7
6.2.3. Montagem de fluxo	6-7
6.3. Resultados e discussão	6-10
6.3.1. Ensaio preliminares por procedimentos discretos	6-16

6.3.2. Desenvolvimento e otimização dos sistemas de fluxo	6-17
6.3.3. Avaliação de interferentes	6-25
6.3.4. Análise de formulações farmacêuticas	6-26
6.4. Conclusões	6-29
6.5. Referências bibliográficas	6-31
 Capítulo 7	 7-1
7. Análise em sistemas de fluxo de interface única. Avaliação das potencialidades	
7.1. Introdução	7-2
7.2. Parte experimental	7-5
7.2.1. Reagentes e soluções	7-5
7.2.2. Equipamento	7-7
7.2.3. Montagem de fluxo	7-8
7.3. Resultados e discussão	7-16
7.3.1. Avaliação preliminar do funcionamento de um sistema SIFA	7-18
7.3.2. Avaliação do sinal analítico resultante da primeira passagem da interface pelo detector	7-20
7.3.3. Hifenização dos sistemas SIFA com o conceito de multi-impulsão	7-32
7.3.4. Inversão do sentido de fluxo	7-42
7.4. Conclusões	7-47
7.5. Referências bibliográficas	7-50
 Capítulo 8	 8-1
8. Conclusões gerais	
8.1. Multi-impulsão (MPFS)	8-2
8.2. Interface única (SIFA)	8-6

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1. Introdução geral

1.1. Métodos automáticos de análise

A necessidade de melhorar os métodos de análise, de modo a responderem às necessidades actuais das mais diversas áreas, nomeadamente necessidade de processamento de um elevado número de amostras, de uma forma rápida e eficaz, e com o menor custo possível, veio impulsionar nos últimos anos o desenvolvimento e a implementação de novos métodos automáticos de análise.

O aumento da importância e consequente utilização deste tipo de métodos tem sido particularmente significativo em áreas como a análise clínica, ambiental, farmacêutica e também análise alimentar. Deste modo, tem sido visível o crescimento de novos procedimentos automáticos, que permitem atenuar ou eliminar muitos dos factores que limitam o desempenho dos procedimentos analíticos, originando metodologias mais seguras, com elevados ritmos de amostragem, elevada eficiência analítica e uma intervenção reduzida do operador.

A crescente adesão a métodos automáticos de análise tem igualmente conduzido à utilização cada vez mais generalizada de expressões como automação, automatização, instrumentação, entre outras, o que obrigou a um esforço de normalização por parte da Comissão para a Nomenclatura Analítica da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), com vista à obtenção de uma uniformidade de critérios e definições [1]. De acordo com a IUPAC, o conceito de automação está associado a sistemas (instrumentos) aos

quais é adicionado um componente de decisão, sem intervenção humana. Mais concretamente, é definida como o uso de uma combinação de mecanismos e/ou instrumentos, para substituir, melhorar, ampliar ou suplementar um esforço humano na realização de uma determinada tarefa, em que pelo menos uma das operações envolvidas é controlada sem intervenção humana, através de um sistema de retroalimentação [1]. Um sistema de retroalimentação é definido como um mecanismo instrumental combinando elementos sensores e actuadores, os quais podem alterar o modo de realização de determinada tarefa [1].

Esta noção de automação conduz assim a uma distinção bem evidente, entre sistemas automáticos e sistemas automatizados. Os sistemas automáticos são sistemas sem capacidade de decisão, portanto sem sistema de retroalimentação, em que determinadas acções incluídas num conjunto mais ou menos alargado de operações são realizadas sequencialmente e de forma repetitiva, sem intervenção humana, enquanto que sistemas automatizados são sistemas que são controlados ou regulados por sistemas de retroalimentação, sem intervenção de um operador. Os sistemas automatizados são assim sistemas automonitorizados e autocontrolados, possuindo uma independência de actuação superior à dos sistemas automáticos.

A utilização de métodos automáticos de análise para implementação de procedimentos com complexidade crescente faz também com que seja cada vez mais difícil fazer uma classificação dos mesmos. Efectivamente, quanto mais complexa é a situação que se pretende resolver, maior é a tendência para procurar uma solução compatibilizando num mesmo sistema mais do que uma metodologia, o que torna assim complexa a sua classificação. Neste trabalho

adoptou-se a classificação proposta por Valcárcel e Luque de Castro [1], segundo a qual, os métodos automáticos de análise são divididos em função do tipo de processamento de amostra, em três categorias fundamentais: métodos descontínuos, métodos robotizados e métodos de fluxo contínuo.

1.1.1. Métodos descontínuos

Os métodos automáticos descontínuos são versões mecanizadas de métodos manuais de análise. Nestes métodos, as amostras mantêm-se separadas em recipientes, nos quais se realizam as diferentes operações analíticas como por exemplo, diluição, adição de reagentes, aquecimento, entre outras. As amostras são transportadas mecanicamente até aos dispositivos onde se realizam as operações referidas, as quais são realizadas de uma forma sequencial. No final das operações, cada amostra é encaminhada para o detector, onde se realiza a medida de grandeza que vai ser relacionada com a concentração da espécie na amostra. Como resultado deste procedimento é obtido um conjunto de sinais discretos, correspondendo cada um deles, a uma das amostras processadas pelo equipamento automático.

1.1.2. Métodos robotizados

Os métodos robotizados são baseados, como o próprio nome indica, no uso de um robô, capaz de executar uma série de manipulações físicas programadas. Estes métodos têm, de uma forma geral, a sua base de funcionamento no emprego de braços mecânicos flexíveis, que realizam as operações de um modo muito semelhante ao que seria efectuado por um

operador humano. Nos métodos robotizados é assim imprescindível a existência de um microprocessador, não só para programar as operações, mas também para as alterar durante o processo, e para registar os dados iniciais e fornecer os resultados das medidas analíticas.

Apesar da sua flexibilidade, da sua capacidade de realização de operações numerosas e repetitivas por longos períodos de tempo, bem como a possibilidade de trabalharem em ambientes tóxicos ou radioactivos e também em condições assépticas, não houve grande adesão à sua implementação no meio laboratorial, o que se deve fundamentalmente aos custos iniciais e à sua manutenção.

1.1.3. Métodos de fluxo contínuo

Os métodos de fluxo contínuo são métodos automáticos de análise em que a determinação da concentração da espécie a analisar é realizada sem interrupções sobre um fluxo líquido ou gasoso [1].

Nos métodos de fluxo contínuo, as amostras a analisar são sucessivamente introduzidas num canal, por onde passa uma solução (solução transportadora) que pode conter um reagente que eventualmente se pretenda adicionar à amostra, ou alternativamente, este reagente poderá ser introduzido em fases posteriores através de um canal auxiliar. O fluxo é encaminhado para um sistema de detecção que fornece um sinal do tipo contínuo, originando cada amostra um sinal transitório em forma de curva, que é registado por um instrumento conveniente. Nestes métodos podem ainda associar-se sistemas

intermédios, os quais permitem a realização de diversas operações como aquecimento, diálise, extracção líquido-líquido, entre outras.

Os métodos de fluxo contínuo são os métodos automáticos mais utilizados para a implementação de procedimentos analíticos, o que se deve fundamentalmente aos menores custos de instalação e operação, à elevada versatilidade e facilidade de operação e controlo, e também devido ao reduzido consumo de amostras, reagentes e tempo de análise.

A evolução registada por estes métodos conduziu a uma divisão na sua classificação, podendo então os métodos de fluxo contínuo ser divididos em dois tipos fundamentais: métodos de fluxo contínuo segmentado e métodos de fluxo contínuo não segmentado [2, 3].

Os métodos de fluxo contínuo segmentado foram propostos pela primeira vez por Skeggs em 1957 [4], e associam-se normalmente ao modo de funcionamento dos Autoanalizadores da firma Technicon que deteve durante muitos anos, em exclusivo, a comercialização destes instrumentos [5]. Nos métodos de fluxo contínuo segmentado, as amostras são aspiradas sequencialmente para um canal, introduzindo-se entre elas bolhas de ar que as separam, ou segmentam o fluxo. Os reagentes são introduzidos no canal por pontos de confluência e a mistura obtida é conduzida a um reactor até que a reacção esteja completa. As bolhas de ar são eliminadas antes de atingirem o detector, seguindo-se um ciclo de lavagem do sistema (inserção alternada da amostra com uma solução de lavagem separada por bolhas) para evitar a contaminação das amostras seguintes pelos resíduos das anteriores.

Nos métodos de fluxo contínuo não segmentado, o fluxo não se encontra segmentado por bolhas de ar e, no momento da detecção, o equilíbrio físico

pode não ser alcançado, nem existe ou tem necessidade de existir o equilíbrio químico. De salientar que as potencialidades dos métodos de fluxo contínuo não segmentado foram primeiro evidenciadas pela análise por injeção em fluxo [6], e desde então pelo aparecimento de outras estratégias de gestão de fluidos como a análise por injeção sequencial [7], a análise por fluxo multicomutado [8], a análise por injeção em fluxo baseada em multi-seringa [9], e mais recentemente, a análise em sistemas de fluxo multi-impulsão [10] e a análise em sistemas de fluxo de interface única [11].

1.2. Análise por injeção em fluxo (FIA)

A análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês “Flow Injection Analysis”) foi proposta em 1975, por J. Ruzicka e E. H. Hansen [6], como uma alternativa aos métodos de fluxo segmentado.

A metodologia FIA é baseada na injeção de um segmento de amostra num fluxo transportador não segmentado, em movimento contínuo, que o transporta até um detector [12]. De salientar que o fluxo transportador para além de apresentar um movimento contínuo, apresenta simultaneamente características de um fluxo laminar [1, 12].

O volume de amostra é definido em função de uma estratégia de volume fixo, isto é, em função das dimensões da alça (loop) do dispositivo de injeção, que é normalmente uma válvula rotativa ou um injector-comutador.

Durante o processo de transporte o segmento de amostra pode reagir com o transportador, ou simplesmente dispersar-se nele, podendo ainda reagir

(ou ser diluído) ao longo do processo se outros fluidos forem adicionados ao canal principal (C, Figura 1.1).

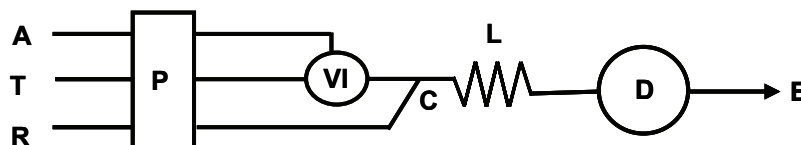


Figura 1.1 – Representação esquemática de uma montagem FIA. A – amostra; T – transportador; R – reagente; P – dispositivo de propulsão (bomba peristáltica multi-canal); VI – válvula de injeção; C – ponto de confluência; L – reactor; D – detector; E – esgoto.

À medida que o segmento de amostra se movimenta no sistema, gera-se um gradiente de concentrações, obtido por reacção química e/ou dispersão física, baseando-se a metodologia fundamentalmente no controlo da dispersão do segmento de amostra intercalado no fluxo transportador. A dispersão do segmento de amostra depende do volume de amostra, do comprimento do reactor e do tempo de residência, que é o tempo que a amostra se mantém dentro da tubagem (tempo que decorre entre o momento de injeção e o aparecimento do máximo do sinal analítico, correspondente a essa amostra [12]), nas mesmas condições temporais e espaciais.

A dispersão do segmento de amostra é conseguida segundo dois mecanismos: o transporte por convecção e o transporte por difusão (radial e axial) que acontece dada a ocorrência de gradientes de concentração nos diversos instantes do transporte por convecção (Figura 1.2) [1].

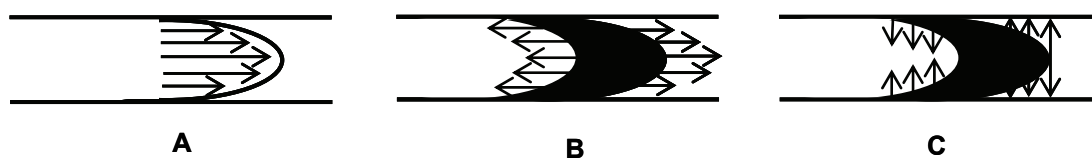


Figura 1.2 – Representação esquemática dos fenómenos de convecção (A) e difusão axial (B) e radial (C) num sistema FIA. Adaptado de [1].

Como consequência dos fenómenos de difusão e convecção, a forma do sinal num sistema FIA depende do percurso entre o local onde se realiza a injeção e o sistema de detecção. Assim, nestes sistemas o sinal analítico apresenta um valor constante enquanto a solução transportadora atravessa o detector, e transiente na forma de uma curva gaussiana distorcida, aquando da passagem da espécie detectável [12].

No que diz respeito aos componentes de uma montagem FIA (Figura 1.1) estes compreendem um dispositivo de propulsão (geralmente uma bomba peristáltica multi-canal), um dispositivo de injeção de amostras (predominantemente uma válvula rotativa ou um injector-comutador), um reactor onde ocorre a formação do gradiente de concentrações e um dispositivo detector que monitoriza a espécie a medir. Os sistemas FIA caracterizam-se assim pela implementação de montagens de configuração muito simples, que exibem elevada versatilidade e flexibilidade para a adaptação a objectivos específicos.

Apesar da metodologia FIA parecer muito semelhante, em termos de concepção, aos métodos de fluxo segmentado, as diferenças entre os dois métodos são assinaláveis, uma vez que em FIA as amostras não são

separadas por bolhas de ar e a tubagem é normalmente mais estreita (o diâmetro interno é da ordem dos 0,5-0,8 mm em vez de 2 mm como acontece frequentemente na análise em fluxo segmentado [13]). Por outro lado, os volumes de amostra injectados em FIA são consideravelmente menores (na ordem de 10-100 μ L em vez de 0,2-2 mL aspirados na análise em fluxo segmentado) e o ritmo de amostragem é, em média, significativamente superior (podem ser apontados como valores de referência 120 determinações por hora, em vez de 80 determinações por hora que a análise em fluxo segmentado admite) [13].

As vantagens referidas, associadas ao facto da análise permitir a detecção em condições de ausência de equilíbrio químico e físico, justificam a larga utilização desta metodologia na implementação e automatização de procedimentos analíticos nas mais diversas áreas.

Como principais desvantagens salienta-se a falta de estabilidade de funcionamento por períodos longos da bomba peristáltica (dispositivo de propulsão), devido à flexibilidade dos respectivos tubos de impulsão, o que implica a sua substituição com relativa frequência e a recalibração dos sistemas. Adicionalmente, salienta-se o elevado consumo de reagentes, devido à circulação contínua dos mesmos nas montagens, e também a necessidade de reconfigurar fisicamente os sistemas de forma a adaptá-los a diferentes determinações analíticas [7, 13].

1.3. Análise por injeção sequencial (SIA)

A análise por injeção sequencial (SIA, do inglês “Sequential Injection Analysis”) foi introduzida em 1990, por J. Ruzicka e G. Marshall [7], como forma de implementação de sistemas mais versáteis, robustos, de baixa manutenção e também sistemas mais flexíveis, isto é, capazes de serem aplicados em distintas situações analíticas, sem necessidade de reconfigurações na montagem de fluxo.

A metodologia SIA é baseada na aspiração sequencial de volumes precisos de amostra e reagente(s) para um tubo de armazenamento. A aspiração das diferentes soluções é efectuada através de uma válvula selectora multiposição, por selecção do canal de acesso às respectivas soluções, sob controlo temporizado. A aspiração sequencial da amostra e reagente(s) cria uma zona com segmentos adjacentes de soluções diferentes (I, Figura 1.3), ocorrendo por inversão do sentido do fluxo, a sobreposição reproduzível dos segmentos de amostra e reagente(s) e a formação de uma zona composta, resultante da penetração mútua dos segmentos, a qual é encaminhada para o sistema de detecção (II, Figura 1.3).

Um aspecto de relevo desta metodologia prende-se assim com o facto de a inversão do sentido de fluxo, associado ao seu modo de funcionamento, permitir a obtenção de diferentes graus de mistura entre as zonas envolvidas, ocorrendo variação do percurso a efectuar dentro do sistema através de inversões sucessivas do fluxo [14]. Deste modo, enquanto que em FIA o tempo de residência é fixado pelo comprimento do reactor e pelo caudal, em SIA a montagem pode ser mantida e controlar-se o tempo de reacção pelo recurso a

alterações no programa de controlo que, além de fixar o escoamento do fluxo num dado sentido, pode promover, inversões sucessivas e também a paragem do fluxo [14, 15].

No que diz respeito aos componentes de uma montagem SIA (Figura 1.3) estes são semelhantes aos de uma montagem FIA (Figura 1.1), diferindo no entanto, ao nível do sistema de injeção, que no caso do SIA é uma válvula selectora multiposição. O sistema de propulsão, geralmente uma bomba peristáltica, é colocado no percurso do canal central da válvula selectora multiposição, o que permite o acesso à amostra, reagentes, tubo reactor e detector, apoiados em cada uma das várias portas laterais da válvula selectora.

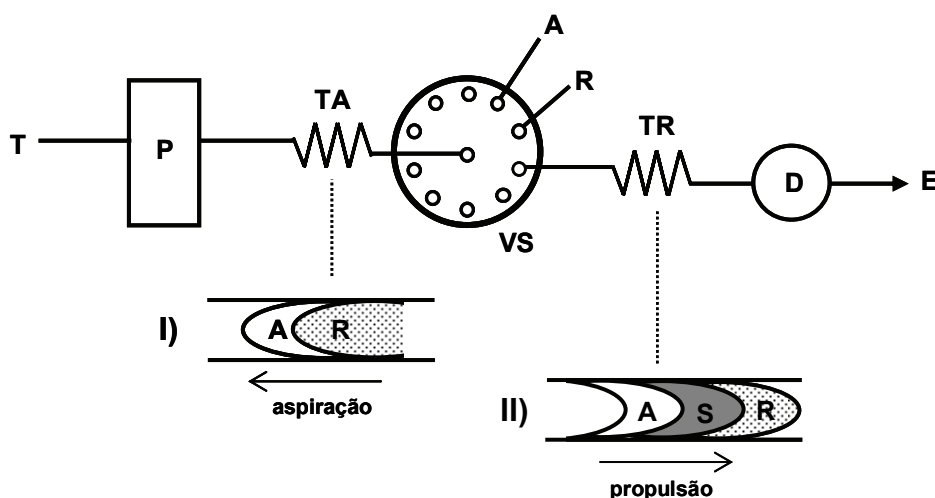


Figura 1.3 – Representação esquemática de uma montagem SIA e do seu modo de funcionamento. T – transportador; P – dispositivo de propulsão; TA – tubo de armazenamento; VS – válvula selectora; A – amostra; R – reagente; TR – reactor; D – detector; E – esgoto; I) – aspiração sequencial de A e R a partir de VS; II) – sobreposição das zonas que são dirigidas para o detector; S – zona de sobreposição.

A montagem SIA inclui ainda um microcomputador (frequentemente ausente nas montagens FIA), o qual possibilita o controlo sincronizado do dispositivo de propulsão e da válvula selectora, e simultaneamente a definição de parâmetros como o volume, o sentido e a velocidade de escoamento das diferentes soluções.

De um modo geral, a metodologia SIA possibilita intervenções ao nível da amostra semelhantes às conferidas pela metodologia FIA, embora as suas características funcionais, nomeadamente a configuração das montagens e a inserção das soluções em função de uma base temporizada, possibilitem a utilização de um número acrescido de reagentes em montagens mais simples, com um consumo inferior dos mesmos e consequentemente um volume inferior de efluentes produzidos [15].

Como principal desvantagem é frequentemente referida a junção dos segmentos de amostra e reagentes que ocorre necessariamente “topo a topo”, de que pode resultar limitações na extensão da mistura. Adicionalmente, o ritmo de amostragem é mais baixo nos sistemas SIA, podendo mesmo ser estimado em 60% do obtido com a metodologia FIA, onde a gestão das soluções é efectuada em paralelo [16].

De salientar ainda que a procura constante pela miniaturização e compactação dos sistemas de análise em fluxo fez surgir em 2000, por J. Ruzicka, os módulos de análise do tipo “Lav-on-valve” (LOV) [17], os quais são baseados no mesmo princípio de funcionamento dos sistemas SIA, embora correspondam a uma versão miniaturizada dos mesmos. A miniaturização é conseguida através da utilização de um componente monobloco que é

montado sobre uma válvula selectora multiposição de uma montagem SIA (Figura 1.4).

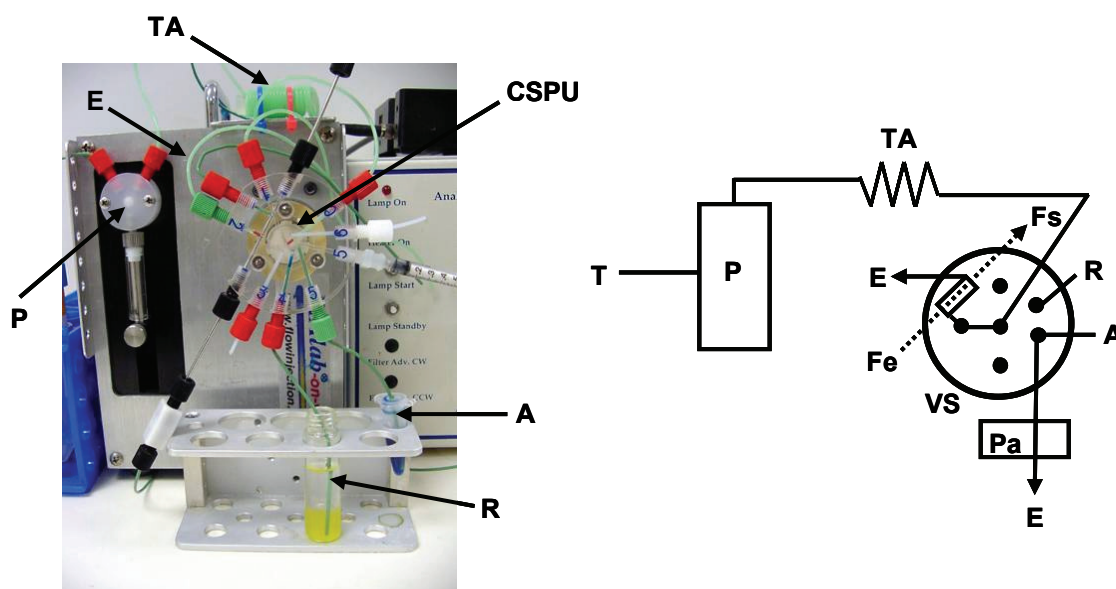


Figura 1.4 – Fotografia de um módulo de análise LOV (à esquerda) e sua representação esquemática (à direita). T – transportador; P – dispositivo de propulsão; TA – tubo de armazenamento; A – amostra; R – reagente; Pa – dispositivo de propulsão auxiliar; VS – válvula selectora multiposição; Fe – feixe de entrada; Fs – Feixe de saída; E – esgoto; CSPU – unidade central de processamento da amostra. Adaptado de [18].

A unidade principal destes módulos é então uma válvula selectora multiposição, controlada por um computador, cuja porta central está ligada através de um tubo de armazenamento, a uma bureta automática, que é utilizada para o transporte das soluções para o tubo de armazenamento, para a sua mistura e para o transporte da zona de reacção para o detector. Esta

unidade, designada por unidade central de processamento da amostra (CSPU, do inglês “central sample processing unit”) integra ainda uma porta de injeção de amostra, canais de acesso para reagentes e uma célula de fluxo que possibilita o acoplamento de diversos sistemas de detecção espectroscópicos. Apesar das dimensões reduzidas da CSPU, os módulos de análise do tipo LOV possibilitam diferentes manipulações da amostra, como diluição, adição de reagentes, mistura, incubação, separação e detecção, por qualquer sequência, devido ao regime de fluxo em modo de aspiração, paragem e impulsão.

Como principais vantagens destaca-se assim a redução drástica do consumo de amostra e reagentes, o que pode ser uma mais valia quando estamos perante pequenas quantidades de amostra e reagentes, e também quando os reagentes são extremamente caros, para além da inerente compactação dos equipamentos utilizados, o controlo informático de todas as etapas do procedimento experimental e a integração de todos os componentes da montagem numa estrutura rígida, que melhora a reprodutibilidade das operações de processamento das amostras [17].

Apesar das vantagens referidas, os módulos de análise do tipo LOV, à semelhança da estratégia SIA, apresentam como principal desvantagem o ritmo de amostragem mais baixo, o que se deve ao armazenamento das soluções no tubo de armazenamento e também devido ao tempo que a válvula selectora necessita para fazer a comutação entre as diferentes posições.

1.4. Multicomutação (MCFA)

A necessidade crescente de sistemas de fluxo caracterizados por uma flexibilidade acrescida, facilidade de operação e versatilidade, conduziu ao aparecimento de uma nova metodologia designada de multicomutação [19]. A multicomutação foi descrita pela primeira vez em 1994 por Reis *et al* [8] e tem como base de funcionamento a utilização de dispositivos de comutação individuais como dispositivos injectores. Tais dispositivos correspondem a válvulas solenóides de três vias (válvulas electromecânicas activadas por um solenóide), sendo cada válvula accionada individualmente.

As válvulas solenóides apresentam uma grande rapidez de comutação, o que lhes confere alguma vantagem em termos de procedimento de inserção de amostra e reagentes, o qual pode ser facilmente alterado e ajustado com base num controlo temporizado, através de um computador.

As montagens desenvolvidas segundo esta metodologia constam assim de um conjunto de válvulas solenóides, dispostas em distintas tipologias, de modo a criar uma rede de fluxo com diferentes possibilidades de percurso analítico (Figura 1.5). As diferentes combinações possíveis para as válvulas tornam esta metodologia bastante versátil no que diz respeito à manipulação da zona de amostra, sem necessidade de introduzir alterações na configuração da montagem analítica.

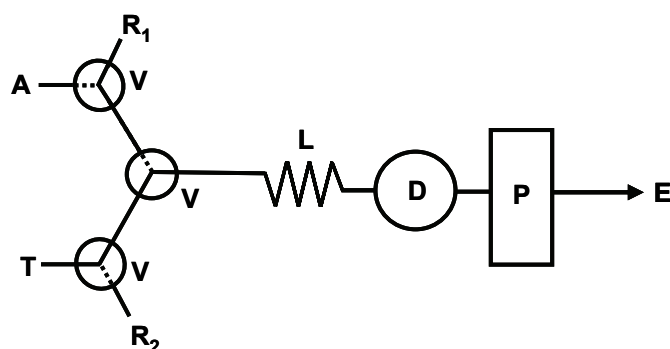


Figura 1.5 – Representação esquemática de um sistema de fluxo multicomutado. A – amostra; T – transportador; R_1 e R_2 – reagentes; V – válvula solenóide (a linha contínua e a linha tracejada referem a posição desactivada e activada, respectivamente); L – reactor; D – detector; P – dispositivo de propulsão; E – esgoto.

A introdução da amostra e reagentes no percurso analítico pode ser efectuada por aspiração para um único canal, colocando o sistema de propulsão após o sistema de detecção (Figura 1.5) e seleccionando as posições das respectivas válvulas. A introdução das soluções na rede de fluxo pode também ser efectuada colocando o sistema de propulsão antes das válvulas de comutação, portanto numa estratégia de impulsão de soluções [20]. Neste tipo de configuração é necessário utilizar um canal por cada solução, o que é conseguido pelo recurso a bombas peristálticas multi-canal, e as soluções são direccionadas para o sistema ou reenviadas para os reservatórios, de modo a reduzir o seu consumo.

A multicomutação permitiu também a introdução de um novo conceito de inserção de amostra e reagentes, designado por amostragem binária [19, 21] (Figura 1.6). Segundo este conceito, por comutação da válvula solenóide entre

as posições activada e desactivada, responsáveis pela inserção das soluções de amostra e reagente, pequenos segmentos de amostra (na ordem dos μL) são intercalados com pequenos segmentos de reagente, o que facilita a homogeneização da zona de amostra com menor dispersão. Por outro lado, é associado a este tipo de amostragem um desenvolvimento mais rápido da reacção, dado que a mistura das soluções tem início durante esta etapa (etapa de amostragem) [21]. De salientar que, os segmentos de amostra e reagente inseridos na montagem podem ter todos o mesmo volume ou podem ter volumes diferentes, dependendo do caudal e da velocidade de comutação da válvula.

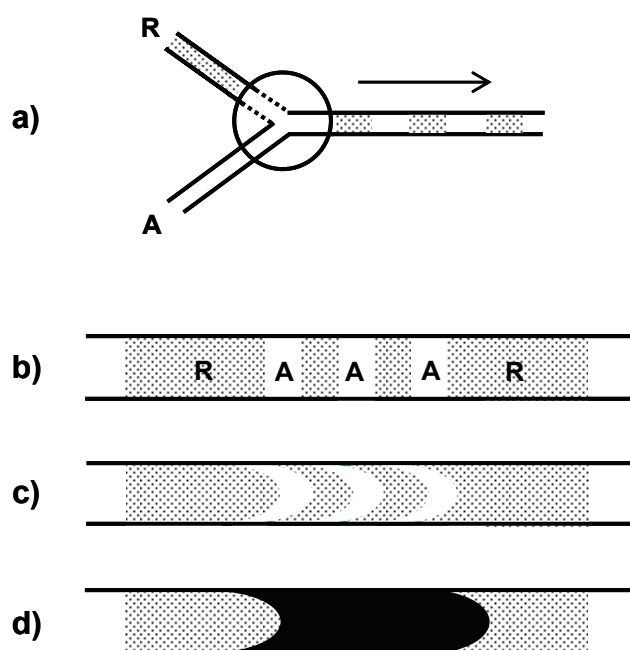


Figura 1.6 – Representação esquemática da estratégia de amostragem binária. a) válvula solenóide; b) intercalação de pequenos segmentos de amostra (A) e reagente (R); c) transporte das duas soluções; d) homogeneização da zona de amostra.

De uma forma geral, a multicomutação é capaz de um desempenho analítico semelhante ao da metodologia SIA com algumas vantagens, onde se incluem os menores custos do conjunto dos componentes da montagem analítica (nomeadamente das válvulas de injeção) e uma optimização dos recursos utilizados, dado que uma válvula solenóide pode ser responsável pela introdução em fluxo de uma ou duas soluções, permitindo deste modo uma adaptação do número de válvulas consoante o número de reagentes do sistema, enquanto que no caso da SIA, na maior parte das vezes há canais da válvula selectora que não são utilizados. Adicionalmente, a multicomutação pode possibilitar uma mais rápida homogeneização amostra/reagente, através do recurso à amostragem binária [21].

Apesar das vantagens referidas, a multicomutação apresenta algumas desvantagens, que estão fundamentalmente associadas com as características operacionais das válvulas solenóides, nomeadamente uma inferior robustez. A activação de uma válvula solenóide durante um período de tempo prolongado leva a um aquecimento da válvula, o que pode conduzir à deformação do teflon das membranas internas, causando assim a sua inutilização [22].

1.5. Multi-seringa (MSFIA)

A análise por injeção em fluxo baseada em multi-seringa (MSFIA, do inglês “Multisyringe Flow Injection Analysis”) foi descrita em 1999, por Cerdà *et al* [9], e caracteriza-se pela utilização solidária de um conjunto de seringas como dispositivo de propulsão. A metodologia MSFIA apresenta assim como elemento básico uma multi-seringa (Figura 1.7), que permite o movimento

simultâneo de quatro seringas, que podem ter capacidades diferentes. As quatro seringas estão ligadas em bloco a um único motor de uma bureta automática convencional, que pode ser controlada por um computador. Deste modo, o movimento do motor propulsiona simultaneamente os êmbolos das quatro seringas, trabalhando em modo multi-canal como no caso das bombas peristálticas utilizadas em FIA, mas evitando o uso dos tubos de impulsão flexíveis [23].

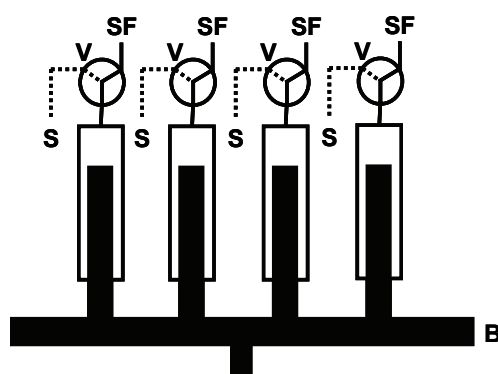


Figura 1.7 – Representação esquemática de uma multi-seringa. B – barra condutora dos êmbolos; S – reservatório de solução; SF – sistema de fluxo; V – válvula solenóide.

A utilização de seringas com diferentes volumes (0,5, 1, 2,5, 5, 10 e 25 mL), associada ao número de passos do motor da bureta, permite que os diferentes canais da multi-seringa apresentem diferentes caudais, uma vez que as seringas são accionadas simultaneamente e à mesma velocidade [23]. À saída de cada seringa está acoplada uma válvula solenóide de três vias e na extremidade oposta encontra-se o êmbolo responsável pelo enchimento ou

esvaziamento da seringa. As válvulas solenóides permitem a ligação das seringas ao sistema (SF, Figura 1.7) ou ao reservatório das soluções (S, Figura 1.7), o que permite gerir as soluções impulsionadas pelos êmbolos, evitando que sejam simultaneamente introduzidas na montagem analítica.

Neste tipo de sistema não é habitual usar-se uma das seringas como reservatório de amostra, para introdução directa da amostra no sistema de fluxo, uma vez que tal procedimento ocasionaria efeitos indesejáveis como contaminação das amostras seguintes por resíduos das anteriores, o que implicaria vários passos de lavagem entre amostras consecutivas, comprometendo assim o volume de amostra utilizado em cada determinação e também o ritmo de amostragem. A introdução da amostra é efectuada recorrendo a dispositivos adicionais, como válvulas de injeção [24], válvulas selectoras [25] ou válvulas solenóides [26], podendo então o processo de amostragem ser efectuado com volume fixo (em função do volume interno de uma porção de tubo bem definida) ou com tempo fixo (em função da relação tempo versus caudal usada durante a etapa de amostragem) [27].

A MSFIA abre assim novas possibilidades em termos de sistemas de fluxo, já que combina um modo de operação multi-canal, proporcionado pelos sistemas FIA, com a possibilidade de selecção de volumes exactos de amostra e reagentes necessários para a análise, proporcionado pelos sistemas SIA e também pela multicomutação.

A presença da válvula solenóide na extremidade de cada seringa traduz-se num acréscimo de flexibilidade dos sistemas, possibilitando uma redução considerável do consumo de reagentes, uma vez que estes são introduzidos no sistema apenas quando necessário [13, 23]. De facto, a presença da válvula

permite a devolução das soluções aos reservatórios, e consequentemente viabiliza a solução de cada seringa. Apesar da vantagem referida, o funcionamento da multi-seringa requer o reenchimento periódico das seringas com as soluções respectivas entretanto consumidas, o que poderá comprometer o ritmo de amostragem [23, 28].

1.6. Novas estratégias de gestão de fluidos

1.6.1. Aspectos gerais

Nos últimos anos assistiu-se ao desenvolvimento de diversas estratégias de gestão de fluidos, como a FIA, SIA, multicomutação e a multi-seringa, que ao permitirem a implementação de sistemas químicos de complexidade variada e também o acoplamento de diferentes tipos de detectores, têm sido utilizadas como suporte de desenvolvimento de novas metodologias analíticas.

Embora baseadas em diversas estratégias de gestão de fluidos, as diferentes estratégias fazem uso de equipamentos com funções semelhantes, os quais condicionam o desempenho dos sistemas analíticos. Destaca-se assim o sistema de propulsão, que é responsável pelo movimento, por aspiração ou impulsão, da zona de amostra e reagentes, e que poderá ser uma bomba peristáltica, uma seringa ou multi-seringa; o sistema de injeção, que tem como função a inserção do volume de amostra na montagem analítica, e que poderá ser uma válvula rotativa, válvula solenóide, válvula selectora multiposição; o sistema de transporte, constituído por reactores com características diversas; e o sistema de detecção, que é responsável pela transdução de um sinal analítico aquando da passagem da zona de amostra.

Embora baseadas em diferentes estratégias, os seus fundamentos são também similares, sendo baseados na precisão na introdução da amostra, na sua dispersão controlada, e no tempo e movimento repetível desde o ponto de introdução até ao sistema de detecção. O volume de amostra é deste modo um parâmetro fundamental que requer controlo e conhecimento, e também uma optimização sistematizada, uma vez que afecta a extensão da dispersão da amostra, e desta forma a sensibilidade da determinação [12].

Adicionalmente, o escoamento das soluções apresenta nas diferentes estratégias, características de um fluxo laminar, o qual é caracterizado por um perfil parabólico de velocidades, como resultado da superfície do líquido em contacto com as paredes do tubo se encontrar praticamente imóvel, em oposição à porção mais interior, que se desloca a uma velocidade que é praticamente o dobro da velocidade média do fluxo (A, Figura 1.2) [1, 12].

Diferenciando-se das estratégias referidas, surge em 2002 uma nova estratégia de gestão de fluidos que os autores designaram por análise em sistemas de fluxo multi-impulsão [10]. A análise em sistemas de fluxo multi-impulsão distingue-se das estratégias anteriores por ser baseada num fluxo com características hidrodinâmicas distintas (fluxo pulsado) e por na concepção e estabelecimento das montagens analíticas não requerer mais do que um tipo de elemento activo (micro-bomba solenóide) o qual poderá ser responsável, em simultâneo, pela propulsão, inserção e comutação de soluções.

Seguindo a análise em sistemas de fluxo multi-impulsão, surge uma outra estratégia de abordar a análise em fluxo designada de análise em sistemas de fluxo de interface única [11], a qual se diferencia também

significativamente das estratégias anteriores, ao não implicar a inserção de volumes definidos de amostra e reagentes nas montagens analíticas, mas o estabelecimento de uma interface única de reacção entre a amostra e os reagentes, antes da detecção. De salientar que, o regime de escoamento das soluções nesta estratégia de gestão de fluidos poderá apresentar características de um fluxo laminar, assim como de um fluxo pulsado.

De seguida, refere-se de uma forma resumida os aspectos gerais de funcionamento destas duas novas estratégias de gestão de fluidos, as quais foram objecto de aprofundamento nesta dissertação.

1.6.2. Multi-impulsão (MPFS)

A análise em sistemas de fluxo multi-impulsão (MPFS, do inglês “Multi-Pumping Flow Systems”) constitui um dos desenvolvimentos mais recentes em termos de desenho, concepção e implementação de metodologias de fluxo contínuo, para a manipulação de soluções de amostra e reagentes e para a automatização de procedimentos analíticos.

Os sistemas automáticos baseados em MPFS foram descritos pela 1ª vez, como já foi referido, em 2002, por Lapa *et al* [10], e têm como base de funcionamento a utilização de micro-bombas solenóides de reduzidas dimensões, para impulsão individual de soluções de amostra e reagentes, o que torna desnecessária a utilização de dispositivos adicionais, nomeadamente dispositivos de inserção de amostra e de comutação (Figura 1.8). Desta forma, as diferentes etapas de um procedimento típico em montagens baseadas em estratégias de fluxo contínuo, como a inserção de amostra, adição de

reagentes e o transporte da zona de reacção para o detector, são efectuadas pelo mesmo elemento da montagem (micro-bomba solenóide), e não por dispositivos distintos e individuais. As micro-bombas possibilitam assim a implementação de sistemas de configuração muito simples, facilmente controlados por computador, uma vez que todas as operações fundamentais podem ser efectuadas pelas referidas micro-bombas solenóides. A redução do número de elementos activos na montagem analítica minimiza ainda a probabilidade de ocorrência de falhas de equipamentos, de deficiências de funcionamento e também a ocorrência de erros.

A actuação das micro-bombas solenóides origina múltiplos fluxos pulsados (causados pelo deslocamento repentino do diafragma da micro-bomba), os quais são caracterizados por um volume (volume de pulso) e uma frequência (frequência de pulso) que em combinação estabelecem o caudal individual de cada solução. O volume de solução inserido no sistema é definido pelo volume de pulso da micro-bomba (determinado pelas suas características estruturais e que poderá ser 3, 8, 25 ou 50 μL , para as micro-bombas usadas até ao momento na implementação desta metodologia de gestão de fluidos) e pelo número de pulsos usados para a operar. Deste modo, é possível um controlo efectivo e preciso dos volumes de amostra e reagentes inseridos no sistema, assim como uma elevada versatilidade na selecção dos mesmos, e também um controlo preciso e efectivo da posição da zona de amostra no interior do sistema. Ao mesmo tempo, permite facilmente controlar a paragem do fluxo, o que pode ser utilizado com evidente vantagem na implementação de métodos cinéticos ou estratégias de paragem de fluxo [29].

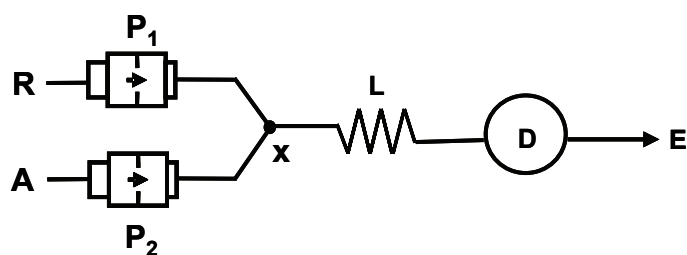


Figura 1.8 – Representação esquemática de um sistema multi-impulsão típico. R – reagente; A – amostra; P_1 , P_2 – micro-bombas solenóides; x – ponto de confluência; L – reactor; D – detector; E – esgoto.

Um aspecto de relevo dos sistemas MPFS é então o fluxo pulsado, produzido tal como referido anteriormente pela actuação das micro-bombas, e que pode ser visto como uma cadeia contínua de segmentos muito pequenos, em que cada um desses segmentos corresponde a um determinado volume de solução (volume de pulso) resultante de cada activação das micro-bombas [10]. O fluxo pulsado apresenta um movimento caótico das soluções em todas as direcções, o que faz com que a mistura entre a amostra e reagentes se faça de uma forma mais rápida e eficaz do que a obtida em condições de fluxo laminar típicas das metodologias de fluxo contínuo clássicas. A extensão da mistura nos sistemas MPFS é assim superior à que se verifica nas montagens com fluxo estritamente laminar, em que a interpenetração das soluções depende exclusivamente de fenómenos de difusão e convecção [29]. Deste modo, em situações de fluxo pulsado obtêm-se sinais analíticos de intensidade superior à dos obtidos em condições de fluxo laminar, com volumes de amostra idênticos, sendo este aspecto tão mais evidente quanto maior for o volume de amostra, uma vez que, em virtude da mais eficiente mistura, se obtém uma maior

extensão da reacção [10, 29]. Adicionalmente, as diferenças observadas na intensidade do sinal analítico, para diferentes estratégias de inserção de amostra, como volume único, amostragem binária e confluência de zonas, revelam-se menos significativas nos sistemas MPFS, uma vez que, a natureza pulsada do fluxo promove uma extensa mistura no ponto onde ocorre a confluência das soluções [29]. De salientar que as diferentes estratégias de inserção referidas, são facilmente implementadas nos sistemas MPFS, sem necessidade de reconfiguração da montagem analítica, devido ao controlo individual e independente de cada micro-bomba.

O grau de mistura depende também do volume de pulso, uma vez que este determina os volumes dos segmentos que são pulsados e portanto misturados e/ou eventualmente intercalados. Para um volume de pulso maior o contacto entre as soluções de amostra e reagente é mais difícil, do que para um volume de pulso menor onde a mistura é quase imediata entre amostra e reagente, permitindo uma redução do comprimento dos reactores que integram as montagens [29]. O volume de pulso desempenha assim um papel decisivo no desenvolvimento da reacção, afectando de igual modo o perfil do sinal analítico obtido (Figura 1.9). De salientar que a natureza pulsada do fluxo pode ser perceptível no perfil do sinal analítico (perfil tipo escada), o qual depende para além do volume de pulso, da frequência de pulso, do comprimento e diâmetro interno do reactor e também do volume interno da célula de fluxo do detector.

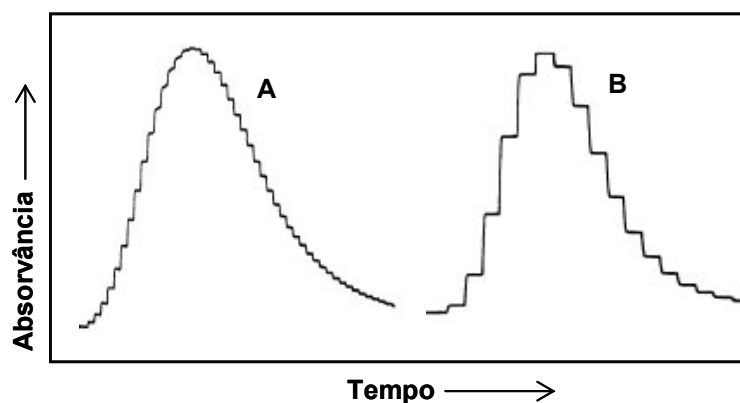


Figura 1.9 – Perfil dos sinais analíticos obtidos após a inserção em água de uma solução de verde de bromocresol ($95,0 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,1$) utilizando micro-bombas solenóides com volume de pulso de (A) 8 e (B) 25 μL , numa montagem analítica semelhante à representada na Figura 1.8. Registo efectuada a 12 cm min^{-1} . Adaptado de [29].

O fluxo pulsado resultante da actuação das micro-bombas solenóides, em combinação com o seu controlo individual e independente e também com as múltiplas tarefas realizadas pelas mesmas, como a inserção da amostra, a adição de reagentes, a mistura das soluções e o transporte da zona de reacção, tornam a estratégia de multi-impulsão particularmente atractiva para implementação de procedimentos analíticos automáticos, podendo ser utilizada com significativas vantagens relativamente às estratégias mais convencionais. De facto, a combinação do fluxo pulsado com a simplicidade das montagens e o controlo automático e individual das micro-bombas, confere à multi-impulsão os meios necessários para a implementação de sistemas analíticos caracterizados por um desenvolvimento rápido da reacção, um baixo consumo de amostra e reagentes e consequentemente uma baixa produção de

efluentes, e também uma grande variedade de intervenções sobre a zona de amostra, sem implicar alterações físicas na montagem analítica.

As vantagens do uso desta nova estratégia de gestão de fluidos em fluxo contínuo justificam assim que, apesar de ser uma estratégia muito recente, possa já ser identificado um número significativo de publicações que referem a sua aplicação (Tabela 1.1).

De salientar contudo que, antes dos sistemas MPFS terem sido propostos, já tinham sido utilizadas micro-bombas solenóides, em 1996, por Weeks and Johnson [30], como uma alternativa aos dispositivos de propulsão usados nas montagens FIA (bomba peristáltica multi-canal). No trabalho proposto, foram utilizadas três micro-bombas solenóides para a propulsão de uma solução transportadora e duas soluções de reagente, sendo a amostra inserida na montagem analítica através de uma válvula rotativa (dispositivo de injeção). O enchimento da alça (loop) da válvula rotativa era efectuado utilizando uma bomba peristáltica (Figura 1.10) [30]. Neste trabalho, os autores reconheceram o carácter pulsante das micro-bombas o qual, seguindo a postura tradicional ligada ao fluxo laminar, consideraram como uma deficiência funcional, que deveria ser evitada utilizando mecanismos que suprimissem os pulsos, ou utilizando células de fluxo com elevados volumes internos e reactores com comprimentos longos. Weeks and Johnson referiram também como principais desvantagens da utilização das micro-bombas, a irregularidade e a falta de reprodutibilidade dos sinais analíticos, o que poderá ser explicado pelo elevado volume de pulso das três micro-bombas utilizadas (50 μ L), que causaram problemas notórios de mistura entre a amostra e os reagentes.

Tabela 1.1 – Quadro resumo das aplicações e características analíticas dos sistemas MPFS.

Determinação	Deteção	Reagentes	Intervalo de aplicação (mol L ⁻¹)	LD (mol L ⁻¹)	Amostra	Ritmo de determinação (h ⁻¹)	Ref.
Cr (VI)	UV/vis	DFC	–	–	Águas naturais	80	[10]
Ácido Fítico	UV/vis	Salicilato de Fe(III)	até 50 mg L ⁻¹ (20pulsos) até 100 mg L ⁻¹ (50pulsos)	1,0 mg L ⁻¹	Extractos de plantas	150	[31]
Dipirona	UV/vis	PDAB	10 – 400 mg L ⁻¹	1,0 mg L ⁻¹	Prep. farmacêuticas	50	[32]
Bromexina	UV/vis	MBTH / Ce (IV)	até 400 mg L ⁻¹	2,0 mg L ⁻¹	Prep. farmacêuticas	45	[33]
Ambroxol	UV/vis	PDAB	10 – 200 mg L ⁻¹	–	Prep. farmacêuticas	60	[34]
Indometacina	Fluorimetria	CTAB / NaOH	até 10 ⁻⁵	1,6x10 ⁻⁸	Prep. farmacêuticas	30	[35]
Ácido ascórbico, trolox, resveratrol	CL	Luminol / H ₂ O ₂ Lucigenina / H ₂ O ₂	até 1,1x10 ⁻³ , 3,2x10 ⁻⁴ , 8,8x10 ⁻⁸ até 5,7x10 ⁻⁶ , 2,0x10 ⁻⁵ , –	–	Prep. farmacêuticas	160 70	[36]
Carvedilol	CL	Luminol / NaClO	0,12 – 3,0x10 ⁻⁶	8,7x10 ⁻⁹	Prep. farmacêuticas	65	[37]
Metformina	CL	Luminol / H ₂ O ₂ / Cu(II)	5 – 15 mg L ⁻¹	0,94 mg L ⁻¹	Prep. farmacêuticas	95	[38]
H ₂ O ₂	CL	Luminol / K ₃ [Fe(CN) ₆]	1,0 – 80x10 ⁻⁶	4x10 ⁻⁷	–	120	[39]
Amónia	CL	Luminol / NaClO	0,6 – 60x10 ⁻⁶	6x10 ⁻⁸	–	120	[39]
Tensioactivos aniónicos	UV/vis	MO / CPC	0,5 – 5,0 mg L ⁻¹	0,034 mg L ⁻¹	Águas de lavagem	60	[40]
Tióis/Sulindac	CL	Luminol / H ₂ O ₂ / NaNO ₂	–	–	–	200	[41]
Fructose, glucose	UV/vis	NaIO ₄ / KI	até 2,0% (m/v)	–	Xaropes	50	[42]
Cu (II)	EAA	–	até 5 mg L ⁻¹ até 300 µg L ⁻¹ , SPE	0,034 mg L ⁻¹ 0,67 µg L ⁻¹	Soro urina	360 12	[43]
Fe (III), Fe total	UV/vis	NH ₄ SCN / H ₂ O ₂	0,01 – 1,75 µg L ⁻¹ , SPE Fe(III) 0,05 – 10 mg L ⁻¹ , sem SPE Fe(III) 0,2 – 15m L ⁻¹ , sem SPE Fe total	10 ng L ⁻¹ 0,05 mg L ⁻¹ 0,2 mg L ⁻¹	Águas do mar	9 120 120	[44]
DRP DOP	UV/vis	Vanadomolibdato de amónio/ peroxidisulfato de potássio	até 20 mg L ⁻¹ até 40 mg L ⁻¹	0,08 mg L ⁻¹ 0,5 mg L ⁻¹	Águas residuais	75 11	[45]
Ferro, Vanádio	UV/vis	KI / Cr(VI)	–	–	Ligas metálicas	50	[46]
Bupirrona	UV/vis	Folin – Ciocalteu / Na ₂ CO ₃	até 60 mg L ⁻¹	2,8 mg L ⁻¹	Prep. farmacêuticas	55	[47]
Zinco	UV/vis	Zincon	até 2 mg L ⁻¹	0,1 mg L ⁻¹	Extractos de plantas	30	[48]

LD, limite de deteção; UV/vis, espectrofotometria de ultra-violeta visível; CL, quimiluminescência; EAA, espectrofotometria de absorção atómica com atomização por chama; DRP, ortofosfato dissolvido; DOP, fósforo orgânico dissolvido; DFC, 1,5-difenilcarbazida; CTAB, brometo de hexadeciltrimetilamónio; PDAB, *p*-dimetilaminobenzaldeído; MBTH, 3- metil-2-benzotiazolinonhidrazona; MO, laranja de metilo; CPC, cloreto de hexadecilpiridina; SPE, extração fase sólida.

