



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Um Luminômetro Fluxo-Batelada para Determinação
Quimiluminescente de Vitamina B₁₂ em Medicamentos**

Renato Allan Navarro Andrade

João Pessoa – PB - Brasil
Novembro/2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Um Luminômetro Fluxo-Batelada para Determinação
Quimiluminescente de Vitamina B₁₂ em Medicamentos**

Renato Allan Navarro Andrade*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: **Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo**

2º Orientador: **Prof. Dr. Valdomiro Lacerda Martins**

***Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**

João Pessoa – PB - Brasil
Novembro/2011

A553u Andrade, Renato Allan Navarro.

Um luminômetro fluxo-batelada para determinação
quimiluminescente de vitamina B12 em medicamentos /
Renato Allan Navarro Andrade.--João Pessoa, 2011.

111f. : il.

Orientadores: Mário César