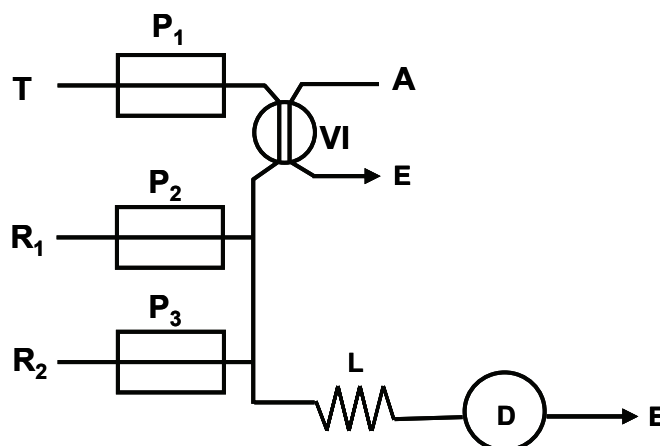


Figura 1.10 – Representação esquemática do sistema de análise por injeção em fluxo proposto por Weeks and Johnson. T – transportador; R₁ e R₂ – reagentes; P₁ a P₃ – micro-bombas solenóides; VI – válvula de injeção; A – amostra; E – esgoto; L – reactor; D – detector. Adaptado de [30].

Quando os sistemas MPFS foram propostos [10], foram utilizadas micro-bombas solenóides com pequenos volumes de pulso (3, 5, 8, 25 μ L), as quais produziam um fluxo pulsado reprodutível, possibilitando o incremento da eficiência da mistura e simultaneamente um aumento da resposta analítica. Este primeiro trabalho utilizou a determinação espectrofotométrica de crómio (VI) em águas por reacção com o reagente 1,5-difenilcarbazida para ilustrar o potencial do fluxo pulsado, e introduziu uma outra importante modificação, tendo em conta a configuração típica das metodologias de fluxo, ao não requerer válvulas específicas de injeção de amostra, uma vez que as micro-bombas solenóides actuavam simultaneamente como unidades de inserção de soluções, propulsão e comutação (Figura 1.8).

Em continuação com o trabalho original, os trabalhos subsequentes envolveram a implementação de sistemas MPFS com detecção

espectrofotométrica. Carneiro *et al* [31] propôs um sistema para a determinação de ácido fítico em extractos de plantas por reacção com o salicilato de Fe (III), a dois níveis de concentração distintos, através da utilização de dois volumes de amostra (20 e 50 pulsos de amostra, 8 µL por pulso). Mais tarde, em 2003, foi desenvolvido um sistema para a determinação de dipirona em formulações farmacêuticas, por reacção com o reagente *p*-dimetilaminobenzaldeído, em meio ácido [32]. Neste trabalho, a viscosidade das soluções causou alguns problemas em termos de homogeneização da zona de reacção, os quais foram resolvidos recorrendo a uma estratégia de amostragem binária para a inserção da amostra. A estratégia de amostragem binária foi também avaliada para a determinação de bromexina em formulações farmacêuticas, por reacção com o reagente 3-metil-2-benzotiazolinonahidrazona [33], e também para a determinação de ambroxol em formulações farmacêuticas, por reacção com o reagente *p*-dimetilaminobenzaldeído [34]. Em ambos os sistemas, o controlo automático e individual das micro-bombas facilitou o estabelecimento da sequência mais adequada de intercalação das soluções, estabelecendo uma zona de reacção com uma boa homogeneização.

Considerando a mistura superior do fluxo pulsado, e visando o estudo do seu efeito em outras estratégias de gestão de fluidos, Pinto *et al* [35] desenvolveu um sistema SIA com detecção fluorimétrica para a determinação de indometacina em formulações farmacêuticas, onde a unidade de propulsão convencional normalmente usada neste tipo de sistemas foi substituída por micro-bombas solenóides. O fluxo pulsado, resultante da actuação das micro-bombas, mostrou ser mais eficiente na mistura quando comparado com condições de fluxo laminar, obviando em boa extensão as dificuldades da

mistura típicas da estratégia SIA, como já referido anteriormente. Adicionalmente, a utilização das micro-bombas permitiu que o processo de aspiração e propulsão de soluções fosse independente, em oposição aos sistemas SIA convencionais, o que possibilitou uma simplificação na operação e controlo do sistema desenvolvido, minimizando também uma potencial contaminação entre as soluções aspiradas e a solução transportadora.

Em 2005, o conceito de multi-impulsão foi pela primeira vez usado associado à detecção por quimiluminescência, o que permitiu combinar as características analíticas vantajosas desta técnica de detecção (sensibilidade, selectividade e gama alargada de intervalos de aplicação) com a capacidade de mistura, versatilidade e a simplicidade operacional dos sistemas MPFS. Meneses *et al* [36], propôs um sistema de fluxo para a determinação da capacidade antioxidante total de compostos como o ácido ascórbico, resveratrol e trolox, por avaliação do efeito inibidor destes compostos, na reacção entre o luminol e a lucigenina com o peróxido de hidrogénio.

Um outro sistema MPFS foi proposto, por Pires *et al* [37], para a determinação de carvedilol em formulações farmacêuticas, por inibição do carvedilol na reacção de quimiluminescência do luminol com o hipoclorito. Este trabalho evidenciou a excelente mistura proporcionada pelo fluxo pulsado dos sistemas MPFS, ao permitir que fosse possível que a reacção quimiluminescente ocorresse apenas no interior da célula de fluxo do detector. Este aspecto foi também evidenciado num sistema desenvolvido por Marques *et al* [38], para a determinação de metformina em formulações farmacêuticas, o qual foi baseado na inibição da radiação emitida pelo sistema luminol/peróxido de hidrogénio/Cu (II), por complexação dos iões Cu (II) com a metformina.

Um sistema portátil e de baixo custo foi também proposto por Rocha *et al* [39], para a determinação quimiluminométrica de peróxido de hidrogénio e amónia, o qual apresentou características analíticas mais favoráveis (limite de detecção, ritmo de amostragem e consumo de reagentes), em comparação com outros sistemas de fluxo previamente desenvolvidos. O mesmo grupo propôs ainda um sistema para a determinação espectrofotométrica de tensoactivos aniónicos em águas, o qual foi baseado na substituição do reagente laranja de metilo pelos tensoactivos aniónicos, na formação do par-iónico com o ião cetil-piridina [40].

Ainda no que diz respeito à associação da multi-impulsão com a detecção por quimiluminescência, o trabalho apresentado nesta dissertação focou esta combinação, comprovando as suas vantagens no desenvolvimento de um sistema para a avaliação *in vitro*, em sistemas não celulares, do efeito captador do anião peroxinitrito por diversos compostos (Capítulo 4) [41].

Também em 2005, a complexidade dos sistemas MPFS foi aumentada, através da introdução nas montagens de um número mais elevado de micro-bombas e também de outros dispositivos, permitindo manipulações mais elaboradas da amostra ou gestões mais complexas das soluções. Neste sentido, Carneiro *et al* [42] propôs um sistema para a determinação espectrofotométrica de glucose e fructose em xaropes, o qual envolvia a utilização de nove micro-bombas solenóides estrategicamente posicionadas na montagem, e uma pequena câmara de diluição, para a dissolução de cápsulas contendo a amostra de xarope. Apesar da sua complexidade, o sistema demonstrou uma boa estabilidade, possibilitando a determinação de 50

amostras por hora, com um baixo consumo de reagentes e uma produção mínima de efluentes.

Um outro sistema de fluxo, com elevada complexidade, foi proposto por Lopes *et al* [43], para a determinação simultânea de cobre em amostras de soro e urina, por espectrofotometria de absorção atômica com atomização por chama. De salientar que este sistema não pode ser exclusivamente classificado como um sistema MPFS, uma vez que o conceito de multi-impulsão foi associado com a multicomutação em dois módulos complementares, acoplados ao mesmo detector e operados simultaneamente. A utilização dos dois módulos separados conferiu uma elevada versatilidade ao sistema, possibilitando a determinação simultânea de cobre a níveis de concentração distintos: as amostras de soro, com concentrações elevadas, eram analisadas directamente no módulo multicomutado, enquanto que as amostras de urina, com concentrações mais baixas, eram analisadas no módulo baseado no conceito de multi-impulsão, por pré-concentração numa mini-coluna empacotada.

Um sistema com extracção por fase sólida foi também proposto Pons *et al* [44], para especiação de ferro em águas do mar, através da reacção espectrofotométrica com o reagente tiocianato de amónio. Usando um disco quelante como fase sólida e cinco micro-bombas solenóides, este sistema mostrou características analíticas mais favoráveis do que as obtidas com um sistema multi-seringa convencional. Adicionalmente, a utilização combinada das micro-bombas com uma válvula solenóide, permitiu melhorar a sua versatilidade. O mesmo grupo de autores, propôs ainda um sistema para a determinação espectrofotométrica de ortofosfato dissolvido e fósforo orgânico

dissolvido, por reacção com o reagente vanadomolibdato de amónio, em águas residuais [45]. Neste trabalho, a montagem incorporava uma lâmpada-UV, posicionada num percurso paralelo, para a foto-oxidação em linha do fósforo orgânico, antes da detecção. A selecção do percurso analítico na montagem era efectuada através de uma válvula solenóide.

Mais recentemente, o conceito de multi-impulsão foi associado a determinações cinéticas, através do desenvolvimento de um sistema para a determinação espectrofotométrica de ferro e vanádio, em ligas metálicas [46]. Neste trabalho, proposto por Fortes *et al*, a determinação do ferro e do vanádio foi baseada no efeito catalítico destes metais, na oxidação do iodeto por Cr (VI) em meio ácido, tendo sido o tratamento de dados efectuado por calibração multivariada pelo algoritmo PLS.

De salientar que no trabalho apresentado nesta dissertação também foi explorado o potencial da multi-impulsão para a implementação de um método cinético, para a determinação espectrofotométrica de buspirona em formulações farmacêuticas, por reacção com o reagente de Folin-Ciocalteu, em meio alcalino (Capítulo 3) [47].

No trabalho desenvolvido e agora apresentado, foi também proposto um sistema para a determinação espectrofotométrica de zinco em extractos de plantas, envolvendo concentração e separação de zinco por troca-iónica. Neste trabalho, foi usado um fluxo ascendente e uma coluna não-empacotada contendo uma resina permutadora, tendo sido explorada a acção mecânica do fluxo pulsado, para colocar as partículas de resina em suspensão, em analogia aos reactores fluidizados (Capítulo 5) [48].

Durante a realização deste trabalho, foi ainda proposto um outro sistema para a determinação espectrofotométrica de gabapentina em formulações farmacêuticas, por reacção com o reagente 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS), em meio alcalino (Capítulo 6) [49]. No trabalho proposto, procurou-se avaliar o potencial e desempenho de novas micro-bombas (micro-bombas piezoeléctricas), em substituição das típicas micro-bombas solenóides, associadas aos sistemas baseados no conceito de multi-impulsão. O trabalho desenvolvido envolveu a implementação de sistemas com diferentes configurações, compreendendo um número variável de micro-bombas e o seu posicionamento em locais distintos na montagem de fluxo.

1.6.3. Interface única (SIFA)

A análise em sistemas de fluxo de interface única (SIFA, do inglês “Single Interface Flow Analysis”) constitui um dos desenvolvimentos mais recentes em termos de estratégias de gestão de fluidos, tendo sido descrita pela 1ª vez em 2005, como resultado do trabalho realizado no âmbito desta dissertação [11]. A análise em sistemas de fluxo de interface única representa uma “ruptura” com o conceito tradicional de análise em fluxo contínuo, uma vez que os sistemas SIFA são caracterizados por não se basearem na inserção de volumes definidos de amostra e reagentes nas montagens analíticas, mas na penetração mútua de zonas de amostra e reagente numa interface única de reacção, onde a amostra e o reagente se encontram antes da detecção. De salientar que o conceito de penetração de zonas foi inicialmente proposto por Ruzicka e Hansen [12] para explicar a formação de uma zona composta

quando, em duas zonas adjacentes em movimento contínuo, a primeira sofre uma penetração da segunda, como consequência da velocidade superior do fluxo no centro do tubo, em relação à velocidade média do fluxo.

Nos sistemas SIFA, a dispersão controlada e a formação da zona de reacção, deixam então de ser influenciados pelo volume de amostra e reagentes, passando a ser determinados exclusivamente pela extensão da sobreposição (penetração) de zonas adjacentes de amostra e reagente. Embora semelhante à metodologia SIA (secção 1.3), no sentido em que a penetração de zonas influencia a extensão da superfície onde o gradiente de concentrações amostra/reagente é estabelecido, com os sistemas SIFA a sobreposição de zonas nunca é total, uma vez que as zonas de amostra e reagente não têm limites definidos. O recurso a múltiplas inversões do sentido do fluxo e a eventual utilização de um fluxo pulsado são factores que poderão contribuir para aumentar o grau de penetração das zonas envolvidas.

Na Figura 1.11 encontra-se representada uma montagem básica de um sistema SIFA, embora configurações mais complexas possam também ser utilizadas, dependendo das necessidades impostas pela metodologia analítica a implementar.

Uma montagem SIFA típica compreende então dispositivos para inserção e propulsão das soluções de amostra e reagentes, representado na figura por micro-bombas solenóides (o que permite obter condições de fluxo pulsado, simplificando também a operação e controlo do sistema) e também válvulas solenóides para o direccionamento do fluxo, sendo as micro-bombas e válvulas posicionadas simetricamente à volta do detector, que ocupa uma posição central na montagem analítica.

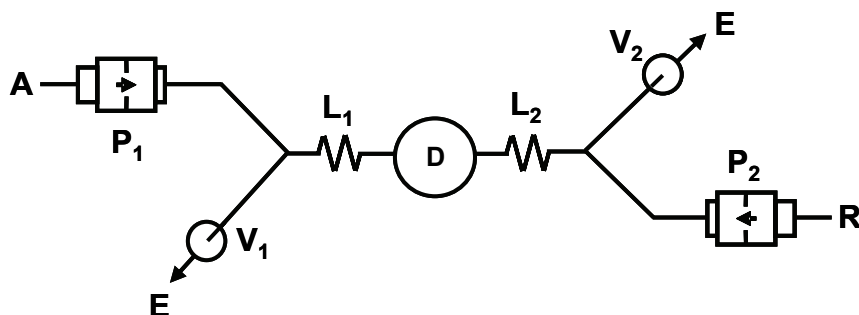


Figura 1.11 - Representação esquemática de um sistema SIFA típico. P_1 , P_2 – dispositivo de inserção e propulsão de soluções (micro-bombas solenóides); V_1 , V_2 – válvulas solenóides de duas vias (uma entrada/uma saída); L_1 , L_2 – reactores; D – detector; A – amostra; R – reagente; E – esgoto.

De salientar que os princípios básicos de funcionamento de um sistema SIFA são independentes do sistema de impulsão utilizado e como tal, a implementação destes sistemas não implica a utilização de micro-bombas solenóides para a propulsão e inserção de soluções.

A montagem analítica compreende ainda dois reactores, com comprimentos idênticos, colocados em cada lado do detector, o que possibilita uma grande variedade de intervenções ao nível da interface de reacção (por actuação combinada dos dispositivos de inserção e propulsão das soluções com as válvulas solenóides), como multidetecções da zona de amostra através da realização de múltiplas inversões do sentido do fluxo (com ou sem detecção) (Figura 1.12), inversões parciais, renovação de reagentes, entre outras, as quais poderão ser facilmente implementadas utilizando uma rotina de controlo baseada em tempo ou, no caso da utilização das micro-bombas, no número de pulsos. Os sistemas SIFA são assim caracterizados pela

localização do detector no centro da montagem analítica, em oposição aos sistemas anteriores de fluxo contínuo onde este ocupa normalmente uma posição terminal, o que possibilita a realização das diversas manipulações da interface de reacção anteriormente referidas.

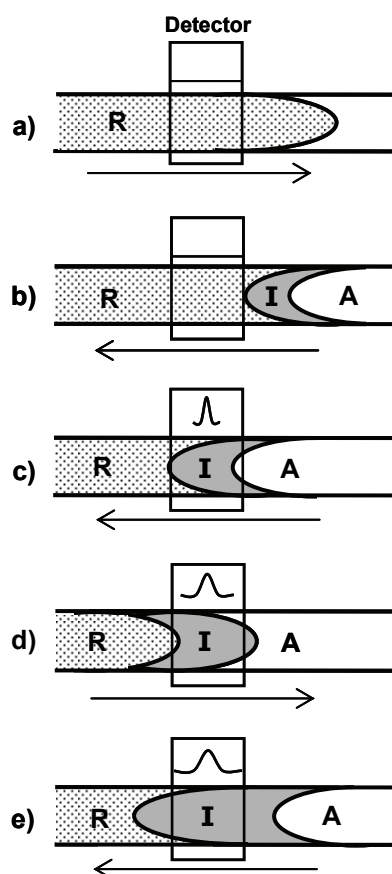


Figura 1.12 - Representação esquemática da evolução do sinal analítico num sistema SIFA. R – reagente; A – amostra; I – interface única de reacção; a) estabelecimento da linha de base por introdução de reagente; b) inserção de amostra na extremidade oposta do canal e estabelecimento da interface única de reacção; c) primeira detecção; d) e e) múltiplas inversões do sentido de fluxo. As setas indicam o sentido da direcção do fluxo.

Embora ainda numa fase muito inicial do seu desenvolvimento, os sistemas SIFA, nomeadamente as suas características operacionais, como será demonstrado no trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação (Capítulo 7), permitem antever um elevado potencial de aplicação desta estratégia, a qual poderá constituir uma alternativa vantajosa relativamente às estratégias de gestão de fluidos referidas anteriormente nesta dissertação.

No trabalho desenvolvido e agora apresentado, procurou-se assim estudar e caracterizar o desempenho dos sistemas SIFA e avaliar o seu potencial em diferentes situações analíticas (Capítulo 7). Foi desenvolvida uma montagem básica utilizando duas buretas automáticas como dispositivo de inserção e propulsão das soluções de amostra e reagente, tendo sido avaliada a montagem quer recorrendo a soluções coradas de azul de bromotimol e bórax como soluções de amostra e reagente, quer através da implementação de diversas reacções espectrofotométricas envolvendo diferentes estequiometrias. Considerando a mistura superior do fluxo pulsado inerente aos sistemas MPFS, e esperando os seus efeitos favoráveis na ocorrência da mistura da interface única, foram ainda desenvolvidas e avaliadas duas montagens SIFA utilizando micro-bombas solenóides como dispositivos de inserção e propulsão das soluções de amostra e reagentes.

1.7. Referências bibliográficas

- [1] M. Valcárcel, M. D. Luque de Castro, Flow-Injection Analysis, Principles and Applications, John Wiley and Sons, Nova York, 1987.
- [2] W. E. Van der Linden, Pure Appl. Chem. 66 (1994) 2493.
- [3] E. A. G. Zagatto, J. F. Van Staden, N. Maniasso, R. I. Stefan, G. D. Marshall, Pure Appl. Chem. 74 (2002) 585.
- [4] L. T. Skeggs, Am. J. Clin. Pathol. 28 (1957) 311.
- [5] L. T. Skeggs, Clin. Chem. 46 (2000) 1425.
- [6] J. Ruzicka, E. H. Hansen, Anal. Chim. Acta 78 (1975) 145.
- [7] J. Ruzicka, G. D. Marshall, Anal. Chim. Acta 237 (1990) 329.
- [8] B. F. Reis, M. F. Giné, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, R. A. Lapa, Anal. Chim. Acta 293 (1994) 129.
- [9] V. Cerdà, J. M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar, Talanta 50 (1999) 695.
- [10] R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, J. L. M. Santos, E. A. G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 466 (2002) 125.
- [11] M. F. T. Ribeiro, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, A. C. B. Dias, E. A. G. Zagatto, Talanta 68 (2005) 351.
- [12] J. Ruzicka, E. H. Hansen, Flow Injection Analysis, John Wiley and Sons, Nova York, 2ª edição, 1988.
- [13] M. Miró, V. Cerdà, J. M. Estela, Trends Anal. Chem. 21 (2002) 199.
- [14] J. Ruzicka, T. Gubeli, Anal. Chem. 63 (1991) 1680.
- [15] R. E. Taljaard, J. F. Van Staden, Lab. Robot. Autom. 10 (1998) 325.
- [16] V. Cerdà, J. M. Estela, Intern. J. Environ. Anal. Chem. 85 (2005) 231.

- [17] J. Ruzicka, *Analyst* 125 (2000) 1053.
- [18] J. Ruzicka, *Flow Injection Analysis*, CD-ROM, FIALab Instruments, Bellevue, USA, 3ª edição, 2005.
- [19] E. A. G. Zagatto, B. F. Reis, C. C. Oliveira, R. P. Sartini, M. A. Z. Arruda, *Anal. Chim. Acta* 400 (1999) 249.
- [20] C. C. Oliveira, R. P. Sartini, B. F. Reis, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 332 (1996) 173.
- [21] F. R. P. Rocha, B. F. Reis, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, R. A. S. Lapa, J. L. M. Santos, *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 119.
- [22] V. Cerdà, *Introducción a los Métodos de Análisis en Flujo*, SCIWARE, Palma de Maiorca, 2006.
- [23] B. Horstkotte, O. Elsholz, V. Cerdà, *J. Flow Injection Anal.* 22 (2005) 99.
- [24] F. Albertús, B. Horstkotte, A. Cladera, V. Cerdà, *Analyst* 124 (1999) 1373.
- [25] F. Albertús, A. Cladera, E. Becerra, V. Cerdà, *Analyst* 126 (2001) 903.
- [26] M. A. Segundo, A. O. S. S. Rangel, A. Cladera, V. Cerdà, *Analyst* 125 (2000) 1501.
- [27] M. A. Segundo, H. M. Oliveira, J. L. F. C. Lima, M. I. G. S. Almeida, A. O. S. S. Rangel, *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 207.
- [28] V. Cerdà, C. Pons, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 236.
- [29] J. L. F. C. Lima, J. L. M. Santos, A. C. B. Dias, M. F. T. Ribeiro, E. A. G. Zagatto, *Talanta* 64 (2004) 1091.
- [30] D. A. Weeks, K. S. Johnson, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2717.
- [31] J. M. T. Carneiro, E. A. G. Zagatto, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Anal. Chim. Acta* 474 (2002) 161.

- [32] J. L. F. C. Lima, S. M. O. Sá, J. L. M. Santos, E. A. G. Zagatto, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 1011.
- [33] A. C. B. Dias, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 499 (2003) 107.
- [34] J. L. M. Santos, A. Clausse, J. L. F. C. Lima, M. L. M. F. S. Saraiva, A. O. S. Rangel, *Anal. Sci.* 21 (2005) 461.
- [35] P. C. A. G. Pinto, M. L. M. F. S. Saraiva, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Anal. Chim. Acta* 539 (2005) 173.
- [36] S. R. P. Meneses, K. L. Marques, C. K. Pires, J. L. M. Santos, E. Fernandes, J. L. F. C. Lima, E. A. G. Zagatto, *Anal. Biochem.* 345 (2005) 90.
- [37] C. K. Pires, K. L. Marques, J. L. M. Santos, R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, E. A. G. Zagatto, *Talanta* 68 (2005) 239.
- [38] K. L. Marques, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 452.
- [39] F. R. P. Rocha, E. Ródenas-Torralba, B. F. Reis, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, *Talanta* 67 (2005) 673.
- [40] A. F. Lavorante, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, B. F. Reis, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1305.
- [41] M. F. T. Ribeiro, A. C. B. Dias, J. L. M. Santos, E. Fernandes, J. L. F. C. Lima, E. A. G. Zagatto, *J. Biomol. Screen.* 12 (2007) 875.
- [42] J. M. T. Carneiro, A. C. B. Dias, E. A. G. Zagatto, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Anal. Chim. Acta* 531 (2005) 279.
- [43] C. M. P. V. Lopes, A. A. Almeida, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Anal. Chim. Acta* 555 (2006) 370.
- [44] C. Pons, R. Forteza, V. Cerdà, *Anal. Chim. Acta* 550 (2005) 33.

- [45] C. Pons, I. V. Tóth, A. O. S. S. Rangel, R. Forteza, V. Cerdà, *Anal. Chim. Acta* 572 (2006) 148.
- [46] P. R. Fortes, S. R. P. Meneses, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 572 (2006) 316.
- [47] M. F. T. Ribeiro, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, A. C. B. Dias, E. A. G. Zagatto, *Anal. Lett.* 39 (2006) 2243.
- [48] M. F. T. Ribeiro, A. C. B. Dias, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, E. A. G. Zagatto, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1019.
- [49] M. F. T. Ribeiro, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Anal. Chim. Acta* 600 (2007) 14.

CAPÍTULO 2

Aspectos gerais da parte experimental

2. Aspectos gerais da parte experimental

2.1. Introdução

Neste capítulo são descritos os aspectos experimentais comuns aos diversos trabalhos realizados, de modo a evitar repetições ao longo desta dissertação. São assim referidos os procedimentos gerais utilizados na preparação das soluções, bem como os materiais, técnicas e produtos usados. É também referido o equipamento utilizado na concepção das montagens de fluxo, salientando-se as suas características e modo de operação e controlo. São ainda apresentados os procedimentos de optimização seguidos no desenvolvimento das metodologias propostas e o tratamento estatístico utilizado na avaliação da qualidade dos resultados obtidos.

2.2. Reagentes e soluções

Na preparação das soluções usaram-se reagentes de qualidade *p.a.* ou semelhante, os quais não foram sujeitos a qualquer tratamento ou purificação adicional.

As soluções utilizadas foram integralmente preparadas com água desionizada, com condutividade específica inferior a $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$, obtida por passagem em resinas de troca iónica de leito misto, incorporadas num aparelho de desionização da marca Milli-Q, modelo RG.

As soluções padrão foram obtidas por pesagem rigorosa do respectivo reagente sólido numa balança analítica (modelo AG 285, Mettler Toledo), seguida de dissolução do mesmo em solvente adequado, em material de vidro

de classe A. As soluções padrão de trabalho foram obtidas por diluição rigorosa da solução padrão mais concentrada, utilizando pipetas volumétricas de diferentes volumes ou pipetas automáticas e balões volumétricos; as pipetas automáticas (modelo LM200, LM1000 e LM5000, LabMate HTL) foram regularmente calibradas com água.

2.3. Componentes dos sistemas de fluxo

Os sistemas de fluxo implementados foram concebidos com recurso a diferentes tipos de equipamento, com diferentes características operacionais e com funções específicas na montagem analítica, nomeadamente para inserção, propulsão, comutação e transporte das soluções, e detecção e registo do sinal analítico.

2.3.1. Dispositivos de propulsão e inserção

Nos sistemas de fluxo desenvolvidos foram utilizados três tipos fundamentais de dispositivos de propulsão e inserção de reagentes e amostras: micro-bombas solenóides, micro-bombas piezoeléctricas e buretas automáticas.

2.3.1.1. Micro-bombas solenóides

Nas montagens analíticas envolvendo a utilização de micro-bombas solenóides (Capítulos 3 a 5 e 7) foram usadas micro-bombas da marca Bio-Chem Valve Inc. (Boonton, EUA) com um volume de pulso fixo de 8 e 25 μL

(modelo 090SP e 120SP, respectivamente), as quais possuíam uma configuração cilíndrica e reduzidas dimensões (aproximadamente 5 cm de altura e 1,8 cm de diâmetro).

O funcionamento das micro-bombas era baseado no deslocamento de um diafragma por activação de um solenóide (Figura 2.1). Na posição de repouso o diafragma era mantido na posição fechada por intermédio de uma mola interna. Por aplicação de uma voltagem o solenóide era activado o que provocava o deslocamento do diafragma e a aspiração do líquido para uma câmara interna. Quando a voltagem era suprimida o solenóide era desactivado e a mola interna recolocava o diafragma na sua posição inicial (posição fechada). A acção da mola sobre o diafragma, num movimento súbito, provocava a impulsão do líquido contido na câmara, gerando um pulso de volume fixo correspondente ao seu volume interno.

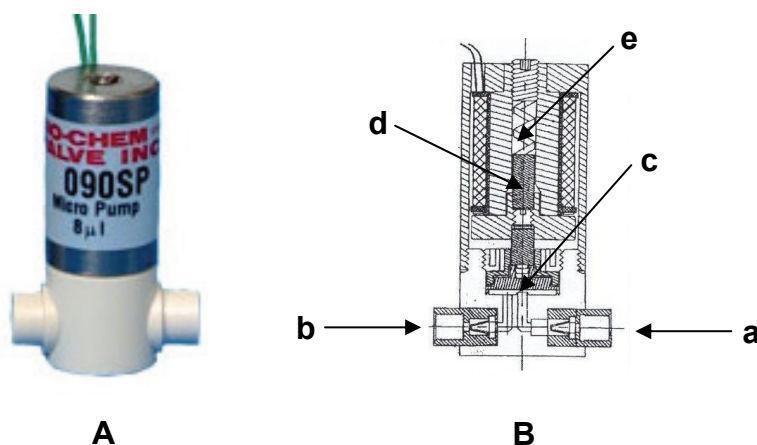


Figura 2.1 – (A) Micro-bomba solenóide com volume de pulso de 8 μL e (B) representação esquemática do seu interior: a – canal de entrada; b – canal de saída; c – diafragma; d – solenóide; e – mola.

De acordo com o manual do fabricante a frequência de pulso das micro-bombas poderia ser ajustada até um máximo de 250 pulsos por minuto, o que permitia atingir caudais de 2,0 e 6,25 mL min⁻¹, para as micro-bombas com um volume de pulso de 8 e 25 µL, respectivamente.

Para um funcionamento ideal, as micro-bombas requeriam a aplicação de uma voltagem de 12 V, durante um período de pelo menos 150 ms (aspiração das soluções), o qual deveria ser seguido de um período mínimo de desactivação do solenóide de aproximadamente 350 ms (impulsão das soluções). A soma do período de activação e de desactivação do solenóide definia o tempo de pulso. Apesar dos valores indicados, as micro-bombas permitiam a utilização de tempos de activação e de desactivação na ordem dos 100 ms, o que permitia atingir frequências de pulso de 300 pulsos por minuto.

Para cada solução, a frequência de pulso em combinação com o volume de pulso da micro-bomba determinava o caudal, enquanto que o número de pulsos definia o volume inserido no percurso analítico.

As micro-bombas solenóides apresentavam ainda uma elevada precisão nos volumes dispensados; elevada resistência química; longo tempo de utilização (aproximadamente 2×10^7 actuações) e um baixo custo.

2.3.1.2. Micro-bombas piezoeléctricas

Nas montagens analíticas envolvendo a utilização de micro-bombas piezoeléctricas (Capítulo 6) foram usadas micro-bombas da marca ThinXXS (Mainz, Alemanha), modelo MDP 1304, as quais possuíam uma configuração

cilíndrica e reduzidas dimensões (aproximadamente 0,8 cm de altura, 2,6 cm de diâmetro e 3 g de peso).

À semelhança das micro-bombas solenóides o funcionamento das micro-bombas piezoelétricas era baseado no deslocamento de um diafragma mas por activação de um cristal piezoelétrico (Figura 2.2). Por aplicação de uma voltagem o cristal piezoelétrico sofria uma deformação o que provocava o deslocamento do diafragma e a aspiração do líquido para uma câmara interna. Quando a voltagem era retirada o cristal retomava a sua forma e repunha o diafragma na posição inicial. A reposição do diafragma, à semelhança das micro-bombas solenóides, provocava a impulsão do líquido contido na câmara, gerando um pulso de solução.

As micro-bombas piezoelétricas para o seu funcionamento requeriam a aplicação de uma voltagem de -84/360 V. A sua frequência de actuação podia ser ajustada até um máximo de 1200 pulsos por minuto, o que correspondia a um caudal de 4,0 mL min⁻¹. O volume de pulso das micro-bombas avaliado sem ligação ao sistema era de aproximadamente 3 µL, sendo ligeiramente inferior após a sua introdução nas montagens devido a efeitos de pressão.

Para cada solução, o caudal era ajustado em função da frequência de actuação da micro-bomba, enquanto que o tempo de actuação em combinação com o caudal utilizado definia o volume inserido no percurso analítico.

As micro-bombas piezoelétricas apresentavam igualmente elevada precisão nos volumes dispensados; elevada resistência química; elevado tempo de vida (aproximadamente 10⁸ actuações) e um baixo custo.

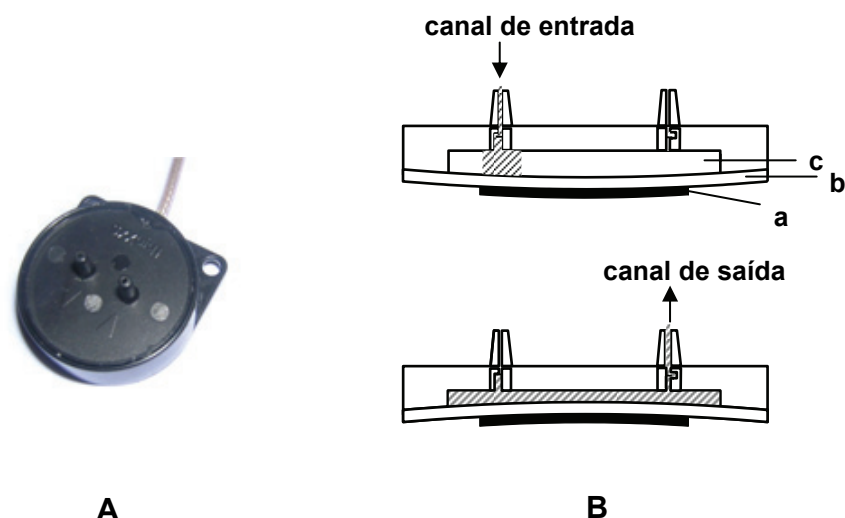


Figura 2.2 – (A) Micro-bomba piezoelétrica e (B) representação esquemática do seu interior. a – cristal piezoelétrico; b – diafragma; C – câmara interna.

2.3.1.3. Buretas automáticas

Na montagem analítica envolvendo a utilização de buretas automáticas (Capítulo 7) foram utilizadas duas buretas da marca Crison (Alella, Espanha), modelo micro BU 2031, equipadas com seringas de vidro da marca Hamilton com a capacidade de 5,0 mL (modelo 1005).

O funcionamento das buretas era baseado no movimento de um êmbolo que era operado por um motor de passo, o qual era controlado externamente por um microcomputador. O curso completo do êmbolo da seringa correspondia a 2500 passos, correspondendo cada passo a um volume de 2 μL . Para cada solução, o tempo de passo determinava o caudal enquanto que o número de passos definia o volume introduzido na montagem analítica.

2.3.2. Dispositivos comutadores

Nas montagens estabelecidas, com excepção da montagem de fluxo descrita no Capítulo 4, foram utilizadas válvulas solenóides da marca NResearch Inc. (W. Caldwell, NJ, EUA), as quais possuíam uma configuração cilíndrica e reduzidas dimensões (aproximadamente 1,9 cm de diâmetro e 2,9 cm de altura).

Nas diferentes montagens estabelecidas as válvulas solenóides foram utilizadas para o direccionamento do fluxo, tendo sido utilizado dois tipos fundamentais de válvulas: válvulas de 3 vias (uma entrada/duas saídas ou duas entradas/uma saída), modelo 161 T031 e válvulas de 2 vias (uma entrada/uma saída) originalmente fechadas (passagem das soluções impedida), modelo 161 T011. Nas válvulas de 3 vias, a selecção do percurso das soluções era condicionada pela posição de duas membranas de politetrafluoretileno (PTFE) presentes na parte central da válvula (Figura 2.3). Um dos percursos era seleccionado através da activação do solenóide, tendo como consequência a aplicação de uma pressão numa das membranas, enquanto que o percurso alternativo era estabelecido após o desligar da válvula, através do deslocamento de uma mola helicoidal que permitia a reposição da membrana na sua posição inicial.

Nas válvulas de 2 vias, uma mola exercia pressão sobre uma membrana (apenas uma membrana no caso das válvulas de 2 vias) obstruindo o percurso. Quando a válvula era accionada, o núcleo do solenóide pressionava a membrana no sentido contrário promovendo a abertura da válvula.

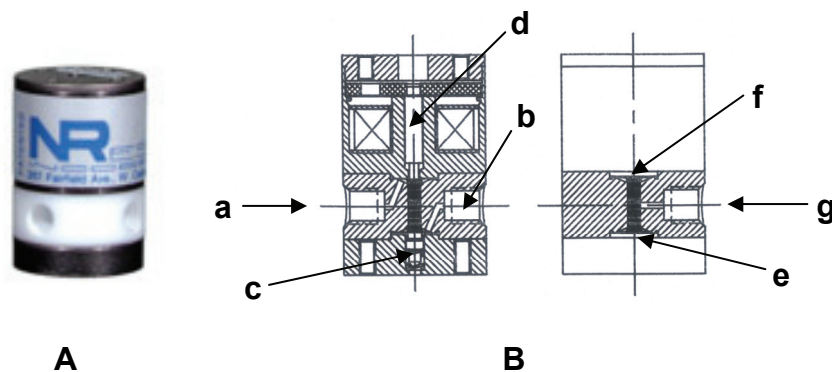


Figura 2.3 – (A) Válvula solenóide de 3 vias e (B) representação esquemática do seu interior: a – canal de entrada 1; b – canal de entrada 2; c – mola; d - solenóide; e, f – membranas de PTFE; g – canal de saída.

As válvulas apresentavam reduzidos volumes mortos; reduzido volume interno; pressão máxima de funcionamento de 30 psi; curto tempo de resposta (5 a 20 ms para activação); elevada resistência química (revestimento em PTFE); baixo custo e alimentação a 12 V.

2.3.3. Tubagem e outros componentes da montagem

O sistema de tubagem para o transporte das soluções era constituído por tubos de PTFE, da marca Omnifit, com um diâmetro interno de 0,8 mm, ligados entre si por ligadores e terminais de fabrico próprio. Foram também utilizados tubos de PTFE com um diâmetro interno de 0,5 mm, da mesma marca.

As confluências utilizadas eram de construção laboratorial e fabricadas em perspex, com diferentes configurações [1].

2.3.4. Sistemas de detecção

A metodologia quimiluminométrica descrita no Capítulo 4 utilizou como sistema de detecção um luminómetro da marca Camspec modelo CL-2, equipado com uma célula de fluxo com um volume óptico de 60 μL e um percurso óptico de 10 cm, o qual apresentava uma configuração adequada para funcionar como detector de um sistema de fluxo. A célula de fluxo possuía duas portas de entrada e uma de saída, podendo as duas portas de entrada ser utilizadas para a inserção das soluções de amostra e reagente, o que possibilitava a mistura das soluções mesmo à entrada da célula de fluxo, podendo também ser utilizada apenas uma das entradas, fechando a outra e efectuando-se a mistura antes da célula de fluxo.

A metodologia espectrofotométrica descrita no Capítulo 5 utilizou como sistema de detecção um espectrofotómetro da marca Femto, modelo 432, equipado com uma célula de fluxo da marca Hellma, com 1 cm de percurso e 30 μL de volume óptico.

Nas restantes metodologias desenvolvidas (Capítulos 3, 6 e 7) foi utilizado como sistema de detecção um espectrofotómetro da marca Jenway, modelo 6300, equipado com uma célula de fluxo com 1 cm de percurso e 18 μL de volume óptico.

Os sinais analíticos eram registados por intermédio de um registador da marca Kipp & Zonen, modelo BD 111, que se encontrava conectado ao sistema de detecção, ou adquiridos directamente para o computador através de uma interface com um conversor analógico/digital com uma resolução de 12 bits.

2.3.5. Controlo informático dos sistemas

Os sistemas analíticos desenvolvidos eram controlados integralmente por computador, através de software desenvolvido no laboratório, possibilitando a selecção e ajuste, de forma simplificada, de todos os parâmetros analíticos que condicionavam o desempenho das montagens.

2.3.5.1. Aparelhagem

Como unidade central de aquisição e processamento de dados e de controlo dos componentes dos sistemas desenvolvidos foi utilizado um microcomputador equipado com um microprocessador Pentium I. A comunicação entre o microcomputador e os diversos componentes das montagens de fluxo, nomeadamente os dispositivos de propulsão e inserção (micro-bombas solenóides, micro-bombas piezoeléctricas e buretas automáticas), dispositivos comutadores (válvulas solenóides) e dispositivos de detecção (espectrofotómetro e luminómetro) foi efectuada através de uma interface da marca Advantech, modelo PC-LabCard PCL-711B.

Para a actuação das micro-bombas solenóides e das válvulas solenóides foi desenvolvido um circuito de potência, com base num circuito integrado ULN 2003 [2]. Este circuito permitia o controlo simultâneo de sete unidades (micro-bombas solenóides e válvulas solenóides).

A actuação das micro-bombas piezoeléctricas era efectuada por intermédio de um controlador electrónico da marca ThinXXS, modelo EDP 0604, sendo utilizado um controlador por cada micro-bomba piezoeléctrica.

Tanto o circuito integrado ULN 2003 como o controlador electrónico EDP 0604, eram activados por sinais TTL através da interface anteriormente referida.

As buretas automáticas eram controladas por comunicação série usando o padrão RS-232C.

2.3.5.2. Software

O software de controlo, aquisição e tratamento de dados, foi elaborado especificamente para aplicação nos trabalhos realizados. As aplicações foram desenvolvidas com recurso a uma linguagem de alto nível, BASIC, implementada em ambiente DOS (QuickBasic 4.5).

De um modo geral, cada programa permitia definir a sequência de etapas para cada determinação. Em cada caso particular as instruções dadas referiam-se à activação das micro-bombas solenóides, tempo de pulso, frequência de pulso e número de pulsos; à activação das micro-bombas piezoeléctricas, frequência de actuação e tempo de actuação; à activação das buretas automáticas, sentido de funcionamento aspiração/impulsão, tempo de activação e ainda à posição das válvulas solenóides.

2.4. Instrumentação adicional

A análise da buspirona em formulações farmacêuticas (Capítulo 3) seguindo o método de referência descrito na Farmacopeia Americana [3], foi realizada num cromatógrafo da marca Merck Hitachi Labchrom, equipado com um detector L-7455, uma bomba L-7100 e uma interface D-7000.

A determinação por espectrofotometria de absorção atómica com atomização por chama utilizada como método de referência no Capítulo 5 [4], foi realizada utilizando um espectrofotómetro de absorção atómica da marca Perkin-Elmer, modelo 503.

As medições espectrofotométricas realizadas para a determinação da quantidade de anião peroxinitrito gerado no sistema de análises em fluxo descrito no Capítulo 4, foram realizadas utilizando um espectrofotómetro de UV/Vis, da marca Perkin Elmer, modelo Lambda 45.

Sempre que necessário o pH das soluções usadas nos diversos trabalhos foi ajustado utilizando um milivoltímetro da marca Crison, modelo GLP 22 equipado com um eléctrodo de vidro combinado de Ag/AgCl, da mesma marca e com a referência 52-02.

2.5. Desenvolvimento e optimização das montagens de fluxo

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

Os estudos de optimização foram efectuados recorrendo ao método da análise univariada, o qual consistia em fazer variar o valor de um determinado parâmetro mantendo os restantes com um valor constante.

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

qual se observava uma relação linear do sinal analítico com a concentração do analito.

O limite de detecção, definido como a concentração resultante da menor medição que pode ser detectada, com razoável certeza, para um determinado procedimento analítico, foi calculado de acordo com as especificações da IUPAC [5], a partir dos sinais analíticos de 10 medições consecutivas do branco.

O ritmo de amostragem, expresso em número de determinações por hora, foi calculado tendo em conta o tempo necessário para a realização de cada etapa do ciclo analítico.

2.6. Tratamento estatístico dos resultados

Nas montagens analíticas envolvendo a determinação de amostras farmacêuticas (Capítulos 3 e 6) e de plantas (Capítulo 5), o sinal analítico, correspondente à concentração da espécie a analisar, foi calculado em função da média de 3 medições consecutivas da mesma amostra. A concentração final era calculada por interpolação gráfica da intensidade do sinal obtido, na curva de calibração estabelecida para cada metodologia.

Na montagem analítica desenvolvida para a avaliação da actividade captadora do anião peroxinitrito (Capítulo 4) o efeito captador dos compostos avaliados era expresso sob a forma de percentagem de inibição (I %), calculada a partir de $I\% = \frac{(S_{\text{branco}} - S_{\text{amostra}})}{S_{\text{branco}}} \times 100$. O sinal analítico obtido na ausência (S_{branco}) e presença do composto em estudo (S_{amostra}) era calculado em função da média de 4 ensaios, realizados em triplicado.

A avaliação da precisão das metodologias implementadas foi efectuada por ensaio de soluções padrão de trabalho e de uma ou mais amostras [5]. Para tal foram realizadas 10 determinações consecutivas de uma solução padrão de trabalho com um nível de concentração situado aproximadamente a meio da zona de linearidade, e de uma ou mais amostras de concentração intermédia das amostras alvo, e foi determinado o desvio padrão relativo.

A exactidão das metodologias desenvolvidas foi avaliada por comparação dos resultados obtidos com os fornecidos pelo método de referência, sempre que disponível. Para cada determinação calcularam-se os desvios relativos, expressos em percentagem, para o valor médio de cada par de resultados obtidos, com base na expressão $(C_{\text{fluxo}} - C_{\text{ref}}) \times 100 / C_{\text{ref}}$. Nos casos em que houve comparação dos resultados com um método de referência também foi aplicado um teste t de Student emparelhado (paired t-test) aos valores obtidos pelas duas metodologias. O valor de t foi calculado com base na expressão $t = \frac{\bar{X}}{S} \sqrt{n}$, com $n-1$ graus de liberdade e onde $\bar{X}$ é a média da diferença entre cada par de valores, S é o desvio padrão e n o número de medidas. O valor calculado ($t_{\text{calculado}}$) quando comparado com o valor tabelado (t_{tabelado}), para um nível de significância de 95%, permite confirmar a concordância entre os dois métodos quando se verifica a hipótese nula [6, 7].

Na metodologia referente à determinação de zinco em extractos de plantas (Capítulo 5), a exactidão foi também avaliada através da análise de amostras de referência certificadas.

Na metodologia referente à determinação de gabapentina em amostras farmacêuticas (Capítulo 6), e perante a impossibilidade de analisar as amostras

por uma metodologia de referência, a avaliação dos resultados e de possíveis interferências de matriz foi efectuada através de ensaios de recuperação. Estes ensaios foram efectuados adicionando a cada amostra soluções padrão concentradas da espécie em análise, de modo a obter dois níveis finais de concentração. O índice de recuperação, expresso em percentagem, foi calculado com base na expressão $(C_{a+p} - C_a) \times 100 / C_p$, onde C_{a+p} é a concentração encontrada para a amostra adicionada de padrão, C_a é a concentração encontrada para a amostra e C_p é a concentração de elemento na amostra resultante da adição de padrão.

2.7. Referências bibliográficas

- [1] S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, A. A. S. C. Machado, J. L. F. C. Lima, J. M. Paulís, Quim. Anal 6 (1987) 278.
- [2] R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, J. L. M. Santos, E. A. G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 351 (1997) 223.
- [3] USP 24/NF 19, The United States Pharmacopeial Convention Inc., 259, 2000.
- [4] AOAC Official Methods of Analysis, Vol. I, AOAC Int., Arlington, 16^a edição, 1990.
- [5] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Anal. Chem. 48 (1976) 2294.
- [6] J. N. Miller, J. C. Miller, Statistics and chemometrics for analytical chemistry, Pearson Education, Great Britain, 4^a edição, 2000.
- [7] J. N. Miller, Analyst 116 (1991) 3.

CAPÍTULO 3

Sistemas de fluxo multi-impulsão. Determinação espectrofotométrica de bupirone em formulações farmacêuticas usando uma estratégia de paragem de fluxo

3.1. Introdução

A buspirona (cloridrato de buspirona), cloridrato de 8-[4-[4-(2-pirimidinil)-1-piperazinil]butil]-8-azaspiro[4,5]decano-7,9-diona (Figura 3.1), é um fármaco ansiolítico, pertencente à classe dos agonistas dos receptores 5-HT_{1A} [1].

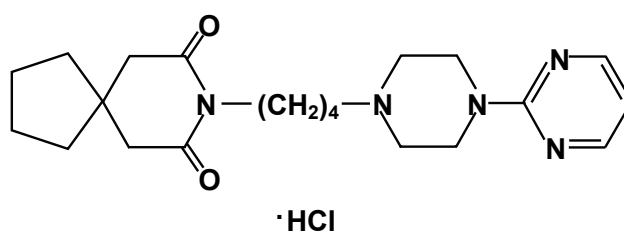


Figura 3.1 - Estrutura química do cloridrato de buspirona.

A buspirona é utilizada no tratamento de distúrbios de ansiedade generalizada, sendo caracterizada pela ausência de alguns efeitos colaterais exibidos pelos fármacos deste grupo terapêutico (nomeadamente benzodiazepinas e barbitúricos), como dependência e tolerância, sedação, descoordenação motora e interação com o álcool [1, 2].

A actividade ansiolítica da buspirona, embora não esteja totalmente esclarecida, parece estar relacionada com a neurotransmissão de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) [1, 2]. A buspirona é um poderoso agonista dos receptores 5-HT_{1A}, receptores abundantes em certas regiões do cérebro, como a região do septo do hipocampo, e desta forma, é possível que actue sobre os receptores pré-sinápticos inibitórios, reduzindo a libertação de 5-HT [1]. Estudos clínicos revelaram que a buspirona como agonista dos receptores 5-HT_{1A} pode também ser útil no tratamento da depressão, possivelmente por

inibição dos receptores 5-HT_{1A} ou dos receptores 5-HT₂, ou ambos [2]. A buspirona possui ainda características quer de agonista quer de antagonista da dopamina, o que pode resultar numa estimulação da hormona de crescimento e da secreção de prolactina [2].

A importância terapêutica e farmacológica da buspirona estimulou o desenvolvimento de diversos métodos para a sua determinação, tanto em amostras biológicas como em formulações farmacêuticas. Na literatura encontram-se referidos essencialmente métodos cromatográficos, dos quais se destacam cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC) com detecção por espectrofotometria na região do ultravioleta, em amostras biológicas [3-6] e em formulações farmacêuticas [7-8], HPLC com detecção electroquímica, em amostras biológicas [9-13], HPLC acoplado a um detector de massa [14-16], cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama [17], cromatografia gasosa com detector de captura electrónica [18], cromatografia gasosa com detector de nitrogénio/fósforo [19], cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa [20-22], electroforese capilar com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta [23] e cromatografia em camada fina [24]. Foram também realizados trabalhos recorrendo a técnicas voltamétricas, em amostras biológicas [25] e em formulações farmacêuticas [26, 27]. A literatura refere ainda um trabalho de determinação do fármaco em amostras biológicas, através de um procedimento específico por radioimunoensaios [28]. Apesar da elevada sensibilidade e selectividade, a maioria dos procedimentos referidos requer na sua implementação equipamentos dispendiosos, operadores qualificados e exige uma preparação laboriosa das amostras, resultando em processos bastante morosos, pouco

atractivos para uma análise de rotina. Para uma análise de rotina é necessário o desenvolvimento de procedimentos analíticos rápidos, simples, fiáveis e robustos, os quais poderiam ser desenvolvidos recorrendo a metodologias de análise em fluxo. No entanto, até ao momento não se encontra descrito na literatura nenhum procedimento para a determinação automática de buspirona com aplicação de metodologias de fluxo.

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema automático de fluxo contínuo, baseado no conceito de multi-impulsão, para a determinação de buspirona em formulações farmacêuticas, com detecção espectrofotométrica por reacção da buspirona com o reagente de Folin-Ciocalteu em meio alcalino. A determinação foi efectuada, através da inserção na montagem analítica de três micro-bombas solenóides, para inserção e propulsão das soluções de amostra e reagentes, e de uma válvula solenóide, para o direccionamento do fluxo para dois reactores paralelos posicionados antes do detector. Um dos reactores foi utilizado para acomodar uma primeira zona de amostra, durante um intervalo pré-definido de paragem de fluxo, de forma a aumentar o tempo de reacção, enquanto que o segundo reactor foi utilizado para a monitorização directa de uma segunda zona de amostra. Com esta configuração foi possível a análise de volumes de amostra idênticos, a diferentes tempos de reacção, sem que o ritmo de amostragem fosse afectado.

3.2. Parte experimental

3.2.1. Reagentes e soluções

Foi preparada uma solução padrão de buspirona com uma concentração de 200,0 mg L⁻¹ dissolvendo 10,0 mg de buspirona (Sigma) em 50,00 mL de água. As soluções padrão de buspirona, com concentrações compreendidas entre 10,0 e 60,0 mg L⁻¹, eram preparadas diariamente, por diluição rigorosa da solução padrão mais concentrada.

As soluções do reagente de Folin-Ciocalteu, com concentrações compreendidas entre 2,0 e 20,0 % (v/v), foram preparadas por diluição rigorosa de uma solução comercial de Folin-Ciocalteu 2 mol L⁻¹ (Sigma).

As soluções de carbonato de sódio, com concentrações compreendidas entre 1,0 e 3,0 % (m/v), eram preparadas por diluição rigorosa de uma solução com uma concentração 10,0 % (m/v).

3.2.2. Equipamento

A montagem analítica envolveu a utilização de três micro-bombas solenóides com um volume de pulso fixo de 8 µL, e uma válvula solenóide de 3 vias (uma entrada/duas saídas), as quais foram já caracterizadas em detalhe no Capítulo 2.

Os tubos de transporte das soluções eram de PTFE, com um diâmetro interno de 0,8 mm. Foram também utilizadas 3 confluências fabricadas em perspex, com uma configuração em “Y”, e ligadores e terminais de fabrico próprio [29].

As medições espectrofotométricas foram realizadas com um espectrofotómetro da marca Jenway modelo 6300, a um comprimento de onda de 760 nm, e equipado com uma célula de fluxo com 1 cm de percurso e 18 μ L de volume óptico.

Os restantes componentes da montagem, nomeadamente os componentes responsáveis pelo controlo das micro-bombas e da válvula solenóide, foram já referidos pormenorizadamente no Capítulo 2.

3.2.3. Montagem de fluxo

No sistema de fluxo desenvolvido (Figura 3.2) as micro-bombas solenóides P_1 , P_2 e P_3 foram utilizadas para a inserção e propulsão das soluções de amostra e reagentes. P_1 era utilizada para a inserção e propulsão da solução de amostra, enquanto que P_2 e P_3 eram utilizadas para a inserção e propulsão das soluções de carbonato de sódio e do reagente de Folin-Ciocalteu, respectivamente. A válvula solenóide V foi utilizada para o direccionamento do fluxo, possibilitando a gestão do mesmo em dois reactores com idênticas dimensões, L_1 e L_2 .

Antes das determinações, todas as micro-bombas (P_1 , P_2 e P_3) eram accionadas para preenchimento do seu interior e das linhas de transmissão. Posteriormente, P_1 era desligada e por actuação simultânea de P_2 e P_3 , procedia-se à limpeza das linhas transmissão e dos reactores.

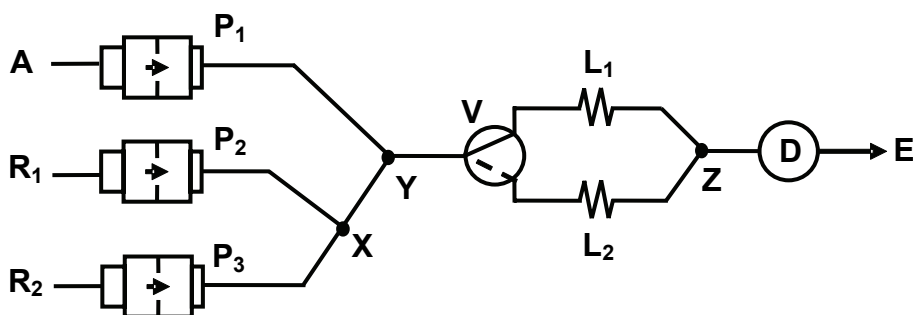


Figura 3.2 - Esquema da montagem de fluxo multi-impulsão usada na determinação de buspirona em formulações farmacêuticas: A – solução de amostra; R₁ – solução de carbonato de sódio; R₂ – solução do reagente de Folin-Ciocalteu; P₁ a P₃ – micro-bombas solenóides; V – válvula solenóide (a linha contínua e a linha tracejada referem a posição desactivada e activada, respectivamente); L₁ e L₂ – reactores (100 cm); X, Y e Z – pontos de confluência; D – detector; E – esgoto.

O ciclo analítico (Figura 3.3) tinha início com a actuação simultânea de P₂ e P₃. Como resultado, as soluções de carbonato de sódio e do reagente de Folin-Ciocalteu eram inseridas na montagem analítica, misturadas por acção do fluxo pulsado no ponto de confluência X e propulsadas, através do reactor L₁, para o detector, estabelecendo a linha de base.

Numa segunda fase, por actuação de P₁, a solução de amostra era inserida no ponto de confluência Y. O volume de amostra era definido pelo número de pulsos de actuação de P₁, correspondendo sempre a um múltiplo de 8 μ L (volume de pulso). Durante a inserção da amostra, as micro-bombas P₂ e P₃ também foram activadas, o que possibilitou a mistura em confluência (no ponto de confluência Y) por acção do fluxo pulsado, das zonas de amostra e

das zonas de reagente (solução de carbonato de sódio/reagente de Folin-Ciocalteu) e por sua vez, o estabelecimento da zona de reacção.

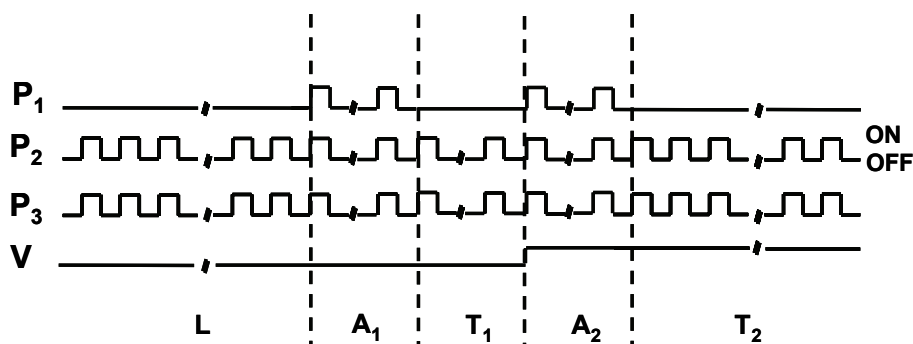


Figura 3.3 – Representação esquemática da posição das micro-bombas e da válvula durante o ciclo analítico. P₁ a P₃ – micro-bombas solenóides; V – válvula solenóide; ON – activada; OFF – desactivada; L – definição da linha de base (10 pulsos); A₁ e A₂ – fase de inserção da primeira e segunda zona de amostra (16 pulsos); T₁ – fase de transporte (20 pulsos); T₂ – fase de transporte (100 pulsos).

Numa terceira fase, a zona de reacção era encaminhada para o reactor L₁ (por actuação simultânea de P₂ e P₃ e com V na posição desactivada), e submetida a uma paragem de fluxo neste reactor por um período de tempo pré-definido, de forma a aumentar a extensão da reacção. Enquanto que a primeira zona de reacção era mantida no reactor L₁, a válvula V era activada, e uma segunda zona de amostra com idêntico volume, era inserida na montagem analítica (usando a mesma estratégia de inserção de amostra), estabelecendo uma segunda zona de reacção, a qual era propulsada através do reactor L₂ para o detector, sem qualquer intervalo de paragem de fluxo. Após a

monitorização da segunda zona de amostra, e com o início de um novo ciclo analítico, a válvula V era desactivada, e por actuação das micro-bombas P₂ e P₃, a zona de amostra inserida no reactor L₁, era encaminhada para a detecção. Como consequência do menor tempo de residência, a extensão da reacção desenvolvida pela segunda zona de amostra era menor, relativamente à desenvolvida com a zona de amostra retida em L₁, originando dois sinais analíticos com diferentes magnitudes. A diferença entre os sinais analíticos obtidos, Δh , constituiu a base da determinação do procedimento proposto, o qual dada a diferença entre os sinais obtidos, designaremos por método cinético em tempo fixo.

3.2.4. Método de referência

Para avaliar a qualidade dos resultados obtidos pela montagem desenvolvida, as amostras das formulações farmacêuticas contendo buspirona, foram também analisadas pela metodologia de referência preconizada pela Farmacopeia Americana USP 24, para comprimidos contendo buspirona como princípio activo [30].

A preparação das amostras analisadas pela metodologia de referência foi feita com base no procedimento indicado pela Farmacopeia. Por cada amostra eram pesados 20 comprimidos, de forma a estimar o peso médio de buspirona por comprimido, os quais eram posteriormente pulverizados em almofariz de porcelana. Uma quantidade equivalente a 100 mg de buspirona era pesada, transferida para um balão volumétrico de 200,0 mL e submetida a agitação por 15 minutos, em 50 mL de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹. A solução era

posteriormente diluída, através da adição de 100 mL de água, e submetida a nova agitação durante um período de 30 minutos. Em seguida, completava-se o volume com água, e filtrava-se a solução, rejeitando os primeiros 20 mL de filtrado. Para um balão volumétrico de 50,00 mL eram transferidos 10 mL de filtrado, 10 mL de uma solução de padrão interno de propilparabeno 0,125 mg L⁻¹, completando o volume com água. A solução obtida era então analisada por HPLC. O sistema cromatográfico incorporava uma coluna C-18 e usava como eluente uma mistura de tampão fosfato (H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻, pH 7,5) e acetonitrilo (60:40) de modo isocrático. A detecção de buspirona era efectuada espectrofotometricamente a 254 nm.

As soluções de amostra, para a análise pela metodologia desenvolvida, eram preparadas por pesagem e dissolução em água, da quantidade correspondente a 40 mg L⁻¹ de buspirona de formulação pulverizada, obtida como já foi descrito anteriormente para o procedimento de referência.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Ensaios preliminares por procedimentos discretos

O desenvolvimento do sistema automático de fluxo contínuo para a determinação de buspirona em formulações farmacêuticas teve início com a realização de estudos discretos envolvendo a reacção espectrofotométrica da buspirona com o reagente de Folin-Ciocalteu.

De acordo com a literatura, o reagente de Folin-Ciocalteu (constituído por uma mistura de heteropoliácidos, ácido fosfomolibdico e ácido fosfotúngstico) reage com compostos contendo grupos fenólicos ou grupos

amina, em meio alcalino, dando origem a compostos corados, com um máximo de absorbância entre 745 e 760 nm [31-33]. A reacção é uma reacção de oxidação/redução, em que o molibdénio e tungsténio dos heteropoliácidos (complexo com coloração amarela) são reduzidos dando origem ao azul de molibdénio e azul de tungsténio [32, 33].

Em face do descrito e considerando a estrutura química da buspirona (Figura 3.1) seria então de prever que a buspirona reduzisse o tungsténio e/ou molibdénio presente no reagente de Folin-Ciocalteu, resultando na formação de um composto corado. Nesse sentido e tendo por base alguns trabalhos descritos na literatura envolvendo a utilização do reagente de Folin-Ciocalteu [32-38], foi realizado um estudo onde se misturaram volumes equivalentes (aproximadamente 1 mL) de uma solução do reagente de Folin-Ciocalteu 5,0 % (v/v), uma solução de carbonato de sódio 2,0 % (m/v) e soluções de buspirona com concentrações distintas (10,0 a 50,0 mg L⁻¹), para avaliar a reacção da buspirona com o reagente de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos revelaram que a buspirona efectivamente reagia com o reagente de Folin-Ciocalteu, dando origem a um composto de cor azul, com um máximo de absorbância a 760 nm. Verificou-se ainda (Figura 3.4) que nestas condições a reacção era lenta, atingindo o equilíbrio aproximadamente aos 25 minutos.

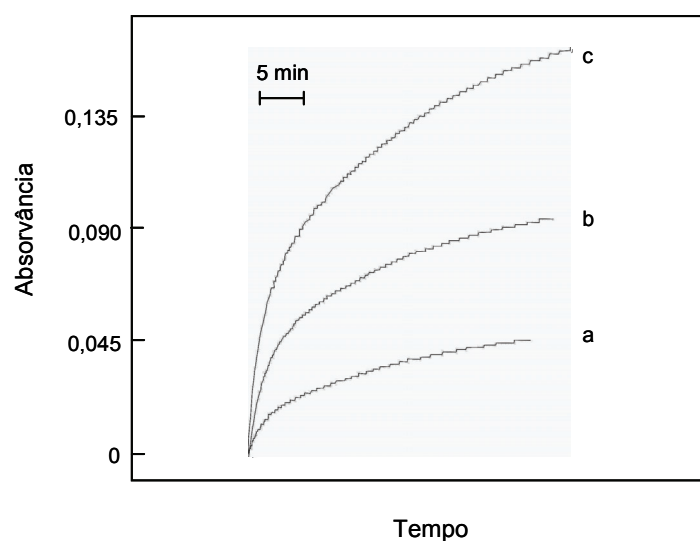


Figura 3.4 – Monitorização do sinal analítico em função do tempo: a – 10,0 mg L⁻¹, b – 25,0 mg L⁻¹ e c – 50,0 mg L⁻¹ de buspirona.

Variando a concentração do reagente de Folin-Ciocalteu entre 2,5 e 20,0 % (v/v) a intensidade do sinal analítico aumentava até uma concentração 5,0 % (v/v) e depois diminuía, como resultado da diminuição do pH do meio reaccional [33, 34]. Relativamente à concentração da solução de carbonato de sódio, verificou-se que a intensidade do sinal analítico aumentava até uma concentração 2,0 % (m/v), observando-se uma diminuição da intensidade para concentrações superiores, devido à falta de estabilidade do reagente de Folin-Ciocalteu num meio demasiado alcalino [33, 34].

3.3.2. Desenvolvimento e optimização do sistema de fluxo

O primeiro aspecto encarado na automatização baseada num sistema de fluxo multi-impulsão para a determinação espectrofotométrica de buspirona em formulações farmacêuticas, considerando as avaliações preliminares

anteriormente referidas, foi o tempo necessário ao desenvolvimento da reacção. Nesse sentido, utilizando uma montagem de fluxo semelhante à da Figura 3.2, mas apenas constituída por um reactor (50 cm), foi efectuado um estudo onde foi avaliado o tempo de reacção, através da realização de uma paragem de fluxo da zona reaccional, no reactor. Para o estabelecimento da zona reaccional foram inseridos 5 pulsos, o que correspondia a um volume de 40 μL (8 μL por pulso) de uma solução de amostra (branco e 50,0 mg L^{-1} de buspirona), a um caudal de 0,8 mL min^{-1} , em confluência com 5 pulsos (40 μL) de uma solução do reagente de Folin-Ciocalteu 5% (v/v) e 5 pulsos (40 μL) de uma solução de carbonato de sódio 2% (m/v), igualmente inseridos a um caudal de 0,8 mL min^{-1} . Após a inserção das soluções de amostra e reagentes, o fluxo foi parado, durante um período de tempo de 0, 15, 30, 45, 60 e 75 segundos. Posteriormente, o fluxo foi reiniciado, através da actuação simultânea de P_2 e P_3 (inserção simultânea das soluções de carbonato de sódio e do reagente de Folin-Ciocalteu, o que permitia manter o pH ao longo do sistema de fluxo), encaminhando a zona de reacção para o detector. Os resultados obtidos (Figura 3.5) revelaram que a intensidade do sinal analítico aumentava significativamente até uma paragem de fluxo de aproximadamente 45 segundos, quase estabilizando a partir deste valor. Para o mesmo tempo de paragem de fluxo, a solução de branco (ausência de buspirona), não mostrava qualquer incremento no sinal analítico. Desta forma, para a implementação da reacção em fluxo, um período de tempo de aproximadamente 45 segundos seria suficiente para o adequado desenvolvimento da reacção, sem que o ritmo de amostragem fosse afectado.

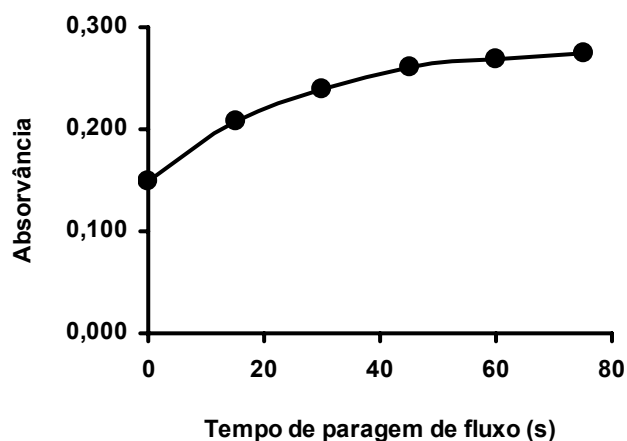


Figura 3.5 – Influência do tempo de paragem de fluxo no sinal analítico para uma solução de amostra 50,0 mg L⁻¹ de buspirona.

A montagem analítica permitia no entanto, a utilização de uma segunda zona de amostra, enquanto que a primeira era submetida a uma paragem de fluxo. Usando dois reactores paralelos, L₁ e L₂ (Figura 3.2), seleccionados por uma válvula solenóide, era possível direccionar o fluxo para dois percursos alternativos, e desta forma, obter dois tempos de reacção distintos para as duas zonas de amostra. Isto seria conseguido, inserindo um segundo volume de amostra, usando a mesma estratégia de inserção da primeira zona de amostra. Contudo, esta segunda zona de amostra seria encaminhada directamente para o detector e monitorizada antes da primeira. Desta forma, obtinha-se informação adicional, por comparação dos sinais analíticos obtidos em ambas as circunstâncias. A diferença entre os sinais analíticos obtidos (Δh) seria apenas uma consequência da cinética da reacção química, a qual poderia então ser relacionada com a concentração de buspirona.

Estabelecida a configuração básica do sistema (Figura 3.2) avaliaram-se os diferentes parâmetros, nomeadamente o volume das zonas de amostra, o comprimento dos reactores, o caudal, a concentração dos reagentes em causa, bem como se avaliou também a forma e sequência de inserção das zonas de amostra e reagentes na montagem analítica.

Relativamente à forma e sequência de inserção das zonas de amostra na montagem analítica, foi efectuado um estudo onde foram testadas diferentes combinações de inserção da solução de bupirone, com as soluções de carbonato de sódio e do reagente de Folin-Ciocalteu. Este estudo foi efectuado utilizando uma solução de bupirone com uma concentração $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ e volumes da mesma a variar de 80 e 160 μL (10 e 20 pulsos, respectivamente). As soluções de carbonato de sódio e do reagente de Folin-Ciocalteu eram inseridas em simultâneo, de modo a evitar variações de pH ao longo do sistema de fluxo. Adicionalmente, as duas soluções funcionavam como solução transportadora, permitindo o transporte das zonas de amostra até ao detector. As diferentes estratégias de inserção de amostra compreenderam então a inserção da amostra como volume único, através da inserção de uma única alíquota de 80 e 160 μL de solução de bupirone entre duas alíquotas de solução de carbonato de sódio/reagente de Folin-Ciocalteu; como amostragem binária, através da intercalação de 10 e 20 alíquotas de 8 μL de solução de bupirone e de 8 μL das soluções de carbonato de sódio/reagente de Folin-Ciocalteu; e por confluência de zonas, através da inserção simultânea de 10 e 20 alíquotas de 8 μL de solução de bupirone e das soluções de carbonato de sódio/reagente de Folin-Ciocalteu. A utilização das diferentes estratégias de inserção das zonas de amostra e reagentes foi possível devido ao controlo

individual e independente de cada micro-bomba, o que possibilitava diferentes combinações de activação, sem ser necessária uma reconfiguração física do sistema. Os resultados obtidos revelaram que para 10 pulsos de amostra (80 μL) não havia diferença significativa no sinal analítico (Δh) para as três estratégias avaliadas, uma vez que a natureza pulsada do fluxo promove uma extensa mistura no ponto onde ocorre a confluência de soluções. No entanto, com a utilização das estratégias amostragem binária e confluência de zonas a repetibilidade dos sinais analíticos obtidos para as duas zonas de amostra (com e sem paragem de fluxo) era superior, facto que é explicado pelo aumento da eficiência da mistura proporcionada por estas duas estratégias [39]. Para 20 pulsos de amostra (120 μL) o sinal analítico (Δh) era ligeiramente superior para as estratégias, amostragem binária e confluência de zonas, como resultado da mistura mais eficaz comparativamente à estratégia de volume único. Perante os resultados obtidos e tendo em consideração que utilizando a estratégia de confluência de zonas o caudal total era mais elevado (uma vez que as três micro-bombas funcionavam em simultâneo), o que possibilitava o aumento do ritmo de amostragem, a optimização prosseguiu utilizando uma estratégia de confluência de zonas.

O estudo da influência do comprimento dos reactores L_1 e L_2 na montagem analítica (Figura 3.2) foi posteriormente efectuado, testando reactores de 50, 100 e 200 cm de comprimento (comprimento idêntico para os reactores L_1 e L_2). Uma vez que o comprimento dos reactores afecta a dispersão das zonas de amostra, este estudo foi efectuado, utilizando simultaneamente volumes crescentes de uma solução de buspirona com uma concentração 50,0 mg L^{-1} . O volume da solução de buspirona, tal como referido

anteriormente, era definido em termos de número de pulsos, correspondendo sempre a um múltiplo de 8 μL (volume de pulso). Atendendo a que a solução de buspirona era inserida na montagem analítica por confluência de zonas com as soluções de carbonato de sódio e do reagente de Folin-Ciocalteu, o número de pulsos das soluções de carbonato de sódio e do reagente de Folin-Ciocalteu era igual ao número de pulsos de amostra, e deste modo, os volumes inseridos eram equivalentes. Verificou-se que para reactores de 50 cm de comprimento (Figura 3.6), o sinal analítico (Δh) aumentava com o volume de amostra até um volume de aproximadamente 96 μL (12 pulsos de amostra) e depois estabilizava, enquanto que para reactores de 100 cm, Δh aumentava até um volume de 128 μL (16 pulsos de amostra) e para reactores de 200 cm, Δh aumentava até um volume de 160 μL (20 pulsos de amostra). Verificou-se ainda (Figura 3.6), que para pequenos volumes de amostra (volumes inferiores a 64 μL , 8 pulsos de amostra), o sinal analítico obtido com os reactores de 50 e 100 cm, era superior relativamente ao obtido com os reactores de 200 cm, o que é explicado pela elevada dispersão das zonas de amostra com os reactores de 200 cm, enquanto que para volumes de amostra mais elevados (volumes de amostra superiores a 96 μL , 12 pulsos de amostra), o sinal analítico (Δh) era superior para os reactores de 200 cm. Perante os resultados obtidos e tendo em consideração um compromisso entre sensibilidade e ritmo de amostragem, a optimização prosseguiu utilizando um volume de amostra de 128 μL (16 pulsos de amostra) e reactores de 100 cm de comprimento.

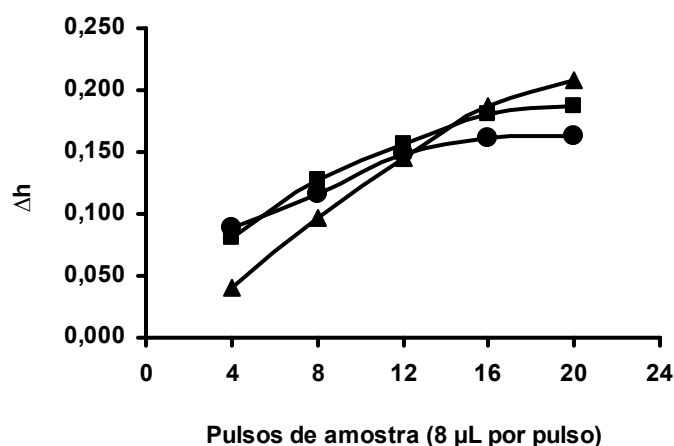


Figura 3.6 - Influência do número de pulsos de amostra (volume de amostra) para diferentes comprimentos de reactor: ● – 50 cm; ■ – 100 cm; ▲ – 200 cm.

Relativamente ao volume de solução transportadora (solução de carbonato de sódio/reagente de Folin-Ciocalteu) utilizado para a propulsão da segunda zona de amostra encaminhada directamente ao detector (Figura 3.3, fase T_2), o seu estudo foi efectuado, variando o número de pulsos de solução transportadora entre 80 e 110 pulsos, seleccionando igual número de pulsos para a solução de carbonato de sódio e para o reagente de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos demonstraram que a utilização de 100 pulsos, o que correspondia a um volume de cerca de 800 μL , era suficiente para o transporte ao detector e monitorização da zona de amostra. O mesmo estudo foi efectuado para a zona de amostra retida em L_1 (Figura 3.2), tendo-se observado que 20 pulsos de solução transportadora, o que correspondia a um volume de cerca de 160 μL , eram suficientes para o encaminhamento da zona de amostra para L_1 (Figura 3.3, fase T_1) e 10 pulsos, o que correspondia a um

volume de cerca de 80 μL , eram suficientes para o seu encaminhamento ao detector após a retenção em L_1 (Figura 3.3, fase L).

Outro parâmetro avaliado, considerando o seu efeito sobre o tempo de residência das zonas de amostra na montagem analítica, e consequentemente sobre o desenvolvimento da reacção, foi o caudal. Num sistema de fluxo multi-impulsão o caudal é determinado pela frequência de actuação e pelo volume de pulso da micro-bomba. No sistema desenvolvido, o caudal era controlado em termos de tempo de pulso, que é definido como o intervalo de tempo entre cada pulso da micro-bomba (soma do período de activação e desactivação do solenóide). A avaliação da influência do caudal da solução transportadora (solução do reagente de Folin-Ciocalteu e solução de carbonato de sódio) foi efectuada testando tempos de pulso entre 0,3 e 2,0 segundos para cada micro-bomba, o que correspondia a frequências de actuação entre 200 e 30 pulsos min^{-1} , e a caudais entre 1,6 e 0,24 mL min^{-1} por solução. Atendendo que a solução transportadora era utilizada para a propulsão da segunda zona de amostra directamente ao detector, através de L_2 (Figura 3.2), os tempos de pulso utilizados permitiam o estabelecimento de intervalos de paragem de fluxo entre 35 e 232 segundos, para a zona de amostra retida em L_1 . Os resultados obtidos revelaram que o sinal analítico (Δh) aumentava com o tempo de pulso, até 0,4 segundos, diminuindo a partir deste valor. Adicionalmente, a utilização de um tempo de pulso de 0,4 segundos, permitia um período de paragem da zona de amostra em L_1 de aproximadamente 46 segundos, o que estava em concordância com o tempo favorável ao desenvolvimento da reacção, obtido no estudo da avaliação do tempo de reacção. Perante os resultados obtidos a optimização prosseguiu utilizando um tempo de pulso de 0,4 segundos, o que

correspondia a uma frequência de actuação de 150 pulsos min^{-1} e a um caudal de 1,2 mL min^{-1} por solução.

A influência da concentração do reagente de Folin-Ciocalteu sobre o sinal analítico (Δh) foi avaliada para o intervalo de concentrações entre 2,0 e 10,0% (v/v), uma vez que a utilização de concentrações superiores mostrou ser problemática, devido à formação de bolhas (CO_2) na montagem analítica, como consequência da reacção entre os iões carbonato e os ácidos presentes no reagente de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos revelaram, à semelhança dos resultados obtidos nos ensaios preliminares, que o sinal analítico (Δh) aumentava significativamente até uma concentração de 5% (v/v), diminuindo a partir deste valor de concentração, como consequência da diminuição do pH do meio reaccional [33, 34].

Relativamente à concentração da solução de carbonato de sódio, a sua influência sobre o sinal analítico (Δh) foi avaliada para o intervalo de concentrações de 1,0 a 3,0% (m/v), verificando-se um aumento do sinal analítico até uma concentração de 1,5% (m/v). Para concentrações superiores, Δh diminuía, devido tal como referido anteriormente, à falta de estabilidade do reagente de Folin-Ciocalteu num meio demasiado alcalino [33, 34].

Nas condições experimentais optimizadas (Tabela 3.1) foi obtido um intervalo de resposta linear entre a amplitude do sinal analítico para concentrações de bupirone até 60,0 mg L^{-1} . A curva analítica foi representada por $\Delta h = 0,0028(\pm 0,0001) C + 0,018(\pm 0,003)$, onde Δh correspondia à diferença entre os sinais analíticos obtidos com e sem paragem da zona de amostra e C à concentração de bupirone expressa em mg L^{-1} , com um coeficiente de correlação de 0,996.

A Figura 3.7 representa o registo gráfico obtido na elaboração da referida curva de calibração e na determinação de uma das amostras analisadas. O limite de detecção da determinação, calculado como já foi exposto no Capítulo 2, foi de $2,8 \text{ mg L}^{-1}$ e a metodologia permitia efectuar cerca de 55 determinações por hora.

Tabela 3.1 – Valores otimizados dos parâmetros analíticos.

Parâmetros analíticos	Valor seleccionado
Concentração do reagente de Folin-Ciocalteu	5 % (v/v)
Concentração de carbonato de sódio	1,5 % (m/v)
Volume de amostra (número de pulsos)	256 μL (2×16 pulsos)
Volume de transportador (número de pulsos)	1296 μL (162 pulsos)
Reactores	100 cm
Caudal (por solução)	$1,2 \text{ mL min}^{-1}$

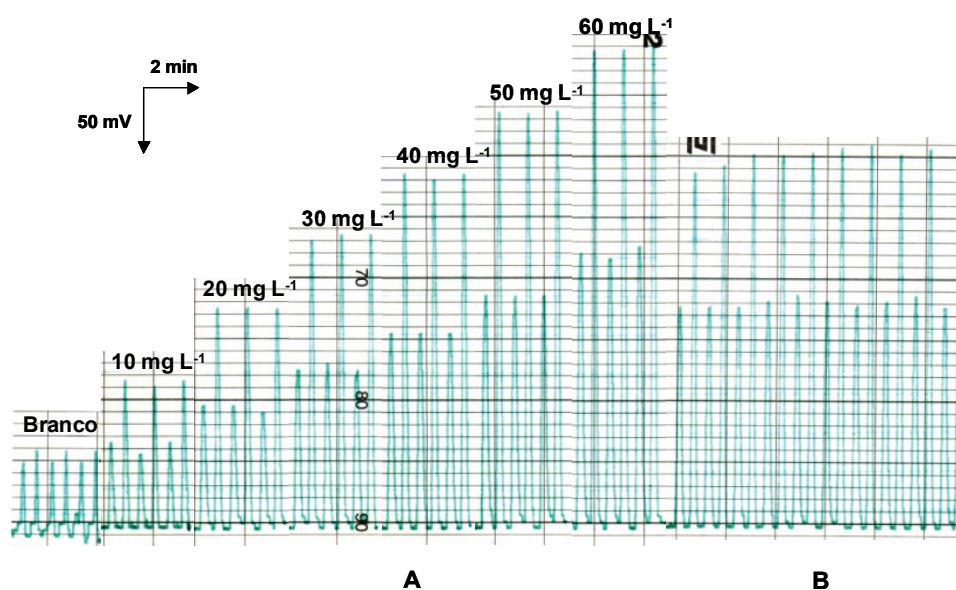


Figura 3.7 - Registo gráfico obtido na elaboração da curva de calibração (A) e na determinação de uma das amostras contendo buspirona (B) .

3.3.3. Avaliação de interferentes

Considerando que a metodologia desenvolvida visa ser aplicada à determinação de buspirona em formulações farmacêuticas, foi efectuado um estudo onde foi avaliada a extensão da interferência de alguns compostos utilizados normalmente como excipientes. Este estudo foi efectuado, analisando soluções contendo cloridrato de buspirona numa concentração fixa de 20,0 mg L⁻¹ e concentrações crescentes de cada um dos excipientes em estudo. Um composto foi considerado como não interferente quando a variação do sinal analítico era $\pm 3\%$ quando comparado com o sinal analítico obtido na ausência do referido composto. Os resultados obtidos demonstraram que nas condições optimizadas os excipientes (lactose, sacarose, galactose e estereato de magnésio) não interferiam até 50 vezes a razão molar em relação à buspirona.

3.3.4. Análise de formulações farmacêuticas

A metodologia analítica desenvolvida foi aplicada à determinação de buspirona em formulações farmacêuticas, disponíveis no mercado português. As soluções das diferentes amostras foram preparadas, a partir das formulações em estudo, como referido na secção 3.2.4 e posteriormente analisadas no sistema de fluxo optimizado.

Os resultados obtidos encontram-se esquematizados na Tabela 3.2 e apresentam desvios relativos da metodologia desenvolvida em relação à metodologia de referência, inferiores a 1,5 %. Estes resultados foram confirmados pela aplicação de um teste *t* de Student emparelhado, para um

nível de confiança de 95 %, o qual confirmou a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos pelos dois métodos ($t_{\text{calculado}} = 0,404$; $t_{\text{tabelado}} = 2,571$).

A análise repetida (n=10) de soluções de amostra de buspirona 40,0 mg L⁻¹ pela metodologia desenvolvida, originou desvios padrão relativos inferiores a 2,0 %, revelando uma boa repetibilidade.

Tabela 3.2 - Resultados da análise de formulações farmacêuticas contendo cloridrato de buspirona pela metodologia desenvolvida e de referência.

Amostra	Concentração declarada (mg/formulação)	Concentração encontrada (mg/formulação)		D.R. ^b (%)
		Metodologia desenvolvida ^a	Metodologia de referência ^a	
Ansiten (comprimidos)	5	4,89 ± 0,05	4,85 ± 0,03	0,8
	10	9,62 ± 0,05	9,76 ± 0,05	- 1,4
Buscalma (comprimidos)	5	4,97 ± 0,06	4,94 ± 0,07	0,6
	10	9,80 ± 0,09	9,84 ± 0,04	- 0,4
Buspar (comprimidos)	5	4,88 ± 0,05	4,86 ± 0,03	0,4
	10	9,92 ± 0,08	9,77 ± 0,06	1,5

^a Média ± desvio padrão.

^b Desvio relativo para a metodologia desenvolvida em relação à metodologia de referência.

3.4. Conclusões

A automatização da determinação espectrofotométrica da bupirone em formulações farmacêuticas utilizando um sistema de fluxo multi-impulsão permitiu comprovar o potencial analítico desta estratégia de gestão de fluidos na implementação de sistemas automáticos de fluxo contínuo. Efectivamente, a utilização das micro-bombas solenóides para a inserção e propulsão das soluções de amostra e reagentes possibilitou a implementação de um sistema de configuração muito simples, assim como um controlo efectivo de todos os parâmetros analíticos do sistema, como o volume de amostra e reagentes, através do número de pulsos e do volume de pulso das respectivas micro-bombas, caudal das soluções, através do volume de pulso e da frequência de pulso, controlando adicionalmente o processo de transporte das duas zonas de amostra ao detector.

O controlo individual e independente de cada micro-bomba possibilitou ainda, através de pequenas alterações no programa informático de controlo, a realização das diferentes estratégias de inserção das soluções, como volume único, amostragem binária e confluência de zonas, sem implicar qualquer alteração na configuração estrutural do sistema.

Adicionalmente, a fácil combinação das micro-bombas com elementos típicos de outras técnicas de fluxo, como a válvula solenóide, resultou em vantagens acrescidas em termos de versatilidade, tendo facilitado a configuração e a implementação do método cinético em tempo fixo, por estabelecimento dos dois percursos alternativos na montagem analítica, sem que o ritmo de amostragem fosse afectado.

A fácil implementação da paragem de fluxo efectuada na montagem multi-impulsão desenvolvida torna-se assim bastante atractiva para aplicação em distintas situações analíticas, sem ser necessário a introdução de reconfigurações na montagem de fluxo, como por exemplo para o aumento da sensibilidade em reacções de cinética lenta, implementação de métodos cinéticos para análise de multi-componentes ou detecções paralelas.

A metodologia desenvolvida constitui ainda uma estratégia para a determinação de buspirona em formulações farmacêuticas, podendo ser uma alternativa útil relativamente aos procedimentos de análise disponíveis, porque exhibe um elevado grau de automação, é uma metodologia simples, rápida, precisa, com um baixo consumo de reagentes (19,4 µg de carbonato de sódio e 64,8 µL de reagente de Folin-Ciocalteu, por determinação) e produção de efluentes (cerca de 2,8 mL por determinação), requerendo simultaneamente pouca intervenção do operador na sua manutenção.

3.5. Referências bibliográficas

- [1] H. P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter, Pharmacology, Churchill Livingstone, Londres, 4ª edição, 1999.
- [2] K. Parfitt, Martindale: The complete drug reference, Pharmaceutical Press, Londres, 32ª edição, 1999.
- [3] F. Péhourcq, Biomed. Chromatogr. 18 (2004) 637.
- [4] S. M. Foroutan, A. Zarghi, A. R. Shafaati, A. Khoddam, IL Farmaco 59 (2004) 739.
- [5] F. Kristjansson, J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl. 566 (1991) 250.
- [6] A. Diaz-Marot, E. Puigdemalliv, C. Salvatella, L. Comellas, M. Gassiot, J. Chromatogr. Biomed. Appl. 490 (1989) 470.
- [7] M. Zaxariou, I. Panderi, J. Pharm. Biomed. Anal. 35 (2004) 41.
- [8] A. Khedr, A. Sakr, J. Chromatogr. Sci. 37 (1999) 462.
- [9] K. Ary, K. Rona, S. Ondi, B. Gachalyi, J. Chromatogr. A, 797 (1998) 221.
- [10] T. H. Tsai, C. F. Chen, J. Chromatogr. A, 762 (1997) 269.
- [11] J. Odontiadis, M. Franklin, J. Pharm. Biomed. Anal. 14 (1996) 347.
- [12] P. Betto, A. Meneguz, G. Ricciarello, S. Pichini, J. Chromatogr. Biomed. Appl. 575 (1992) 117.
- [13] M. Franklin, J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl. 526 (1990) 590.
- [14] W. M. Chew, M. Xu, C. A. Cordova, H. S. Chow, J. Chromatogr. B, 844 (2006) 235.
- [15] M. Zhang, N. Pace, E. H. Kerns, T. Kleintop, N. Kagan, T. Sakuma, J. Mass Spectrom. 40 (2005) 1017.

- [16] W. M. A. Niessen, J. Lin, G. C. Bondoux, J. Chromatogr. A, 970 (2002) 131.
- [17] S. Caccia, S. Garattini, A. Mancinelli, M. Muglia, J. Chromatogr. 252 (1982) 310.
- [18] S. Caccia, M. Muglia, A. Mancinelli, S. Garattini, Xenobiótica 3 (1983) 147.
- [19] K. T. Kivisto, J. Laitila, K. Martensson, P. J. Neuvonen, Ther. Drug Monit. 21 (1999) 317.
- [20] M. A. Sciacca, G. F. Duncan, J. P. Shea, H. C. Faulkner, R. H. Farmen, K. A. Pittman, J. Chromatogr. Biomed. Appl. 428 (1988) 265.
- [21] E. H. Kerns, W. W. Bullen, R. E. Gammans, J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl. 377 (1986) 195.
- [22] R. E. Gammans, E. H. Kerns, W. W. Bullen, J. Chromatogr. Biomed. Appl. 345 (1985) 285.
- [23] M. G. Quaglia, A. Farina, E. Bossu, C. Dell'aquila, J. Pharm. Biomed. Anal. 13 (1995) 505.
- [24] Z. Plotkowiak, J. Cybulski, M. Popielarz-Brzezinska, A. Grzeszkiewicz, I. Centrowska, A. Kalska-kowalska, Chem. Anal. 41 (1996) 983.
- [25] S. Z. Chen, F. Xu, H. Zhang, Z. Q. Zhang, Talanta 40 (1993) 1551.
- [26] J. A. Squella, Y. Borges, L. Bobadilla, L. J. Nunez-Vergara, Electroanalysis 2 (2005) 333.
- [27] S. M. Sabry, M. H. Barary, M. H. Abdel-Hay, T. S. Beld, J. Pharm. Biomed. Anal. 34 (2004) 509.
- [28] R. E. Gammans, R. F. Mayol, A. V. Mackenthun, L. F. Sokya, Biopharm. Drug Dispos. 6 (1985) 139.

- [29] S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, A. A. S. C. Machado, J. L. F. C. Lima, J. M. Paulís, *Quim. Anal* 6 (1987) 278.
- [30] USP 24 / NF 19, The United States Pharmacopeial Convention Inc. (2000) 259.
- [31] G. R. Rao, G. Kanjilal, K. R. Mohan, *Analyst* 103 (1978) 993.
- [32] M. Ikawa, T. D. Schaper, C. A. Dollard, J. J. Sasner, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1811.
- [33] R. L. Pryor, X. Wu, K. Schaich, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 4290.
- [34] M. Peris-Tortajada, M. P. Cerrada, A. Maquieira, *Quim. Anal.* 8 (1989) 211.
- [35] L. G. Gracia, M. D. Luque de Castro, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 447.
- [36] V. L. Dressler, E. L. Machado, A. F. Martins, *Analyst* 120 (1995) 1185.
- [37] N. P. Sadler, H. Jacobs, *Talanta* 42 (1995) 1385.
- [38] C. S. P. Sastry, J. S. V. M. L. Rao, *Talanta* 43 (1996) 1827.
- [39] A. C. B. Dias, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 499 (2003) 107.

CAPÍTULO 4

Sistemas de fluxo multi-impulsão. Avaliação da actividade captadora do anião peroxinitrito com detecção por quimiluminescência

4.1. Introdução

O anião peroxinitrito (ONOO^-) é uma espécie reactiva de azoto (ERA), formada *in vivo* pela reacção dos radicais óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) e anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [1-4]. A reacção entre o $\cdot\text{NO}$ e o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é uma reacção extremamente rápida, sendo biologicamente significativa uma vez que transforma estes dois radicais, numa espécie mais reactiva [5].

Em condições fisiológicas o ONOO^- está em equilíbrio com a sua forma protonada, o ácido peroxinitroso (ONOOH , $\text{pK}_a = 6,8$), composto que tem um tempo de semi-vida de aproximadamente 1 segundo, e que origina por decomposição espécies oxidantes e nitrantes, nomeadamente os radicais hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) e dióxido nítrico ($\cdot\text{NO}_2$) [6]. A pH fisiológico o ONOO^- também reage muito rapidamente com o dióxido de carbono dando origem ao anião nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2^-), que por decomposição leva à formação de mais espécies oxidantes e nitrantes (NO_3^- e os radicais $\cdot\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3^{\cdot-}$) [5-7]. Quer o ONOO^- quer os seus derivados envolvem-se em variadas reacções de oxidação e nitração, causando danos a nível celular de que são exemplo a oxidação de grupos tiol de proteínas [7-9], a oxidação de lípidos [7, 9], a quebra da cadeia de ADN [10-12], a nitração e desaminação de bases de ADN [10-12] e a nitração de resíduos de aminoácidos aromáticos em proteínas [7-9]. O ONOO^- tem por isso sido implicado em diversas patologias das quais se destacam a inflamação, as doenças cardiovasculares, a isquemia-reperfusão, o choque séptico, o cancro, a asma, a diabetes e desordens neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e Parkinson [1, 5, 8, 13, 14].

A importância fisiológica e patológica do ONOO^- tem estimulado o desenvolvimento de diversas metodologias, que permitam a sua síntese, e também a sua detecção e determinação. No que diz respeito à síntese do ONOO^- , o procedimento descrito na literatura considerado como o mais adequado devido ao elevado rendimento e à quantidade mínima de contaminantes, é baseado na reacção do ácido nitroso com o peróxido de hidrogénio (adição de nitrito de sódio a uma solução de peróxido de hidrogénio acidulado), com posterior adição de NaOH para conversão do ONOOH em ONOO^- [15, 16]. Outros procedimentos convencionais são também referidos como a autooxidação da hidroxilamina em soluções alcalinas [17], a reacção do ozono com iões azida [18], a reacção do óxido nítrico com o radical superóxido [19] e a fotólise e radiólise de soluções de nitrato [20]. De uma forma geral, os procedimentos referidos são morosos e utilizam soluções alcalinas para aumentar a estabilidade do ONOO^- .

No que diz respeito à detecção e determinação do ONOO^- , na literatura são também referidos diversos procedimentos baseadas em reacções de oxidação de compostos pelo ONOO^- , com detecção por fluorescência [21-26] e quimiluminescência [27-32]. São também referidos procedimentos baseados numa avaliação indirecta, por determinação de compostos formados *in vivo* pela acção do ONOO^- [33]. Nos procedimentos referidos é destacada a detecção de resíduos de 3-nitrotirosina de proteínas, através do uso de métodos imunológicos e cromatográficos [33-35].

O luminol (5-amino-2,3-di-hidroftalazina-1,4-diona) é um composto com propriedades quimiluminescentes muito utilizado para a detecção de espécies reactivas de oxigénio (ERO), assim como para a detecção de ONOO^- [27, 28].

De uma forma geral, a emissão de luz pelo luminol depende da sua oxidação e da formação de uma espécie electronicamente excitada que culmina no aparecimento do anião 3-aminofthalato como produto final (Figura 4.1) [27, 28].

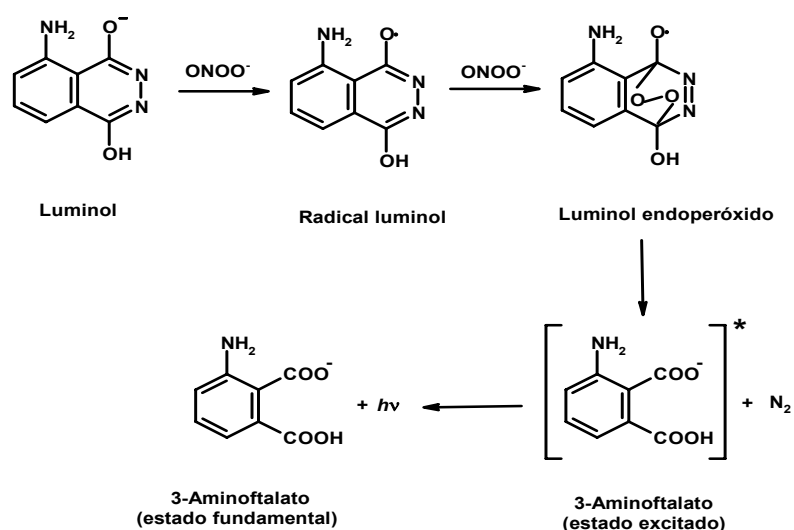
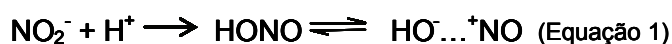


Figura 4.1 - Reacção de oxidação do luminol pelo ONOO^- . Adaptado de [28].

A monitorização da luminescência resultante da reacção do luminol com o ONOO^- tem sido igualmente utilizada para avaliar a potencial capacidade de alguns compostos captarem o ONOO^- *in vivo*. Estes compostos ao captarem o ONOO^- , vão competir com o luminol na sua reacção com este, originando assim uma diminuição da luminescência. A maior parte dos estudos referidos na literatura para a avaliação da actividade captadora do ONOO^- são baseados na utilização de métodos discretos manuais, envolvendo o uso de luminómetros de desenho convencional ou “leitor de microplacas”, sendo a preparação das soluções processada manualmente [36-44]. As medições são morosas, laboriosas e dispendiosas, sendo também susceptíveis a erros operacionais, como uma mistura inadequada entre amostra e reagentes, o que

poderia ser evitado recorrendo a metodologias automáticas de análise em fluxo, nomeadamente à multi-impulsão, devido à mistura rápida e reprodutível entre amostra e reagentes. A referência a metodologias automáticas de análise em fluxo para a avaliação captadora de ONOO^- é contudo reduzida, encontrando-se apenas descritos dois procedimentos desenvolvidos em FIA [45, 46]. Nos procedimentos referidos o efeito captador de ONOO^- foi avaliado para as enzimas catalase e superóxido dismutase [45] e para os compostos ácido ascórbico, ácido úrico, manitol [45], melatonina, serotonina e triptofano [46]. O ONOO^- era sintetizado através de métodos discretos manuais, e posteriormente introduzido no sistema automático de análises em fluxo [45, 46].

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema automático de fluxo contínuo, baseado no conceito de multi-impulsão, para a avaliação *in vitro*, em sistemas não celulares, do efeito captador de ONOO^- dos seguintes compostos: ácido di-hidrolipóico, ácido lipóico, cisteína, glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), sulindac e sulindac sulfona. A avaliação da capacidade de captação de ONOO^- pelos compostos referidos foi realizada através da monitorização da oxidação do luminol pelo ONOO^- , com detecção por quimiluminescência. O ONOO^- foi gerado em linha, no sistema multi-impulsão, através da adição de uma solução de nitrito de sódio a uma solução de peróxido de hidrogénio acidulado (Equações 1 e 2), com posterior adição de NaOH (Equação 3) [15].



No que diz respeito aos compostos avaliados, o ácido di-hidrolipóico, a cisteína e a GSH são compostos estruturalmente relacionados por serem constituídos por um ou mais grupos tióis (Figura 4.2). O ácido lipóico e a GSSG resultam da oxidação do ácido di-hidrolipóico e da GSH, respectivamente (Figura 4.2). Os compostos referidos desempenham um papel importante ao nível das células participando em muitas reacções bioquímicas de oxidação-redução nas quais eles são interconvertidos [47].

Relativamente ao sulindac, este é um fármaco incluído na classe terapêutica dos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) [48]. É utilizado como analgésico e anti-inflamatório no tratamento sintomático da artrite reumatóide crónica e aguda, osteoartrite e espondilite anquilosante. Adicionalmente, desempenha um papel importante na prevenção da carcinogénese do cólon [48, 49]. O sulindac é ingerido como um pró-fármaco e por reacções de biotransformação hepática origina um metabolito reduzido, o sulindac sulfeto e um metabolito oxidado, o sulindac sulfona (Figura 4.2) [48, 49]. Apesar da inibição da síntese de prostaglandinas constituir o principal mecanismo de acção pelo qual o sulindac actua, tem sido sugerido que os efeitos anti-inflamatórios deste fármaco serão também parcialmente devido à sua capacidade de capturar espécies reactivas de oxigénio (ERO) e de azoto (ERA) como o ONOO^- , produzidas durante a resposta inflamatória [50].

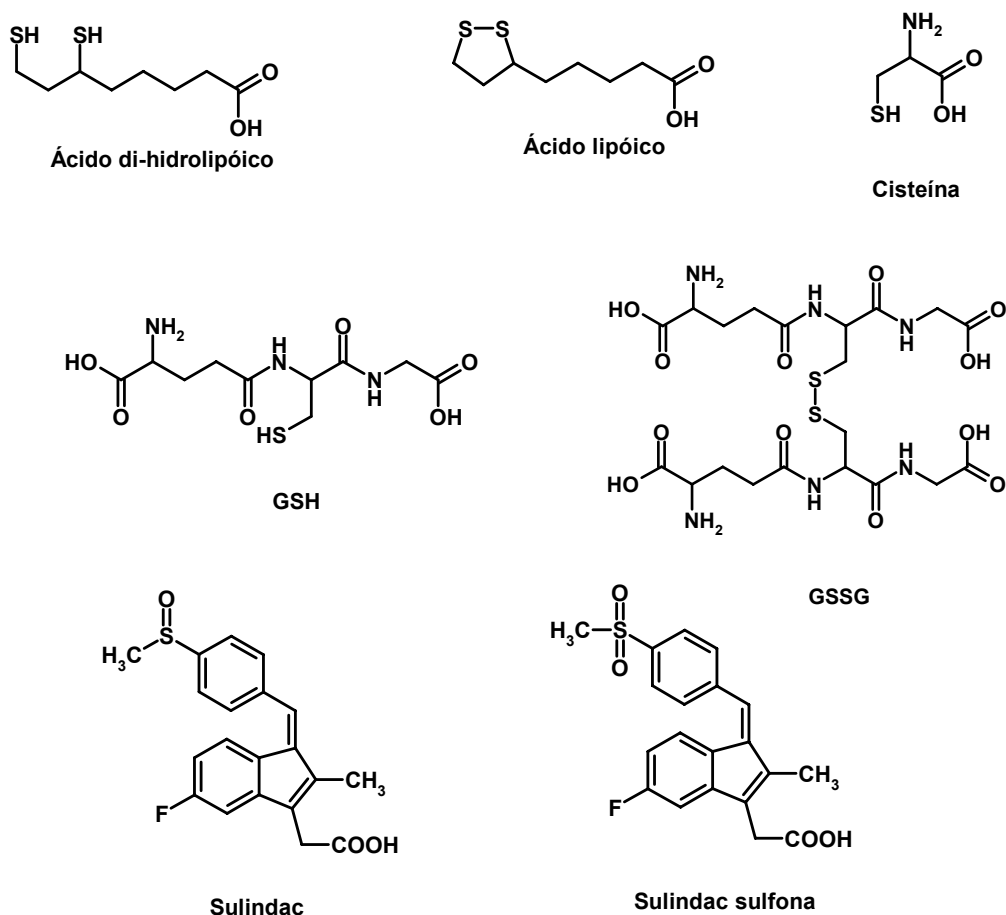


Figura 4.2 - Estrutura química dos compostos ácido di-hidrolipóico, ácido lipóico, cisteína, glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), sulindac e sulindac sulfona.

4.2. Parte experimental

4.2.1. Reagentes e soluções

A solução de nitrito de sódio era preparada por pesagem e dissolução da quantidade adequada de sólido, de modo a obter uma concentração de 0,01 mol L⁻¹.

A solução de peróxido de hidrogénio 0,03 mol L⁻¹ era preparada diariamente por diluição rigorosa de uma solução de peróxido de hidrogénio

com uma concentração $9,7 \text{ mol L}^{-1}$, numa solução de ácido clorídrico com uma concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução de luminol (5-amino-2,3-di-hidroftalazina-1,4-diona, Fluka) era preparada por diluição de uma solução de concentração $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, numa solução de hidróxido de sódio com uma concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As soluções de luminol eram mantidas ao abrigo da luz de modo a garantir a sua conservação ao longo do tempo.

Soluções concentradas $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de L-cisteína (Sigma), ácido lipóico (Sigma), glutathione reduzida (GSH, Fluka), glutathione oxidada (GSSG, Fluka) e soluções concentradas $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de sulindac (Sigma) e sulindac sulfona (Sigma) eram preparadas por pesagem e dissolução da quantidade adequada de sólido, numa solução tampão fosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4). As soluções padrão dos compostos referidos eram preparadas por diluição rigorosa das soluções concentradas, no mesmo tampão.

As soluções padrão de ácido di-hidrolipóico eram preparadas por diluição rigorosa de uma solução comercial 25 mg mL^{-1} (Sigma), em solução tampão fosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4).

A solução tampão fosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) era preparada dissolvendo 4,75 g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ em 250 mL de água, ajustando o pH com uma solução concentrada de HCl [21].

4.2.2. Equipamento

A montagem de fluxo envolveu a utilização de um detector de quimiluminescência da marca Camspec, modelo CL2, o qual, como referido no

Capítulo 2 desta dissertação, apresentava uma configuração adequada para funcionar como detector de um sistema de fluxo. A célula de fluxo possuía duas portas de entrada e uma de saída. As duas portas de entrada podiam ser utilizadas para a inserção das soluções de amostra e reagente, o que possibilitava a mistura das soluções mesmo à entrada da célula de fluxo e consequentemente, a detecção do máximo de radiação emitida no caso de reacções de cinética rápida, ou poderia apenas ser utilizada uma das portas de entrada, fechando a outra, e efectuando-se a mistura antes da célula de fluxo, o que permitia controlar o tempo de reacção e a extensão da mistura, no caso de uma reacção de quimiluminescência mais lenta.

Foram também utilizadas 5 micro-bombas solenóides com um volume de pulso fixo de 8 μ L, as quais foram já caracterizadas em detalhe no Capítulo 2. Os tubos de transporte das soluções eram de PTFE, da marca Omnifit, com um diâmetro interno de 0,8 mm. Foram também utilizadas 2 confluências fabricadas em perspex, e ligadores e terminais de fabrico próprio [51].

Os restantes componentes da montagem de fluxo, nomeadamente os componentes responsáveis pelo controlo das micro-bombas, foram já referidos pormenorizadamente no Capítulo 2.

4.2.3. Montagem de fluxo

No sistema de fluxo desenvolvido (Figura 4.3) as micro-bombas solenóides foram utilizadas para a inserção e propulsão das soluções de amostra e reagentes. Nenhum dispositivo específico de injeção de amostras foi utilizado, uma vez que P_2 possibilitava a inserção da amostra e a sua

propulsão. Com esta configuração o número de componentes activos da montagem de fluxo foi reduzido, o que facilitava a sua operação e controlo.

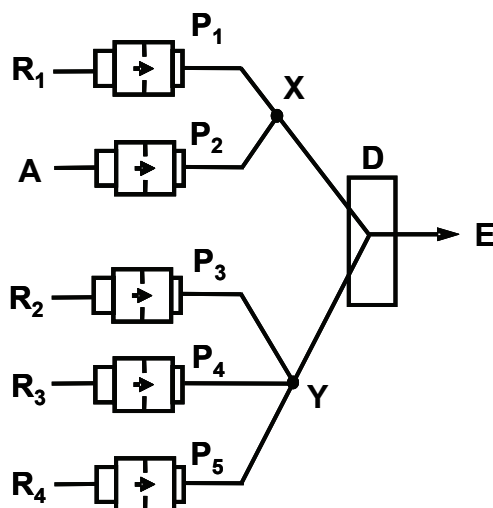


Figura 4.3 - Esquema da montagem de fluxo multi-impulsão usada para a avaliação da actividade captadora do ONOO^- . R_1 – solução de luminol; A – Amostra; R_2 – solução de NaNO_2 ; R_3 – solução de H_2O_2 acidulado; R_4 – solução de NaOH ; P_1 a P_5 – microbombas solenóides; X e Y – pontos de confluência (localizados à distância mínima fisicamente possível das micro-bombas e do detector); D – detector; E – esgoto.

P_1 era utilizada para a inserção da solução de luminol, P_3 para a inserção da solução de NaNO_2 , P_4 para a inserção da solução de H_2O_2 acidulado e P_5 para a inserção de uma solução de NaOH . A frequência de pulso das micro-bombas em combinação com o volume de pulso determinava o caudal, permitindo também estabelecer uma rotina baseada na contagem de pulsos, que definia o volume de cada solução inserida no percurso analítico.

Antes do início das determinações todas as micro-bombas eram accionadas para preenchimento do seu interior e das linhas de transmissão.

O ciclo analítico (Figura 4.4) tinha início com o estabelecimento da linha de base, através da introdução da solução de NaOH, por actuação de P₅.

Posteriormente, por actuação simultânea de P₃ e P₄ as soluções de NaNO₂ e de H₂O₂ acidulado eram inseridas na montagem analítica e misturadas por acção do fluxo pulsado no ponto de confluência Y. Como resultado era gerado o ONOO⁻. A actuação destas micro-bombas (P₃ e P₄) era alternada com a actuação simultânea de P₁ e P₂, o que permitia a introdução e mistura, por acção do fluxo pulsado, das soluções de luminol e amostra no ponto de confluência X. Por actuação alternada e repetida das micro-bombas (P₃+P₄ e P₁+P₂) o ONOO⁻ gerado era misturado no interior da célula de fluxo com a zona de reacção luminol/amostra. A natureza pulsada do fluxo, produzida pela actuação das micro-bombas, permitia atingir uma rápida homogeneização da zona de reacção no interior da célula de fluxo, originando a emissão de luz.

Com o início de um novo ciclo analítico era introduzida a solução de NaOH, o que permitia a limpeza da célula de fluxo e simultaneamente o estabelecimento da linha de base para a detecção subsequente.

As determinações eram iniciadas pela medição do sinal de branco (correspondente ao sinal maior de luminescência), a partir do qual se avaliava a capacidade captadora do ONOO⁻ para cada composto, por diminuição da intensidade do sinal inicial.

O efeito captador dos compostos avaliados era expresso sob a forma de percentagem de inibição (I %) da resposta quimiluminescente resultante da

oxidação do luminol pelo ONOO^- , a qual era calculada a partir de

$$I \% = \frac{(CL_{\text{branco}} - CL_{\text{amostra}})}{CL_{\text{branco}}} \times 100, \text{ onde } CL_{\text{branco}} \text{ e } CL_{\text{amostra}} \text{ correspondiam à}$$

intensidade de luminescência obtida na ausência e presença do composto em estudo, respectivamente.

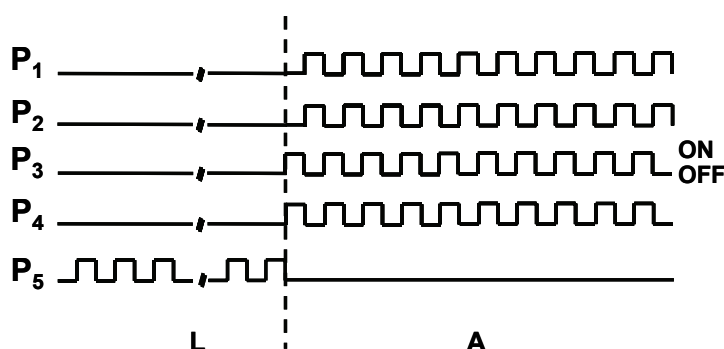


Figura 4.4 – Representação esquemática da posição das micro-bombas durante o ciclo analítico. P₁ a P₅ – micro-bombas solenóides; ON – micro-bomba activada; OFF – micro-bomba desactivada; L – definição da linha de base (60 pulsos); A – fase de inserção da amostra (10 pulsos).

4.3. Resultados e discussão

A montagem de fluxo desenvolvida para a avaliação da actividade captadora do ONOO^- pelos compostos ácido di-hidrolipóico, ácido lipóico, cisteína, GSH, GSSG, sulindac e sulindac sulfona, foi projectada tendo em consideração trabalhos realizados por outros autores, os quais envolviam a utilização de métodos discretos manuais para a síntese do ONOO^- , por reacção entre o ácido nitroso e o peróxido de hidrogénio (adição de NaNO_2 a uma

solução de H_2O_2 acidulado, com posterior adição de NaOH) [15, 16], e a sua subsequente monitorização por oxidação do luminol [27].

Os procedimentos experimentais tiveram início com a optimização dos diferentes parâmetros da montagem de fluxo. A optimização teve como principal objectivo o estabelecimento de condições que favoreciam a obtenção de um sinal inicial (sinal de branco) com uma intensidade elevada, para que fosse possível a monitorização da sua diminuição, na presença dos compostos em estudo.

4.3.1. Optimização dos parâmetros físicos

Considerando que imediatamente após a mistura do luminol com o ONOO^- ocorre o máximo de intensidade de emissão de luz, observando-se o decaimento da mesma ao fim de alguns segundos [27], a montagem de fluxo desenvolvida (Figura 4.3) foi concebida de modo a que a solução de luminol e o ONOO^- gerado, fossem colocados em contacto apenas no interior da célula de fluxo. Deste modo, a geração do ONOO^- era efectuada através da inserção e mistura prévia em confluência (ponto de confluência Y, Figura 4.3) das soluções de NaNO_2 e de H_2O_2 acidulado. Nesta confluência foi também introduzida uma solução alcalina (solução de NaOH) a qual permitia a conversão do ONOOH gerado em ONOO^- [15, 16].

A inserção da solução de NaOH na montagem analítica foi estudada quer através da inserção simultânea das soluções de NaOH, NaNO_2 e H_2O_2 acidulado, quer através da mistura prévia das soluções de NaNO_2 e H_2O_2 acidulado e subsequente transporte com a solução de NaOH. Os resultados

obtidos revelaram que o sinal analítico era semelhante em ambas as circunstâncias, podendo a solução de NaOH ser utilizada apenas como solução transportadora.

Em relação à inserção da solução de amostra, esta poderia ser efectuada em simultâneo com a solução de luminol ou em simultâneo com o ONOO^- gerado. Verificou-se que a intensidade do sinal analítico era ligeiramente superior, assim como a repetibilidade (r.s.d. < 10%), introduzindo a solução de amostra em simultâneo com a solução de luminol (ponto de confluência X, Figura 4.3).

A montagem de fluxo permitia então a mistura em confluência das soluções de amostra e luminol, através da actuação simultânea das micro-bombas P_2 e P_1 (Figura 4.3 e 4.4) e a mistura em confluência das soluções de NaNO_2 e de H_2O_2 acidulado, através da actuação das micro-bombas P_3 e P_4 . O número de pulsos das soluções de amostra e luminol e das soluções de NaNO_2 e de H_2O_2 acidulado era igual e, deste modo, os volumes inseridos, determinados pelo número de pulsos e pelo volume de pulso da micro-bomba (8 μL), eram equivalentes.

A influência do volume de amostra sobre a intensidade do sinal analítico foi posteriormente avaliada, através do estudo do número de pulsos de solução de amostra inseridos. Este estudo foi efectuado introduzindo na montagem de fluxo um número crescente de pulsos de solução tampão fosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ 0,05 mol L^{-1} , pH 7,4), os quais foram introduzidos quer por confluência de zonas com as soluções de NaNO_2 e de H_2O_2 acidulado (as micro-bombas P_1 , P_2 , P_3 e P_4 eram accionadas todas ao mesmo tempo), quer por amostragem binária com as soluções de NaNO_2 e de H_2O_2 acidulado (as micro-

bombas P_1 e P_2 eram accionadas alternadamente com as micro-bombas P_3 e P_4). Para a realização deste estudo foi utilizada uma solução de luminol com uma concentração de $3,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e soluções de NaNO_2 e de H_2O_2 com concentrações de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl , respectivamente. O tempo de pulso das micro-bombas foi fixado em 0,3 segundos. Os resultados obtidos (Figura 4.5) revelaram que a intensidade do sinal analítico aumentava com o aumento do número de pulsos de amostra. Entre 5 e 11 pulsos de amostra (o que correspondia a um volume de amostra entre 40 e 88 μL), a intensidade do sinal analítico era semelhante para os dois tipos de estratégia de inserção de amostra avaliados, observando-se a partir de 11 pulsos uma intensidade de sinal ligeiramente superior para a estratégia de amostragem binária. A partir de 13 pulsos de amostra (o que correspondia a um volume de amostra superior a 104 μL), com amostragem binária a intensidade do sinal analítico mantinha-se constante (saturação do detector), enquanto que com confluência de zonas a saturação do detector era observada apenas a partir dos 15 pulsos (120 μL).

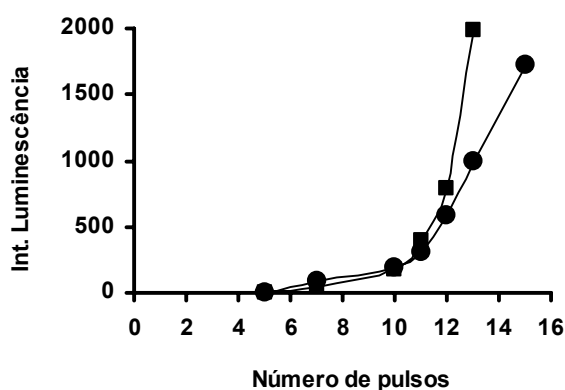


Figura 4.5 - Influência do número de pulsos de amostra na intensidade do sinal analítico: estratégia de amostragem binária (■) e confluência de zonas (●).

Outro parâmetro avaliado, considerando a sua importância no desenvolvimento de sistemas de análises em fluxo com detecção por quimiluminescência, foi o caudal. O caudal é um parâmetro cuja optimização é importante, uma vez que estabelece não só o tempo de reacção, mas principalmente o tempo de residência da zona de reacção no interior da célula de fluxo, condicionando deste modo a intensidade de radiação sujeita a medida. O uso de caudais muito elevados resulta num tempo de residência muito baixo, o que afecta a sensibilidade e reprodutibilidade das determinações, enquanto que com um caudal muito baixo a eficácia da mistura do fluxo pulsado é menor e o sinal analítico é afectado.

No sistema de fluxo desenvolvido, o caudal era definido pela frequência de actuação e pelo volume de pulso da micro-bomba. A frequência de actuação era definida em termos de tempo de pulso, o qual correspondia ao intervalo de tempo entre cada pulso da micro-bomba (soma do período de activação e desactivação do solenóide). A influência do caudal durante a fase de inserção da amostra foi então estudada através da configuração de diferentes valores para o tempo de pulso das micro-bombas. Através da inserção de 12 pulsos de solução de amostra e utilizando as duas estratégias de inserção de amostra referidas anteriormente (amostragem binária e confluência de zonas) foram avaliados tempos de pulso entre 0,2 e 0,6 segundos, o que correspondia a frequências de actuação entre 300 e 100 pulsos min^{-1} e a caudais entre 2,4 e 0,8 mL min^{-1} , para cada solução. Verificou-se que a intensidade do sinal analítico apresentava um comportamento semelhante para as duas estratégias de inserção de amostra avaliadas, embora a intensidade fosse ligeiramente superior para a estratégia de amostragem binária. Efectivamente seria de

esperar que com a utilização do fluxo pulsado a aplicação da estratégia de amostragem binária ou confluência de zonas resultasse em sinais analíticos semelhantes. Os resultados obtidos podem contudo ser explicados pelo facto de que com a estratégia de confluência de zonas o caudal total era mais elevado, uma vez que as micro-bombas funcionavam em simultâneo, o que resultava num menor tempo de residência na célula de fluxo e numa diminuição no máximo de radiação detectada.

A intensidade do sinal analítico aumentava então para as duas estratégias até um tempo de pulso de 0,3 segundos, diminuindo a partir deste valor. Perante os resultados obtidos, e visando a obtenção de uma intensidade máxima de luminescência, a optimização prosseguiu utilizando uma inserção alternada (amostragem binária) de 12 pulsos de solução de amostra e luminol, com as soluções de NaNO_2 e H_2O_2 acidulado. Adicionalmente foi seleccionado um tempo de pulso de 0,3 segundos, o que correspondia a uma frequência de actuação de $200 \text{ pulsos min}^{-1}$ e a um caudal por solução de $1,6 \text{ mL min}^{-1}$.

Relativamente ao caudal de inserção da solução transportadora de NaOH, variando o tempo de pulso entre 0,2 e 0,6 segundos, o que correspondia a caudais entre $2,4$ e $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, não se observaram variações na intensidade do sinal analítico. Deste modo, a optimização prosseguiu utilizando um tempo de pulso de 0,2 segundos, o que correspondia a um caudal de $2,4 \text{ mL min}^{-1}$, uma vez que este caudal permitia a obtenção de um ritmo de amostragem superior (aproximadamente 190 determinações por hora).

No que diz respeito ao volume de solução transportadora de NaOH utilizado para a limpeza da célula de fluxo e simultaneamente para o estabelecimento da linha de base (fase L, Figura 4.4), variando o número de

pulsos de solução de NaOH entre 50 e 70 pulsos, verificou-se que 60 pulsos de solução, o que correspondia a um volume de 480 μL , eram suficientes para a limpeza da célula de fluxo e retorno do sinal analítico à linha de base.

No que diz respeito ao comprimento dos tubos de transporte entre o ponto de confluência X e o detector e o ponto de confluência Y e o detector (Figura 4.3), o seu aumento levava a uma diminuição da intensidade do sinal analítico e como tal a distância entre estes pontos de confluência e o detector foi mantida a mínima fisicamente possível.

4.3.2. Optimização dos parâmetros químicos

A influência da concentração do reagente luminol sobre a intensidade do sinal analítico foi avaliada para concentrações entre $1,6$ e $7,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. Este estudo foi efectuado utilizando uma solução de NaNO_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e uma solução de H_2O_2 $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl. Os resultados obtidos (Figura 4.6) revelaram que a intensidade do sinal analítico aumentava linearmente com a concentração de luminol até uma concentração de $7,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se constante a partir deste valor de concentração (saturação do detector). Tendo em conta os resultados obtidos e visando simultaneamente a obtenção de uma intensidade máxima do sinal analítico, passou a ser utilizada nos estudos seguintes uma concentração de luminol de $6,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

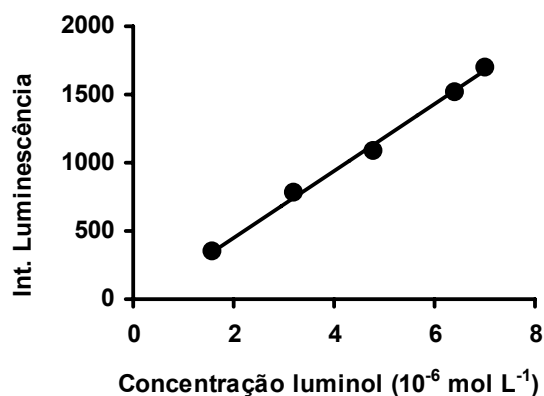


Figura 4.6 - Influência da concentração do reagente luminol na intensidade do sinal analítico.

Relativamente à concentração da solução de NaOH utilizada na preparação do reagente luminol, a sua influência foi avaliada para concentrações entre $0,05$ e $0,3 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos revelaram uma diminuição na intensidade do sinal analítico à medida que a concentração de NaOH aumentava. Atendendo a que uma concentração de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ quase saturava o detector, a solução do reagente luminol passou a ser preparada em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH.

Outro parâmetro químico importante no desenvolvimento da reacção, considerando o seu efeito sobre a geração do ONOO^- , foi a concentração da solução de NaNO_2 . A influência da concentração da solução de NaNO_2 foi avaliada para concentrações entre $0,005$ e $0,02 \text{ mol L}^{-1}$. Verificou-se que a intensidade do sinal analítico aumentava com o aumento da concentração de NaNO_2 até uma concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se praticamente constante a partir deste valor de concentração. Perante os resultados obtidos e

visando a obtenção de uma intensidade máxima do sinal analítico, a restante optimização prosseguiu utilizando uma solução de NaNO_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

A influência da concentração da solução de H_2O_2 implicada na geração do ONOO^- foi avaliada posteriormente para concentrações entre $0,015$ e $0,06 \text{ mol L}^{-1}$, preparando a solução de H_2O_2 em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl . Os resultados obtidos (Figura 4.7) revelaram uma diminuição linear da intensidade do sinal analítico à medida que se aumentava a concentração de H_2O_2 , como resultado da decomposição de H_2O_2 em soluções alcalinas (solução transportadora de NaOH), inibindo assim a formação de ONOO^- [52]. Para uma concentração de H_2O_2 $0,015 \text{ mol L}^{-1}$ era observada quase uma saturação do detector. Perante os resultados obtidos, a optimização prosseguiu utilizando uma solução de H_2O_2 com uma concentração $0,03 \text{ mol L}^{-1}$.

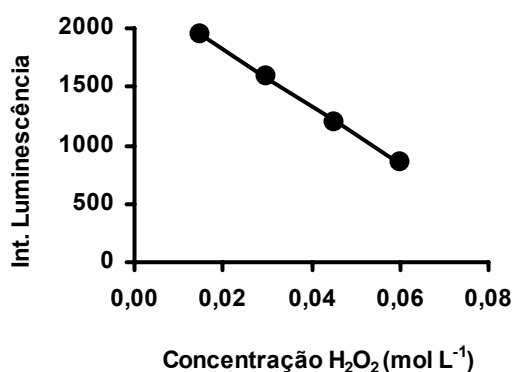


Figura 4.7 - Influência da concentração de H_2O_2 na intensidade do sinal analítico.

No que diz respeito à concentração de HCl utilizado na preparação da solução de H_2O_2 o seu estudo foi efectuado para concentrações entre $0,05$ e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando uma concentração de H_2O_2 $0,03 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos revelaram que a intensidade do sinal analítico aumentava

significativamente com o aumento da concentração de HCl até uma concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a partir da qual se mantinha praticamente constante. Perante os resultados obtidos e visando a obtenção da intensidade máxima do sinal analítico, a solução de H_2O_2 passou a ser preparada em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl. Nestas condições ($0,03 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl e $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaNO}_2$), a quantidade de ONOO^- gerada no ponto de confluência Y, avaliada por recolha da solução neste ponto de confluência e medição da absorvância a 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ mol L}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [15] era de $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$, sendo, seguindo o mesmo procedimento, de $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ no final do sistema de fluxo.

Relativamente à concentração da solução de NaOH utilizada como solução transportadora, as melhores condições, nomeadamente a intensidade do sinal analítico, foram obtidas utilizando uma solução com uma concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para concentrações superiores era observada uma diminuição na intensidade do sinal analítico, o que pode ser explicado, pela decomposição de H_2O_2 em soluções alcalinas, inibindo a formação de ONOO^- [52].

Como solução de branco foi utilizada uma solução tampão fosfato $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,4 de modo a simular um pH semelhante ao fisiológico.

4.3.3. Avaliação da capacidade de captação do anião peroxinitrito

Após a optimização, o sistema de fluxo desenvolvido foi aplicado na avaliação da capacidade de captação do ONOO^- por diferentes compostos: ácido lipóico, ácido di-hidrolipóico, cisteína, GSH, GSSG, sulindac e sulindac sulfona.

Considerando que em condições fisiológicas, e como referido na introdução, o ONOO^- reage muito rapidamente com o CO_2 , afectando assim a reactividade desta espécie [5, 6], e tendo em conta a elevada concentração de H_2CO_3 em equilíbrio com o HCO_3^- nos espaços extra e intracelulares (1,3 mmol L^{-1} de H_2CO_3 nos fluidos extra e intracelulares e 12 e 25 mmol L^{-1} de HCO_3^- nos fluidos intracelulares e no plasma, respectivamente [1]), a avaliação do efeito captador do ONOO^- pelos compostos referidos foi também efectuada na presença de NaHCO_3 25 mmol L^{-1} . De salientar que, sendo as montagens de fluxo sistemas fechados estas possibilitam um controlo efectivo das variáveis do sistema, ao mesmo tempo que limitam a ocorrência de variações pontuais, permitindo uma reprodução das condições da análise. Este aspecto é particularmente importante no sistema desenvolvido considerando a reacção do ONOO^- com o CO_2 .

Analizou-se assim o comportamento de cada um dos compostos como uma substância padrão, na ausência e presença de NaHCO_3 . Para a avaliação do efeito captador do ONOO^- na presença de NaHCO_3 , a solução tampão referida em 4.2.1 era adicionada de NaHCO_3 25 mmol L^{-1} . Considerando que o sinal inicial (sinal de branco) na presença de NaHCO_3 25 mmol L^{-1} , para as condições de optimização referidas, saturava o detector, os parâmetros operacionais da metodologia desenvolvida foram reajustados, sem modificação da montagem analítica, para que fosse possível a comparação entre o efeito captador do ONOO^- na presença e ausência de NaHCO_3 . Considerando então este efeito reduziu-se o volume de amostra para 10 pulsos (o que correspondia a um volume de 80 μL), mantendo os restantes parâmetros operacionais (Tabela 4.1).

Para a avaliação do efeito captador do ONOO^- na presença e ausência de NaHCO_3 25 mmol L^{-1} foram realizados quatro ensaios. Em cada ensaio, efectuado em triplicado, era calculado o parâmetro IC_{50} (concentração de composto que resultava em 50 % de inibição) a partir da representação gráfica de I % (percentagem de inibição da resposta quimiluminescente) versus log C (concentração de composto).

A Figura 4.8 representa o registo gráfico obtido na elaboração de um dos ensaios, para um dos compostos avaliados.

Tabela 4.1 – Valores optimizados dos parâmetros analíticos.

Parâmetros analíticos	Valor seleccionado
Concentração de luminol	$6,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$)
Concentração de NaNO_2	$0,01 \text{ mol L}^{-1}$
Concentração de H_2O_2	$0,03 \text{ mol L}^{-1}$ (em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$)
Volume de amostra (número de pulsos)	$80 \mu\text{L}$ (10 pulsos)
Volume de luminol, NaNO_2 , H_2O_2 (número de pulsos)	$80 \mu\text{L}$ (10 pulsos)
Volume de transportador (número de pulsos)	$480 \mu\text{L}$ (60 pulsos)
Caudal da fase de inserção da amostra	$1,6 \text{ mL min}^{-1}$ (por solução)
Caudal da fase de retorno à linha de base	$1,2 \text{ mL min}^{-1}$

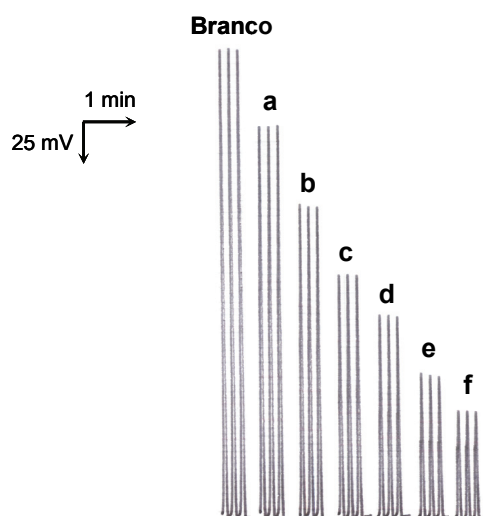


Figura 4.8 - Registo gráfico obtido na elaboração de um dos ensaios, para o ácido lipóico oxidado na presença de NaHCO_3 25 mmol L^{-1} : a – 0,025; b - 0,075; c - 0,25; d - 0,5; e - 1,0 e f - 2,0 mmol L^{-1} .

Dos compostos avaliados, o ácido lipóico, o ácido di-hidrolipóico, a cisteína, a GSH, o sulindac e o metabolito sulindac sulfona apresentaram efeito captador de ONOO^- nas concentrações estudadas, na ausência e presença de NaHCO_3 25 mmol L^{-1} (Figura 4.9 a 4.12 e Tabela 4.2). A GSSG não apresentou efeito captador até à concentração de 10 mmol L^{-1} .

A cisteína e a GSH foram os compostos que apresentaram maior actividade, quer na ausência quer na presença de NaHCO_3 (Tabela 4.2). O sulindac e o seu metabolito sulfona apesar de apresentaram um efeito captador elevado foram os compostos que apresentaram menor actividade. O sulindac sulfona apresentou no entanto maior efeito captador quando comparado com o sulindac. Como referido na introdução, o ONOO^- é produzido durante a inflamação podendo contribuir para os efeitos deletérios da mesma. O efeito captador de ONOO^- observado para o sulindac e para o seu metabolito

reveste-se assim de extrema importância, uma vez que este efeito pode representar um mecanismo adicional para a actividade anti-inflamatória deste fármaco. O efeito captador de ONOO^- do sulindac e do seu metabolito sulfona já tinha sido observado por Fernandes *et al* [50] mas apenas na ausência de NaHCO_3 . Nesses ensaios foi também observado que o metabolismo do sulindac aumentava a sua actividade [50].

Na sua maioria os compostos avaliados apresentaram (Tabela 4.2) um maior efeito captador de ONOO^- na ausência de NaHCO_3 do que na sua presença. Apenas o ácido di-hidrolipóico e o ácido lipóico apresentaram um valor de IC_{50} maior na ausência de NaHCO_3 . De facto, o CO_2 ao competir pelo ONOO^- diminui a capacidade de determinados compostos para captar esta espécie reactiva [53]. Este efeito foi descrito para compostos como o ácido úrico [54], trolox [54], ácido cafeico [53], ácido gálico [53], através da realização de ensaios discretos, assim como para a GSH [6, 54-56] e a cisteína [56]. Os efeitos observados estão assim em concordância com o descrito na literatura.

Um aspecto curioso nos resultados obtidos, também observado por Trujillo *et al* [57] é a ausência do efeito captador da GSSG e a presença deste no ácido lipóico. Os dois compostos em causa estão estruturalmente relacionados, uma vez que são ambos dissulfetos (forma oxidada do tiol) (Figura 4.2), contudo a posição dos dois átomos de enxofre no anel 1,2-ditiolano do ácido lipóico, parece resultar numa elevada densidade electrónica no anel, conferindo actividade a este composto [57-59].

Nenhuma evidência foi encontrada na literatura para o efeito captador do ácido lipóico e ácido di-hidrolipóico na presença de NaHCO_3 25 mmol L^{-1} .

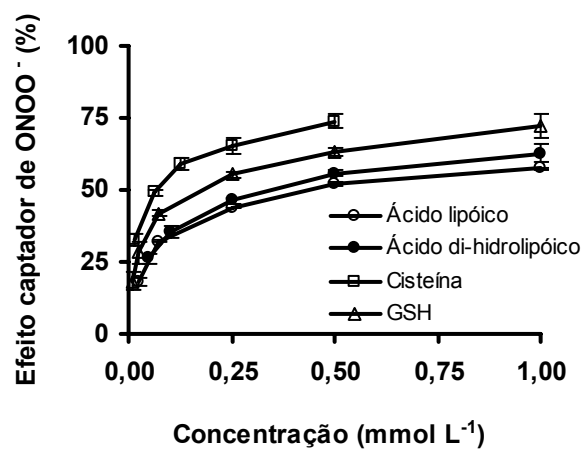


Figura 4.9 - Efeito captador de ONOO^- (%) do ácido lipóico, ácido di-hidrolipóico, cisteína e GSH, na ausência de NaHCO_3 25 mmol L^{-1} .

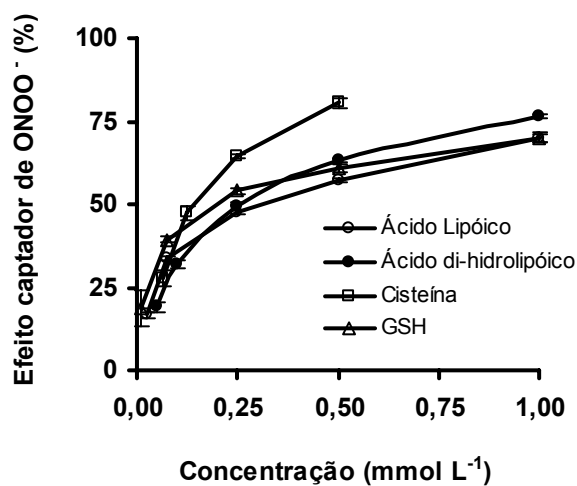


Figura 4.10 - Efeito captador de ONOO^- (%) do ácido lipóico, ácido di-hidrolipóico, cisteína e GSH, na presença de NaHCO_3 25 mmol L^{-1} .

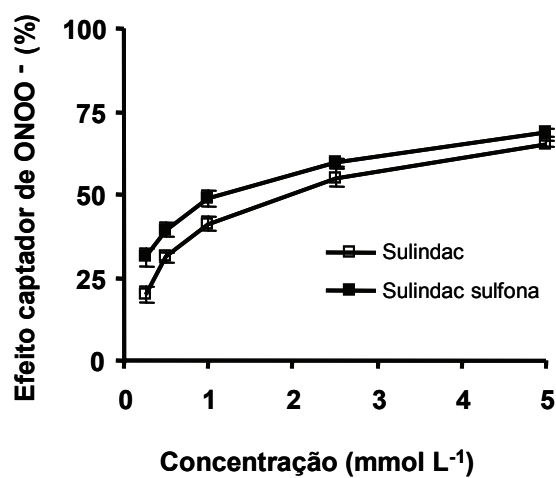


Figura 4.11 - Efeito captador de ONOO⁻ (%) do sulindac e do seu metabolito sulfona, na ausência de NaHCO₃ 25 mmol L⁻¹.

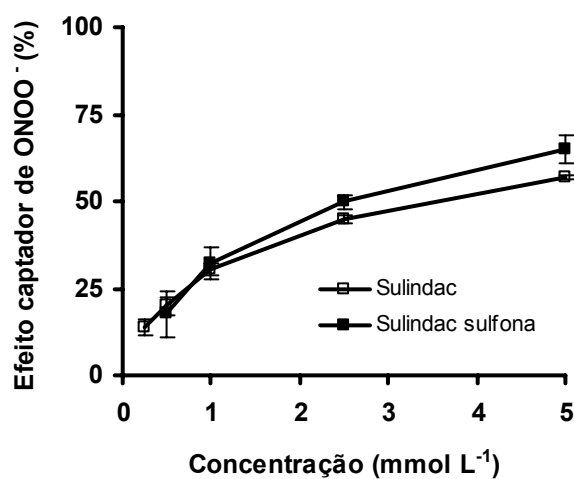


Figura 4.12 - Efeito captador de ONOO⁻ (%) do sulindac e do seu metabolito sulfona, na presença de NaHCO₃ 25 mmol L⁻¹.

Tabela 4.2 - Efeito captador na ausência e presença de 25 mmol L⁻¹ NaHCO₃.

Composto	Ausência de NaHCO ₃		Presença de NaHCO ₃	
	Curva de inibição ^a	IC ₅₀	Curva de inibição ^a	IC ₅₀
Ácido lipóico	I % = 23,6(±0,9)logC + 57,5(±0,8)	0,48 ± 0,02	I % = 31,8(±1,0)logC + 68,1(±0,9)	0,271 ± 0,009
Ácido di-hidrolipóico	I % = 28,4(±0,7)logC + 63,5(±0,5)	0,33 ± 0,02	I % = 44,3(±0,3)logC + 76,4(±0,3)	0,26 ± 0,01
Cisteína	I % = 27,0(±0,8)logC + 82,1(±0,9)	0,065 ± 0,003	I % = 58,3(±1,9)logC + 98,9(±1,5)	0,145 ± 0,004
GSH	I % = 26,9(±0,2)logC + 71,8(±0,3)	0,16 ± 0,01	I % = 25,5(±0,4)logC + 69,1(±0,4)	0,177 ± 0,009
GSSG	SA	-	SA	-
Sulindac	I % = 34,8(±0,4)logC + 41,2(±0,2)	1,8 ± 0,1	I % = 33,8(±1,9)logC + 31,8(±0,9)	3,4 ± 0,1
Sulindac sulfona	I % = 28,8(±0,2)logC + 48,4(±0,1)	1,14 ± 0,09	I % = 46,9(±0,8)logC + 31,8(±0,4)	2,5 ± 0,1

Valores de IC₅₀ (média ± desvio padrão) expressos em mmol L⁻¹.SA, sem actividade para uma concentração até 10 mmol L⁻¹.^a equações de calibração (I, percentagem de inibição; C, concentração em mmol L⁻¹).

A metodologia desenvolvida permitia efectuar 200 determinações por hora, obtendo-se em cada ciclo analítico informação sobre a actividade captadora de ONOO^- . A metodologia desenvolvida permitia ainda um baixo consumo de reagentes por determinação (0,09 μg de luminol, 55,2 μg de NaNO_2 e 81,6 μg de H_2O_2) e uma baixa produção de efluentes (0,8 mL).

4.4. Conclusões

A metodologia desenvolvida constitui uma estratégia para a avaliação *in vitro*, em sistemas não celulares, do efeito captador de ONOO^- , podendo ser considerada uma alternativa útil perante as metodologias clássicas disponíveis, uma vez que é totalmente automática, não estando por isso sujeita a uma intervenção constante do operador e a todos os erros potencialmente associados a esta intervenção. A metodologia desenvolvida distingue-se ainda pela sua simplicidade, rapidez e pelo baixo consumo de amostra e reagentes e produção de efluentes.

A metodologia desenvolvida quando comparada com as metodologias desenvolvidas em FIA para a avaliação da actividade captadora do ONOO^- [45, 46], para além de se apresentar como mais económica em termos de reagentes, possibilita a síntese do ONOO^- em linha, o que é de extrema importância considerando a falta de estabilidade desta espécie a um pH fisiológico. Adicionalmente, possibilita a geração do ONOO^- num sistema fechado, o que é fundamental para a manutenção das condições da análise, dada a reacção do ONOO^- com o CO_2 .

A utilização exclusiva das micro-bombas solenóides como elementos activos da montagem de fluxo facilitou a configuração e implementação da montagem, assim como o seu controlo computadorizado. De facto, o controlo automático individual e independente de cada micro-bomba proporcionou uma maior flexibilidade na montagem desenvolvida, possibilitando a mistura das soluções por confluência de zonas e amostragem binária, sem uma reconfiguração física da montagem.

Adicionalmente, a natureza pulsada do fluxo produzido pelas micro-bombas solenóides, a qual contribui para uma mais eficiente mistura da amostra e reagentes, e desta forma para uma mais rápida homogeneização da zona de reacção, permitiu que a mistura das soluções de amostra e reagentes e o desenvolvimento da reacção se realizasse apenas no interior da célula de fluxo, possibilitando assim a detecção da intensidade máxima de emissão de luz.

Relativamente aos resultados obtidos pela metodologia desenvolvida, verificou-se que todos os compostos avaliados, com excepção da GSSG, apresentaram efeito captador de ONOO^- dependente da concentração. Com excepção do ácido lipóico e do ácido di-hidrolipóico, todos os compostos avaliados apresentaram um maior efeito captador na ausência de NaHCO_3 25 mmol L^{-1} do que na sua presença. Adicionalmente, o elevado efeito captador de ONOO^- apresentado pelo sulindac e pelo seu metabolito sulfona poderá contribuir para a eficácia anti-inflamatória e anti-carcinogénica deste fármaco.

4.5. Referências bibliográficas

- [1] C. Ducrocq, B. Blanchard, B. Pignatelli, H. Ohshima, *Cell. Mol. Life Sci.* 55 (1999) 1068.
- [2] J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, B. A. Freeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 1620.
- [3] S. Goldstein, G. Czapski, *Free Radic. Biol. Med.* 19 (1995) 505.
- [4] R. Radi, A. Cassina, R. Hodara, C. Quijano, L. Castro, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 1451.
- [5] G. L. Squadrito, W. A. Pryor, *Free Radic. Biol. Med.* 25 (1998) 392.
- [6] A. Gomes, E. Fernandes, J. L. F. C. Lima, *J. Fluoresc.* 16 (2006) 119.
- [7] A. Denicola, R. Radi, *Toxicol.* 208 (2005) 273.
- [8] B. Alvarez, R. Radi, *Amino Acids* 25 (2003) 295.
- [9] M. P. Murphy, M. A. Packer, J. L. Scarlett, S. W. Martin, *Gen. Pharmac.* 31 (1998) 179.
- [10] V. Yermilov, J. Rubio, H. Ohshima, *FEBS Lett.* 376 (1995) 207.
- [11] B. Epe, D. Ballmaier, I. Roussyn, K. Briviba, H. Sies, *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 4105.
- [12] J. Tuo, L. Liu, H. E. Poulsen, A. Weimann, O. Svendsen, S. Loft, *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000) 147.
- [13] B. Halliwell, K. Zhao, M. Whiteman, *Free Rad. Res.* 31 (1999) 651.
- [14] G. Sadeghi-Hashjin, G. Folkerts, P. A. J. Henricks, R. B. R. Muijsers, F. P. Nijkamp, *Clin. Exp. Aller.* 28 (1998) 1464.
- [15] J. S. Beckman, J. Chen, H. Ischiropoulos, J. P. Crow, *Methods Enzymol.* 233 (1994) 229.

- [16] A. Saha, S. Goldstein, D. Cabelli, G. Czapski, *Free Radic. Biol. Med.* 24 (1998) 653.
- [17] M. N. Hughes, H. G. Nicklin, *J. Chem. Soc. A* (1971) 164.
- [18] W. A. Pryor, R. Cueto, X. Jin, W. H. Koppenol, M. Ngu-Schwemlein, G. L. Squadrito, P. L. Uppu, R. M. Uppu, *Free Radic. Biol. Med.* 18 (1995) 75.
- [19] M. Whangbo, J. M. Williams, P. C. W. Leung, M. A. Beno, T. J. Emge, H. H. Wang, *Inorg. Chem.* 24 (1985) 3502.
- [20] T. Logager, K. Sehested, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 6664.
- [21] N. W. Kooy, J. A. Royall, H. Ischiropoulos, J. S. Beckman, *Free Radic. Biol. Med.* 16 (1994) 149.
- [22] J. P. Crow, *Nitric Oxide* 1 (1997) 145.
- [23] H. Possel, H. Noack, W. Augustin, G. Keilhoff, G. Wolf, *FEBS Lett.* 416 (1997) 175.
- [24] X. Yang, X. Guo, Y. Zhao, *Talanta* 57 (2002) 883.
- [25] J. Glebska, W. H. Koppenol, *Free Radic. Biol. Med.* 35 (2003) 676.
- [26] F. J. Martin-Romero, Y. Gutiérrez-Martin, F. Henao, C. Gutiérrez-Merino, *J. Fluorescence*, 14 (2004) 17.
- [27] R. Radi, T. P. Cosgrove, J. S. Beckman, B. A. Freeman, *Biochem. J.* 290 (1993) 51.
- [28] R. Radi, G. Peluffo, M. N. Alvarez, M. Naviliat, A. Cayota, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 463.
- [29] L. Castro, M. N. Alvarez, R. Radi, *Arch. Biochem. Biophys.* 333 (1996) 179.
- [30] S. D. Catz, M. C. Carreras, J. J. Poderoso, *Free Radic. Biol. Med.* 19 (1995) 741.

- [31] S. Kudoh, K. Suzuki, M. Yamada, Q. Liu, S. Nakaji, K. Sugawara, *Luminescence* 14 (1999) 335.
- [32] M. M. Tarpey, C. R. White, E. Suarez, G. Richardson, R. Radi, B. A. Freeman, *Circ. Res.* 84 (1999) 1203.
- [33] C. Herce-Pagliai, S. Kotecha, D. E. G. Shuker, *Nitric Oxide* 2 (1998) 324.
- [34] J. P. Crow, H. Ischiropoulos, *Methods Enzymol* 269 (1996) 185.
- [35] A. V. Vliet, J. P. Eiserich, C. A. O'Neill, B. Halliwell, C. E. Cross, *Arch. Biochem. Biophys.* 319 (1995) 341.
- [36] K. V. Dyke, M. Sacks, N. Qazi, *J. Biolumin. Chemilumin.* 13 (1998) 339.
- [37] J. Kanski, J. Drake, M. Arsenova, L. Engman, D. A. Butterfield, *Brain Res.* 911 (2001) 12.
- [38] K. V. Dyke, P. McConnell, L. Marquardt, *Luminescence* 15 (2000) 37.
- [39] C. Pascual, K. Reinhart, *Luminescence* 14 (1999) 83.
- [40] B. Gunaydin, A. T. Demiryurek, *Int. Immunopharmacol.* 3 (2003) 757.
- [41] B. Gunaydin, A. T. Demiryurek, *Eur. J. Anaesthesiol.* 18 (2001) 816.
- [42] G. Yildiz, A. T. Demiryurek, I. Sahin-Erdemli, I. Kanzik, *Br. J. Pharmacol.* 124 (1998) 905.
- [43] B. Gunaydin, A. T. Demiryurek, *Acta Anaesthesiol. Scand.* 45 (2001) 741.
- [44] K. Oettl, J. Greilberger, S. Dikalov, G. Reibnegger, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 321 (2004) 379.
- [45] M. Sariahmetoglu, R. A. Wheatley, Y. Çakycy, Y. Kanzyk, A. Townshend, *Anal. Lett.* 36 (2003) 749.
- [46] M. Sariahmetoglu, R. A. Wheatley, Y. Çakycy, Y. Kanzyk, A. Townshend, *Pharmacol. Res.* 48 (2003) 361.

- [47] L. K. Moran, J. M. C. Gutteridge, G. J. Quinlan, *Current. Med. Chem.* 8 (2001) 763.
- [48] K. Parfitt, *Martindale: The complete drug reference*, Pharmaceutical Press, Londres, 33^a edição, 2002.
- [49] J. G. Hardman, L. E. Limbird, A. G. Gilman, *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, Nova York, 10^a edição, 2001.
- [50] E. Fernandes, S. A. Toste, J. L. F. C. Lima, S. Reis, *Free Radic. Biol. Med.* 35 (2003) 1008.
- [51] S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, A. A. S. C. Machado, J. L. F. C. Lima, J. M. Paulís, *Quim. Anal* 6 (1987) 278.
- [52] C. Lu, F. Qu, J. Lin, M. Yamada, *Anal. Chim. Acta* 474 (2002) 107.
- [53] U. Ketsawatsakul, M. Whiteman, B. Halliwell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279 (2000) 692.
- [54] M. Whiteman, U. Ketsawatsakul, B. Halliwell, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 962 (2002) 242.
- [55] H. Zhang, G. L. Squadrito, R. M. Uppu, J. Lemercier, R. Cueto, W. A. Pryor, *Arch. Biochem. Biophys.* 339 (1997) 183.
- [56] M. G. Bonini, O. Augusto, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 9749.
- [57] M. Trujillo, R. Radi, *Arch. Biochem. Biophys.* 397 (2002) 91.
- [58] A. R. Smith, S. V. Shenvi, M. Widlansky, J. H. Suh, T. M. Hagen, *Current. Med. Chem.* 11 (2004) 1135.
- [59] A. Bast, G. R. M. M. Haenen, *BioFactors* 17 (2003) 207.

CAPÍTULO 5

Sistemas de fluxo multi-impulsão. Determinação espectrofotométrica de zinco em plantas com concentração em reactor fluidizado

5.1. Introdução

De uma forma geral, a utilização de reagentes sólidos em sistemas de análises em fluxo é baseada no empacotamento dos reagentes em mini-colunas cilíndricas, as quais são posicionadas estrategicamente nas montagens de fluxo, e a reacção química ocorre na interface sólido-líquido [1]. As mini-colunas geralmente de vidro, politetrafluoretileno, tygon ou perspex são empacotadas com diversos reagentes sólidos pouco solúveis (sais inorgânicos, metais, amálgamas) [2-4], resinas de troca iónica [5-8], adsorventes (alumina activada, sílica) [9-12], ou alternativamente, os reagentes são imobilizados em suportes sólidos, como a sílica [13], alumina [14], resinas [15, 16] ou espuma de poliuretano [17], que são então empacotados nas mini-colunas.

Na literatura é possível encontrar diversos procedimentos automáticos recorrendo a mini-colunas empacotadas, normalmente designadas por reactores sólidos empacotados, as quais são introduzidas nas montagens com as mais diversas finalidades. Pode ser referido um conjunto de procedimentos em que os reactores sólidos empacotados são utilizados para a conversão do analito de interesse numa outra espécie que é detectável pelo procedimento analítico, sendo uma das aplicações mais referidas na literatura a determinação de nitrato, pela sua redução a nitrito numa mini-coluna com cádmio coperizado, seguida da determinação espectrofotométrica de nitrito [2, 18-22]. Destacam-se também diversos procedimentos em que os reactores sólidos empacotados são utilizados para a realização de processos de separação, quer para retenção de espécies interferentes presentes na amostra, quer para retenção do analito de interesse, que desta forma pode ser simultaneamente pré-concentrado,

aumentando a sensibilidade do procedimento analítico [5-11]. Na literatura é ainda possível encontrar diversos procedimentos envolvendo a imobilização de reagentes dispendiosos cujo consumo mínimo é imperativo, como é o caso de enzimas imobilizadas [23-26], e também diversos procedimentos utilizando reactores sólidos empacotados para a geração de reagentes, geralmente espécies oxidantes e redutoras, as quais são normalmente instáveis em solução [27, 28].

Apesar do uso bastante generalizado de reactores sólidos empacotados em sistemas de análises em fluxo, o seu uso apresenta algumas dificuldades, que se prendem nomeadamente com a ocorrência de caminhos preferenciais (o que leva a uma menor interacção entre o analito/fase sólida), a ocorrência de variações de pressão interna e efeitos *swelling* (expansão ou contracção), o que pode prejudicar a eficiência do reagente, e consequentemente, a sensibilidade do procedimento analítico [5, 6, 29-33]. Por outro lado, a preparação dos reactores sólidos empacotados, assim como a sua manutenção e conservação, requer uma certa experiência e prática por parte do operador, o que constitui uma limitação adicional ao seu uso.

Na literatura é possível encontrar algumas estratégias que visam minimizar as limitações referidas, das quais se destacam a redução da quantidade de amostra e/ou reagente sólido empacotado [29], a utilização de reversões no sentido de fluxo (por exemplo inversão do sentido do fluxo entre a etapa de pré-concentração e a etapa de eluição) [5, 6], a utilização de reactores tubulares abertos (a imobilização do reagente é feita apenas na superfície interna da parede do tubo) [31] e a exploração do conceito de *bead injection* (renovação da fase sólida em cada ciclo analítico) [32, 33].

Uma outra estratégia importante envolvendo a utilização de reagentes sólidos, embora nunca tenha sido implementada em sistemas de análises em fluxo contínuo, é a utilização de reactores fluidizados [34]. A fluidização baseia-se fundamentalmente na circulação de sólidos em contacto com um fluído (gás, líquido ou gás e líquido), evitando desta forma o bloqueio ou os efeitos de variação de pressão interna associados aos reactores sólidos empacotados [35]. Adicionalmente, a fluidização impede a existência de gradientes de temperatura, de pontos muito activos ou de regiões estagnadas no reactor, proporcionando desta forma um maior contacto superficial entre o sólido e o fluido. As aplicações envolvendo reactores fluidizados estão associadas essencialmente a processos industriais de grande escala, como processos de *cracking* catalítico (decomposição de hidrocarbonetos longos em moléculas mais pequenas), reacções de síntese para produção de polietileno, anidrido ftálico, acrilonitrilo e hidrocarbonetos, reacções de oxidação ou redução de minérios, tratamento de efluentes e de resíduos radioactivos, e processos biológicos como produção de antibióticos (penicilinas), enzimas e vacinas virais humanas [34, 36]. Apesar das diferentes metodologias desenvolvidas a nível industrial, até ao momento e como já referido anteriormente, não se encontra descrito na literatura nenhum procedimento automático envolvendo reactores fluidizados com aplicação de metodologias de fluxo.

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema automático de fluxo contínuo, baseado no conceito de multi-impulsão, para a determinação espectrofotométrica de zinco em extractos de plantas, utilizando um reactor com uma resina fluidizada para a concentração do analito e separação de espécies interferentes. A determinação de zinco foi baseada na formação de

clorocomplexos de zinco $[\text{ZnCl}_4]^{2-}$ e posterior troca iônica com os íons cloreto da resina Dowex AG 1X-8, sendo o zinco determinado após eluição por reação com o reagente de desenvolvimento de cor zincon, em meio alcalino [37]. As partículas de resina foram fluidizadas no interior de uma coluna cilíndrica, posicionada verticalmente em relação ao módulo de análises, através do fluxo pulsado inerente aos sistemas de fluxo multi-impulsão.

5.2. Parte experimental

5.2.1. Reagentes e soluções

Foi preparada uma solução padrão de catião zinco com uma concentração $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ dissolvendo 50 mg de zinco metálico em pó em 10 mL de HNO_3 $7,0 \text{ mol L}^{-1}$ e completando o volume para 500,0 mL com água. As soluções padrão de catião zinco com concentrações até $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ eram preparadas diariamente, por diluição rigorosa da solução padrão mais concentrada em HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução do reagente Zincon 0,05% (m/v) era preparada diariamente por pesagem e dissolução de 0,05 g de Zincon (Merck) em 100,0 mL de uma solução tampão $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3^-$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 9,0.

A solução tampão $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3^-$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,0 era preparada dissolvendo 30,9 g de H_3BO_3 e 8,4 g de NaOH em aproximadamente 900 mL de água, ajustando posteriormente o pH com uma solução de NaOH ou HCl, e completando o volume para 1000,0 mL com água.

A solução de lavagem 1 mol L^{-1} NaCl em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ HCl, era preparada por pesagem e dissolução de 0,585 g de NaCl em 100,0 mL de uma solução HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução eluente, solução de NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, era preparada por pesagem e dissolução de 0,04 g de NaOH em 100,0 mL de água.

Para a avaliação de potenciais espécies interferentes na determinação de zinco em plantas foram preparadas soluções padrão de catião zinco com concentrações até $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ em HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, as quais incluíam para além do catião zinco, a espécie potencialmente interferente. A concentração máxima testada do ião potencialmente interferente foi: $200,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}^+$, $100,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ PO}_4^{3-}$ e SO_4^{2-} , $30,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$, Ca^{2+} e Al^{3+} , $10,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mn}^{2+}$, Cu^{2+} e Mg^{2+} , $2,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$ e Cr^{6+} e $0,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ Co}^{2+}$.

A resina utilizada foi a resina aniónica Dowex AG 1-X8, na forma de anião cloreto, com granulação 50-100 mesh (BIO-RAD). As diferentes quantidades de resina avaliadas foram transferidas para o interior da coluna através de uma seringa plástica, após pesagem e preparação de uma suspensão das partículas de resina em água. Após a sua introdução na coluna, a resina sofria um processo de condicionamento, que consistia em fazer passar através desta a solução de lavagem anteriormente referida, por um período de 5 minutos.

5.2.2. Equipamento

A montagem analítica envolveu a utilização de cinco micro-bombas solenóides com um volume de pulso fixo de 8 e 25 μL , e uma válvula solenóide

de 3 vias (uma entrada/duas saídas), as quais foram já caracterizadas em detalhe no Capítulo 2.

Foi também utilizada uma coluna de vidro cilíndrica, de fabrico próprio (2,0 cm de comprimento e 3,0 mm de diâmetro interno), posicionada verticalmente em relação ao módulo de análises. Nas suas extremidades foi colocada uma pequena quantidade de lã de vidro para evitar a saída de partículas de resina da coluna com a montagem em funcionamento. De salientar que a utilização dos tampões de lã de vidro não retirava os pulsos ao sistema apesar de uma eventual contra-pressão exercida pelos mesmos.

Os tubos de transporte das soluções eram de PTFE, com um diâmetro interno de 0,8 mm, tendo sido também utilizadas duas confluências fabricadas em perspex, com uma configuração em “+”, e ligadores e terminais de fabrico próprio [38].

As medições espectrofotométricas foram realizadas com um espectrofotómetro da marca Femto, modelo 432, a um comprimento de onda de 630 nm, e equipado com uma célula de fluxo com 1 cm de percurso e 30 µL de volume óptico.

Os restantes componentes da montagem, nomeadamente os componentes responsáveis pelo controlo das micro-bombas e da válvula solenóide, foram já referidos pormenorizadamente no Capítulo 2.

5.2.3. Montagem de fluxo

No sistema de fluxo desenvolvido (Figura 5.1) as micro-bombas solenóides P_1 a P_5 foram utilizadas para a inserção e propulsão das soluções

de amostra e reagentes e adicionalmente, no caso das micro-bombas P_1 , P_2 e P_3 , para a fluidização das partículas de resina contidas na coluna C.

P_1 era utilizada para a inserção e propulsão da solução de amostra, P_2 para a inserção e propulsão de uma solução de lavagem (solução de NaCl 1 mol L⁻¹ em HCl 0,01 mol L⁻¹), P_3 para a inserção e propulsão da solução eluente (solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹), P_4 para a inserção e propulsão de uma solução tampão (solução de H₃BO₃/H₂BO₃⁻ 0,5 mol L⁻¹ pH 9,0) e P_5 para a inserção e propulsão da solução do reagente zincon.

Atendendo a que a determinação de catião zinco foi baseada na formação de clorocomplexos de zinco $[ZnCl_4]^{2-}$ e posterior troca iónica com os iões cloreto da resina contida na coluna C, as soluções de amostra eram preparadas em ácido clorídrico, de forma a converter os iões Zn²⁺ no complexo $[ZnCl_4]^{2-}$, o qual apresenta uma elevada estabilidade e maior afinidade para os radicais a que os iões cloreto se encontram ligados na resina [39].

A válvula solenóide V, posicionada após a coluna, era utilizada para o direccionamento do fluxo, possibilitando a gestão do mesmo quer para o esgoto quer para o percurso analítico.

Antes das determinações, todas as micro-bombas eram accionadas para preenchimento do seu interior e das linhas de transmissão. Posteriormente, por actuação simultânea de P_4 e P_2 e com a válvula V desactivada era estabelecida a linha de base e simultaneamente recondicionada a resina.

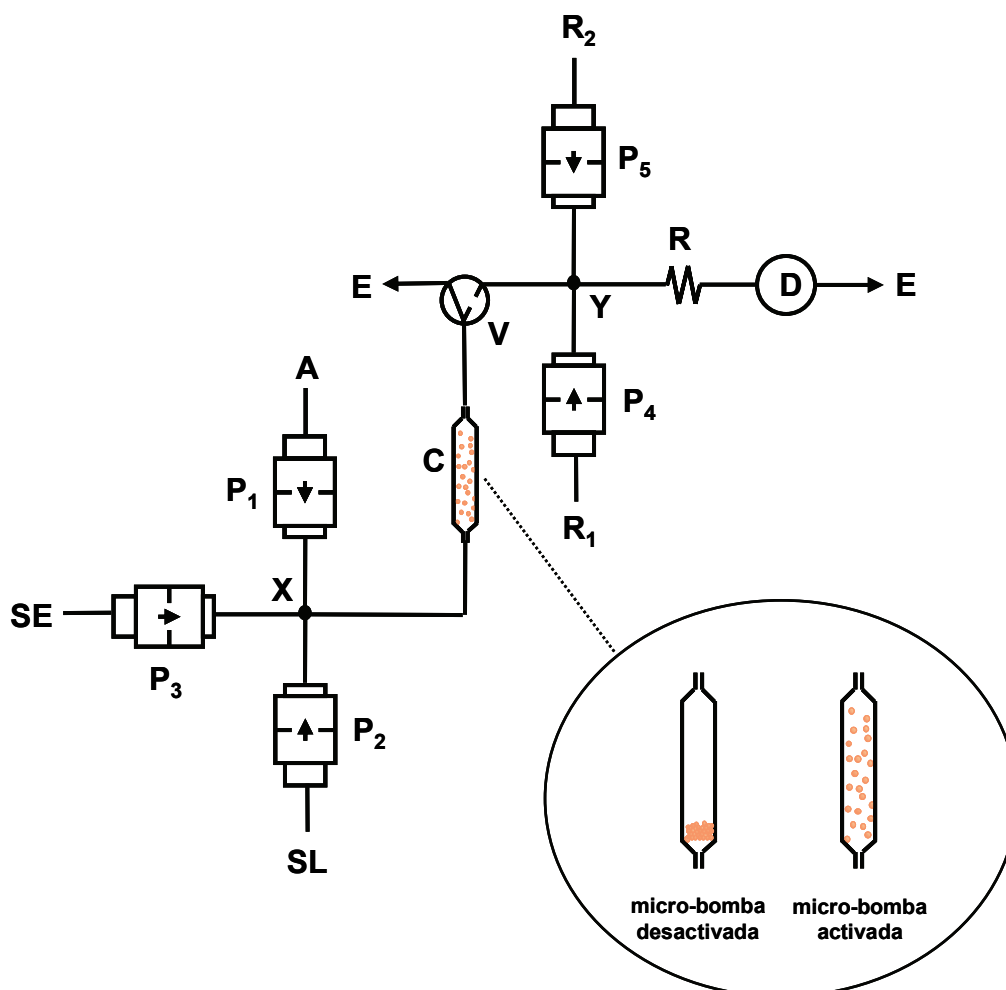


Figura 5.1 - Esquema da montagem de fluxo multi-impulsão usada na determinação de catião zinco em extractos de plantas. P₁ a P₅ – micro-bombas solenóides; V – válvula solenóide (a linha contínua e a linha tracejada referem a posição desactivada e activada, respectivamente); A – solução de amostra; SE – solução eluente; SL – solução de lavagem; R₁ – solução tampão; R₂ – solução do reagente Zincon; C – coluna contendo a resina (2,0 cm de comprimento e 3,0 mm de diâmetro interno); R – reactor (50 cm); X e Y – pontos de confluência; D – detector; E – esgoto.

O ciclo analítico (Figura 5.2) tinha início com a introdução da solução de amostra na coluna, através da actuação de P_1 . O volume de amostra era definido pelo número de pulsos de actuação de P_1 , correspondendo a um múltiplo de 8 μL (volume de pulso). Como resultado, os clorocomplexos de zinco $[\text{ZnCl}_4]^{2-}$ eram retidos pela resina, por permuta com os iões cloreto, sendo a restante matriz da amostra encaminhada para o esgoto através da válvula V (Fase 1, Figura 5.2).

Posteriormente, P_1 era desactivada e por actuação de P_2 fazia-se passar pela coluna uma solução de lavagem, a qual era encaminhada para o esgoto através da válvula V (Fase 2, Figura 5.2). Esta etapa tinha como objectivo eliminar o volume de amostra residual contido na coluna antes da etapa de eluição.

Por actuação de P_3 e comutação da válvula V, o zinco era eluido da resina e encaminhado para o reactor R. Durante esta fase, a solução tampão R_1 era introduzida no ponto de confluência Y, por actuação de P_4 , de forma a manter o pH próximo de 9 (Fase 3, Figura 5.2). Após a introdução de um volume definido de solução eluente e solução tampão, P_5 também era activada, o que possibilitava a mistura em confluência, por acção do fluxo pulsado, do reagente zincon R_2 com a zona de amostra eluída e a solução tampão, e por sua vez, o estabelecimento da zona de reacção (Fase 4, Figura 5.2).

Posteriormente P_3 e P_5 eram desactivadas e por actuação de P_4 a zona de reacção formada era encaminhada para o detector (Fase 5, Figura 5.2). Durante esta fase, a válvula V era desactivada, e por actuação de P_2 , a solução de lavagem era introduzida na coluna o que permitia o acondicionamento da

resina (resina na forma cloreto) e consequentemente o início de um novo ciclo analítico (Fase 5, Figura 5.2).

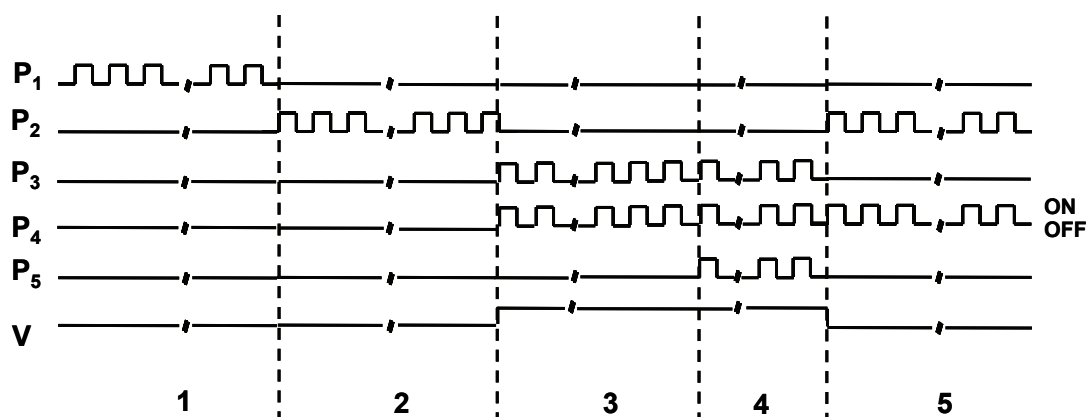


Figura 5.2 – Representação esquemática da posição das micro-bombas e da válvula durante o ciclo analítico. P₁ a P₅ – micro-bombas solenóides (8 μ L por pulso, excepto P₃ com 25 μ L por pulso); V – válvula solenóide; ON – activada; OFF – desactivada; 1 – fase de inserção da amostra (200 pulsos); 2 – fase de lavagem da coluna (200 pulsos); 3 – fase de eluição (15 pulsos); 4 – fase de inserção do reagente zincon (10 pulsos); 5 – fase de transporte e acondicionamento da resina (160 pulsos).

5.2.4. Método de referência

Para avaliar a qualidade dos resultados fornecidos pela montagem desenvolvida, a concentração de catião zinco presente nos extractos de plantas foi também determinada por espectrofotometria de absorção atómica seguindo a metodologia de referência preconizada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) [40].

A preparação das amostras para a determinação do seu conteúdo em catião zinco foi feita com base no procedimento indicado pela AOAC [40]. Por cada amostra seca e moída eram pesadas 2,0 g, transferindo-as para um cadinho de porcelana. A amostra era posteriormente colocada numa mufla a 550 °C, por um período de 4 horas. Após o arrefecimento, as cinzas eram solubilizadas em 2 mol L⁻¹ de ácido clorídrico, sendo posteriormente o solubilizado transferido para um balão volumétrico de 50,00 mL, por filtração em papel de filtro Whatman nº 1, e o seu volume completado com ácido da mesma molaridade. As soluções obtidas eram analisadas por espectrofotometria de absorção atómica, utilizando um espectrofotómetro de absorção atómica com atomização por chama da marca Perkin-Elmer, modelo 503. As determinações foram efectuadas a 213,9 nm, utilizando uma lâmpada de cátodo oco de zinco do mesmo fabricante.

A qualidade dos resultados fornecidos pela montagem desenvolvida foi ainda avaliada através da análise de amostras certificadas de referência. As soluções das amostras certificadas de referência foram preparadas de acordo com o procedimento descrito anteriormente, com excepção da amostra de algas (amostra certificada de referência BCR 060) em que foi efectuada uma diluição superior devido ao elevado conteúdo em catião zinco. Foram pesadas 0,25 g de amostra seca e moída, sendo a solução diluída para 100,0 mL com uma solução de ácido clorídrico 2 mol L⁻¹.

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Ensaios preliminares

A inclusão de resinas sob a forma de reactores sólidos empacotados num sistema de fluxo origina um conjunto de problemas tipificados na introdução. Procurou-se assim verificar se o uso das micro-bombas solenóides, e consequentemente do fluxo pulsado, era capaz de fluidizar um leito de resinas, e desta forma minimizar os problemas associados à utilização de reactores empacotados. Nesse sentido foi efectuado um estudo utilizando uma micro-bomba solenóide (volume de pulso de 8 μL) ligada uma coluna de vidro (2,0 cm de comprimento e 3,0 mm de diâmetro interno) colocada numa posição vertical e contendo no seu interior aproximadamente 20 mg de resina (resina aniónica Dowex AG 1-X8). Para verificar a fluidização das partículas foi utilizada água, a qual era introduzida na coluna através de um fluxo ascendente. Os resultados obtidos revelaram que cada pulso originado pela micro-bomba (frequências de actuação entre 300 e 60 pulsos min^{-1}) causava a circulação e suspensão de todas as partículas de resina, e o período de paragem entre cada pulso causava a deposição das partículas na sua posição original. O pulso seguinte repetia o fenómeno, resultando em ciclos de movimentos típicos aos reactores fluidizados. Variando o volume de pulso da micro-bomba para 25 μL os resultados obtidos eram semelhantes, embora se observasse para frequências de actuação superiores a 50 pulsos min^{-1} (o que correspondia a tempos de pulso inferiores a 1,2 s), que as partículas de resina, devido à amplitude superior do pulso e também devido ao tempo reduzido para a deposição das partículas durante o intervalo de paragem entre cada pulso,

tinham tendência para abandonar a coluna, não se estabelecendo uma fluidização estável. Para um volume de pulso de 50 μL , e à semelhança do observado com um volume de pulso de 25 μL , apenas frequências de actuação inferiores a 30 pulsos min^{-1} (o que correspondia a tempos de pulso superiores a 2 s) permitiam uma fluidização estável sem se que observasse a saída das partículas de resina da coluna.

5.3.2. Desenvolvimento e optimização do sistema de fluxo

Atendendo a que as micro-bombas solenóides através do fluxo pulsado demonstravam capacidade de fluidização das partículas de resina (resina aniónica Dowex AG 1X-8), a utilidade analítica da estratégia proposta foi então testada por aplicação da mesma à determinação espectrofotométrica de zinco em plantas. A montagem de fluxo para a determinação espectrofotométrica de zinco foi projectada tendo em consideração trabalhos realizados por outros autores, os quais envolviam a utilização da resina aniónica Dowex AG 1X-8 para a concentração/separação do catião zinco [37, 39, 41, 42] e a reacção espectrofotométrica do catião zinco com o reagente zincon [37, 43].

Os procedimentos experimentais tiveram início com a optimização dos diferentes parâmetros da montagem de fluxo, principalmente os parâmetros envolvidos na fluidização das partículas de resina (dimensões da coluna, massa de resina, volume de pulso e frequência de actuação das micro-bombas, sendo a qualidade da fluidização avaliada por observação visual), os parâmetros envolvidas na etapa de concentração, etapa de eluição e também na reacção espectrofotométrica do catião zinco com o reagente zincon.

5.3.2.1. Optimização das condições de fluidização

No que diz respeito à influência das dimensões da coluna na fluidização das partículas de resina foi efectuado um estudo onde foram avaliadas colunas de vidro com diferentes comprimentos e também diferentes diâmetros internos. Para a realização deste estudo foi utilizada uma massa de resina de aproximadamente 20 mg. Verificou-se que para colunas com um comprimento inferior a 1,5 cm (diâmetro interno fixado em 3,0 mm), com a montagem em funcionamento e independentemente do volume de pulso e da frequência de actuação das micro-bombas, as partículas de resina tinham tendência a abandonar a coluna não se estabelecendo uma fluidização estável. Em oposição, para colunas com um comprimento superior a 3,0 cm, as partículas mantinham-se dentro da coluna observando-se uma fluidização estável. O aumento do volume morto da coluna resultava no entanto num consumo superior de reagentes, numa elevada dispersão da amostra e simultaneamente numa diminuição do ritmo de amostragem.

Relativamente ao diâmetro interno (d.i.) observou-se que para colunas com um d.i. inferior a 3,0 mm (comprimento fixado em 2,0 cm), com a montagem em funcionamento e independentemente do volume de pulso e da frequência de actuação das micro-bombas, as partículas de resina tinham tendência a abandonar a coluna. Para colunas com um d.i. superior a 3,0 mm, tal situação já não era observada sendo a fluidização das partículas estável. Visando a fluidização das partículas de resina, sem contudo ocorrer um consumo elevado de reagentes, uma elevada dispersão da amostra e uma diminuição do ritmo de amostragem, foi então seleccionada para a realização

de estudos posteriores uma coluna de vidro com um comprimento de 2,0 cm e um d.i. de 3,0 mm (volume interno de aproximadamente 140 μL).

No que diz respeito à massa de resina que poderia ser fluidizada, o seu estudo foi efectuado avaliando quantidades de resina entre 5 e 200 mg. Os resultados obtidos revelaram que para quantidades de resina superiores a 80 mg, independentemente do volume de pulso e da frequência de actuação das micro-bombas, com a montagem em funcionamento as partículas de resina saíam da coluna ou acumulavam-se no topo da coluna (devido à colocação de lã de vidro na extremidade da coluna) não se estabelecendo uma fluidização das partículas de resina. Entre 20 e 50 mg de resina, apenas as micro-bombas com um volume de pulso de 8 μL e para frequências de actuação inferiores a 100 pulsos min^{-1} possibilitavam uma fluidização estável, sem se observar perda ou empacotamento no topo da coluna das partículas de resina. Para quantidades de resina inferiores a 20 mg era possível a utilização de frequências de actuação mais elevadas no caso das micro-bombas com um volume de pulso de 8 μL , sendo também possível a utilização de micro-bombas com um volume de pulso de 25 μL mas apenas para frequências de actuação inferiores a 50 pulsos min^{-1} e de micro-bombas com um volume de pulso de 50 μL para frequências de actuação inferiores a 30 pulsos min^{-1} (para frequências de actuação superiores era observada a saída das partículas da coluna ou o empacotamento no topo da mesma). Perante os resultados obtidos e tendo em consideração um compromisso entre fluidização das partículas, ritmo de amostragem (a utilização de frequências de actuação mais elevadas possibilitava o aumento do ritmo de amostragem) e sensibilidade (a massa de resina não poderia ser muito reduzida para evitar uma diminuição na

sensibilidade devido à falta de locais de troca disponíveis para a interação com os clorocomplexos aniônicos) a optimização prosseguiu utilizando uma massa de resina de 15 mg.

5.3.2.2. Optimização da etapa de concentração, etapa de eluição e da reacção espectrofotométrica do catião zinco com o reagente zincon

No que diz respeito à etapa de concentração (Fase 1, Figura 5.2), a influência do volume de amostra sobre a intensidade do sinal analítico foi avaliada através da inserção na coluna de volumes crescentes de soluções de catião zinco com uma concentração até $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ em $\text{HCl } 2,0 \text{ mol L}^{-1}$. As soluções de catião zinco, tal como referido anteriormente, eram preparadas em HCl de forma a converter os iões Zn^{2+} no complexo $[\text{ZnCl}_4]^{2-}$, o qual durante a etapa de concentração era então retido pela resina por permuta com os iões cloreto. O volume da solução de amostra era definido em termos de número de pulsos, correspondendo a um múltiplo de $8 \text{ }\mu\text{L}$ (condicionado pela micro-bomba seleccionada). Na realização deste estudo após a inserção da amostra foram inseridos na coluna 125 pulsos ($8 \text{ }\mu\text{L}$ por pulso) de uma solução $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$ em $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ (Fase 2, Figura 5.2), seguidos da inserção de 15 pulsos ($25 \text{ }\mu\text{L}$ por pulso) de uma solução eluente de $\text{NaOH } 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (Fase 3, Figura 5.2). O comprimento do reactor (Figura 5.1) foi fixado em 50 cm , tendo sido utilizado 10 pulsos ($8 \text{ }\mu\text{L}$ por pulso) de uma solução do reagente Zincon $0,05\%$ (m/v) (Fase 4, Figura 5.2). Os resultados obtidos (Figura 5.3) revelaram que a intensidade do sinal analítico aumentava com o volume de amostra até um volume de aproximadamente $2,0 \text{ mL}$, e depois quase estabilizava devido a

uma saturação da resina [5]. De salientar que, para um volume de amostra de 2,0 mL a dispersão resultante do volume morto no interior da coluna não era muita acentuada, tendo sido avaliado o coeficiente de dispersão [44] em 1,2, após a remoção das partículas de resina da coluna. Tendo em conta os resultados obtidos e simultaneamente o consumo de amostra, a optimização prosseguiu utilizando um volume de amostra de 1,6 mL.

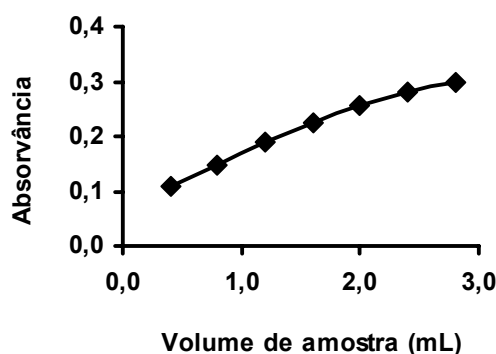


Figura 5.3 - Influência do volume de amostra na etapa de concentração para uma solução de zinco $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, em $2,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$.

A influência do caudal na etapa de concentração foi avaliada posteriormente, considerando o seu efeito sobre a amplitude do sinal analítico e também sobre as condições de fluidização. No sistema de fluxo desenvolvido, o caudal era definido pelo volume de pulso e pela frequência de actuação da micro-bomba. A frequência de actuação era definida em termos de tempo de pulso, que correspondia ao intervalo de tempo entre cada pulso da micro-bomba. A avaliação da influência do caudal da solução de amostra foi então efectuada testando tempos de pulso entre 0,2 e 1,0 segundos, o que

correspondia a frequências de actuação entre 300 e 60 pulsos min^{-1} e a caudais para um volume de pulso de 8 μL , entre 2,4 e 0,48 mL min^{-1} . Verificou-se que a fluidização das partículas era estável para os diferentes tempos de pulso avaliados, e que mesmo para os tempos de pulso mais baixos (frequências de actuação mais elevadas) havia tempo suficiente para a deposição das partículas de resina durante o intervalo de tempo de paragem entre cada pulso, resultando em boas condições de fluidização. Verificou-se ainda que o sinal analítico não era afectado pelo caudal da solução de amostra, uma vez que este se mantinha praticamente constante para os diferentes tempos de pulso avaliados. Nas mesmas condições, mas utilizando uma micro-bomba com um volume de pulso de 25 μL , verificou-se que a fluidização era apenas estável para tempos de pulso superiores a 1,2 s, o que correspondia a frequências de actuação inferiores a 50 pulsos min^{-1} . Verificou-se ainda que para tempos de pulso superiores a 1,2 s o sinal analítico se mantinha praticamente constante, sendo semelhante ao obtido com um volume de pulso de 8 μL . Tendo em conta os resultados obtidos e visando simultaneamente a obtenção de um ritmo de amostragem superior, a optimização prosseguiu utilizando uma micro-bomba com um volume de pulso de 8 μL , a um tempo de pulso de 0,2 segundos, o que correspondia a um caudal de 2,4 mL min^{-1} .

Outro parâmetro avaliado durante a etapa de concentração, considerando o seu efeito sobre a formação dos clorocomplexos de zinco, e simultaneamente sobre a selectividade da determinação (devido à formação de clorocomplexos com outros metais), foi a concentração de HCl na solução da amostra. A influência da concentração de HCl na solução da amostra (soluções de catião zinco até 2,0 mg L^{-1}) foi avaliada para concentrações entre 0,1 e 5,0

mol L⁻¹, tendo sido também testadas soluções de amostra contendo os iões potencialmente interferentes. As concentrações máximas testadas dos iões potencialmente interferentes encontram-se referidas na parte experimental (secção 5.2.1.). Os resultados obtidos (Tabela 5.1) revelaram que o sinal analítico aumentava com a concentração de HCl, como consequência do aumento da formação de clorocomplexos de zinco. Para uma concentração de HCl 2,0 mol L⁻¹, a interferência das espécies Cu²⁺ e Fe³⁺ não era significativa (Tabela 5.1), não se observando interferência por parte dos restantes iões avaliados. Para concentrações de HCl superiores a 2,0 mol L⁻¹ era observada uma diminuição do sinal analítico para soluções de amostra contendo os cátions Cu²⁺ e Fe³⁺, como resultado da formação de clorocomplexos de cobre e de ferro, os quais levavam a uma eluição parcial dos clorocomplexos de zinco durante a etapa de concentração [39, 41]. Perante os resultados obtidos a solução de amostra passou a ser preparada em 2,0 mol L⁻¹ de HCl.

Tabela 5.1 - Influência da concentração de HCl. Os resultados referem a absorvância obtida para soluções de catião zinco 1 mg L⁻¹, sem e com adição dos iões Cu²⁺ e Fe³⁺.

Concentração de ácido clorídrico (mol L ⁻¹)	Ião adicionado		
	Nenhum	10,0 mg L ⁻¹ Cu ²⁺	30,0 mg L ⁻¹ Fe ³⁺
0,5	0,090	0,088	0,087
1,0	0,113	0,117	0,120
2,0	0,187	0,190	0,180
3,0	0,248	0,215	0,180

Visando eliminar o volume de amostra residual contido na coluna antes da etapa de eluição, foi introduzida entre as etapas de concentração e eluição, uma etapa de lavagem da coluna (Fase 2, Figura 5.2). De salientar que esta etapa, para além de visar a eliminação de potenciais iões interferentes retidos no volume morto da coluna, visava também a redução da acidez resultante da etapa de concentração. A acidez resultante da etapa de concentração não era adequada para o desenvolvimento da reacção espectrofotométrica do zinco com o reagente zincon, uma vez que as melhores condições eram obtidas para um pH de 8,5-9,0 unidades. Adicionalmente, ocorria o aparecimento de um precipitado e de uma coloração azul intensa referente à cor do reagente Zincon em condições acídicas [37]. Como solução de lavagem foi avaliada uma solução de NaCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl, de forma a manter a concentração de anião cloreto após a remoção do excesso de ácido clorídrico. A ligeira acidez da solução embora não fosse crítica prevenia eventuais perdas de zinco, por eluição parcial durante esta etapa. A influência da etapa de lavagem foi então avaliada através da inserção na coluna de volumes crescentes da solução de NaCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl. O volume de solução era definido, tal como referido anteriormente, em termos de número de pulsos, correspondendo a um múltiplo de $8 \mu\text{L}$ (condicionado pela micro-bomba seleccionada). Este estudo foi efectuado utilizando soluções de catião zinco com concentrações até $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ em $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ HCl, testando adicionalmente soluções contendo os catiões cobre 10 mg L^{-1} e ferro 30 mg L^{-1} , em $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ HCl. Os resultados obtidos revelaram que não poderiam ser utilizados volumes de solução de lavagem inferiores a $600 \mu\text{L}$, uma vez que se observava o aparecimento da coloração azul intensa referente à cor do

reagente Zincon em meio ácido, evidenciando que nem todo o ácido presente na fase anterior havia sido removido. Para volumes de solução de lavagem entre 800 e 1600 μL eram observadas interferências por parte dos cátions cobre e ferro, as quais eram eliminadas para volumes de solução de lavagem superiores a 1600 μL .

A influência do caudal da solução de lavagem foi avaliada posteriormente, variando o tempo de pulso entre 0,2 e 1,0 segundos, o que correspondia a caudais para um volume de pulso de 8 μL , entre 2,4 e 0,48 mL min^{-1} . Os resultados obtidos revelaram que o caudal não afectava a etapa de lavagem, e deste modo, a optimização prosseguiu utilizando um volume de solução de lavagem de 1600 μL e um tempo de pulso de 0,2 segundos (volume de pulso de 8 μL), o que correspondia a um caudal de 2,4 mL min^{-1} , uma vez que este tempo e volume de pulso permitiam a obtenção de um ritmo de amostragem superior.

No que diz respeito à etapa de eluição (Fase 3, Figura 5.2) foram testadas como solução eluente água e soluções de hidróxido de sódio com concentrações compreendidas entre 0,01 e 0,1 mol L^{-1} . Considerando, como referido anteriormente, que as melhores condições para a formação do complexo zinco-zincon eram obtidas para um pH de 8,5-9,0 unidades, o estudo da solução eluente foi efectuado introduzindo em simultâneo na montagem uma solução tampão de $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3^-$ 0,5 mol L^{-1} pH 9,0. A solução tampão de $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3^-$ era inserida na montagem após a coluna (ponto de confluência Y, Figura 5.1) o que permitia a mistura em confluência, por acção do fluxo pulsado, do zinco eluído com a solução tampão, e consequentemente, o estabelecimento das condições ideais para o desenvolvimento da reacção

espectrofotométrica do zinco com o reagente zincon. O reagente zincon foi também introduzido neste ponto de confluência (ponto de confluência Y, Figura 5.1), tendo sido então avaliada a influência da solução eluente através da inserção simultânea na montagem de fluxo da solução eluente (água e soluções de hidróxido de sódio com concentrações compreendidas entre 0,01 e 0,1 mol L⁻¹), da solução tampão e da solução do reagente zincon. Para evitar uma diluição excessiva do zinco eluído no ponto de confluência com as soluções tampão e o reagente zincon (ponto de confluência Y, Figura 5.1), a avaliação da solução eluente foi efectuada utilizando para a sua inserção e propulsão uma micro-bomba com um volume de pulso de 25 µL, utilizando para as restantes soluções micro-bombas com um volume de pulso de 8 µL. Os resultados obtidos revelaram que a eluição era favorecida com a solução de hidróxido de sódio, relativamente à água, mas o aumento da alcalinidade não afectava a eluição. Adicionalmente, aumentando a concentração de hidróxido de sódio era observada uma aglutinação das partículas de resina, afectando as condições de fluidização. Tendo em conta os resultados obtidos a optimização prosseguiu utilizando como solução eluente uma solução de hidróxido de sódio com uma concentração 0,01 mol L⁻¹.

A inserção da solução do reagente zincon na zona eluída mais concentrada, minimizava o consumo de reagente zincon e como tal, foi efectuado um estudo onde foi avaliado um intervalo de tempo entre a inserção da solução eluente e a inserção do reagente zincon no percurso analítico. Este estudo foi efectuado introduzindo na montagem de fluxo, após a inserção da solução de amostra (soluções de catião zinco até 2,0 mg L⁻¹ em 2,0 mol L⁻¹ HCl, Fase 1 da Figura 5.2) e da solução de lavagem (solução de NaCl 1,0 mol

L⁻¹ em 0,01 mol L⁻¹ de HCl, Fase 2 da Figura 5.2), um número crescente de pulsos de solução eluente em simultâneo com a solução tampão, seguidos da inserção simultânea de 10 pulsos da solução do reagente zincon, solução eluente e solução tampão. Os resultados obtidos (Figura 5.4) revelaram que o sinal analítico aumentava até à inserção de aproximadamente 15 pulsos de solução eluente e solução tampão (o que correspondia a um volume de solução eluente de 375 µL e a um volume de solução tampão de 120 µL, 25 e 8 µL por pulso respectivamente), diminuindo ligeiramente para um número de pulsos superior. Perante os resultados obtidos a optimização prosseguiu inserindo 15 pulsos de solução eluente (inseridos em simultâneo com a solução tampão), antes da inserção da solução do reagente zincon.

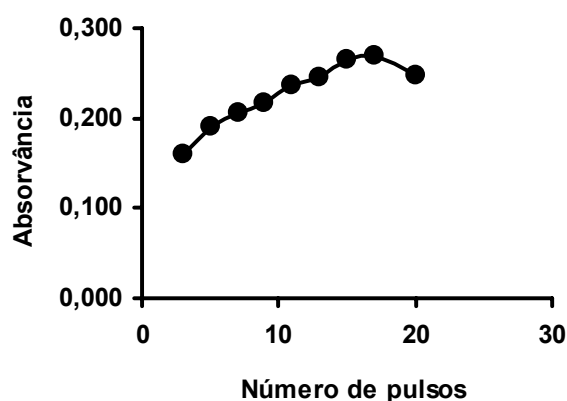


Figura 5.4 – Influência do número de pulsos de solução eluente e solução tampão antes da inserção do reagente zincon (Fase 3, Figura 5.2). A figura refere uma solução de catião zinco 1,0 mg L⁻¹, em 2,0 mol L⁻¹ HCl.

A avaliação do caudal durante esta etapa foi avaliada posteriormente, variando o tempo de pulso entre 0,4 e 5 segundos, o que correspondia a

frequências de actuação entre 150 e 12 pulsos min^{-1} e a caudais para a solução eluente entre 3,75 e 0,3 mL min^{-1} (25 μL por pulso). Atendendo a que a solução tampão era inserida em simultâneo com a solução eluente, os tempos de pulso avaliados determinavam caudais para a solução tampão (8 μL por pulso) entre 1,2 e 0,096 mL min^{-1} . Os resultados obtidos revelaram que não podiam ser utilizados tempos de pulso inferiores a 1,2 segundos uma vez que, as partículas de resina, devido à amplitude do pulso (25 μL por pulso) e também devido ao tempo reduzido para a deposição das partículas durante o intervalo de paragem entre cada pulso, tinham tendência a empacotar no topo da coluna, não se estabelecendo uma fluidização estável. Para tempos de pulso superiores a 1,2 segundos, a fluidização era estável, não se observando variações no sinal analítico para os diferentes tempos de pulso avaliados. Tendo em conta os resultados obtidos e visando a obtenção de um ritmo de amostragem o mais elevado possível, a optimização prosseguiu utilizando um tempo de pulso de 1,2 segundos, o que correspondia a um caudal para a solução eluente de 1,25 mL min^{-1} e para a solução tampão de 0,4 mL min^{-1} .

No que diz respeito ao volume da solução do reagente zincon (Fase 4, Figura 5.2), a optimização deste parâmetro foi efectuada através da inserção de um número de pulsos crescente de uma solução do reagente zincon com uma concentração 0,1 % (m/v), os quais eram inseridos em simultâneo com a solução eluente e com a solução tampão. Este estudo foi efectuado utilizando soluções de catião zinco com concentrações até 2,0 mg L^{-1} em 2,0 mol L^{-1} HCl, e fixando o comprimento do reactor (R, Figura 5.1) em 150 cm. Os resultados obtidos revelaram que a sensibilidade aumentava até 10 pulsos, o que correspondia a um volume de solução de reagente zincon de 80 μL , e

simultaneamente a um volume de solução tampão e de solução eluente de 80 e de 250 μL , respectivamente, diminuindo ligeiramente a partir deste valor. Perante os resultados obtidos, a optimização prosseguiu utilizando 10 pulsos da solução do reagente zincon.

Relativamente ao caudal durante a fase de inserção do reagente zincon (Fase 4, Figura 5.2), variando o tempo de pulso entre 1,2 e 5 segundos, o que correspondia a caudais entre 0,4 e 0,096 mL min^{-1} para as soluções de zincon e para a solução tampão, e entre 1,25 e 0,3 mL min^{-1} para a solução eluente (25 μL por pulso), não se observaram variações no sinal analítico. Deste modo, foi seleccionado para a realização de estudos posteriores um tempo de pulso de 1,2 segundos, o que correspondia a um caudal de 0,4 mL min^{-1} para as soluções de zincon e solução tampão, e a um caudal de 1,25 mL min^{-1} para a solução eluente, uma vez que este tempo de pulso permitia a obtenção de um ritmo de amostragem superior.

A influência da concentração do reagente zincon foi avaliada posteriormente para concentrações entre 0,025 e 0,15 % (m/v). Na realização deste estudo foram também utilizadas soluções de catião zinco com concentrações até 2,0 mg L^{-1} em 2,0 mol L^{-1} HCl. Verificou-se (Figura 5.5) que a sensibilidade não era afectada para concentrações de reagente zincon entre 0,025 e 0,1 % (m/v), observando-se uma ligeira diminuição para concentrações de reagente superiores a 0,1 % (m/v). Tendo em conta os resultados obtidos e considerando simultaneamente o sinal analítico do branco e o consumo de reagente, passou a ser utilizada uma concentração de reagente zincon de 0,05 % (m/v).

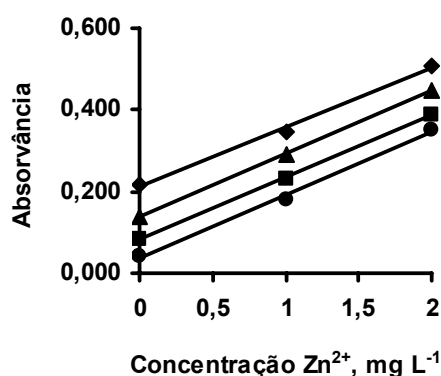


Figura 5.5 – Influência da concentração do reagente zincon no sinal analítico: (●) 0,025 %; (■) 0,05 %; (▲) 0,1 % e (◆) 0,15 % (m/v).

Relativamente à influência do comprimento do reactor (R, Figura 5.1) sobre o sinal analítico, a sua influência foi avaliada testando reactores com comprimentos entre 50 e 200 cm. Os resultados obtidos revelaram que a sensibilidade se mantinha praticamente constante entre 50 e 100 cm de comprimento de reactor, diminuindo ligeiramente a partir deste valor. Perante os resultados obtidos e visando a obtenção de um ritmo de amostragem superior a optimização prosseguiu utilizando um reactor de 50 cm de comprimento.

Posteriormente foi efectuado um estudo onde foi avaliado o volume de solução tampão necessário para a propulsão da zona de reacção para o detector (Fase 5, Figura 5.2). Visando o aumento do ritmo de amostragem, através da eliminação de uma etapa subsequente para acondicionamento da resina antes do início de um novo ciclo analítico, o estudo do volume da solução tampão foi efectuado inserindo simultaneamente a solução de lavagem na coluna (a válvula V era desactivada e a solução de lavagem era encaminhada para o esgoto, Figura 5.1). Os resultados obtidos revelaram que

a utilização de 160 pulsos, o que correspondia a um volume de cerca de 1280 μL de solução tampão e de solução de lavagem (8 μL por pulso), era suficiente para o transporte ao detector e simultaneamente para o acondicionamento da resina. Adicionalmente, variando o tempo de pulso entre 0,2 e 0,6 segundos não se observaram variações no sinal analítico, e deste modo, visando a obtenção de um ritmo de amostragem o mais elevado possível, foi seleccionado para a realização de estudos posteriores um tempo de pulso de 0,2 segundos, o que correspondia a um caudal de $2,4 \text{ mL min}^{-1}$ para cada solução.

Após a optimização do sistema e usando as condições experimentais definidas anteriormente (Tabela 5.2) foi obtido um intervalo de resposta linear para concentrações de catião zinco até $2,0 \text{ mg L}^{-1}$.

A curva analítica foi representada por $A = 0,160(\pm 0,002) C + 0,082(\pm 0,002)$, onde A correspondia ao sinal analítico em absorvância, e C à concentração de catião zinco expressa em mg L^{-1} , com um coeficiente de correlação de 0,9995. O limite de detecção da determinação foi calculado em $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de catião zinco, seguindo o procedimento descrito no Capítulo 2. A metodologia permitia efectuar cerca de 25 determinações por hora, sendo o consumo dos reagentes zincon, NaOH e NaCl de 40 μg , 250 μg e 168 mg por determinação, respectivamente.

Tabela 5.2 – Valores otimizados dos parâmetros analíticos.

Parâmetros analíticos	Valor seleccionado
Dimensões da coluna	2 cm altura × 3 mm d.i.
Massa de resina	15 mg
Fase 1	
Volume de amostra (nº de pulsos)	1600 µL (200 pulsos)
Caudal	2,4 mL min ⁻¹
Concentração de HCl	2,0 mol L ⁻¹
Fase 2	
Volume de solução de lavagem (nº de pulsos)	1600 µL (200 pulsos)
Caudal	2,4 mL min ⁻¹
Fase 3	
Volume de solução eluente, tampão (nº de pulsos)	375 µL, 120 µL (15 pulsos)
Caudal (solução eluente / tampão)	1,25 mL min ⁻¹ / 0,4 mL min ⁻¹
Fase 4	
Volume de zincon, eluente, tampão (nº de pulsos)	80, 250, 80 µL (10 pulsos)
Concentração de zincon	0,05 % (m/v)
Caudal (solução de zincon / eluente / tampão)	0,4 / 1,25 / 0,4 mL min ⁻¹
Fase 5	
Comprimento do reactor	50 cm
Volume de solução tampão, lavagem (nº de pulsos)	1280 µL (160 pulsos)
Caudal (por solução)	2,4 mL min ⁻¹

5.3.3. Análise de extractos de plantas

A metodologia analítica desenvolvida foi posteriormente aplicada à determinação de catião zinco em extractos de plantas, disponíveis no laboratório do Departamento de Química Analítica, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Brasil.

As soluções das diferentes amostras e as amostras certificadas de referência (Community Bureau of Reference (BCR) materials, 1994, Bélgica)

foram preparadas como referido na secção 5.2.4. e posteriormente analisadas no sistema de fluxo otimizado.

Os resultados obtidos encontram-se esquematizados na Tabela 5.3 e apresentam desvios relativos da metodologia desenvolvida em relação à metodologia de referência e aos valores certificados de referência, inferiores a 4,5 %. Estes resultados foram confirmados pela aplicação de um teste t de Student emparelhado, para um nível de confiança de 95 %, o qual confirmou a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos pela metodologia desenvolvida e pela metodologia de referência/valores certificados de referência ($t_{\text{calculado}} = 1,378$; $t_{\text{tabelado}} = 2,306$).

A análise repetida ($n=10$) de diferentes soluções de amostra pela metodologia desenvolvida originou desvios padrão relativos inferiores a 1,5 %, revelando uma boa repetibilidade.

Tabela 5.3 – Concentração de catião zinco nos extractos de plantas (mg kg^{-1}) obtida pela metodologia desenvolvida e pela metodologia de referência. A quarta coluna refere os valores de referência para as amostras certificadas.

Amostra	Metodologia desenvolvida ^a	Metodologia de referência ^a	Valor certificado ^a	D.R. ^b (%)
Codia discolor	$6,7 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,2$	-	3,1
Maçã Golden	$23,1 \pm 0,3$	$24,8 \pm 0,2$	-	-6,9
Palma	$9,3 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,2$	-	4,5
Azeitona	$14,0 \pm 0,2$	$13,7 \pm 0,1$	-	2,2
Pêssego	$24,6 \pm 0,5$	$25,0 \pm 0,8$	-	-1,6
Laranja	53 ± 2	54 ± 1	-	-1,9
Maçã (BCR 1515)	$11,5 \pm 0,4$	-	$12,5 \pm 0,3$	-8,0
Pêssego (BCR 1547)	$18,6 \pm 0,3$	-	$17,9 \pm 0,4$	3,9
Alga (BCR 060)	305 ± 9	-	313 ± 8	-2,6

^a Média $\pm$ desvio padrão.

^b Desvio relativo para a metodologia desenvolvida em relação à metodologia de referência/valores certificados de referência.

5.4. Conclusões

A implementação de reactores fluidizados em sistemas de análises em fluxo mostrou-se viável, tendo sido aplicada com sucesso à determinação espectrofotométrica de catião zinco em extractos de plantas.

A utilização do reactor fluidizado minimizou a ocorrência de variações de pressão interna, e simultaneamente a ocorrência de caminhos preferenciais e efeitos *swelling*, os quais constituem as principais limitações na utilização de reactores sólidos empacotados em sistemas de análises em fluxo.

A utilização do fluxo pulsado inerente aos sistemas multi-impulsão mostrou ser um bom processo para a implementação de reactores fluidizados,

uma vez que com o fluxo pulsado foi facilmente conseguida uma fluidização estável das partículas de resina. A fluidização das partículas mostrou contudo ser dependente das dimensões do reactor (coluna), da massa de resina, do volume de pulso e da frequência de actuação das micro-bombas.

A utilização das micro-bombas facilitou ainda a implementação e configuração da montagem de fluxo, assim como o controlo de todo o sistema. De facto, o controlo automático individual e independente de cada micro-bomba possibilitou a realização das diferentes estratégias de inserção das soluções de amostra e reagentes, sem implicar qualquer reconfiguração física do sistema.

A fácil combinação das micro-bombas com a válvula solenóide resultou ainda em vantagens acrescidas em termos de versatilidade, através da sinergia entre as capacidades propulsoras e comutadoras das micro-bombas e a facilidade de direccionamento das soluções proporcionada pela válvula solenóide.

No que diz respeito à metodologia desenvolvida para a determinação de cálcio e zinco em extractos de plantas, esta pode constituir uma alternativa às metodologias já existentes para o mesmo fim, já que envolve a utilização de uma montagem de fluxo de configuração muito simples e permite efectuar a análise de uma forma rápida, com um baixo consumo de reagentes (40 µg de reagente zincon, 250 µg de NaOH e 168 mg de NaCl, por determinação) e simultaneamente com pouca intervenção do operador na sua manutenção.

5.5. Referências bibliográficas

- [1] J. M. Calatayud, Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals. Automation in the Laboratory, Taylor and Francis, Londres, 1996.
- [2] C. Gal, W. Frenzel, J. Moller, Microchim. Acta 146 (2004) 155.
- [3] S. L. Ortiz, C. G. Benito, Anal. Chim. Acta 276 (1993) 281.
- [4] J. M. Calatayud, V. C. Mateo, Anal. Chim. Acta 264 (1992) 283.
- [5] S. Olsen, L. C. R. Pessenda, J. Ruzicka, E. H. Hansen, Analyst 108 (1983) 905.
- [6] R. G. Wuilloud, H. A. Acevedo, F. A. Vazquez, L. D. Martinez, Anal. Lett. 35 (2002) 1649.
- [7] N. Z. Aracama, A. N. Araújo, R. Perez-Olmos, Anal. Sci. 20 (2004) 679.
- [8] L. O. Leal, N. V. Semenova, R. Forteza, V. Cerdà, Talanta 64 (2004) 1335.
- [9] M. Miró, A. Cladera, J. M. Estela, V. Cerdà, Analyst 125 (2000) 943.
- [10] J. A. Erustes, A. Andrade-Eiroa, A. Cladera, R. Forteza, V. Cerdà, Analyst 126 (2001) 451.
- [11] Z. Xu, H. Pan, S. Xu, Z. Fang, Spectrochim. Acta, Part B 55 (2000) 213.
- [12] M. J. Marqués, A. Morales-Rubio, A. Salvador, M. de la Guardia, Talanta 53 (2001) 1229.
- [13] E. L. Silva, A. O. Martins, A. Valentini, V. T. Fávere, E. Carasek, Talanta 64 (2004) 181.
- [14] A. M. H. Shabani, S. Dadfarnia, K. Dehghan, Talanta 59 (2003) 719.
- [15] L. L. Zamora, J. M. Calatayud, Anal. Chim. Acta 281 (1993) 601.
- [16] L. L. Zamora, J. V. G. Mateo, J. M. Calatayud, Anal. Chim. Acta 265 (1992) 81.

- [17] V. Azevedo Lemos, A. A. Jesus, E. M. Gama, G. T. David, R. T. Yamaki, *Anal. Lett.* 38 (2005) 683.
- [18] M. F. Giné, H. Bergamin, E. A. G. Zagatto, B. F. Reis, *Anal. Chim. Acta* 114 (1980) 191.
- [19] A. Kojlo, E. Gorodkiewicz, *Anal. Chim. Acta* 302 (1995) 283.
- [20] D. Gabriel, J. Baeza, F. Valero, J. Lafuente, *Anal. Chim. Acta* 359 (1998) 173.
- [21] R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, I. V. O. S. Pinto, *Anal. Sci.* 16 (2000) 1157.
- [22] A. A. Ensafi, B. Rezaei, S. Nouroozi, *Anal. Sci.* 20 (2004) 1749.
- [23] M. L. S. Silva, M. Beatriz Q. Garcia, J. L. F. C. Lima, E. Barrado, *Anal. Chim. Acta* 573 (2006) 383.
- [24] R. M. Peña, J. L. F. C. Lima, M. L. M. F. S. Saraiva, *Anal. Chim. Acta* 514 (2004) 37.
- [25] R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, I. V. O. S. Pinto, *Food Chem.* 81 (2003) 141.
- [26] M. A. Segundo, A. O. S. S. Rangel, *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 131.
- [27] R. C. Schothorst, J. M. Reijn, H. Poppe, G. Den Boef, *Anal. Chim. Acta* 145 (1983) 197.
- [28] R. C. Schothorst, G. Den Boef, *Anal. Chim. Acta* 169 (1985) 99.
- [29] Z. Fang, *Flow Injection Separation and Preconcentration*, Verlag Chemie, Weinheim, 1993.
- [30] M. Miró, E. H. Hansen, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 3.
- [31] J. Z. Zhang, C. J. Fischer, P. B. Ortner, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 76 (2000) 99.
- [32] J. Ruzicka, L. Scampavia, *Anal. Chem.* 1 (1999) 257A.

- [33] S. K. Hartwell, G. D. Christian, K. Grudpan, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 619.
- [34] L. S. Fan, Powder Technol. 88 (1996) 245.
- [35] J. H. Koh, N. H. L. Wang, P. C. Wankat, Ind. Eng. Chem. Res. 34 (1995) 2700.
- [36] X. Feng, S. Jing, Q. Wu, J. Chen, C. Song, Powder Technol. 134 (2003) 235.
- [37] J. R. Ferreira, E. A. G. Zagatto, M. A. Z. Arruda, S. M. B. Brienza, Analyst 115 (1990) 779.
- [38] S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, A. A. S. C. Machado, J. L. F. C. Lima, J. M. Paulís, Quim. Anal 6 (1987) 278.
- [39] J. A. Sweileh, E. M. El-Nemma, Anal. Chim. Acta 523 (2004) 287.
- [40] AOAC Official Methods of Analysis, Vol. I, AOAC Int., Arlington, 16^a edição, 1990.
- [41] K. A. Kraus, G. E. Moore, J. Am. Chem. Soc. 75 (1953) 1460.
- [42] S. Kallmann, C. G. Steele, N. Y. Chu, Anal. Chem. 28 (1956) 230.
- [43] R. M. Rush, J. H. Yoe, Anal. Chem. 26 (1954) 1345.
- [44] J. Ruzicka, E. H. Hansen, Flow Injection Analysis, John Wiley and Sons, Nova York, 2^a edição, 1988.

CAPÍTULO 6

Sistemas de fluxo multi-impulsão. Determinação espectrofotométrica de gabapentina em formulações farmacêuticas usando micro-bombas piezoelétricas

6.1. Introdução

Neste trabalho é proposto o uso de outro tipo de micro-bombas, micro-bombas piezoelétricas, como uma alternativa às micro-bombas solenóides, associadas aos sistemas de fluxo baseados no conceito de multi-impulsão.

As micro-bombas piezoelétricas (modelo MDP1304, ThinXXS), à semelhança das micro-bombas solenóides são micro-bombas de diafragma, que actuam por movimento repentino do seu diafragma interno (por activação de um cristal piezoelétrico), originando um fluxo pulsado. Quando incorporadas numa montagem de fluxo as micro-bombas piezoelétricas podem também efectuar diferentes tarefas, como a inserção individual de soluções de amostra e reagentes e a propulsão de diferentes soluções, embora não possam ser utilizadas, ao contrário das micro-bombas solenóides, como elementos comutadores. As micro-bombas piezoelétricas são ainda unidades compactas, extremamente leves (aproximadamente 0,8 cm de altura, 2,6 cm de diâmetro e 3 g de peso), sendo também caracterizadas por um baixo consumo de alimentação e uma grande simplicidade operacional. Adicionalmente, as micro-bombas referidas são constituídas por componentes plásticos moldados por microinjecção, o que assegura a sua resistência e diminui a probabilidade de um mau funcionamento [1].

De salientar que na literatura é possível encontrar alguns trabalhos onde o conceito de fluxo pulsado, inerente aos sistemas de fluxo multi-impulsão, foi igualmente implementado através da utilização de diversos dispositivos. Em 1980 Owens *et al* [2] apresentou um equipamento de análises em fluxo que os autores denominaram “fluxo acelerado por pulsos” (do inglês, “pulsed-

accelerated-flow”), o qual utilizava a inserção de volumes pequenos de soluções (pulsos) a uma frequência constante, através do uso de uma seringa acoplada a um computador. Este equipamento utilizado numa perspectiva de mistura rápida de pequenos volumes de soluções foi usado exclusivamente para a avaliação da cinética rápida de diversas reacções [3-5].

Dispositivos de impulsão capazes de fornecer um regime pulsado para o processo de transporte foram também sugeridos por Korenaga *et al* [6], usando micro-bombas de pistão que desenvolveu com volumes de pulso entre 0,01 e 5 mL, e por Carlsson *et al* [7-11], através da utilização de micro-bombas de pistão com um volume de pulso de 3-4 μ L para impulsão de soluções em micro-canais gravados num bloco de plástico, ou em tubos capilares onde decorriam processos extractivos.

Em 1998 Wang *et al* [12] propôs também um equipamento que os autores denominaram “sistema químico de fluxo pulsado” (do inglês, “pulsed flow chemistry system”) que compreendia a inserção de pulsos por diferenças de pressão induzida em membranas. Como aplicação foi explorada a determinação potenciométrica de cálcio em águas [12], assim como a determinação quimiluminométrica de morfina [13].

O conceito de fluxo pulsado num sistema de análises em fluxo foi ainda explorado por Prior *et al* [14] através da utilização de buretas automáticas, num sistema para a determinação de isoniazida em formulações farmacêuticas, tendo sido contudo demonstrado que estes dispositivos apenas produziam um fluxo pulsado em condições de dispersão limitadas.

No trabalho desenvolvido e apresentado neste capítulo, o conceito de fluxo pulsado foi então implementado através das micro-bombas

piezoelétricas, tendo sido o seu desempenho e potencial analítico avaliados através do desenvolvimento de uma nova metodologia para a determinação de gabapentina em formulações farmacêuticas. A metodologia desenvolvida foi baseada na reacção da gabapentina com o reagente 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS) em meio alcalino, com detecção espectrofotométrica do produto de reacção a 480 nm. Considerando que se trata da primeira vez que as micro-bombas referidas são utilizadas em sistemas de análises em fluxo, procurou-se avaliar a possibilidade de implementação de sistemas com diferentes configurações, compreendendo um número variável de micro-bombas e o seu posicionamento em locais distintos na montagem de fluxo.

A gabapentina, ácido 1-(aminometil)ciclohexanoacético (Figura 6.1), é um fármaco antiepiléptico de nova geração usado no tratamento de crises epiléticas parciais, com ou sem generalização secundária [15]. É também usada como terapia adjuvante em pacientes que não respondem ou que são intolerantes aos fármacos antiepiléticos padrão. Apesar da gabapentina ser uma substância análoga do ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor inibidor, a gabapentina não é agonista ou antagonista gabaérgico, estando ainda o seu mecanismo de acção por definir [15, 16].

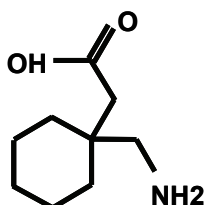


Figura 6.1 - Estrutura química da gabapentina.

De salientar ainda que a importância terapêutica e farmacológica da gabapentina estimulou o desenvolvimento de diversos métodos para a sua determinação, tanto em amostras biológicas como em formulações farmacêuticas. Na literatura encontram-se referidos essencialmente métodos cromatográficos, dos quais se destacam cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC) com detecção por espectrofotometria na região do ultra-violeta [17], HPLC com detecção por espectrofluorimetria [18-23], cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa [24] e electroforese capilar [25-27]. A literatura refere ainda um método espectrofluorimétrico [28] e algumas metodologias com detecção espectrofotométrica, baseadas na formação de compostos corados por reacção com vanilina, ninidrina e *p*-benzoquinona [29]. Apesar das diferentes metodologias referidas não se encontra descrito na literatura nenhum procedimento para a determinação de gabapentina com aplicação de metodologias de fluxo. A maioria dos procedimentos correntemente utilizados requer assim equipamentos específicos, dispendiosos e manipulações extensas das amostras, o que afecta o ritmo de amostragem e aumenta a possibilidade de ocorrência de erros que afectam a precisão e a exactidão.

6.2. Parte experimental

6.2.1. Reagentes e soluções

Foi preparada uma solução padrão de gabapentina com uma concentração de 500 mg L⁻¹ dissolvendo 0,025 g de gabapentina (Tecnimed) em 50,00 mL de solução tampão HCO₃⁻/CO₃²⁻ 0,025 mol L⁻¹, pH 10,3. As

soluções padrão de gabapentina, com concentrações entre 25,0 e 150 mg L⁻¹, foram preparadas por diluição rigorosa da solução padrão mais concentrada, no mesmo tampão.

A solução do reagente 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS) era preparada diariamente por dissolução da quantidade adequada de sólido (Sigma), de modo a obter uma concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. A solução de NQS era mantida ao abrigo da luz de modo a garantir a sua conservação ao longo do tempo [30].

A solução tampão HCO₃⁻/CO₃²⁻ 0,025 mol L⁻¹ pH 10,3 foi preparada dissolvendo 0,525 g de hidrogenocarbonato de sódio em 250,0 mL de água, ajustando o pH com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹.

A solução de azul de bromotimol com uma concentração de 200 mg L⁻¹ foi preparada por diluição de uma solução com uma concentração de 4000 mg L⁻¹, numa solução de bórax 0,01 mol L⁻¹. A solução de azul de bromotimol mais concentrada foi preparada dissolvendo 0,4 g de corante em 25 mL de etanol 96 %, perfazendo-se o volume de 100,0 mL com a solução de bórax referida anteriormente [31].

As soluções de amostras de formulações farmacêuticas contendo gabapentina foram preparadas por pesagem de vinte comprimidos/cápsulas, que de seguida eram pulverizados em almofariz de porcelana. Calculava-se a quantidade correspondente ao peso médio de uma unidade de cada formulação e dissolvia-se uma quantidade correspondente a 7,5 mg de gabapentina em 100,0 mL da solução tampão anteriormente referida.

6.2.2. Equipamento

As montagens analíticas envolveram a utilização de uma ou duas micro-bombas piezoelétricas da marca ThinXXS (Mainz, Alemanha), modelo MDP 1304, as quais, como já referido, possuíam uma configuração cilíndrica e reduzidas dimensões (aproximadamente 0,8 cm de altura, 2,6 cm diâmetro interno e 3 g de peso). Foi também utilizada uma válvula solenóide de 3 vias (duas entradas/uma saída), a qual foi já igualmente caracterizada em detalhe no Capítulo 2.

Os tubos de transporte das soluções eram de PTFE, da marca Omnifit, com um diâmetro interno (d.i.) de 0,8 mm. Foram também utilizados tubos de transporte com d.i. de 0,5 mm e ligadores e terminais de fabrico próprio.

As medições espectrofotométricas foram realizadas com um espectrofotómetro da marca Jenway modelo 6300, a um comprimento de onda de 480 nm, e equipado com uma célula de fluxo com 1 cm de percurso e 18 μ L de volume óptico.

Os restantes componentes das montagens, nomeadamente os componentes responsáveis pelo controlo das micro-bombas piezoelétricas e da válvula solenóide, foram já referidos pormenorizadamente no Capítulo 2.

6.2.3. Montagem de fluxo

Os sistemas de fluxo desenvolvidos eram constituídos por uma ou duas micro-bombas piezoelétricas, dependendo se as soluções de amostra e reagente eram aspiradas para um único canal (modo de funcionamento de aspiração, Figura 6.2-A) ou se as soluções de amostra e reagente eram

propulsionadas utilizando um canal por cada solução (modo de funcionamento de impulsão, Figura 6.2-B).

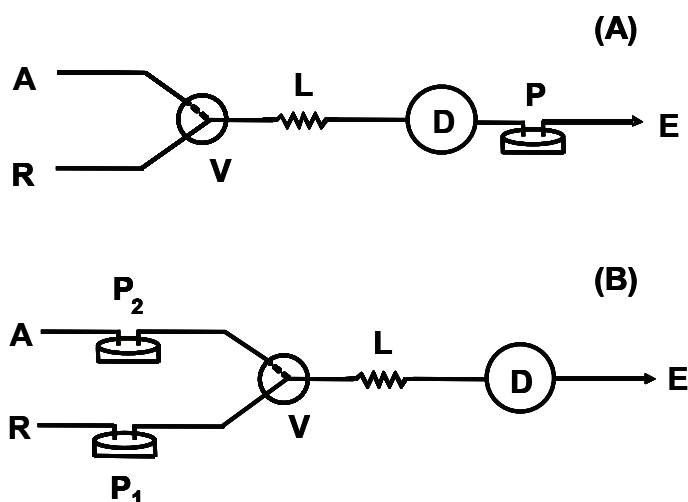


Figura 6.2 - Esquema das montagens de fluxo usadas na determinação de gabapentina em formulações farmacêuticas. (A) Modo de funcionamento de aspiração; (B) Modo de funcionamento de impulsão. P, P₁ e P₂ – micro-bombas piezoelétricas; A – solução de amostra; R – solução de NQS; V – válvula solenóide (a linha contínua e a linha tracejada referem a posição desactivada e activada, respectivamente); L – reator; D – detector; E – esgoto.

Na primeira montagem (Figura 6.2-A), a micro-bomba piezoelétrica foi colocada após o detector, sendo as soluções de amostra e do reagente NQS aspiradas pela micro-bomba P, enquanto que na segunda montagem (Figura 6.2-B) as micro-bombas P₁ e P₂ foram colocadas antes da válvula solenóide V, que funcionou como um ponto de confluência. Nesta configuração, P₁ era utilizada para a inserção e propulsão da solução do reagente NQS, que

funcionava em ambas as montagens simultaneamente como solução transportadora, e P_2 para a inserção e propulsão da solução de amostra.

A válvula solenóide V foi utilizada em ambas as montagens para a selecção das soluções de amostra e do reagente NQS, impedindo simultaneamente na montagem da Figura 6.2-B o refluxo das soluções. Na posição desactivada a válvula solenóide V permitia a passagem da solução de NQS e na posição activada permitia a passagem da solução de amostra.

Antes das determinações as micro-bombas P (Figura 6.2-A) e P_1 e P_2 (Figura 6.2-B) eram accionadas para preenchimento do seu interior e das linhas de transmissão.

O ciclo analítico, semelhante em ambas as montagens de fluxo (Figura 6.3), tinha início com o estabelecimento da linha de base, através da introdução da solução de NQS, por actuação de P (Figura 6.2-A) ou P_1 (Figura 6.2-B), a uma frequência de actuação fixa que definia o caudal durante a inserção da solução do reagente/transportador. Durante esta fase a válvula V encontrava-se na posição desactivada.

Por comutação da válvula V e simultaneamente actuação de P (Figura 6.2-A) ou P_2 (Figura 6.2-B), a solução de amostra era introduzida no percurso analítico. O volume de amostra era definido em função do tempo de actuação da micro-bomba (tempo de amostragem), o qual, em combinação com o caudal (definido pela frequência de actuação da micro-bomba) determinava o volume de amostra introduzido. De salientar que o volume de amostra podia também ser definido em função do número de pulsos e do volume de pulso da micro-bomba.

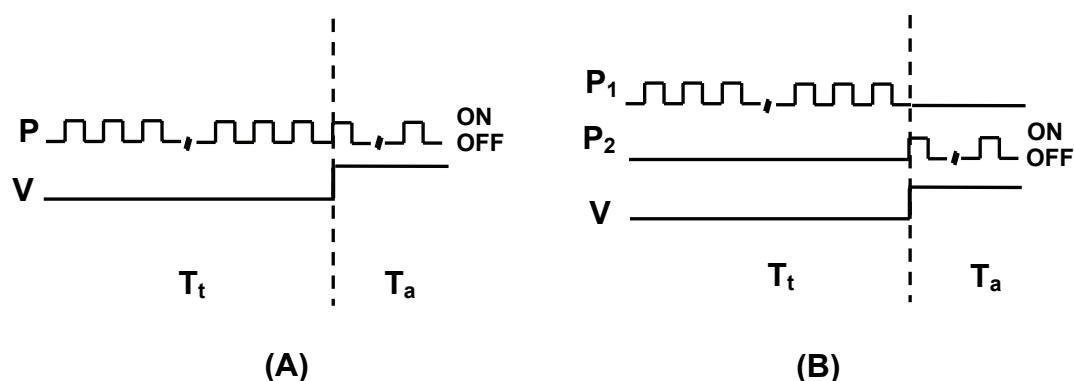


Figura 6.3 – Representação esquemática da posição das micro-bombas e da válvula durante o ciclo analítico. (A) Modo de funcionamento de aspiração e (B) impulsão; P, P_1 e P_2 – micro-bombas piezoelétricas; V – válvula solenóide; ON – activada; OFF – desactivada; T_t – fase de transporte e definição da linha de base (120 s, 600 pulsos); T_a – fase de inserção da zona de amostra (8 s, 40 pulsos).

Posteriormente, e com o início de um novo ciclo analítico, V era desactivada e por actuação de P (Figura 6.2-A) ou P_1 (Figura 6.2-B), a solução de NQS era introduzida no percurso analítico e a zona de reacção estabelecida por acção do fluxo pulsado, era encaminhada através do reactor L ao detector, onde era produzido um sinal analítico cuja magnitude era proporcional à concentração de gabapentina.

6.3. Resultados e discussão

Considerando que se trata da primeira vez que as micro-bombas piezoelétricas são utilizadas em sistemas de análises em fluxo, e procurando avaliar sistemas com diferentes configurações, compreendendo um número variável de micro-bombas piezoelétricas e o seu posicionamento em locais

distintos na montagem de fluxo, foram projectados para a determinação espectrofotométrica da gabapentina em formulações farmacêuticas dois sistemas de análises em fluxo. Os dois sistemas de fluxo projectados embora semelhantes diferiam na gestão dos fluidos: um dos sistemas apresentava uma configuração mais simples sendo constituído apenas por uma micro-bomba piezoelétrica, a qual era usada para a propulsão das soluções de amostra e do reagente NQS no modo de funcionamento de aspiração, sendo a selecção das soluções efectuada através de uma válvula solenóide; enquanto que o segundo sistema usava uma micro-bomba piezoelétrica por cada solução, introduzindo as soluções de amostra e reagente no modo de funcionamento de impulsão. Este segundo sistema foi projectado, utilizando uma válvula solenóide como ponto de confluência, uma vez que, após a realização de estudos preliminares utilizando duas micro-bombas piezoeléctricas ligadas através de uma confluência, com a inserção de uma solução de azul de bromotimol concentrada (200 mg L^{-1}) e uma solução de bórax ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$), era observado o refluxo das soluções ao nível da confluência.

Os primeiros estudos efectuados, antes do desenvolvimento e optimização propriamente dita dos dois sistemas de fluxo, visaram uma avaliação do comportamento das micro-bombas. Como referido anteriormente, as micro-bombas piezoeléctricas à semelhança das micro-bombas solenóides, actuam por movimento repentino do seu diafragma interno, originando um fluxo pulsado. O fluxo pulsado era manifestado pela projecção de pequenas gotas de solução, após cada movimento do diafragma da micro-bomba. Visando então uma avaliação do comportamento das micro-bombas piezoeléctricas em relação à frequência de actuação, volume de pulso e ao caudal, foi efectuado

um estudo onde foi avaliado, para diferentes frequências de actuação, o caudal imediatamente à saída de uma micro-bomba piezoelétrica (caudal em circuito aberto) e o caudal após a sua introdução numa montagem analítica. Para a avaliação do caudal após a sua introdução numa montagem analítica foram utilizadas montagens semelhantes às da Figura 6.2-A e 6.2-B, nas quais foram introduzidas reactores com diferentes comprimentos (50, 100 e 200 cm) e simultaneamente tubos de transporte com diferentes diâmetros internos (0,5 e 0,8 mm). A determinação do caudal era efectuada por pesagem da quantidade de água propulsãoada pela micro-bomba piezoelétrica durante um período de tempo definido [32].

Os resultados obtidos (Figura 6.4) revelaram que o caudal em circuito aberto aumentava linearmente com a frequência de actuação da micro-bomba até uma frequência de actuação de 20 Hz (1200 pulsos min^{-1}), o que correspondia a um caudal máximo de aproximadamente 4,0 mL min^{-1} e a um volume de pulso neste intervalo de frequências de actuação de aproximadamente 3,3 μL . Para frequências de actuação superiores era observada uma ligeira diminuição no caudal, a qual era acompanhada de uma diminuição significativa da precisão ($\text{r.s.d.} > 10\%$). Para frequências de actuação muito elevadas (frequências de actuação superiores a 80 Hz, o que correspondia a frequências de actuação superiores a 4800 pulsos min^{-1}) o funcionamento das micro-bombas piezoelétricas era alterado, impossibilitando a sua utilização.

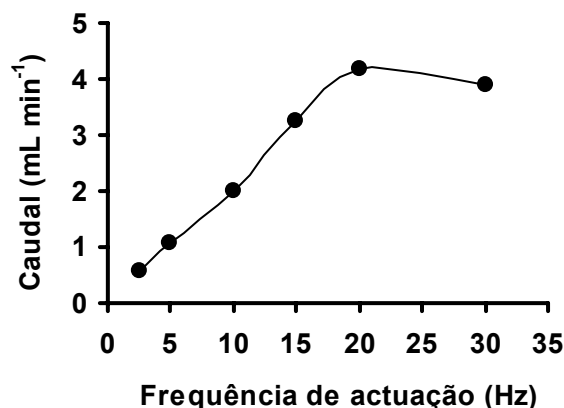


Figura 6.4 - Caudal em circuito aberto para diferentes frequências de actuação da micro-bomba piezoelétrica.

Quando introduzidas na montagem analítica as micro-bombas, quer no modo de funcionamento de aspiração quer no modo de impulsão, apresentavam uma diminuição acentuada no caudal, quando comparado com o caudal obtido em circuito aberto (Figura 6.5, A e B). De salientar que apesar da diminuição observada, e da presença de eventuais contra-pressões exercidas pela montagem analítica, continuava a observar-se a projecção de pequenas gotas de solução no final da montagem, após cada movimento do diafragma da micro-bomba.

Para uma tubagem com um d.i. de 0,8 mm (Figura 6.5-A), o caudal da micro-bomba aumentava linearmente com a frequência de actuação até 10 Hz (600 pulsos min⁻¹), para ambos os modos de funcionamento (aspiração e impulsão), aumentando ligeiramente a partir deste valor de frequência de actuação. Para os diferentes comprimentos de reactor (50 a 200 cm) o caudal era semelhante, observando-se um caudal máximo de aproximadamente 1,2

mL min^{-1} (r.s.d. < 3,0%) a uma frequência de actuação de 20 Hz (1200 pulsos min^{-1}). De salientar que o volume de pulso até uma frequência de actuação de 10 Hz era de aproximadamente 1,7 μL (aproximadamente metade do observado em circuito aberto), diminuindo ligeiramente a partir deste valor de frequência de actuação.

Para uma tubagem com um d.i. de 0,5 mm (Figura 6.5-B) e para ambos os modos de funcionamento, era observada uma diminuição significativa do caudal à medida que o comprimento do reactor aumentava. Para um reactor com 50 cm de comprimento, o caudal máximo para ambos os modos de funcionamento, era aproximadamente 0,81 mL min^{-1} (r.s.d. < 1,6%) para uma frequência de actuação de 15 Hz (900 pulsos min^{-1}), enquanto que para 100 e 200 cm de comprimento de reactor o caudal máximo era aproximadamente 0,53 e 0,29 mL min^{-1} (r.s.d. < 2,7%), a uma frequência de actuação de 10 e 5 Hz (600 e 300 pulsos min^{-1}), respectivamente. O aumento da frequência de actuação da micro-bomba não afectava o caudal, o qual se mantinha praticamente constante para ambos os modos de funcionamento. De salientar que a diminuição observada no caudal com o aumento do comprimento do reactor era acompanhada de uma diminuição significativa no volume de pulso da micro-bomba, assim como uma diminuição na distância de projecção das pequenas gotas de solução após cada movimento do diafragma da micro-bomba.

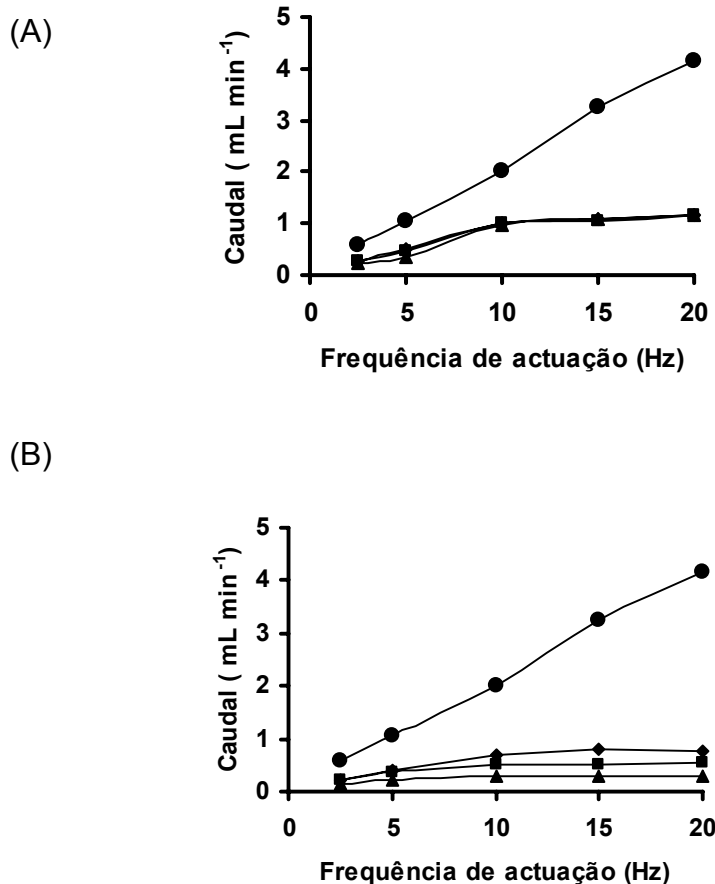


Figura 6.5 – Avaliação do caudal em função da frequência de actuação. ● - caudal em circuito aberto; ◆ - 50 cm de reactor; ■ – 100 cm de reactor; ▲ - 200 cm de reactor. Tubagem com (A) 0,8 e (B) 0,5 mm d.i.. A figura é relativa ao modo de funcionamento de aspiração.

Perante os resultados obtidos, e tendo em consideração as variações observadas no caudal usando uma tubagem com um d.i. de 0,5 mm foi seleccionado para o desenvolvimento dos dois sistemas automáticos para a determinação espectrofotométrica de gabapentina em formulações farmacêuticas, uma tubagem com um d.i. de 0,8 mm. Adicionalmente, e tendo

por base o programa informático de controlo implementado para o estudo do comportamento das micro-bombas piezoelétricas (programa definido em função da frequência e tempo de actuação da micro-bomba), o volume das soluções foi definido neste trabalho com base numa inserção temporizada (o tempo de actuação da micro-bomba em combinação com o caudal definia o volume de solução inserido na montagem analítica) e não com base numa contagem do número de pulsos e do volume de pulso, como no caso das micro-bombas solenóides.

6.3.1. Ensaios preliminares por procedimentos discretos

O desenvolvimento dos dois sistemas automáticos de fluxo contínuo para a determinação espectrofotométrica de gabapentina em formulações farmacêuticas, incorporando as micro-bombas piezoelétricas para a inserção e propulsão das soluções, teve início com a realização de estudos envolvendo a reacção da gabapentina com o reagente NQS.

De acordo com a literatura, o reagente NQS é reduzido por compostos contendo grupos amina primários e secundários, em meio alcalino, dando origem a compostos corados, com um máximo de absorvância entre 470 e 500 nm [30, 33-36]. Considerando que a gabapentina é constituída por um grupo amina primário (Figura 6.1), seria então prever que a gabapentina reduzisse o reagente NQS em meio alcalino, resultando na formação de um composto corado. Nesse sentido e tendo por base alguns trabalhos descritos na literatura envolvendo a utilização do reagente NQS [34-38], foi realizado um estudo onde se misturaram volumes equivalentes (aproximadamente 1,5 mL) de uma

solução de NQS com uma concentração de $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e soluções de gabapentina com concentrações distintas ($50,0$ a 200 mg L^{-1}) preparadas numa solução tampão $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ pH $10,0$, para avaliar a reacção da gabapentina com o reagente NQS. Os resultados obtidos revelaram que a gabapentina reagia com o reagente NQS em meio alcalino, dando origem a um composto corado com um máximo de absorvância a 480 nm . Verificou-se ainda que nestas condições (Figura 6.6), a reacção era relativamente lenta, atingindo o equilíbrio aproximadamente aos 5 minutos.

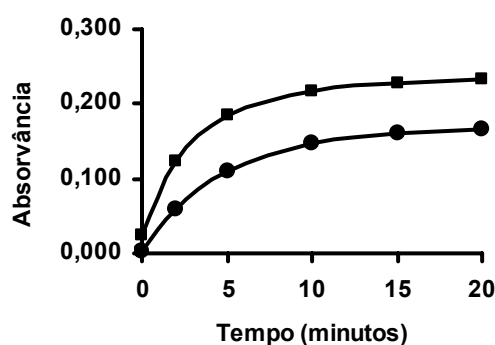


Figura 6.6 – Monitorização do sinal analítico em função do tempo. (●) $50,0$ e (■) 100 mg L^{-1} de gabapentina.

6.3.2. Desenvolvimento e optimização dos sistemas de fluxo

Após uma avaliação preliminar da reacção da gabapentina com o reagente NQS, foram definidos os diversos parâmetros dos sistemas de fluxo projectados, os quais, à semelhança de outros sistemas de fluxo com gestão convencional, compreenderam o volume de amostra, a forma e sequência de

inserção da zona de amostra, o comprimento do reactor, o caudal, e a concentração do reagente NQS.

No que diz respeito ao volume de amostra, definido como referido anteriormente, pelo tempo de actuação da micro-bomba piezoelétrica durante a inserção da solução de amostra e pelo caudal, o seu estudo foi efectuado testando diferentes tempos de actuação da micro-bomba (tempo de amostragem). Através da inserção de soluções de gabapentina com concentrações até 100 mg L^{-1} e fixando a frequência de actuação da micro-bomba em 5 Hz, o que correspondia a uma frequência de actuação de $300 \text{ pulsos min}^{-1}$ e a um caudal de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, foram avaliados em ambas as montagens (modo de funcionamento de aspiração e impulsão) tempos de amostragem entre 2 e 14 s. Os tempos de amostragem referidos correspondiam a um número de pulsos entre 10 e 70, e a um volume de amostra entre 17 e $119 \text{ }\mu\text{L}$ (volume de pulso de $1,7 \text{ }\mu\text{L}$). Adicionalmente, e visando o estudo da forma e sequência de inserção da zona de amostra, os diferentes tempos de amostragem foram avaliados testando em ambas as montagens, diferentes combinações de inserção da solução de gabapentina. As diferentes estratégias de inserção da amostra compreenderam a inserção da amostra como volume único, através da inserção de uma única alíquota de solução de gabapentina (definida pelo tempo de amostragem) entre duas alíquotas de solução do reagente NQS; e como amostragem binária, através da intercalação de pequenas alíquotas de solução de gabapentina e de solução do reagente NQS (para os diferentes tempos de amostragem referidos foram avaliadas alíquotas de solução de gabapentina e alíquotas de reagente NQS definidas com tempos de 1 e 2 s). Atendendo a que em ambas as montagens

de fluxo era utilizada uma válvula solenóide, a qual permitia a selecção da solução de amostra ou do reagente NQS no percurso analítico, não foi possível testar a estratégia de inserção da amostra por confluência de zonas, que consistia numa inserção simultânea das soluções de gabapentina e do reagente NQS.

Os resultados obtidos foram semelhantes para ambas as montagens de fluxo (modo de funcionamento de aspiração e impulsão) e simultaneamente para as duas estratégias de inserção da zona de amostra avaliadas. Verificou-se que a sensibilidade aumentava até um tempo de amostragem de 8 s, o que para um caudal de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ correspondia a um volume de amostra de aproximadamente $67 \text{ }\mu\text{L}$ (aproximadamente 40 pulsos de amostra, sendo o volume de pulso de pulso de $1,7 \text{ }\mu\text{L}$), mantendo-se praticamente constante a partir deste tempo de amostragem. Perante os resultados obtidos a optimização prosseguiu utilizando em ambas as montagens de fluxo um tempo de amostragem de 8 s. Adicionalmente, e considerando que utilizando a estratégia de amostragem binária o consumo de reagente NQS por determinação era ligeiramente superior, foi seleccionada para a realização de estudos posteriores a estratégia de inserção da zona de amostra de volume único.

No que diz respeito à influência do comprimento do reactor (L, Figura 6.2) sobre a amplitude do sinal analítico, a sua influência foi avaliada testando em ambas as montagens de fluxo, reactores com comprimentos entre 50 e 250 cm. Para a realização deste estudo foram utilizadas soluções de gabapentina com concentrações até 100 mg L^{-1} e uma solução do reagente NQS com uma concentração de $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Verificou-se que a sensibilidade apresentava

um comportamento semelhante em ambas as montagens de fluxo (modo de funcionamento de aspiração e impulsão), observando-se um aumento até 200 cm de comprimento de reactor, e mantendo-se praticamente constante a partir deste valor. Tendo em conta os resultados obtidos e considerando que o comprimento do reactor para além de afectar a sensibilidade, também afectava o ritmo de amostragem (para comprimentos de reactor superiores a 200 cm era obtido um ritmo de amostragem inferior a 16 determinações por hora), foi seleccionado para a realização de estudos posteriores um reactor com 150 cm de comprimento.

Outro parâmetro importante no desempenho dos sistemas de fluxo desenvolvidos, considerando o seu efeito sobre o tempo de residência, logo sobre o desenvolvimento da reacção, foi o caudal. Com as micro-bombas piezoeléctricas, tal como referido anteriormente, o caudal era definido em termos de frequência de actuação das micro-bombas. A avaliação da influência do caudal da solução transportadora (solução do reagente NQS) sobre a amplitude do sinal analítico foi efectuada, testando em ambas as montagens de fluxo (modo de funcionamento de aspiração e impulsão), frequências de actuação entre 2,5 e 20 Hz (frequências de actuação entre 150 e 1200 pulsos min^{-1}) o que correspondia a caudais entre 0,3 e 1,2 mL min^{-1} (Figura 6.5-A). Este estudo foi efectuado utilizando soluções de gabapentina com concentrações até 100 mg L^{-1} e uma solução do reagente NQS com uma concentração de $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos, à semelhança dos estudos anteriores, foram semelhantes para ambas montagens de fluxo (Figura 6.7). Observou-se que a sensibilidade diminuía significativamente com a frequência de actuação até 10 Hz (600 pulsos min^{-1}), como consequência da

diminuição do tempo de residência, e conseqüentemente do tempo disponível para o desenvolvimento da reacção, mantendo-se praticamente constante a partir deste valor de frequência de actuação.

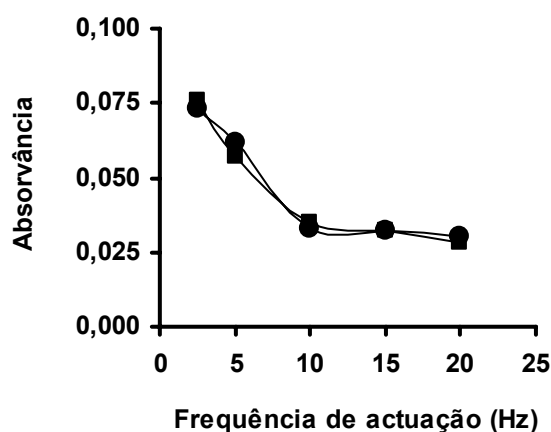


Figura 6.7 – Influência da frequência de actuação para os sistemas actuando por (●) aspiração e (■) impulsão. A figura refere uma solução de gabapentina 100 mg L^{-1} .

Perante os resultados obtidos e tendo em consideração um compromisso entre sensibilidade e ritmo de amostragem (a utilização de frequências de actuação muito baixas comprometia o ritmo de amostragem), a optimização prosseguiu utilizando uma frequência de actuação de 5 Hz ($300 \text{ pulsos min}^{-1}$), o que correspondia a um caudal de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

No que diz respeito ao volume de solução transportadora (solução do reagente NQS) utilizado para a propulsão da zona de amostra ao detector, o seu estudo foi efectuado variando em ambas as montagens de fluxo, o tempo de actuação da micro-bomba durante a inserção da solução transportadora, entre 100 e 140 s (T_t , Figura 6.3). Os resultados obtidos demonstraram que a utilização de um tempo de actuação de 120 s, o que correspondia para uma

frequência de actuação de 5 Hz, a 600 pulsos de solução transportadora e a um volume de cerca de 1000 μL (volume de pulso de aproximadamente 1,7 μL), era suficiente em ambas as montagens para o transporte da zona de amostra ao detector e monitorização do sinal analítico.

A influência da concentração do reagente NQS sobre a amplitude do sinal analítico foi avaliada para um intervalo de concentrações entre $5,0 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando soluções de gabapentina com concentrações até 100 mg L^{-1} . Os resultados obtidos (Figura 6.8) revelaram que a sensibilidade aumentava até uma concentração de NQS de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se praticamente constante a partir deste valor de concentração. Tendo em conta os resultados obtidos e visando a obtenção da máxima sensibilidade passou a ser utilizada nos estudos seguintes uma concentração de reagente NQS de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

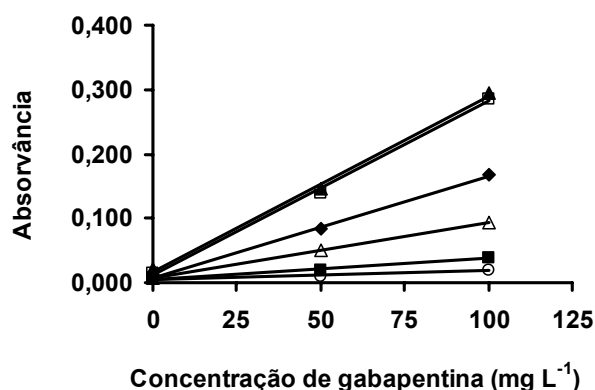


Figura 6.8 - Influência da concentração do reagente NQS na amplitude do sinal analítico: (○) $5,0 \times 10^{-5}$, (■) $1,0 \times 10^{-4}$, (△) $2,5 \times 10^{-4}$, (◆) $5,0 \times 10^{-4}$, (□) $1,0 \times 10^{-3}$ e (▲) $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A figura é relativa ao modo de funcionamento de impulsão.

Outro parâmetro químico que se mostrou importante no desenvolvimento da reacção foi o pH. A influência do pH no desenvolvimento da reacção foi avaliada preparando soluções de gabapentina até 100 mg L⁻¹ numa solução tampão HCO₃⁻/CO₃²⁻ 0,025 mol L⁻¹, com o pH ajustado a valores entre 9,6 e 11,4 unidades. Verificou-se que a sensibilidade aumentava com o aumento do pH até 10,3 unidades, diminuindo significativamente a partir deste valor. Tendo em conta os resultados obtidos foi fixado um valor de pH de 10,3 unidades para a preparação das soluções de gabapentina.

Após a optimização dos dois sistemas de fluxo e usando as condições experimentais definidas anteriormente (Tabela 6.1) foi obtido um intervalo de resposta linear entre a amplitude do sinal analítico e a concentração de gabapentina, para concentrações até 150 mg L⁻¹. A curva analítica foi representada por $A = 0,0018(\pm 0,0001) C + 0,004(\pm 0,005)$ e $A = 0,0018(\pm 0,0001) C + 0,013(\pm 0,005)$, para o modo de funcionamento de aspiração e impulsão, respectivamente, onde A correspondia ao sinal analítico em absorvância, e C à concentração de gabapentina expressa em mg L⁻¹, com um coeficiente de correlação de 0,9963 e 0,9971, respectivamente.

A Figura 6.9 representa o registo gráfico obtido na elaboração da curva de calibração referida para o modo de funcionamento de aspiração, e na análise de uma das amostras e respectivos ensaios de recuperação.

Através de uma análise múltipla de soluções de gabapentina com uma concentração de 100 mg L⁻¹, ambos os sistemas desenvolvidos, sistema actuando por aspiração (Figura 6.9-B) e impulsão, exibiram uma boa repetibilidade, apresentando desvios padrão relativos (em percentagem) inferiores a 1,5 (n=10) e 0,9 (n=10), respectivamente.

O limite de detecção da determinação foi de 11,0 mg L⁻¹ de gabapentina para o modo de funcionamento de aspiração, e de 9,8 mg L⁻¹ de gabapentina para o modo de funcionamento de impulsão. A metodologia desenvolvida permitia ainda efectuar para ambos os modos de funcionamento cerca de 28 determinações por hora, sendo o consumo de amostra e reagente NQS por determinação, de 66,7 µL e 0,26 mg, respectivamente.

Tabela 6.1 – Valores optimizados dos parâmetros analíticos.

Parâmetros analíticos	Valor seleccionado
Volume de amostra (tempo, número de pulsos)	67 µL (8 s, 40 pulsos)
Volume de transportador (tempo, número de pulsos)	1000 µL (120 s, 600 pulsos)
Reactor	150 cm
Caudal	0,5 mL min ⁻¹
Concentração do reagente NQS	1,0×10 ⁻³ mol L ⁻¹
pH da solução de amostra	10,3

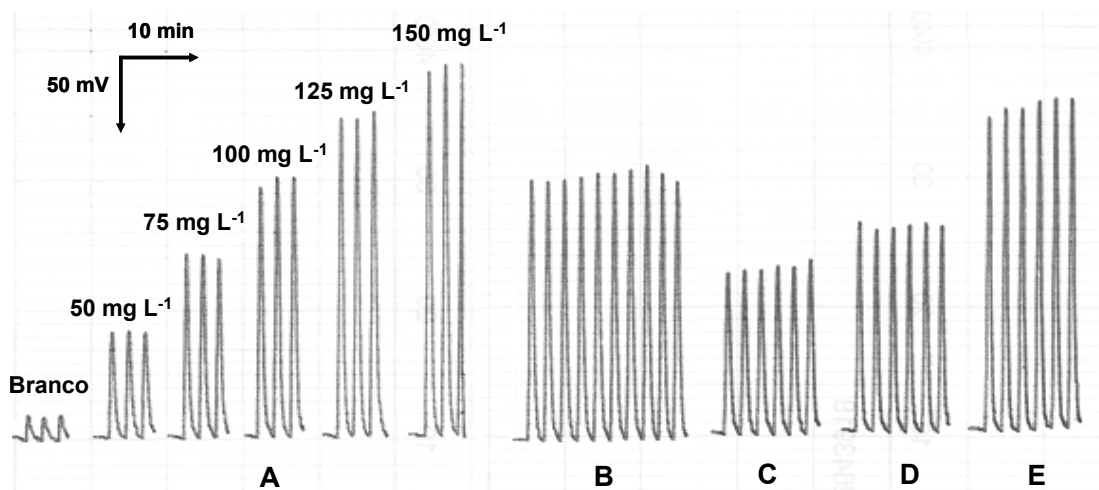


Figura 6.9 – (A) Registro gráfico obtido na elaboração da curva de calibração; (B) realização de 10 determinações consecutivas de uma solução de gabapentina 100 mg L⁻¹; (C) determinação de uma das amostras e (D) e (E) respectivos ensaios de recuperação. A figura é relativa ao modo de funcionamento de aspiração.

6.3.3. Avaliação de interferentes

Considerando que a metodologia desenvolvida seria posteriormente aplicada à determinação de gabapentina em formulações farmacêuticas, foi efectuado um estudo onde foi avaliada a extensão da interferência de alguns compostos utilizados normalmente como excipientes. Este estudo foi efectuado analisando soluções contendo gabapentina numa concentração fixa de 100 mg L⁻¹ e concentrações crescentes de cada um dos excipientes em estudo. Um composto foi considerado como não interferente quando a variação do sinal analítico era $\pm 3\%$ quando comparado com o sinal analítico obtido na ausência do referido composto. Os resultados obtidos demonstraram que nas condições optimizadas, os excipientes (galactose, lactose, sacarose e estereato de magnésio) não interferiam até 80 vezes a razão molar em relação à gabapentina.

6.3.4. Análise de formulações farmacêuticas

Com o objectivo de avaliar o desempenho da metodologia desenvolvida, os sistemas de fluxo descritos anteriormente foram aplicados na análise de formulações farmacêuticas contendo gabapentina, disponíveis no mercado português. As soluções das diferentes amostras foram preparadas, a partir das formulações em estudo, como referido na secção 6.2.1., e posteriormente analisadas nos sistemas de fluxo otimizados.

Com o objectivo de confirmar os resultados obtidos e avaliar possíveis efeitos de matriz, foram efectuados ensaios de recuperação adicionando a cada amostra 25,0 e 75,0 mg L⁻¹ de gabapentina, uma vez que nas várias Farmacopeias não existia nenhuma metodologia disponível para a determinação deste composto. As amostras adicionadas de padrão foram depois analisadas pelos sistemas de fluxo otimizados, utilizando-se para efeitos de interpolação, a curva de calibração obtida com padrões de gabapentina.

Os resultados da análise das amostras e dos ensaios de recuperação estão esquematizados na Tabela 6.2 (modo de funcionamento de aspiração) e Tabela 6.3 (modo de funcionamento de impulsão), tendo-se obtido valores de recuperação para ambos os sistemas, entre 94,8 e 105,6 %.

A análise repetida (n=10) de soluções de amostra de gabapentina com uma concentração de 75,0 mg L⁻¹ pelos dois sistemas de fluxo desenvolvidos originou desvios padrão relativos inferiores a 3,1 %, revelando uma boa repetibilidade.

Tabela 6.2 – Resultados da análise das amostras e dos ensaios de recuperação para o modo de funcionamento de aspiração.

Amostra	Concentração declarada (mg/formulação)	Concentração encontrada ^a (mg/formulação)	Recuperação (%)	
			25,0 mg L ⁻¹	75,0 mg L ⁻¹
Neurontin (comprimidos)	600	591 ± 10	103,8	104,6
	800	829 ± 16	105,4	102,5
Generis (cápsulas)	100	95 ± 3	97,9	98,1
	400	404 ± 7	96,7	97,2
Gabamox (cápsulas)	300	315 ± 2	96,7	95,0
	300	307 ± 5	104,4	96,3
Bexal (cápsulas)	400	398 ± 12	101,8	97,8
	400	390 ± 10	105,6	95,2

^a Média ± desvio padrão (n=6).

Tabela 6.3 – Resultados da análise das amostras e dos ensaios de recuperação para o modo de funcionamento de impulsão.

Amostra	Concentração declarada (mg/formulação)	Concentração encontrada ^a (mg/formulação)	Recuperação (%)	
			25,0 mg L ⁻¹	75,0 mg L ⁻¹
Neurontin (comprimidos)	600	614 ± 10	105,3	101,9
	800	854 ± 19	103,5	94,9
Generis (cápsulas)	100	105 ± 3	98,3	100,4
	400	418 ± 10	99,3	103,7
Gabamox (cápsulas)	300	310 ± 4	104,0	97,5
	300	316 ± 3	97,5	95,7
Bexal (cápsulas)	400	418 ± 3	102,6	97,0
Ciclum (cápsulas)	400	411 ± 8	105,2	101,3

^a Média ± desvio padrão (n=10).

6.4. Conclusões

Os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho confirmam o potencial analítico das micro-bombas piezoeléctricas para a implementação de sistemas automáticos de fluxo contínuo, constituindo uma alternativa às micro-bombas solenóides associadas aos sistemas de fluxo multi-impulsão.

Como características mais relevantes salientam-se as pequenas dimensões das micro-bombas e o fluxo pulsado, o que permite o desenvolvimento de sistemas de análises em fluxo de reduzidas dimensões, e ainda caracterizados por um desenvolvimento rápido da reacção. Adicionalmente, destaca-se o elevado grau de automação proporcionado pelas micro-bombas, uma vez que os principais parâmetros analíticos do sistema são controlados por computador, o que facilita a operação dos sistemas e a sua monitorização. De facto, as micro-bombas piezoeléctricas à semelhança das micro-bombas solenóides possibilitam um controlo efectivo dos volumes de amostra e reagentes inseridos no sistema (em função do tempo de actuação da micro-bomba ou em função do número de pulsos e volume de pulso da micro-bomba), assim como um controlo efectivo do caudal com base na frequência de pulso, possibilitando também uma monitorização efectiva da posição da zona de amostra no interior do sistema.

Como principais desvantagens, destaca-se o facto das micro-bombas piezoeléctricas não poderem ser utilizadas como elementos comutadores, o que implica obrigatoriamente a inserção nas montagens analíticas de dispositivos comutadores, aumentando a complexidade dos sistemas. Adicionalmente, e quando comparadas com as micro-bombas solenóides as

micro-bombas piezoelétricas são mais sensíveis a contra-pressões exercidas pelas montagens analíticas, como demonstrado pela diminuição significativa do volume de pulso da micro-bomba piezoelétrica após a sua introdução na montagem. As micro-bombas piezoelétricas possibilitam a obtenção de um caudal máximo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ (para tubos de transporte com d.i. de 0,8 mm), enquanto que as micro-bombas solenóides possibilitam a obtenção de caudais superiores (para uma micro-bomba solenóide com um volume de pulso de $8 \mu\text{L}$ é possível obter um caudal máximo de aproximadamente $2,4 \text{ mL min}^{-1}$).

Relativamente aos métodos descritos na literatura para a determinação de gabapentina em formulações farmacêuticas, a metodologia desenvolvida, quer utilizando uma única micro-bomba piezoelétrica para a inserção e propulsão das soluções (modo de funcionamento de aspiração), quer utilizando uma micro-bomba por solução (modo de funcionamento de impulsão), é uma alternativa analítica para a determinação de gabapentina, que pode ser aplicada com evidentes vantagens em análises de rotina, uma vez que, para além de exibir um elevado grau de automação, possibilita com um equipamento simples e de baixo custo, a realização de um número razoável de determinações por hora (28), com um consumo mínimo de reagentes (0,26 mg de reagente NQS por determinação) e produção de efluentes (cerca de 1,1 mL por determinação), não sendo também necessária uma manipulação extensa da amostra. Adicionalmente, requer pouca intervenção do operador, o que minimiza a ocorrência de erros durante as determinações.

6.5. Referências bibliográficas

- [1] <http://www.thinxxs.com>
- [2] G. D. Owens, R. W. Taylor, T. Y. Ridley, D. W. Margerum, *Anal. Chem.* 52 (1980) 130.
- [3] S. A. Jacobs, M. T. Nemeth, G. W. Kramer, T. Y. Ridley, D. W. Margerum, *Anal. Chem.* 56 (1984) 1058.
- [4] M. T. Nemeth, K. D. Fogelman, T. Y. Ridley, D. W. Margerum, *Anal. Chem.* 59 (1987) 283.
- [5] C. P. Bowers, K. D. Folgeman, J. C. Nagy, T. Y. Ridley, Y. L. Wang, S. W. Evetts, D. W. Margerum, *Anal. Chem.* 69 (1997) 431.
- [6] T. Korenaga, X. Zhou, T. Moriwake, H. Muraki, T. Naito, S. Sanuki, *Anal. Chem.* 66 (1994) 73.
- [7] K. Carlsson, H. S. Jacobsen, A. L. Jensen, T. Stenstrom, B. Karlberg, *Anal. Chim. Acta* 354 (1997) 35.
- [8] K. Carlsson, L. Moberg, B. Karlberg, *Water Res.* 375 (1999) 33.
- [9] K. Carlsson, B. Karlberg, *Anal. Chim. Acta* 415 (2000) 1.
- [10] K. Carlsson, B. Karlberg, *Anal. Chim. Acta* 423 (2000) 137.
- [11] K. Carlsson, B. Karlberg, *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 149.
- [12] X. D. Wang, T. J. Cardwell, R. W. Catrall, G. E. Jenkins, *Anal. Commun.* 35 (1998) 97.
- [13] S. W. Lewis, P. S. Francis, K. F. Lim, G. E. Jenkins, X. D. Wang, *Analyst* 125 (2000) 1869.
- [14] J. A. V. Prior, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 1234.

- [15] K. Parfitt, Martindale: The complete drug reference, Pharmaceutical Press, Londres, 32^a edição, 1999.
- [16] M. A. Marcolin, M. F. Tatsch, Rev. Psiqu. Clín., 27 (2000) 4.
- [17] Z. Zhu, L. Neirinck, J. Chromatogr. B, 779 (2002) 307.
- [18] G. Bahrami, A. Kiani, J. Chromatogr. B, 835 (2006) 123.
- [19] T. A. C. Vermeij, P. M. Edelbroek, J. Chromatogr. B, 810 (2004) 297.
- [20] Q. Jiang, S. Li, J. Chromatogr. B, 727 (1999) 119.
- [21] P. H. Tang, M. V. Miles, T. A. Glauser, T. Degrauw, J. Chromatogr. B, 727 (1999) 125.
- [22] N. Wad, G. Kramer, J. Chromatogr. B, 705 (1998) 154.
- [23] G. Forrest, G. J. Sills, J. P. Leach, M. J. Brodie, J. Chromatogr. B, 681 (1996) 421.
- [24] D. C. R. Borrey, K. O. Godderis, V. I. L. Engelrelst, D. R. Bernard, M.R. Langlois, Clin. Chem. Acta 354 (2005) 147.
- [25] R. Sekar, S. Azhaguvel, J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 663.
- [26] S. Y. Chang, F. Wang, J. Chromatogr. B, 799 (2004) 265.
- [27] L. L. Garcia, Z. K. Shihabi, K. Oles, J. Chromatogr. B, 669 (1995) 157.
- [28] F. Belal, H. Abdine, A. Al-Majed, N.Y. Khalil, J. Pharm. Biomed. Anal. 27 (2002) 253.
- [29] H. E. Abdellatif, H. M. Khalil, J. Pharm. Biomed. Anal. 31 (2003) 209.
- [30] L. Gallo-Martinez, A. Sevillano-Cabeza, P. Camping-Falcó, F. Bosch-Reig, Anal. Chim. Acta 370 (1998) 115.
- [31] J. Ruzicka, E. H. Hansen, Flow Injection Analysis, John Wiley and Sons, Nova York, 2^a edição, 1988.

- [32] M. Valcárcel, M. D. Luque de Castro, Flow-Injection Analysis, Principles and Applications, John Wiley and Sons, Nova York, 1987.
- [33] K. Hartke, U. Lohmann, Chem. Lett., 12 (1983) 693.
- [34] J. Saurina, S. Hernández-Cassou, Anal. Chim. Acta 396 (1999) 151.
- [35] A. G. Kumbhar, S. V. Narasimhan, P. K. Mathur, Talanta 47 (1998) 421.
- [36] C. S. P. Sastry, J. S. V. M. L. Rao, Anal. Lett. 29 (1996) 1763.
- [37] C. Cabero, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, Anal. Chim. Acta 381 (1999) 307.
- [38] J. Saurina, S. Hernández-Cassou, Anal. Chim. Acta 283 (1993) 414.

CAPÍTULO 7

Análise em sistemas de fluxo de interface única.

Avaliação das potencialidades

7.1. Introdução

A necessidade de adaptação a novas exigências analíticas, envolvendo tanto o número, como a diversidade ou a qualidade dos resultados da análise, e a cada vez maior disponibilidade de nova instrumentação com capacidades analíticas superiores, ditou, como referido no Capítulo 1 desta dissertação, o aparecimento da análise por injeção em fluxo (FIA), tendo motivado a introdução subsequente de novos conceitos, técnicas e aplicações analíticas. Nos últimos anos foram propostas um conjunto de alternativas à metodologia FIA, caracterizadas por uma elevada robustez, fiabilidade e estabilidade a longo termo, as quais compreendem como já anteriormente referido, a análise por injeção sequencial (SIA), a multicomutação (MCFA), a multi-seringa (MSFIA) e mais recentemente, a análise em sistemas de fluxo multi-impulsão (MPFS).

Embora baseadas em diferentes estratégias de gestão de fluidos, as diferentes metodologias são, no entanto, baseadas na inserção de um volume definido de amostra num fluxo transportador, com combinação em linha de soluções reagentes, e posterior encaminhamento da zona de reacção, em condições reproduzíveis de dispersão e temporização, para o detector. De salientar que, o segmento de amostra ao ser introduzido num fluxo transportador estabelece duas interfaces de reacção com o transportador, podendo estabelecer múltiplas interfaces, no caso da aplicação do conceito de amostragem binária [1].

Independentemente da estratégia usada, o volume de amostra é um parâmetro fundamental, que requer controlo e uma optimização sistematizada,

uma vez que condiciona o estabelecimento da zona de reacção. Qualquer que seja a estratégia de inserção da zona de amostra na montagem analítica, desde volume único, amostragem binária ou confluência de zonas, a alteração do volume de amostra é sempre uma estratégia efectiva para ajustar a sensibilidade da determinação analítica, afectando também a gama de concentrações de trabalho e o ritmo de amostragem [2].

Uma outra característica muito comum à maior parte dos sistemas de análises em fluxo é a localização do detector no final da montagem analítica, dando origem a uma única leitura da amostra, a qual em algumas circunstâncias pode não ser considerada suficiente, como no caso de determinações cinéticas [3, 4], podendo também, por exemplo, não compensar a ocorrência de eventuais erros operacionais. A informação recolhida através de multidetecções efectuadas numa única zona de amostra pode, em contraste, ser usada para determinações cinéticas, assim como para a determinação de multi-componentes, eliminação de espécies interferentes, e para o ajuste da sensibilidade e intervalo de concentrações de trabalho [4].

Este capítulo refere uma nova estratégia de gestão de fluidos baseada num conceito de reacção em interface única (SIFA, do inglês “Single Interface Flow Analysis”), a qual diverge significativamente do conceito tradicional de análise em fluxo contínuo, ao não implicar a inserção de volumes definidos de amostra e reagentes nas montagens analíticas, mas o estabelecimento de uma interface única de reacção entre a amostra e os reagentes antes da detecção. O desenvolvimento da reacção fica assim dependente da penetração mútua de zonas adjacentes amostra/reagente e do estabelecimento de gradientes dinâmicos de concentração. Como já referido, a penetração de zonas foi um

conceito inicialmente proposto por Ruzicka e Hansen [2] para explicar a formação de uma zona composta quando, em duas zonas adjacentes em movimento contínuo, a primeira zona sofre uma penetração da segunda, como consequência da velocidade superior do fluxo no centro do tubo, em relação à velocidade média do fluxo. O conceito ganhou especial relevância com o aparecimento do SIA, o qual combina, como também já foi referido no Capítulo 1 desta dissertação, a aspiração sequencial e a inversão do sentido de fluxo para obter diferentes graus de penetração das zonas de amostra e reagente [5-7]. Embora semelhante à metodologia SIA no sentido em que a penetração de zonas influencia dramaticamente a extensão da superfície onde o gradiente de concentrações amostra/reagente é estabelecido, com a estratégia SIFA nunca é obtida uma sobreposição total de zonas, já que as zonas de amostra e reagente não têm limites definidos. O recurso a múltiplas inversões do sentido do fluxo, e a eventual utilização de um fluxo pulsado inerente aos sistemas MPFS, são factores que poderão contribuir para aumentar o grau de interpenetração das zonas envolvidas.

A avaliação das potencialidades da estratégia SIFA incluída nesta dissertação foi efectuada através do desenvolvimento de montagens básicas, e do seu estudo em distintas situações analíticas. Foi desenvolvida uma montagem básica utilizando duas buretas automáticas como dispositivo de inserção e propulsão das soluções de amostra e reagente, tendo sido avaliado o funcionamento do sistema recorrendo a soluções coradas de azul de bromotimol e bórax. A avaliação da montagem foi ainda efectuada através da implementação de três reacções com diferentes estequiometrias amostra:reagente. As reacções compreenderam a formação dos complexos

metálicos entre o Fe (III) e o reagente Tiron (estequiometria 1:1) [8, 9], entre o Cu (II) e o PAR (estequiometria 1:2) [10, 11] e entre o Fe (II) e a 1,10-fenantrolina (estequiometria 1:3) [12, 13].

Considerando a mistura superior do fluxo pulsado inerente aos sistemas multi-impulsão, e esperando os seus efeitos favoráveis na ocorrência da mistura da interface única foram ainda desenvolvidas duas montagens analíticas utilizando micro-bombas solenóides como dispositivos de inserção e propulsão das soluções de amostra e reagentes. As duas montagens, constituídas por duas e quatro micro-bombas, foram avaliadas através das reacções do Fe (III) com o ácido salicílico [14] e do fosfato através da formação do azul de molibdénio [15, 16].

7.2. Parte experimental

7.2.1. Reagentes e soluções

Foi preparada uma solução de azul de bromotimol com uma concentração de 4000 mg L^{-1} dissolvendo 0,4 g de corante em 25 mL de etanol 96 %, perfazendo-se o volume de 100,0 mL com uma solução de bórax $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. As soluções de trabalho foram preparadas por diluição rigorosa da solução mais concentrada, na solução de bórax $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ [2].

As soluções padrão de Fe (III), utilizadas para a implementação da reacção com o reagente Tiron, foram preparadas por diluição rigorosa de uma solução de concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, numa solução de HClO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. A solução padrão mais concentrada foi preparada por pesagem e dissolução de 4,040 g de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ em 100,0 mL da mesma solução de HClO_4 [9].

As soluções padrão do reagente Tiron (1,2-dihidroxibenzeno-3,5-disulfonato dissódico) foram preparadas por diluição rigorosa de uma solução de concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na solução de HClO_4 referida anteriormente. A solução padrão mais concentrada foi preparada por pesagem e dissolução de 3,142 g de Tiron (Sigma) em 100,0 mL da solução de HClO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ [9].

As soluções padrão de cobre (II), foram preparadas por diluição rigorosa de uma solução padrão comercial de concentração 1000 mg L^{-1} (Spectrosol), numa solução tampão $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3^-$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,0.

As soluções padrão de PAR (4-(2-piridilazo)-resorcinol) foram preparadas por diluição rigorosa de uma solução de concentração $3,15 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, na solução tampão $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3^-$ pH 9,0 referida anteriormente. A solução padrão mais concentrada foi preparada por pesagem e dissolução de 8,140 mg de PAR (Fluka) em 100,0 mL do mesmo tampão.

As soluções padrão de 1,10-fenantrolina, foram preparadas por diluição rigorosa de uma solução de concentração $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, numa solução tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0. A solução padrão mais concentrada foi obtida por pesagem e dissolução de 39,60 mg de 1,10-fenantrolina em 100,0 mL do mesmo tampão.

As soluções padrão de Fe (II) eram preparadas diariamente, na solução tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0, por diluição rigorosa da solução padrão de Fe (III) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ anteriormente referida, com adição de ácido ascórbico de modo a obter uma concentração 1 % (m/v) e reduzir o Fe (III) a Fe (II).

As soluções padrão de Fe (III), utilizadas para a implementação da reacção com o ácido salicílico, foram preparadas por diluição rigorosa de uma

solução de concentração $7,16 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, obtida por pesagem e dissolução de 1,936 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 10 mL de HCl e 10 mL de HNO_3 concentrado, completando em balão volumétrico o volume para 1000,0 mL com água.

A solução de ácido salicílico foi preparada por dissolução da quantidade adequada de sólido numa solução 10% (v/v) de etanol.

As soluções padrão de fosfato foram preparadas por diluição rigorosa de uma solução de concentração de $5,26 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, obtida por pesagem e dissolução de 1,201 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em 1000,0 mL de água.

A solução de ácido ascórbico, utilizada na implementação da reacção do fosfato, foi preparada diariamente por dissolução da quantidade adequada de sólido, de modo a obter uma concentração de $6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

A solução de heptamolibdato de amónio com uma concentração de $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada por pesagem e dissolução de 1,236 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 200,0 mL de uma solução de HNO_3 0,4 mol L^{-1} .

7.2.2. Equipamento

As montagens analíticas envolveram a utilização de duas buretas automáticas equipadas com seringas de vidro com a capacidade de 5,0 mL, as quais foram já caracterizadas em detalhe no Capítulo 2. Foram também utilizadas duas ou quatro micro-bombas solenóides com um volume de pulso fixo de 8 μL , e duas válvulas solenóides de duas vias (uma entrada/uma saída), as quais foram já igualmente caracterizadas no Capítulo 2.

Os tubos de transporte das soluções eram de PTFE, da marca Omnifit, com um diâmetro interno de 0,8 mm. Foram também utilizadas confluências

fabricadas em perspex, com uma configuração em “+” e “Y”, e ligadores e terminais de fabrico próprio [17].

As medições espectrofotométricas foram realizadas com um espectrofotómetro da marca Jenway modelo 6300, equipado com uma célula de fluxo com um percurso de 1 cm e 18 μ L de volume óptico. Para os estudos efectuados envolvendo as soluções de azul de bromotimol e bórax foi utilizado um comprimento de onda de 620 nm, tendo sido utilizado um comprimento de onda de 667 nm na reacção do Fe (III) com o reagente Tiron, de 510 nm nas reacções do Cu (II) com o PAR e do Fe (II) com a 1,10-fenantrolina, de 530 nm na reacção do Fe (III) com o ácido salicílico e de 660 nm na reacção do fosfato.

Os restantes componentes das montagens nomeadamente os componentes responsáveis pelo controlo e activação das buretas automáticas, das micro-bombas e das válvulas solenóides foram já referidos pormenorizadamente no Capítulo 2.

7.2.3. Montagem de fluxo

As montagens de fluxo desenvolvidas eram constituídas por duas buretas automáticas (Figura 7.1) ou duas (Figura 7.2-A) e quatro (Figura 7.2-B) micro-bombas solenóides, no caso da hifenização da estratégia SIFA com o conceito de multi-impulsão. As buretas automáticas e as micro-bombas solenóides eram utilizadas para a inserção e propulsão das soluções de amostra e reagentes. Cada montagem era também constituída por duas válvulas solenóides V_1 e V_2 (uma entrada/uma saída), as quais eram utilizadas para o direccionamento do fluxo. As múltiplas inversões do sentido de fluxo

eram efectuadas através da actuação combinada das buretas ou micro-bombas com as válvulas solenóides. O detector foi colocado no centro das montagens de fluxo, sendo as buretas ou micro-bombas e as válvulas solenóides posicionadas simetricamente à volta deste. As montagens de fluxo incorporavam ainda dois reactores L_1 e L_2 , com comprimentos idênticos, colocados em cada lado do detector. Desta forma, era possível efectuar múltiplas detecções, após a realização de inversões do sentido de fluxo, cuja extensão era determinada pelo percurso da interface dentro de cada reactor, através de uma rotina de controlo baseada em tempo ou devido à utilização das micro-bombas na contagem do número de pulsos.

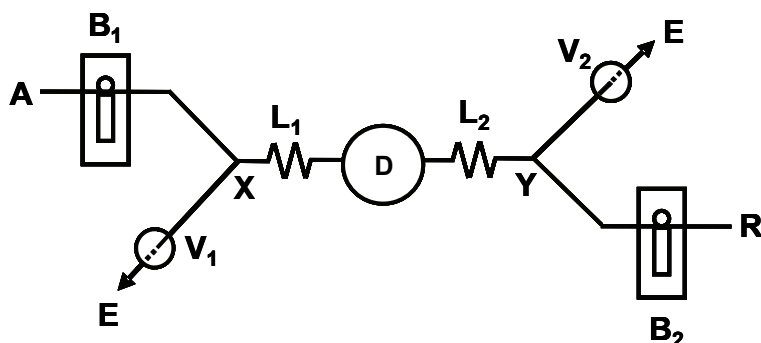
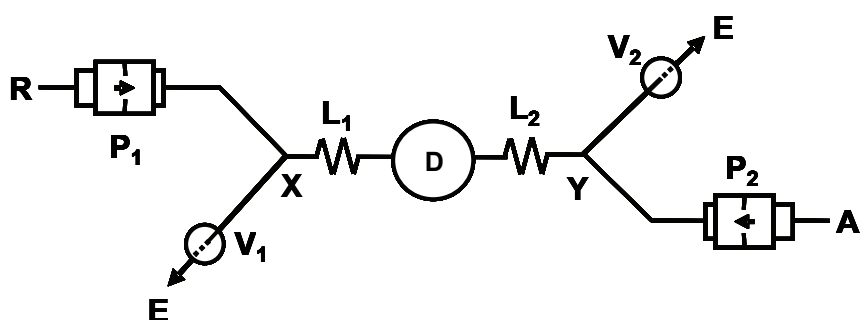
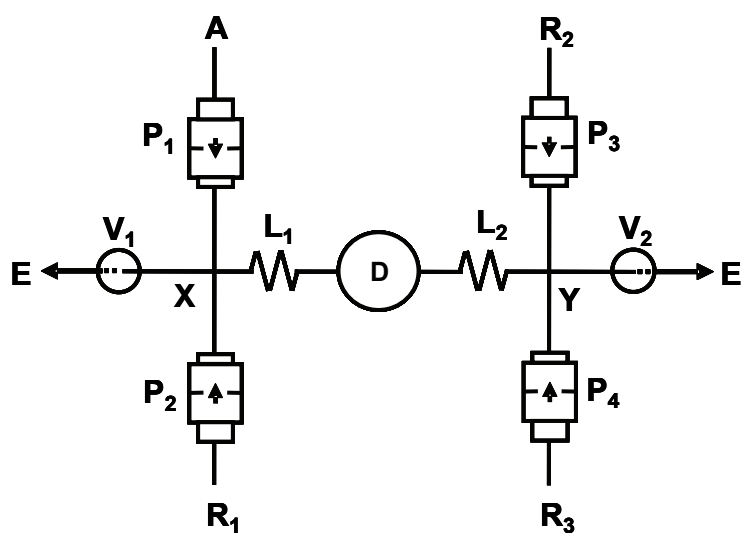


Figura 7.1 – Esquema da montagem de fluxo de interface única utilizando buretas automáticas como dispositivo de inserção e propulsão das soluções. B_1 e B_2 – buretas automáticas; V_1 e V_2 – válvulas solenóides (uma entrada/uma saída); A – amostra (solução de Fe (III), Cu (II) ou Fe (II)); R – reagente (Tiron, PAR ou 1,10-fenantrolina); L_1 e L_2 – reactores; X e Y – pontos de confluência; D – detector; E – esgoto.



(A)



(B)

Figura 7.2 – Esquema das montagens de fluxo de interface única utilizando micro-bombas solenóides. (A) montagem de fluxo envolvendo a utilização de um reagente: A – amostra (solução de Fe (III)); R – solução de ácido salicílico. (B) montagem de fluxo envolvendo a utilização de dois reagentes: A – amostra (solução de fosfato); R₁ – solução de heptamolibdato de amónio; R₂ – solução de ácido ascórbico; R₃ – água. P₁ a P₄ – micro-bombas solenóides; V₁ e V₂ – válvulas solenóides (uma entrada/uma saída); D – detector; L₁ e L₂ – reactores; X e Y – pontos de confluência; E – esgoto.

No que diz respeito à montagem de fluxo utilizando as buretas automáticas como dispositivo de inserção e propulsão das soluções de amostra e reagente (Figura 7.1), B_1 era utilizada para a inserção e propulsão da solução de amostra (solução de Fe (III), Cu (II) ou Fe (II), dependendo da reacção), enquanto que B_2 era utilizada para a inserção e propulsão da solução do reagente (Tiron, PAR ou 1,10-fenantrolina, respectivamente).

O ciclo analítico tinha início com o estabelecimento da linha de base, que podia ser efectuado quer através da inserção na montagem de fluxo da solução de amostra, quer através da inserção da solução do reagente. Para o estabelecimento da linha de base com a solução do reagente (Figura 7.3-A), a válvula V_2 era fechada e a bureta B_2 era activada, o que permitia a inserção e propulsão da solução do reagente para o reactor L_1 , através do reactor L_2 e do detector. Após atingir o ponto de confluência X, a solução do reagente era encaminhada para o esgoto através da válvula V_1 , que era mantida aberta.

Posteriormente, a válvula V_1 era fechada, a válvula V_2 era aberta, a bureta B_2 era desactivada e por activação da bureta B_1 a solução de amostra era inserida na montagem de fluxo. A solução de amostra encontrava a solução do reagente no ponto de confluência X, propulsionando-a para trás, em direcção ao reactor L_2 . A dispersão mútua das zonas adjacentes amostra/reagente no reactor L_1 resultava num sinal analítico, o qual era monitorizado quando a interface de reacção passava para o reactor L_2 através do detector.

Após a primeira detecção, podiam ser efectuadas diversas manipulações da interface de reacção, agora presente no reactor L_2 . A interface de reacção podia ser transportada repetidamente entre os reactores L_1 e L_2 , através de

múltiplas inversões do sentido de fluxo (actuação sincronizada da bureta B_2 com a válvula V_1 e da bureta B_1 com a válvula V_2), o que permitia multidetecções de toda a interface de reacção ou de uma zona específica. Alternativamente, a interface de reacção podia ser eliminada para o esgoto através da válvula V_2 , e uma nova interface podia ser estabelecida no ponto de confluência Y, através da inserção da solução de reagente, por actuação da bureta B_2 (V_1 aberta, V_2 fechada). Com esta estratégia, a solução de amostra presente no reactor L_2 era propulsionada, para trás em direcção ao reactor L_1 , resultando num segundo sinal analítico. A interface de reacção inicialmente estabelecida, podia ainda ser parcialmente eliminada para o esgoto, através da válvula V_2 , e a zona mantida no reactor L_2 , podia ser revertida para detecção através da inserção da solução de reagente, por actuação da bureta B_2 (V_1 aberta, V_2 fechada), o que asseguraria por um lado, uma renovação da solução do reagente na interface, caso a reacção não estivesse completa devido a uma limitação de reagente, ou evitaria um efeito de diluição, caso a reacção tivesse sido completa. Outra possível manipulação da interface de reacção seria a sua retenção num dos reactores e a realização de pequenas e múltiplas inversões do sentido de fluxo, antes da detecção, o que iria contribuir para aumentar a interpenetração mútua das zonas amostra/reagente e simultaneamente o tempo de residência.

Se a linha de base tivesse sido estabelecida inicialmente com a solução de amostra, o funcionamento do sistema de fluxo seria idêntico, envolvendo a mesma sincronização dos dispositivos: quando a bureta B_1 era activada a válvula V_2 era mantida aberta, enquanto que quando a bureta B_2 era activada a válvula aberta era V_1 .

Para a substituição das soluções de amostra e reagentes na montagem de fluxo, a bureta B_1 era activada e a válvula V_1 era aberta (V_2 fechada), e a bureta B_2 era activada e a válvula V_2 era aberta (V_1 fechada), respectivamente, o que permitia que as soluções de amostra e reagente fossem encaminhadas directamente para o esgoto sem ter que passar pelo detector. A solução de amostra ou reagente eventualmente retida nos reactores L_1 e L_2 seria posteriormente eliminada através do estabelecimento da linha de base.

No que diz respeito às montagens de fluxo utilizando as micro-bombas solenóides para a inserção e propulsão das soluções de amostra e reagentes, no caso da montagem constituída apenas por duas micro-bombas (Figura 7.2-A), a micro-bomba P_1 era utilizada para a inserção e propulsão da solução do reagente (solução de ácido salicílico), enquanto que a micro-bomba P_2 era utilizada para a inserção e propulsão da solução de amostra (solução de Fe (III)). O funcionamento do sistema (Figura 7.3-B), dada a semelhança da configuração da montagem, era idêntico ao da montagem utilizando as buretas automáticas. Quando a micro-bomba P_1 era activada a válvula V_2 era mantida aberta, enquanto que quando a micro-bomba P_2 era activada a válvula aberta era V_1 . Para a substituição das soluções de amostra e reagente, a micro-bomba P_2 era activada e a válvula V_2 era aberta, e a micro-bomba P_1 era activada e a válvula V_1 era aberta, respectivamente, o que permitia que as soluções de amostra e reagente fossem encaminhadas para o esgoto sem ter que passar pelo detector.

No caso da montagem de fluxo apresentando uma configuração mais complexa (Figura 7.2-B), a micro-bomba P_1 era utilizada para a inserção e propulsão da solução de amostra (solução de fosfato), a micro-bomba P_2 para

a inserção e propulsão de uma solução de heptamolibdato de amónio, a micro-bomba P_3 para a inserção e propulsão de uma solução de ácido ascórbico, enquanto que a micro-bomba P_4 era utilizada para a inserção e propulsão de uma solução inerte (água) de forma a garantir uma configuração simétrica da montagem de fluxo, e desta forma assegurar a utilização de caudais similares durante as etapas de inversão do sentido de fluxo. A micro-bomba P_4 poderia também ser utilizada como uma micro-bomba promotora de diluição, para a análise de amostras muito concentradas. De qualquer forma, a utilização da micro-bomba P_4 não era essencial na montagem de fluxo, uma vez que o caudal durante as etapas de inversão do sentido de fluxo podia ser equilibrado aumentando a frequência de actuação da micro-bomba P_3 .

O funcionamento do sistema (Figura 7.3-C), em analogia com as montagens de fluxo anteriormente apresentadas, dependia da sincronização de duas fases arbitrárias consecutivas. Durante uma das fases, a válvula V_1 era fechada, a válvula V_2 era aberta, e por actuação simultânea das micro-bombas P_1 e P_2 as soluções de fosfato e de heptamolibdato de amónio eram inseridas na montagem analítica, misturadas por acção do fluxo pulsado no ponto de confluência X e propulsionadas através do reactor L_1 , do detector, e do reactor L_2 , para o esgoto (V_2 aberta). Na fase seguinte, e após o estabelecimento da linha base, a válvula V_2 era fechada, a válvula V_1 era aberta, as micro-bombas P_1 e P_2 eram desactivadas e por actuação simultânea das micro-bombas P_3 e P_4 as soluções de ácido ascórbico e água eram inseridas na montagem analítica. Como resultado, as soluções de ácido ascórbico/água encontravam a mistura de fosfato/heptamolibdato no ponto de confluência Y, propulsionando-a para trás, para o reactor L_1 , por acção do fluxo pulsado. O produto de reacção

formado na interface em movimento produzia um sinal analítico, quando a interface passava para o reactor L_1 através do detector. A interface de reacção agora presente no reactor L_1 podia ser submetida às mesmas manipulações anteriormente referidas, desde múltiplas inversões do sentido de fluxo (com ou sem detecção), reversões parciais, renovação de reagentes, entre outras.

Para a substituição das soluções de amostra, e à semelhança das montagens anteriormente apresentadas, a micro-bomba P_1 era activada e a válvula V_1 era aberta (V_2 fechada), o que permitia que a solução de amostra fosse encaminhada directamente para o esgoto sem ter que passar pelo detector.

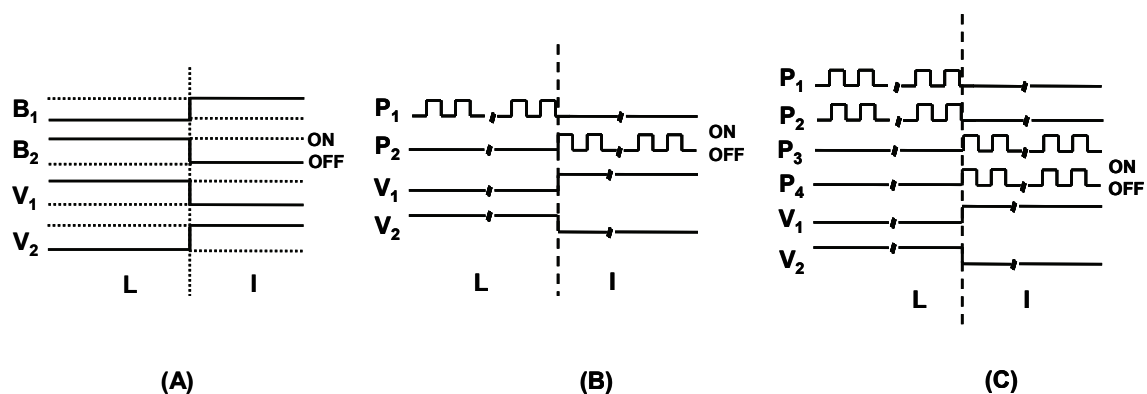


Figura 7.3 – Representação esquemática da posição das buretas, micro-bombas e válvulas durante o ciclo analítico. (A) montagem de fluxo utilizando buretas e (B) e (C) micro-bombas solenóides. B_1 e B_2 – buretas automáticas; P_1 a P_4 – micro-bombas solenóides; V_1 e V_2 – válvulas solenóides; ON – activada; OFF – desactivada; L – definição da linha de base; I – estabelecimento da interface única de reacção.

7.3. Resultados e discussão

Analogamente a outras estratégias de gestão de fluidos em fluxo contínuo, o SIFA é um processo que pode depender de dois fenómenos complementares: o fenómeno físico da dispersão amostra/reagente e o fenómeno químico, resultante da reacção entre a amostra e as espécies reagentes. Contudo em outros processos, quando é utilizado um volume fixo de amostra, mesmo que o equilíbrio físico não seja alcançado, se o tempo de residência e a quantidade de reagente forem adequados pode ser alcançado um equilíbrio químico. Isto explica porque é que nas estratégias anteriores de gestão de fluidos em fluxo contínuo ocorre sempre uma diminuição do sinal analítico e um alargamento da zona de amostra quando se utilizam reactores muito longos nas montagens analíticas; um efeito de diluição prevalece sobre a reacção completa. Além disso, para tempos de residência muito longos o processo de dispersão é controlado primariamente por fenómenos de difusão e o sinal analítico tende a assumir a forma de uma curva gaussiana [2].

No SIFA, e como será demonstrado posteriormente, nenhum dos equilíbrios referidos anteriormente é alcançado: à medida que o tempo de residência aumenta e a penetração de zonas avança, é estabelecido um gradiente de concentrações ao longo da interface de reacção, com razões variáveis amostra/reagente, entre duas secções puras de amostra (C_A) e reagente (C_B) (Figura 7.4). Se o tempo de residência for suficiente algumas zonas da interface podem atingir o equilíbrio químico, o que irá corresponder ao máximo de formação do produto de reacção (P), e consequentemente ao máximo do sinal analítico.

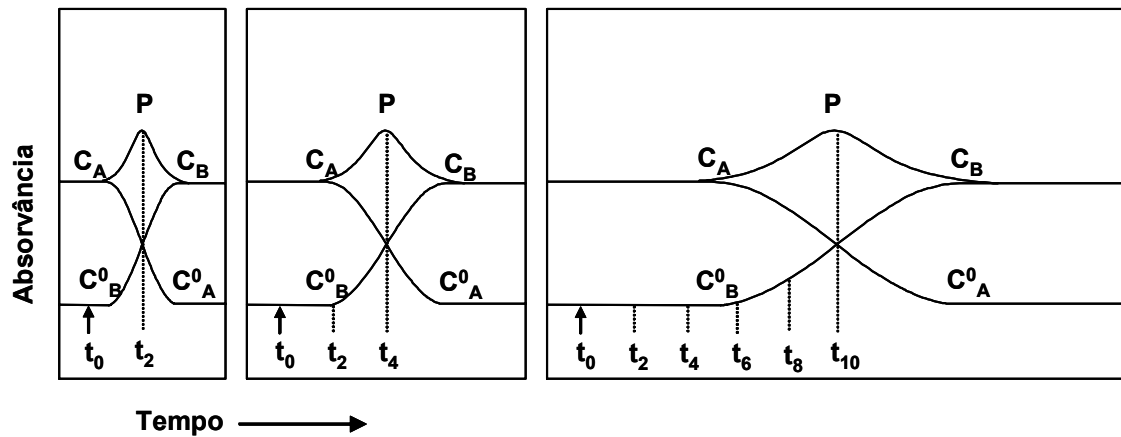


Figura 7.4 – Esquema da evolução do gradiente de concentrações em função do tempo de residência na interface única de reacção. C_A – amostra; C_B – reagente; C_A^0 e C_B^0 – limite da concentração da amostra e reagente, respectivamente, tende para zero; P – produto da reacção.

Um aumento no tempo de residência resultará num alargamento da interface, uma vez que a reacção é estendida às zonas vizinhas, que garantem um excesso permanente de amostra (C_A) e reagente (C_B). Como resultado, independentemente do aumento do tempo de residência, o sinal analítico manter-se-à constante, em oposição às estratégias anteriores de gestão de fluidos, mesmo que sejam utilizados reactores muito longos. Um dos objectivos das estratégias anteriores de gestão de fluidos em fluxo contínuo, a homogeneização da zona de reacção, nunca será atingido num sistema SIFA, e consequentemente, o efeito de diluição observado em alguns sistemas, devido a uma elevada dispersão da zona de amostra, não ocorrerá nos sistemas SIFA.

7.3.1. Avaliação preliminar do funcionamento de um sistema SIFA

Visando o estudo e caracterização dos sistemas SIFA, os primeiros estudos efectuados compreenderam uma avaliação do seu funcionamento, e simultaneamente uma avaliação da influência do fenómeno físico da dispersão. Para tal, foram utilizadas soluções coradas de azul de bromotimol e bórax, as quais foram introduzidas na montagem de fluxo (Figura 7.1) como zonas de amostra e reagente, respectivamente. A utilização das soluções coradas de azul de bromotimol e bórax permitia o registo gráfico de dois perfis de concentração, um para a zona de amostra funcionando como transportadora da interface de reacção e outro para a zona de reagente. A sobreposição gráfica dos dois perfis de concentração permitia a visualização da sobreposição (penetração mútua) das zonas de amostra e reagente na interface de reacção. Numa primeira avaliação foram utilizadas para a propulsão da interface, ambas as soluções de bórax e de azul de bromotimol com concentrações distintas (concentrações compreendidas entre 1,0 e 10,0 mg L⁻¹). O comprimento dos reactores L₁ e L₂ foi fixado em 100 cm, tendo sido fixado o tempo de passo da bureta automática em 0,1 s o que correspondia a um caudal de 1,2 mL min⁻¹. Os resultados obtidos revelaram que quando a solução de azul de bromotimol era utilizada como transportadora da interface (linha de base estabelecida inicialmente com bórax) a amplitude do sinal analítico aumentava para as diferentes concentrações de azul de bromotimol avaliadas até um limite, correspondente à solução de azul de bromotimol não diluída (secção pura de amostra) (Figura 7.5). Por outro lado, quando era utilizado bórax como solução transportadora da interface (linha de base estabelecida inicialmente com a

solução de azul de bromotimol) era observada uma diminuição na amplitude do sinal analítico, até um limite mínimo, correspondente agora à solução de bórax (secção pura de reagente) não diluída. Adicionalmente, e para as diferentes concentrações de azul de bromotimol avaliadas era observado um ponto (linha tracejada, Figura 7.5), em que a dispersão sofrida pelas zonas de amostra e reagente era semelhante. Este ponto, chamado de ponto de isodispersão [6, 9], era independente da concentração de azul de bromotimol, ocorrendo para as condições referidas a um tempo de aproximadamente 38 s. De salientar que neste ponto, a razão entre as concentrações de amostra e reagente, antes e depois de serem introduzidas na montagem de fluxo era semelhante, uma vez que as zonas de amostra e reagente sofriam a mesma dispersão.

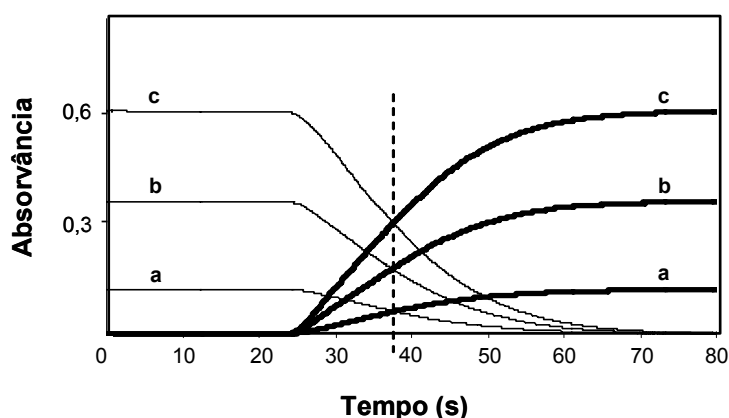


Figura 7.5 – Registo gráfico obtido utilizando as soluções de azul de bromotimol (linha carregada) e bórax (linha suave) como transportadoras da interface. (a) 2,0; (b) 6,0 e (c) 10,0 mg L⁻¹ de azul de bromotimol. A linha tracejada refere o ponto de isodispersão.

Variando o caudal entre 0,6 e 1,2 mL min⁻¹ (o que correspondia a tempos de passo para a bureta automática entre 0,2 e 0,1 s) o registo gráfico dos perfis de concentração para as zonas de amostra e reagente funcionando como transportadoras da interface, era semelhante ao descrito anteriormente, embora se observasse um deslocamento no tempo correspondente ao ponto de isodispersão, como resultado da variação do tempo de residência. Para um caudal de 0,6 mL min⁻¹ o ponto de isodispersão era observado aproximadamente aos 78 s. Adicionalmente, a sobreposição das zonas de amostra e reagente, avaliada através de uma razão entre a largura da zona sobreposta e a largura da zona de amostra (ou reagente) [6] aumentava com o aumento do tempo de residência.

7.3.2. Avaliação do sinal analítico resultante da primeira passagem da interface pelo detector

Após a avaliação do fenómeno físico da dispersão referido em 7.3.1, foram testadas na montagem de fluxo reacções envolvendo diferentes estequiometrias. As reacções seleccionadas foram, como já referido, as reacções de complexação entre o Fe (III) e o reagente Tiron (estequiometria 1:1), entre o Cu (II) e o PAR (1:2) e entre o Fe (II) e a 1,10-fenantrolina (1:3). Os estudos efectuados compreenderam uma avaliação da primeira detecção para as três reacções referidas, nomeadamente em função da concentração da amostra e reagente, e também do tempo de residência (nomeadamente em função do caudal e do comprimento do reactor).

No que diz respeito à reacção do Fe (III) com o reagente Tiron, o seu estudo foi efectuado avaliando inicialmente a influência da concentração do reagente Tiron sobre o sinal analítico. Para a propulsão da interface de reacção foram utilizadas ambas as soluções de Fe (III) com uma concentração de $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e de Tiron com concentrações distintas ($6,25 \times 10^{-4}$ a $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Numa primeira avaliação o comprimento dos reactores L_1 e L_2 (Figura 7.1) foi fixado em 100 cm, tendo sido fixado o caudal em $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ (o que correspondia a um tempo de passo para a bureta automática de 0,2 s).

Os resultados obtidos revelaram que para ambas as soluções de amostra e reagente funcionando como transportadoras da interface de reacção, a amplitude do sinal analítico aumentava com o aumento da concentração do reagente Tiron, sendo o aumento linear até uma razão de concentrações unitária entre o reagente e a amostra (razão molar correspondente à estequiometria do complexo).

Verificou-se ainda que, quando a amostra e o reagente eram inseridos na montagem de fluxo nas mesmas proporções (razão de concentrações unitária entre o Tiron e o Fe (III)), o perfil dos sinais analíticos era semelhante, ocorrendo mesmo uma sobreposição, para ambas as soluções de Fe (III) e de Tiron funcionando como transportadoras da interface de reacção (b, Figura 7.6). Adicionalmente, o tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico era observado aproximadamente aos 78 s, o que correspondia, de acordo com os estudos preliminares, ao ponto de isodispersão.

Quando a amostra e o reagente não se encontravam nas mesmas proporções, o perfil dos sinais analíticos era diferente para as duas soluções funcionando como transportadoras da interface de reacção, nomeadamente em

termos de tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico. À medida que a razão de concentrações entre o reagente e a amostra aumentava (aumento da concentração da solução de tiron, mantendo constante a concentração da solução de Fe (III)) era observada uma diminuição no tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico quando a solução de Tiron funcionava como transportadora da interface de reacção (linha suave, Figura 7.6), enquanto que quando a solução de Fe (III) funcionava como transportadora da interface era observado um aumento no tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico (linha carregada, Figura 7.6).

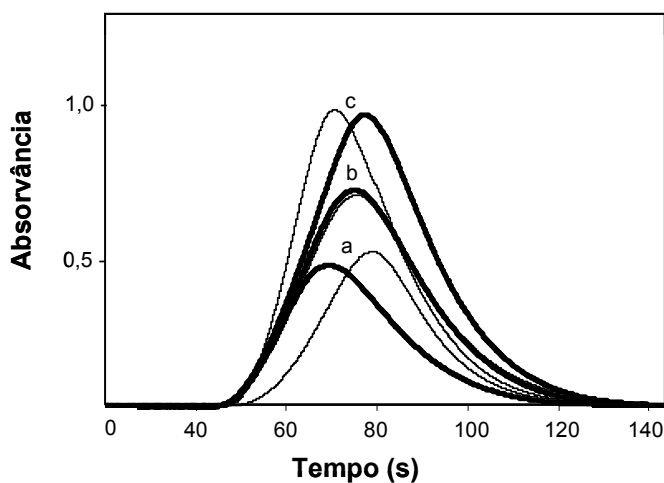


Figura 7.6 – Influência no sinal analítico da concentração do reagente Tiron. (a) $6,25 \times 10^{-4}$, (b) $1,25 \times 10^{-3}$ e (c) $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ Tiron. A linha suave e a linha carregada referem a solução de Tiron e de Fe (III) ($1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), respectivamente, como transportadoras da interface de reacção.

O perfil dos sinais analíticos mostra assim que, independentemente da solução que funciona como transportadora da interface de reacção há um deslocamento do tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico, relativamente ao ponto de isodispersão, para a solução menos concentrada, considerando a estequiometria de 1:1, que participa na interface de reacção.

Relativamente à concentração da solução de Fe (III), a sua influência sobre o sinal analítico foi avaliada para o intervalo de concentrações de 1,79 a $8,95 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, fixando a concentração da solução de Tiron em $5,37 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Verificou-se a semelhança do estudo anterior, que quando a amostra e o reagente eram inseridos na montagem de fluxo nas mesmas proporções (razão de concentrações unitária entre a amostra e o reagente), o perfil dos sinais analíticos era semelhante para ambas as soluções de Fe (III) e de Tiron funcionando como transportadoras da interface de reacção, observando-se o aparecimento do máximo do sinal analítico igualmente no ponto de isodispersão. Quando a amostra e o reagente não se encontravam na mesma proporção, era observado um deslocamento do máximo do sinal analítico, relativamente ao ponto de isodispersão, para a solução menos concentrada que participava na interface de reacção. Adicionalmente, era também observado um aumento linear na amplitude do sinal analítico com o aumento da concentração da solução de Fe (III), até uma razão de concentrações unitária entre a amostra e o reagente.

Variando o comprimento dos reactores entre 25 e 200 cm, e deste modo o tempo de residência, era observado para as diferentes razões de concentração entre reagente e amostra, um comportamento semelhante ao descrito anteriormente, embora se observasse, para ambas as soluções de Fe

(III) e de Tiron funcionando como transportadoras da interface de reacção, um aumento na amplitude do sinal analítico até 100 cm de comprimento de reactor, a partir do qual estabilizava (Figura 7.7). O aumento do tempo de residência era também acompanhado de um alargamento do sinal analítico (largura do pico), como resultado da extensão da reacção às zonas vizinhas da interface de reacção.

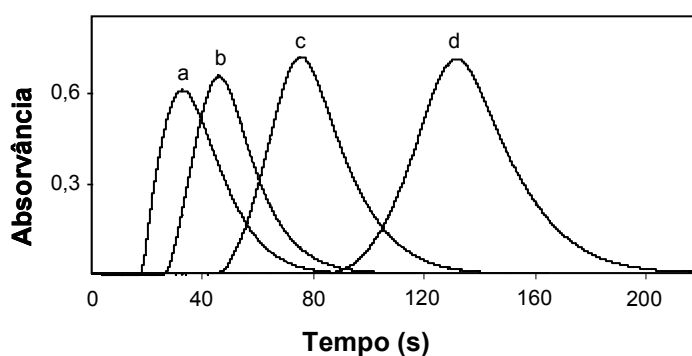


Figura 7.7 – Influência no sinal analítico do comprimento do reactor. (a) 25 cm, (b) 50 cm, (c) 100 cm e (d) 200 cm. A figura é relativa à solução de Tiron como transportadora da interface de reacção e a uma razão de concentrações unitária entre o reagente e a amostra.

No que diz respeito ao complexo formado entre o Cu (II) e o PAR (estequiometria 1:2), o seu estudo foi efectuado avaliando inicialmente a influência da concentração da solução de Cu (II) sobre o sinal analítico. Para a propulsão da interface de reacção foram utilizadas ambas as soluções de PAR ($1,57 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) e de Cu (II) com concentrações distintas ($1,97 \times 10^{-6}$ a $6,30 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). O comprimento dos reactores L₁ e L₂ (Figura 7.1) foi fixado

em 100 cm, tendo sido fixado o tempo de passo da bureta automática em 0,2 s, o que correspondia a um caudal de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$.

Verificou-se que, para ambas as soluções de Cu (II) e PAR funcionando como transportadoras da interface de reacção, a amplitude do sinal analítico aumentava linearmente com o aumento da concentração da solução de Cu (II), até uma concentração de $7,87 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, o que correspondia a uma razão de concentrações entre o PAR e o Cu (II), inserida na montagem de fluxo, igual a 2 (razão molar correspondente à estequiometria do complexo). Verificou-se ainda que quando a solução de PAR funcionava como transportadora da interface de reacção a amplitude do sinal analítico era ligeiramente superior, quando comparada com a amplitude obtida utilizando a solução de Cu (II) (Figura 7.8-A).

Relativamente ao perfil do sinal analítico verificou-se, à semelhança do observado na reacção entre o Fe (III) e o reagente Tiron, que este era diferente dependendo da solução que funcionava como transportadora da interface de reacção, nomeadamente em termos de tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico. Quando a solução de Cu (II) funcionava como transportadora da interface de reacção, o tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico diminuía com o aumento da concentração de Cu (II), enquanto que quando a solução de PAR funcionava como transportadora era observado exactamente o oposto. Para uma razão de concentrações entre o PAR e o Cu (II) igual 2 (correspondente à estequiometria do complexo), o tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico (c, Figura 7.8-A) era semelhante para ambas as soluções de Cu (II) e PAR funcionando como transportadoras da interface de

reação, ocorrendo aproximadamente aos 78 s, o que correspondia de acordo com os estudos preliminares ao ponto de isodispersão.

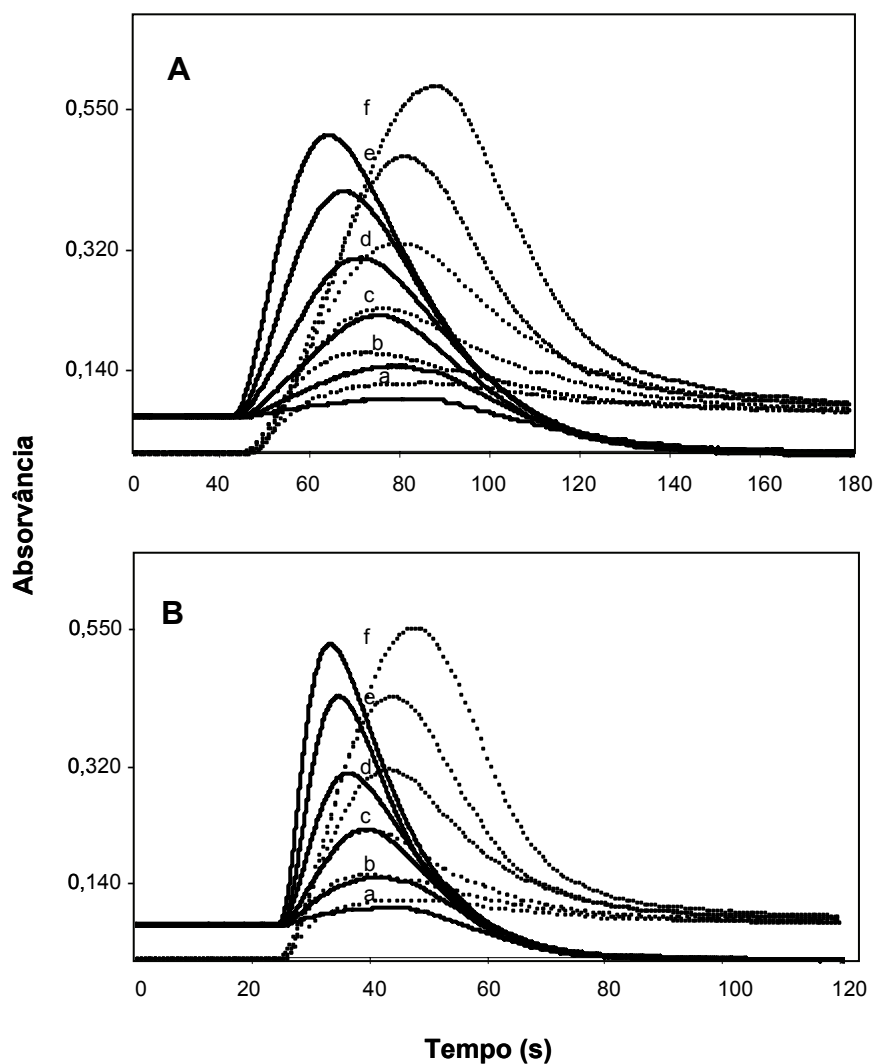


Figura 7.8 – Influência no sinal analítico da concentração de Cu (II). (A) $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ e (B) $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. (a) $1,97 \times 10^{-6}$, (b) $3,94 \times 10^{-6}$, (c) $7,87 \times 10^{-6}$, (d) $1,57 \times 10^{-5}$, (e) $3,15 \times 10^{-5}$ e (f) $6,30 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Cu (II). A linha tracejada e a linha inteira referem a solução de PAR ($1,57 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e de Cu (II), respectivamente, como transportadoras da interface de reação.

Independentemente da solução que funcionava como transportadora da interface de reacção, era então observado um deslocamento do máximo do sinal analítico, relativamente ao ponto de isodispersão, para a solução em défice que participava na interface de reacção.

Variando o tempo de passo entre 0,2 e 0,1 s, o que correspondia a caudais entre 0,6 e 1,2 mL min⁻¹, e deste modo variando o tempo de residência, era observado um comportamento semelhante ao descrito anteriormente, embora se observasse, quando a solução de PAR funcionava como transportadora da interface de reacção, uma pequena diminuição na amplitude do sinal analítico com a diminuição do tempo de residência (Figura 7.8). Como resultado, a pequena diferença observada na amplitude dos sinais analíticos para um caudal de 0,6 mL min⁻¹ desaparecia para um caudal de 1,2 mL min⁻¹. Para um caudal de 1,2 mL min⁻¹ o tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico, para uma razão de concentrações entre o PAR e o Cu (II) igual a 2, ocorria aproximadamente aos 38 s, o que correspondia igualmente ao ponto de isodispersão (c, Figura 7.8-B).

Relativamente à concentração da solução de PAR, a sua influência sobre o sinal analítico foi avaliada para o intervalo de concentrações $3,94 \times 10^{-6}$ a $1,26 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, fixando a concentração da solução de Cu (II) em $1,57 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Verificou-se que a amplitude do sinal analítico, à semelhança do estudo da concentração de Cu (II), aumentava linearmente com a concentração de PAR, até uma concentração de $3,14 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, o que correspondia a uma razão de concentrações entre o PAR e o Cu (II), inserida na montagem de fluxo, igual a 2 (razão molar correspondente à estequiometria do complexo). Quando a solução de PAR funcionava como transportadora da interface era

igualmente observado um ligeiro aumento na amplitude do sinal analítico, quando comparado com a amplitude obtida utilizando a solução de Cu (II).

No que diz respeito ao perfil dos sinais analíticos, as modificações observadas eram também semelhantes às já anteriormente descritas. Assim, quando a solução de PAR funcionava como transportadora da interface de reacção, o tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico diminuía à medida que a concentração de PAR aumentava, enquanto que quando a solução de Cu (II) funcionava como transportadora da interface era observado exactamente o oposto. Para uma razão de concentrações entre o PAR e o Cu (II) igual a 2 (o que correspondia à estequiometria do complexo) o tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico era semelhante para ambas as soluções de PAR e Cu (II) funcionando como transportadoras da interface, embora se observasse um pequeno desfasamento (a sobreposição dos sinais analíticos não era total). Variando o tempo de residência, através da variação do caudal entre 0,6 e 1,2 mL min⁻¹, o desfasamento anteriormente referido diminuía, assim como a amplitude do sinal analítico quando a solução de PAR funcionava como transportadora da interface de reacção.

No que diz respeito ao complexo formado entre o Fe (II) e a 1,10-fenantrolina (estequiometria 1:3), o seu estudo foi efectuado avaliando inicialmente a influência da concentração de 1,10-fenantrolina sobre o sinal analítico. Para a propulsão da interface de reacção foram utilizadas ambas as soluções de Fe (II) ($5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) e de 1,10-fenantrolina com concentrações distintas (concentrações compreendidas entre $2,5 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). O comprimento dos reactores L₁ e L₂ foi fixado em 100 cm, e o tempo de passo em 0,2 s, o que correspondia a um caudal de 0,6 mL min⁻¹.

Verificou-se, para ambas as soluções de Fe (II) e de 1,10-fenantrolina funcionando como transportadoras da interface de reacção, que a amplitude do sinal analítico aumentava linearmente com o aumento da concentração da solução de 1,10-fenantrolina, até uma concentração de $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, o que correspondia a uma razão de concentrações entre a 1,10-fenantrolina e o Fe (II), inseridas na montagem de fluxo, igual a 3 (razão molar correspondente à estequiometria do complexo). Adicionalmente, e tal como observado com as reacções anteriores, o perfil dos sinais analíticos era diferente dependendo da solução que funcionava como transportadora da interface de reacção, particularmente em termos de aparecimento do máximo do sinal analítico. Quando a solução de 1,10-fenantrolina funcionava como transportadora da interface de reacção, e à medida que a sua concentração aumentava (mantendo constante a concentração da solução de Fe (II)) era observada uma diminuição no tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico, enquanto que quando a solução de Fe (II) era utilizada como transportadora da interface de reacção era observado exactamente o contrário. Para uma razão de concentrações entre a 1,10-fenantrolina e o Fe (II) igual a 3, e à semelhança do observado na reacção entre o Cu (II) e o PAR para uma razão de concentrações entre o reagente e a amostra igual a 2, era observado uma pequena diferença no tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico (a sobreposição dos sinais analíticos não era total). Diminuindo o tempo de residência, a diferença observada diminuía, observando-se uma sobreposição dos sinais analíticos praticamente total para ambas as soluções de 1,10-fenantrolina e de Fe (II) funcionando como transportadoras da interface de reacção, a um caudal de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. A um caudal de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ o tempo de

aparecimento do máximo do sinal analítico ocorria aproximadamente aos 38 s, o que correspondia de acordo com os estudos preliminares ao ponto de isodispersão.

Relativamente à influência da concentração da solução de Fe (II) sobre o sinal analítico, o seu estudo foi efectuado para o intervalo de concentrações de $2,5 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, fixando a concentração da solução de 1,10-fenantrolina em $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Verificou-se, à semelhança do estudo anterior, que para ambas as soluções de Fe (II) e de 1,10-fenantrolina funcionando como transportadoras da interface, a amplitude do sinal analítico aumentava linearmente com o aumento da concentração da solução de Fe (II), até uma concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, o que correspondia a uma razão de concentrações entre o reagente e a amostra igual a 3 (razão molar correspondente à estequiometria do complexo). Também à semelhança do estudo anterior e do observado com as reacções entre o Fe (III) e o reagente Tiron e entre o Cu (II) e o PAR, o perfil dos sinais analíticos variava com a solução transportadora, nomeadamente em termos de aparecimento do máximo do sinal analítico, observando-se um deslocamento em direcção à solução que se encontrava em défice na interface de reacção. Assim, à medida que aumentava a concentração da solução de Fe (II) o tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico diminuía quando a solução de Fe (II) funcionava como transportadora da interface de reacção (linha inteira, Figura 7.9-A), verificando-se exactamente o oposto quando a solução de 1,10-fenantrolina funcionava como transportadora da interface de reacção (linha tracejada, Figura 7.9-A).

Para uma razão de concentrações entre a 1,10-fenantrolina e o Fe (II) igual a 3, o tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico era semelhante para ambas as soluções funcionando como transportadoras da interface, embora se observasse uma ligeira diferença (c, Figura 7.9-A).

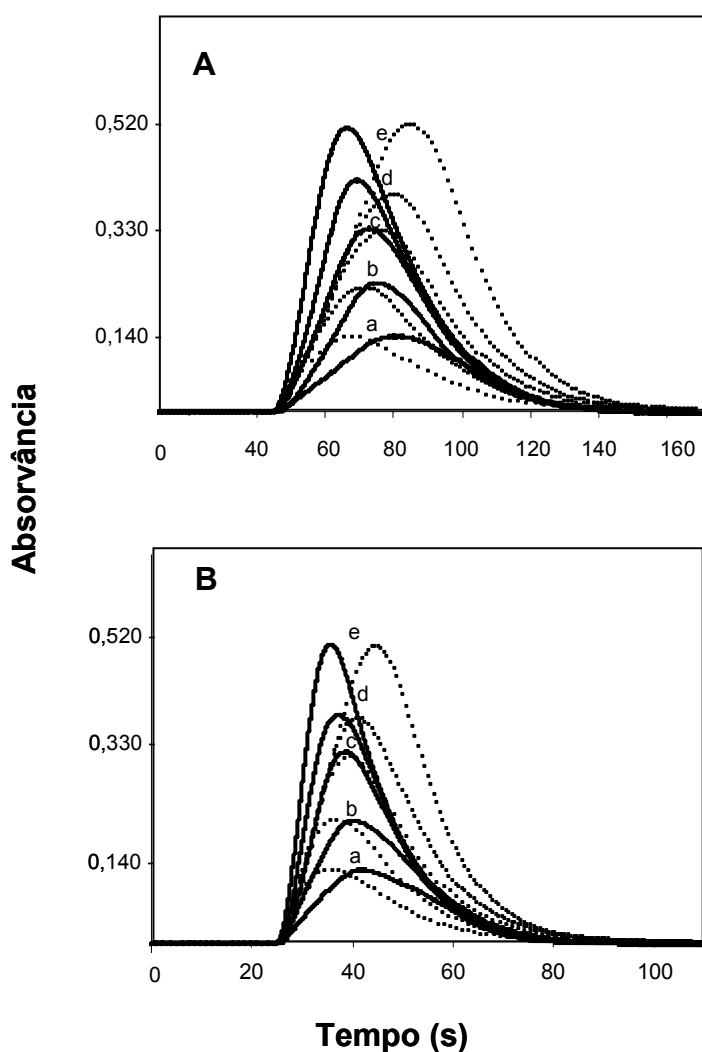


Figura 7.9 – Influência no sinal analítico da concentração de Fe (II). (A) 0,6 mL min⁻¹ e (B) 1,2 mL min⁻¹. (a) 2,5×10⁻⁵, (b) 5,0×10⁻⁵, (c) 1,0×10⁻⁴, (d) 1,5×10⁻⁴ e (e) 3,0×10⁻⁴, mol L⁻¹ Fe (II). A linha tracejada e a linha inteira referem a solução de 1,10-fenantrolina e Fe (II), respectivamente, como transportadoras da interface de reacção.

Variando o tempo de residência, através da variação do caudal entre 0,6 e 1,2 mL min⁻¹, a ligeira diferença diminuía observando-se praticamente uma sobreposição dos sinais analíticos para ambas as soluções de Fe (II) e de 1,10-fenantrolina funcionando como transportadoras da interface de reacção (c, Figura 7.9-B).

7.3.3. Hifenização dos sistemas SIFA com o conceito de multi-impulsão

Considerando a mistura superior do fluxo pulsado inerente aos sistemas multi-impulsão, e esperando os seus efeitos favoráveis na ocorrência da mistura da interface única, foram ainda desenvolvidas duas montagens de fluxo utilizando micro-bombas solenóides como dispositivos de inserção e propulsão das soluções de amostra e reagentes. Uma das montagens (Figura 7.2-A) era constituída por duas micro-bombas (substituição das buretas automáticas na montagem de fluxo da Figura 7.1), enquanto que a segunda montagem (Figura 7.2-B) apresentando uma configuração mais complexa, era constituída por quatro micro-bombas.

Os primeiros estudos efectuados visaram uma comparação entre o fluxo pulsado (inerente aos sistemas multi-impulsão) e laminar (através da utilização das buretas automáticas), e deste modo, a avaliação da sua influência na extensão da interpenetração amostra/reagente e no gradiente de concentrações da interface de reacção. Para tal foi utilizada a reacção do Fe (III) com o reagente Tiron, a qual foi testada nas montagens de fluxo utilizando as buretas automáticas (Figura 7.1) e as micro-bombas solenóides (Figura 7.2-A). Para a propulsão da interface de reacção foram utilizadas ambas as

soluções de Fe (III) e do reagente Tiron, com uma concentração de $1,25 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. O comprimento dos reactores foi fixado em ambas as montagens em 100 cm, tendo sido utilizado um caudal de 0,6 mL min⁻¹.

Os resultados obtidos revelaram que a amplitude do sinal analítico era ligeiramente superior quando as micro-bombas eram utilizadas como dispositivo de inserção e propulsão das soluções de amostra e reagente (a, Figura 7.10). Adicionalmente, a dispersão mútua sofrida pela zona de amostra/reagente era menor com as micro-bombas solenóides, resultando num sinal analítico (largura de pico) mais estreito, e com o tempo de máxima detecção ligeiramente inferior. Os resultados obtidos confirmam assim a mistura superior do fluxo pulsado inerente aos sistemas MPFS, relativamente às montagens apresentando um fluxo estritamente laminar.

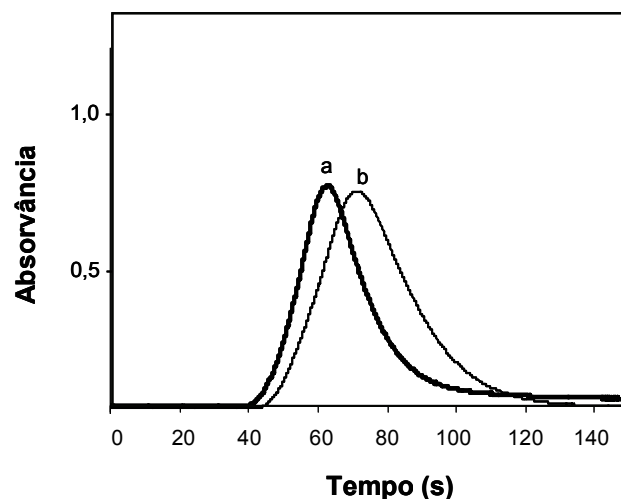


Figura 7.10 – Influência do fluxo pulsado (a) e laminar (b) sobre o sinal analítico. A figura é relativa à solução de Tiron como transportadora da interface de reacção.

Procurando contribuir para a caracterização do desempenho dos sistemas SIFA a montagem de fluxo incorporando as duas micro-bombas foi ainda avaliada através da implementação da reacção do Fe (III) com o ácido salicílico. Os estudos efectuados à semelhança da montagem utilizando as buretas automáticas, compreenderam uma avaliação da primeira detecção, em função do tempo de residência e também da concentração da amostra e reagente. No que diz respeito à influência do tempo de residência sobre o sinal analítico, o seu estudo foi efectuado testando na montagem analítica reactores com comprimentos de 50, 100, 200 e 400 cm. Para a propulsão da interface de reacção foram utilizadas ambas as soluções de ácido salicílico ($1,45 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e de Fe (III) com concentrações distintas (1,8 a $9,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). Este estudo foi efectuado fixando o caudal em 0,8 mL min⁻¹ e o volume óptico da célula de fluxo em 18 µL.

Os resultados obtidos revelaram que quando a solução de Fe (III) era utilizada como transportadora da interface de reacção (linha de base estabelecida com a solução de ácido salicílico) a amplitude do sinal analítico aumentava ligeiramente até 100 cm de comprimento de reactor, e depois estabilizava, como resultado da extensão da reacção às zonas vizinhas da interface, que garantiam como já referido um excesso permanente de amostra e reagente. Quando a solução de ácido salicílico era utilizada como transportadora da interface o comportamento era semelhante, embora a amplitude do sinal analítico aumentasse ligeiramente até 200 cm de comprimento de reactor. Para ambas as soluções era observado um alargamento do sinal analítico (largura do pico) com o aumento do

comprimento do reactor, o qual resultava como também já referido da extensão da reacção às zonas vizinhas da interface.

Verificou-se ainda que, quando a solução de Fe (III) era utilizada como transportadora da interface de reacção a largura do sinal analítico (largura do pico na linha de base) era ligeiramente superior, quando comparada com a obtida utilizando a solução de ácido salicílico (Figura 7.11). Adicionalmente, o perfil dos sinais analíticos era diferente para as duas soluções funcionando como transportadoras da interface, nomeadamente em termos de tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico, que era menor quando a solução de ácido salicílico funcionava como transportadora da interface (Figura 7.11-A). Para além disso, quando a solução de ácido salicílico funcionava como transportadora da interface, o tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico aumentava com o aumento da concentração da solução de Fe (III) (Figura 7.11-A), enquanto que quando a solução de Fe (III) funcionava como transportadora da interface, o tempo de aparecimento do máximo do sinal analítico diminuía com o aumento da concentração da solução de Fe (III) (B, Figura 7.11). O perfil dos sinais analíticos, e à semelhança do observado com a montagem utilizando as buretas automáticas, mostra que, independentemente da solução que funciona como transportadora da interface, o máximo do sinal analítico está mais próximo da solução menos concentrada que participa na interface de reacção (solução de Fe (III), considerando as elevadas razões de concentração ácido salicílico/Fe (III) utilizadas). Deste modo, à medida que a concentração da solução de Fe (III) aumenta, diminuindo a razão de concentrações ácido salicílico/Fe (III), o máximo do sinal analítico desloca-se em direcção à solução de ácido salicílico.

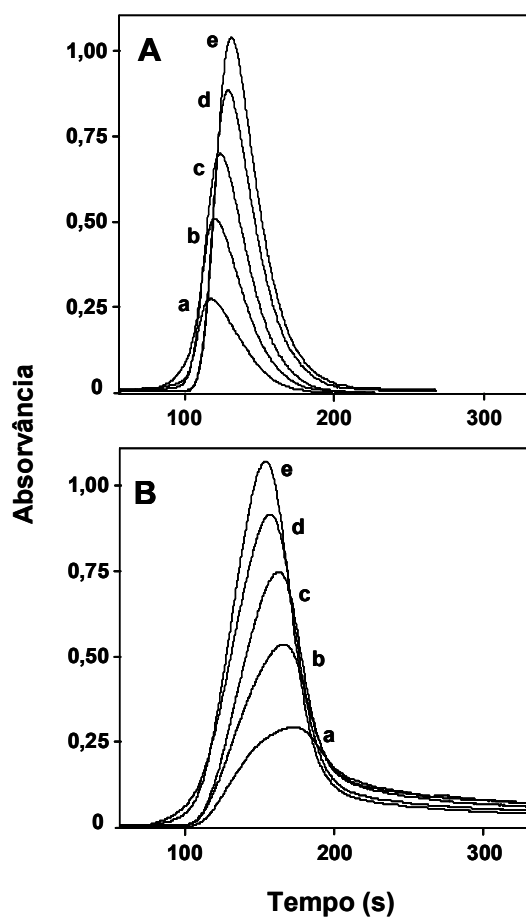


Figura 7.11 – Influência no sinal analítico da concentração de Fe (III). (A) solução de ácido salicílico ($1,45 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e (B) Fe (III) como transportadoras da interface. (a) $1,8 \times 10^{-4}$; (b) $3,6 \times 10^{-4}$; (c) $5,4 \times 10^{-4}$; (d) $7,2 \times 10^{-4}$ e (e) $9,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Fe (III). A figura é relativa à utilização de reactores com 200 cm de comprimento.

Relativamente à concentração da solução de ácido salicílico, a sua influência sobre o sinal analítico foi avaliada para o intervalo de concentrações de $3,6$ a $18 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, fixando a concentração da solução de Fe (III) em $5,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Verificou-se (Figura 7.12) que a amplitude do sinal analítico,

em contraste com o estudo anterior, não era tão afectada com o aumento da concentração da solução de ácido salicílico, mesmo utilizando reactores (L_1 e L_2 , Figura 7.2-A) com 400 cm de comprimento, o que é explicado pela elevada razão inicial de concentrações ácido salicílico/Fe (III).

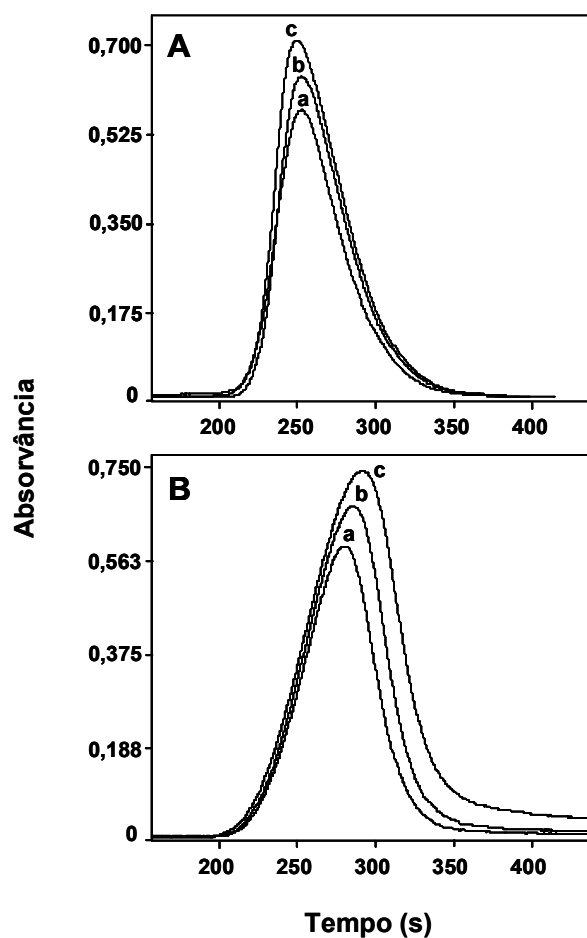


Figura 7.12 – Influência no sinal analítico da concentração de ácido salicílico. (A) solução de ácido salicílico e (B) Fe (III) ($5,4 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) funcionando como transportadoras da interface. (a) $3,6 \times 10^{-3}$; (b) $7,2 \times 10^{-3}$ e (c) 18×10^{-3} mol L^{-1} de ácido salicílico. A figura é relativa à utilização de reactores com 400 cm de comprimento.

Por sua vez, as modificações no perfil dos sinais analíticos também não eram significativas, particularmente quando a solução de ácido salicílico era utilizada como transportadora da interface de reacção (Figura 7.12-A). Contudo, era observado um pequeno deslocamento do máximo do sinal analítico, o qual ocorria agora, independentemente da solução utilizada como transportadora da interface, na direcção da solução de Fe (III).

No que diz respeito à montagem de fluxo da Figura 7.2-B, esta foi utilizada como referido anteriormente para a avaliação da interface de reacção envolvendo quatro soluções. Na verdade, as quatro soluções eram previamente misturadas duas a duas, o que poderia ser considerado individualmente como duas soluções que se encontravam numa única interface. A reacção era baseada na reacção do fosfato com o heptamolibdato de amónio em meio ácido, com formação de heteropoliácidos fosfomolibdicos (complexo de coloração amarela), e sua posterior redução a azul de molibdénio por acção do ácido ascórbico [16]. Uma vez que se decidiu estabelecer uma montagem de fluxo com uma configuração simétrica, de forma a possibilitar durante as etapas de inversão do sentido de fluxo a utilização de frequências de pulso similares para as micro-bombas solenóides, foi introduzida na montagem uma quarta micro-bomba, a qual como já referido, era utilizada para a inserção e propulsão de uma solução que não interferia na reacção (água).

Relativamente à influência do tempo de residência sobre a primeira detecção, o seu estudo foi efectuado testando na montagem analítica reactores (L_1 e L_2 , Figura 7.2-B) com comprimentos entre 10 e 200 cm. Este estudo foi efectuado utilizando para a propulsão da interface, ambas as soluções de fosfato (com concentrações compreendidas entre $1,1$ a $4,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e

heptamolibdato de amónio ($5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) (actuação combinada de P_1 e P_2 , Figura 7.2-B) e as soluções de ácido ascórbico ($6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e água (actuação combinada de P_3 e P_4 , Figura 7.2-B). O tempo de pulso das micro-bombas foi fixado em 0,6 segundos, o que correspondia a uma frequência de actuação das micro-bombas de $100 \text{ pulsos min}^{-1}$ e a um caudal por solução de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

Os resultados obtidos revelaram que a amplitude do sinal analítico (altura de pico) aumentava com o aumento do tempo de residência, quer utilizando a solução de fosfato e heptamolibdato de amónio como transportadoras da interface, quer utilizando a solução de ácido ascórbico e água (Figura 7.13), o que confirma a cinética lenta da reacção quando comparada com a reacção do Fe (III) com o ácido salicílico. Adicionalmente, e para ambas as soluções funcionando como transportadoras da interface, era também observado um alargamento do sinal analítico (largura do pico) com o aumento do comprimento do reactor, o qual resultava como já anteriormente referido da extensão da reacção às zonas vizinhas da interface. Verificou-se ainda que, a magnitude do sinal analítico era ligeiramente superior quando a solução de fosfato e heptamolibdato de amónio funcionavam como transportadoras da interface, observando-se um aumento nesta diferença à medida que a concentração de fosfato aumentava. Contudo a diferença observada diminuía com o aumento do comprimento do reactor.

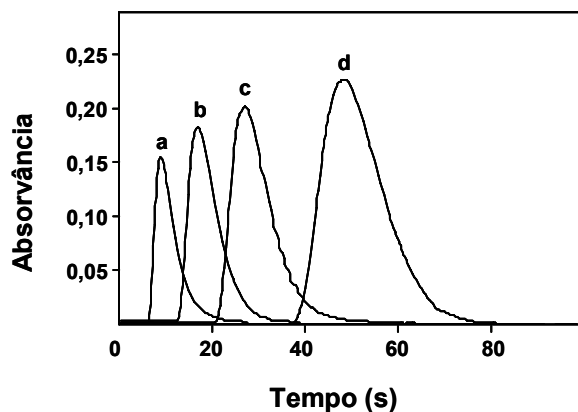


Figura 7.13 – Influência no sinal analítico do comprimento do reactor: (a) 10 cm; (b) 50 cm; (c) 100 cm e (d) 200 cm. A figura é relativa a uma solução de fosfato $2,1 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} e à solução de ácido ascórbico e água como transportadoras da interface.

No que diz respeito ao perfil do sinal analítico, verificou-se que o tempo de máxima detecção era ligeiramente inferior quando a solução de ácido ascórbico e água funcionavam como transportadoras da interface (para um reactor com um comprimento de 100 cm o máximo do sinal analítico era obtido aproximadamente aos 27 segundos, Figura 7.14-B), não se observando no entanto um deslocamento do máximo do sinal analítico com a variação da concentração de fosfato (Figura 7.14-B). Com a solução de fosfato e de heptamolibdato de amónio funcionando como transportadoras da interface o comportamento observado era semelhante, embora os sinais analíticos apresentassem um perfil mais gaussiano (Figura 7.14-A). O máximo do sinal analítico era obtido aproximadamente aos 40 segundos.

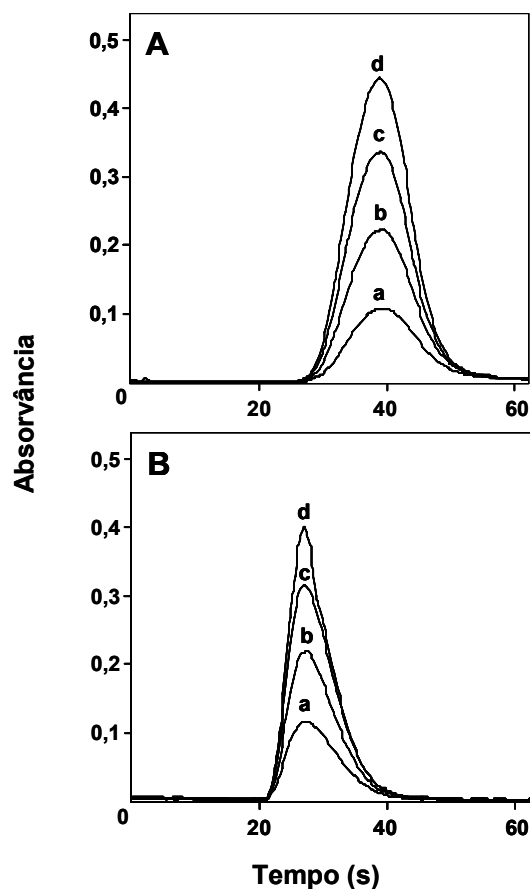


Figura 7.14 – Influência no sinal analítico da concentração de fosfato. (A) solução de fosfato e heptamolibdato de amónio e (B) solução de ácido ascórbico e água como transportadoras da interface. (a) $1,1 \times 10^{-4}$; (b) $2,1 \times 10^{-4}$; (c) $3,2 \times 10^{-4}$; (d) $7,2 \times 10^{-4}$ e (e) $4,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de fosfato. A figura refere a utilização de reactores com 100 cm de comprimento.

Variando a concentração de heptamolibdato de amónio entre $2,5 \times 10^{-3}$ e $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e fixando a concentração de fosfato em $3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e de ácido ascórbico em $6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ verificou-se que a amplitude do sinal analítico aumentava ligeiramente até $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e depois estabilizava,

quer utilizando a solução de fosfato e de heptamolibdato de amónio, quer utilizando a solução de ácido ascórbico e água como transportadoras da interface, não se observando alterações significativas no perfil dos sinais analíticos, nomeadamente nos tempos de máxima detecção para as diferentes concentrações avaliadas.

No que diz respeito à concentração de ácido ascórbico, variando a concentração entre 3×10^{-2} e 1×10^{-1} mol L⁻¹, era observado um aumento na amplitude do sinal analítico com o aumento da concentração de ácido ascórbico, contudo e à semelhança do estudo anterior o perfil dos sinais analíticos era semelhante para as diferentes concentrações avaliadas.

7.3.4. Inversão do sentido de fluxo

A inversão do sentido de fluxo numa montagem em fluxo contínuo cria uma zona composta, na qual as zonas de amostra e reagente penetram uma na outra [6, 18]. A inversão do sentido de fluxo, controlada em função de uma rotina baseada em tempo ou na contagem do número de pulsos devido à utilização das micro-bombas solenóides, pode ser efectuada após a passagem de toda a interface no detector (reversão efectuada no momento em que a amplitude do sinal analítico atinge a linha de base), ou seleccionando uma zona específica da interface, a qual pode ser transportada repetidamente para a frente e para trás, de tal modo que todas as medições são efectuadas sem que se observe um retorno do sinal analítico à linha de base. As múltiplas detecções possibilitam assim, a recolha de informação cinética de toda a interface ou o estabelecimento do perfil cinético de uma zona específica.

Alternativamente, a inversão do sentido de fluxo pode ser efectuada apenas num dos reactores, antes da detecção.

A influência da realização de múltiplas inversões do sentido de fluxo sobre o sinal analítico num sistema SIFA foi avaliada na reacção entre o Fe (III) e o ácido salicílico, por inversão de toda a interface, após o retorno do sinal analítico à linha de base. Para a realização deste estudo foram utilizadas soluções de ácido salicílico ($1,45 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e de Fe (III) com concentrações distintas ($1,8$ a $9,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). O comprimento dos reactores foi fixado em 100 cm, tendo sido fixado o tempo de pulso das micro-bombas em 0,6 s, o que correspondia a uma frequência de actuação de 100 pulsos min⁻¹ e a um caudal por solução de 0,8 mL min⁻¹.

Os resultados obtidos (Figura 7.15) revelaram que quando a solução de ácido salicílico funcionava como transportadora da interface de reacção a amplitude do sinal analítico era ligeiramente inferior, quando comparada com a obtida utilizando a solução de Fe (III). A diferença observada podia ser devido à ocorrência do efeito de Schlieren [19], como resultado da formação do gradiente de concentrações entre as duas soluções, resultando na formação de uma interface com diferentes índices de refacção, os quais podiam provocar a refacção ou reflexão do feixe de radiação incidente, focalizando-o em direcção ao detector ou provocando o espalhamento da radiação. Contudo, após a inversão da direcção das soluções na entrada da célula de fluxo, o que resultava numa reversão do gradiente de concentrações atravessado pelo feixe de radiação, verificou-se que a diferença na amplitude dos sinais analíticos se mantinha.

Verificou-se ainda que quando a solução de Fe (III) funcionava como transportadora da interface de reacção a largura do sinal analítico na linha de base era bastante superior, quando comparada com a largura obtida utilizando a solução de ácido salicílico. Efectivamente, o tempo correspondente à largura do sinal analítico na linha de base era aproximadamente 180 s quando a solução de Fe (III) funcionava como transportadora da interface, enquanto que quando a solução de ácido salicílico funcionava como transportadora o tempo era aproximadamente 90 s. Adicionalmente, com a solução de Fe (III) como transportadora da interface, a largura do sinal analítico aumentava ligeiramente com o aumento do número de inversões do sentido de fluxo, enquanto que com a solução de ácido salicílico se mantinha praticamente constante. Por outro lado, para ambas as soluções funcionando como transportadoras da interface, a amplitude do sinal analítico não era afectada pelo aumento do tempo de residência, resultante das múltiplas inversões do sentido de fluxo, uma vez que a reacção na zona central da interface já estava completa.

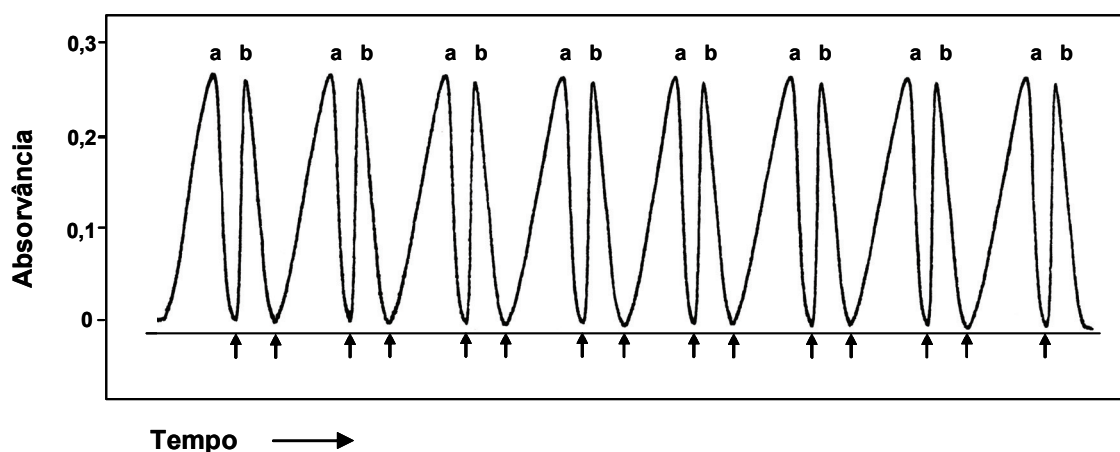


Figura 7.15 – Múltiplas inversões do sentido de fluxo (16) para a interface de reacção ácido salicílico/Fe (III). (a) solução de Fe (III) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e (b) ácido salicílico como transportadoras da interface. As setas pequenas indicam o ponto de inversão do sentido de fluxo. O tempo correspondente à largura do pico na linha de base era aproximadamente para (a) 180 s e para (b) 90 s.

A influência de múltiplas inversões do sentido de fluxo foi ainda avaliada na montagem SIFA envolvendo as quatro micro-bombas, através da realização de uma rotina baseada em tempo. Tendo em conta os resultados obtidos após a avaliação da primeira detecção, nomeadamente no que diz respeito aos tempos de residência (secção 7.3.3, Figura 7.14), a rotina estabelecida foi baseada numa inversão automática do sentido de fluxo, e consequentemente da interface de reacção, após um período de 50, 60 e 70 s (a contagem do tempo era efectuada pelo computador através de um rotina previamente estabelecida). Para a propulsão da interface, foram utilizadas ambas as soluções de fosfato (com concentrações compreendidas entre $1,1$ a $4,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e heptamolibdato de amónio ($5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) (actuação combinada de

P₁ e P₂, Figura 7.2-B) e as soluções de ácido ascórbico (6×10^{-2} mol L⁻¹) e água (actuação combinada de P₃ e P₄). O tempo de pulso das micro-bombas foi fixado em 0,6 segundos, o que correspondia a uma frequência de actuação de 100 pulsos min⁻¹ e a um caudal por solução de 0,8 mL min⁻¹, tendo sido fixado o comprimento dos reactores em 100 cm.

Verificou-se (Figura 7.16) que a largura do sinal analítico na linha de base, em contraste com o observado na reacção do Fe (III) com o ácido salicílico, era semelhante independentemente das soluções utilizadas como transportadoras da interface. Contudo, quando a inversão do sentido de fluxo era efectuada após um período de 50 s (Figura 7.16-A), nas sucessivas inversões do sentido de fluxo, a amplitude do sinal analítico quando a solução de ácido ascórbico e água eram utilizadas como transportadoras da interface (b, Figura 7.16-A) era ligeiramente superior, quando comparada com a amplitude obtida utilizando as soluções de fosfato e heptamolibdato de amónio (a, Figura 7.16-A). Quando a inversão do sentido de fluxo era efectuada após um período de 60 s (Figura 7.16-B), a amplitude do sinal analítico era semelhante nas sucessivas inversões e para ambas as soluções funcionando como transportadoras da interface, enquanto que quando a inversão do sentido de fluxo era efectuada após um período de 70 s (Figura 7.16-C), a amplitude dos sinais analíticos quando a solução de fosfato e heptamolibdato de amónio eram utilizadas como transportadoras da interface (a, Figura 7.16-C) era agora superior à obtida utilizando as soluções de ácido ascórbico e água (b, Figura 7.16-C). Aparentemente, um aumento no tempo de inversão do sentido de fluxo resultava numa diminuição da amplitude do sinal analítico quando as soluções de ácido ascórbico e água funcionavam como transportadoras da interface,

enquanto que para as soluções de fosfato e heptamolibdato de amónio como transportadoras da interface a amplitude do sinal analítico parecia não ser afectada para os diferentes intervalos de inversão do sentido de fluxo avaliados.

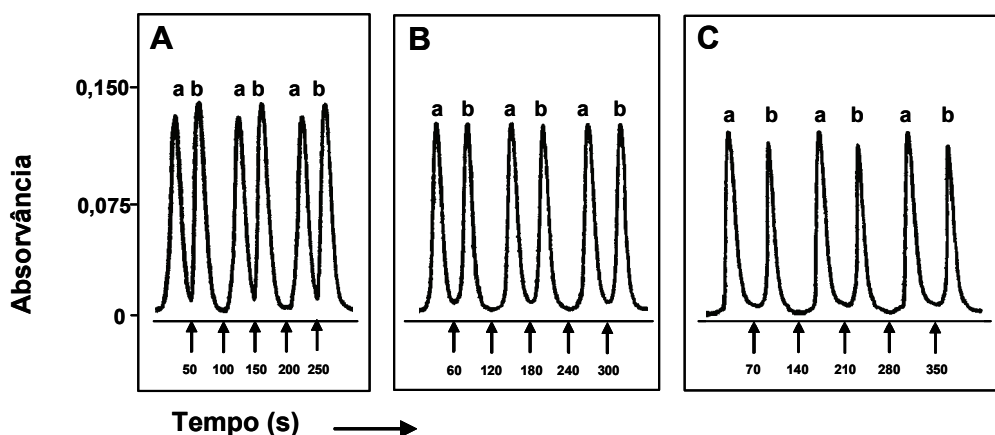


Figura 7.16 – Influência do tempo de inversão do sentido de fluxo. (A) 50, (B) 60 e (C) 70 s. (a) soluções de fosfato ($1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) /heptamolibdato de amónio e (b) ácido ascórbico/água como transportadoras da interface.

7.4. Conclusões

Neste trabalho foi desenvolvida uma nova estratégia de gestão de fluidos, designada como análise em sistemas de fluxo de interface única (SIFA, do inglês “Single Interface Flow Analysis”), a qual diverge significativamente do conceito tradicional de análise em fluxo contínuo ao não implicar a inserção de volumes definidos de amostra e reagentes nas montagens analíticas, mas o estabelecimento de uma interface única de reacção entre a amostra e os reagentes antes da detecção. A estratégia desenvolvida distingue-se assim das

estratégias anteriores de gestão de fluidos em fluxo contínuo ao não implicar o controlo dos volumes de amostra e reagentes introduzidos nas montagens.

Embora com algumas semelhanças com a estratégia SIA, nomeadamente na forma como ocorre a mistura entre a amostra e os reagentes, o SIFA difere em aspectos importantes como é o caso de não necessitar de um tubo de armazenamento (TA, Figura 1.3, Capítulo 1), o qual em SIA (usualmente superior a 2 m [18],) é utilizado para prevenir a contaminação da solução transportadora com as soluções aspiradas. No SIFA qualquer secção da interface que não possa estar contida no percurso analítico é encaminhada para o esgoto, através das válvulas solenóides. No SIFA todas as soluções são também propulsionadas sob pressão positiva, enquanto que em SIA as zonas de amostra e reagentes são aspiradas para o tubo de armazenamento sob pressão negativa. Adicionalmente, a extensão da penetração das zonas de amostra e reagente, que em contraste com a estratégia SIA não apresentam limites definidos, pode ser controlada quer com base no comprimento dos reactores, quer com base em múltiplas inversões do sentido de fluxo. Efectivamente, a estratégia SIFA possibilita o aumento da extensão da zona de reacção em função do tempo de residência, sem que isso implique, em contraste com a SIA e as restantes estratégias de gestão de fluidos em fluxo contínuo, um aumento da dispersão e uma diminuição do sinal analítico.

A importância da manipulação de certos parâmetros para a obtenção de um determinado grau de dispersão, como o volume de amostra e reagentes, assim como o comprimento dos reactores e o caudal, é minimizada com a

estratégia SIFA, o que facilita a implementação dos sistemas de fluxo, assim como, a simplificação do seu controlo e optimização.

Adicionalmente, destaca-se a possibilidade de efectuar múltiplas detecções da zona de reacção de uma forma simples e rápida, em parte devido à centralidade do detector e à facilidade de alteração da direcção do fluxo, o que possibilita a recolha de mais informação quer relativamente a toda a interface de reacção quer relativamente a uma zona específica, e desta forma a implementação de metodologias automáticas de análise baseadas em métodos cinéticos e análise de multi-componentes.

A estratégia de gestão de fluidos desenvolvida exibiu ainda um elevado grau de reprodutibilidade, tendo em consideração que a reacção ocorre numa interface com um intenso gradiente de concentrações. Naturalmente, que à medida que a reacção prossegue e a dispersão aumenta os gradientes de concentração são atenuados, mas mesmo quando foram utilizados reactores pequenos foi obtida uma boa precisão. Estes resultados confirmam assim a reprodutibilidade da penetração de zonas, quer para reacções compreendendo duas ou quatro soluções, independentemente da solução utilizada como transportadora da interface.

7.5. Referências bibliográficas

- [1] F. R. P. Rocha, B. F. Reis, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, R. A. S. Lapa, J. L. M. Santos, *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 119.
- [2] J. Ruzicka, E. H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, John Wiley and Sons, Nova York, 2ª edição, 1988.
- [3] A. Rios, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1803.
- [4] M. Valcárcel, M. D. Luque de Castro, F. Lázaro, A. Rios, *Anal. Chim. Acta* 216 (1989) 275.
- [5] J. Ruzicka, G. D. Marshall, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329.
- [6] T. Gubeli, G. D. Christian, J. Ruzicka, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2407.
- [7] G. D. Christian, *Analyst* 119 (1994) 2309.
- [8] J. Liu, H. Ma, *Talanta* 40 (1993) 969.
- [9] J. F. Van Staden, H. du Plessis, S. M. Linsky, R. E. Taljaard, B. Kremer, *Anal. Chim. Acta* 354 (1997) 59.
- [10] E. B. Sandell, H. Onishi, *Photometric determination of traces of metals: general aspects*, Interscience, Nova York, 4ª edição, 1978.
- [11] P. C. A. Jerónimo, A. N. Araújo, M. C. B. S. M. Montenegro, C. Pasquini, I. M. Raimundo Jr., *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 108.
- [12] Z. Marczenko, *Separation and Spectrophotometric Determination of Elements*, Ellis Horwood, Chichester, 1986.
- [13] F. R. P. Rocha, P. B. Martelli, B. F. Reis, *Quím. Nova* 23 (2000) 119.
- [14] P. B. Martelli, B. F. Reis, E. A. M. Kronka, H. Bergamin Fº, M. Korn, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, A. N. Araújo, *Anal. Chim. Acta* 308 (1995) 397.
- [15] J. Ruzicka, E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 78 (1975) 145.

- [16] S. Motomizu, Z. Li, *Talanta* 66 (2005) 332.
- [17] S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, A. A. S. C. Machado, J. L. F. C. Lima, J. M. Paulís, *Quim. Anal* 6 (1987) 278.
- [18] J. F. Van Staden, A. Botha, *S. Afr. Tydskr. Chem.* 51 (1998) 100.
- [19] F. R. P. Rocha, J. A. Nóbrega, *Quím. Nova* 19 (1996) 636.

CAPÍTULO 8

Conclusões gerais

8. Conclusões gerais

O trabalho realizado no âmbito desta dissertação de doutoramento visou o desenvolvimento e implementação de sistemas de fluxo contínuo baseados nos conceitos de multi-impulsão e de reacção em interface única, avaliando as suas potencialidades.

8.1. Multi-impulsão (MPFS)

1. No que diz respeito ao conceito de multi-impulsão, o desenvolvimento e aplicação analítica das montagens apresentadas, permitiram confirmar a grande versatilidade e robustez associada ao conceito de multi-impulsão. Efectivamente, a utilização das micro-bombas solenóides para a inserção das soluções de amostra e reagentes, propulsão e comutação das soluções, confere uma elevada versatilidade aos sistemas de fluxo e facilita o controlo de todo o sistema.
2. As características hidrodinâmicas do fluxo pulsado permitiram uma mistura entre a amostra e os reagentes mais eficiente, mesmo em condições de dispersão limitada, facilitando o desenvolvimento da reacção. A elevada capacidade de mistura dos sistemas de fluxo multi-impulsão foi evidenciada no sistema desenvolvido para a avaliação da actividade captadora do anião peroxinitrito com detecção por quimiluminescência, ao permitir que a mistura das soluções de amostra e reagentes e o desenvolvimento da reacção se realizasse à entrada da

célula de fluxo. O fluxo pulsado inerente aos sistemas de fluxo multi-impulsão torna-se assim particularmente vantajoso para sistemas de fluxo com detecção por quimiluminescência onde o sinal analítico resulta da emissão de radiação originada pela mistura entre amostra e reagentes na entrada da célula de fluxo.

3. A utilização de reactores fluidizados em sistemas de análises em fluxo constitui uma alternativa às metodologias envolvendo a utilização de reactores sólidos empacotados, resolvendo alguns problemas associados à utilização deste tipo de reactores, como o aumento da pressão hidrodinâmica, a ocorrência de efeitos *swelling* (expansão ou contracção) e simultaneamente a ocorrência de caminhos preferenciais. A utilização do fluxo pulsado mostrou ser um bom processo para a implementação de reactores fluidizados em sistemas de análises de fluxo, como demonstrado através do sistema multi-impulsão desenvolvido para a determinação espectrofotométrica de zinco em extractos de plantas, utilizando uma resina fluidizada para concentração do analito e separação de espécies interferentes.
4. A fácil combinação do conceito de multi-impulsão com elementos típicos de outras estratégias de gestão de fluidos, como a válvula solenóide, resultou em vantagens acrescidas em termos de versatilidade e capacidade analítica, através da sinergia entre as capacidades propulsoras e comutadoras das micro-bombas solenóides e a facilidade de direccionamento das soluções proporcionada pela válvula solenóide.

Efectivamente, a combinação das micro-bombas solenóides com a válvula solenóide facilitou a configuração e implementação do método cinético em tempo fixo para a determinação espectrofotométrica da buspirona em formulações farmacêuticas, através do estabelecimento dos dois percursos alternativos na montagem analítica, tendo igualmente facilitado a gestão das soluções de amostra e reagentes na montagem desenvolvida para a determinação espectrofotométrica de zinco em extractos de plantas, utilizando a resina fluidizada.

5. O controlo individual e independente das micro-bombas solenóides possibilitou também, através de pequenas alterações no programa informático de controlo, a realização das diferentes estratégias de inserção das soluções de amostra e reagentes nas diferentes montagens apresentadas, como volume único, amostragem binária e confluência de zonas, sem implicar qualquer alteração na reconfiguração física dos sistemas.
6. A utilização das micro-bombas piezoeléctricas para a obtenção de um processo alternativo de fluxo pulsado em sistemas de análises em fluxo mostrou-se viável, demonstrando ser uma alternativa às micro-bombas solenóides originalmente associadas ao conceito de multi-impulsão. As micro-bombas piezoeléctricas destacam-se das micro-bombas solenóides pelas suas reduzidas dimensões, pelo seu sistema de controlo, apresentando como principais desvantagens, o facto de não poderem ser utilizadas como elementos comutadores, o que implica

obrigatoriamente a inserção nas montagens de fluxo de dispositivos comutadores, aumentando a complexidade dos sistemas, para além de serem mais sensíveis a contra-pressões exercidas pelas montagens analíticas e apresentarem caudais inferiores relativamente às micro-bombas solenóides.

7. As metodologias desenvolvidas apresentaram um baixo consumo de amostra e reagentes, e uma baixa produção de efluentes. Efectivamente, a adição sincronizada dos reagentes à zona de amostra, inserindo no percurso analítico apenas a quantidade de reagente necessária ao desenvolvimento da reacção, resulta numa redução do consumo de reagentes e consequentemente numa redução do volume de efluentes gerados.
8. Os resultados obtidos, por aplicação das metodologias desenvolvidas às amostras respectivas, foram em todos os casos estatisticamente comparáveis aos fornecidos por métodos de referência ou de comparação, quando estes existiam e foram aplicados. Nas situações em que se recorreu à análise de amostras de referência e ensaios de recuperação, os resultados foram de igual forma aceitáveis.
9. As metodologias desenvolvidas demonstraram ainda ser alternativas vantajosas, relativamente às metodologias disponíveis, as quais de uma forma geral se apresentaram como morosas, laboriosas e dispendiosas, envolvendo por vezes a utilização de reagentes de difícil

manuseamento. Em oposição, as metodologias desenvolvidas exibiram uma grande simplicidade, versatilidade e flexibilidade, tendo-se adaptado aos objectivos analíticos para que foram idealizadas.

8.2. Interface única (SIFA)

1. Uma nova estratégia de gestão de fluidos baseada num conceito de reacção em interface única foi desenvolvida e implementada pela primeira vez, no trabalho apresentado nesta dissertação. A estratégia desenvolvida, representa uma inovação relativamente à noção tradicional de análise em fluxo contínuo ao não implicar a inserção de volumes definidos de amostra e reagentes nas montagens de fluxo, mas o estabelecimento de uma interface única de reacção entre a amostra e os reagentes antes da detecção.
2. A optimização das montagens apresentadas foi relativamente simples, em virtude da minimização da influência dos parâmetros volume de amostra e reagentes. Efectivamente, a estratégia desenvolvida distingue-se das metodologias de fluxo contínuo uma vez que não requer a inserção de volumes definidos de amostra e reagentes.
3. A localização do detector no centro da montagem de fluxo e não na habitual posição terminal, e a facilidade de alteração do sentido de fluxo, possibilitou a realização de diversas manipulações da interface de reacção, desde multidetecções da zona de amostra à monitorização

contínua do desenvolvimento da reacção. De facto, a bi-direccionalidade do fluxo e a centralidade do detector possibilita a recolha de mais informação quer relativamente a toda a interface de reacção quer a uma zona específica.

4. A utilização das micro-bombas solenóides como dispositivo de inserção e propulsão das soluções de amostra e reagentes num sistema SIFA confirmou as vantagens da hifenização do conceito de interface única e de multi-impulsão. Efectivamente, a utilização das micro-bombas possibilitou para além da implementação de sistemas versáteis e de fácil controlo, uma mais rápida mistura amostra/reagente (aumento da interpenetração das zonas envolvidas) devido às características hidrodinâmicas do fluxo gerado.
5. Embora o consumo de amostra e reagentes não tenha sido sujeito a uma optimização específica nas montagens SIFA desenvolvidas, os volumes podem ser reduzidos através da utilização nas montagens de reactores de pequenas dimensões, os quais não afectam o desenvolvimento da reacção, uma vez que podem ser efectuadas múltiplas inversões do sentido de fluxo, o que contribui para o aumento do tempo de residência.
6. A avaliação feita no âmbito deste trabalho foi reduzida, deixando em aberto avaliações posteriores e aprofundamento. A caracterização dos sistemas SIFA requer implementação de esquemas reaccionais com

complexidade variada, envolvendo diferente número de reagentes, bem como a sua avaliação em distintas situações analíticas, e o seu acoplamento a diferentes tipos de detectores.

7. À avaliação preliminar não passou contudo despercebida a necessidade da gestão de fluidos pela metodologia SIFA ter de contar inevitavelmente, no caso das determinações electroquímicas, com a disponibilidade de detectores tubulares. Efectivamente, as determinações electroquímicas poderão ser encaradas como mais problemáticas, relativamente às determinações com detecção espectrofotométrica, mais habituais na literatura, contudo o grupo de investigação onde foi desenvolvido este trabalho tem vindo a demonstrar largamente a possibilidade de construção de detectores tubulares potenciométricos e voltamétricos com características equivalentes aos eléctrodos de configuração convencional.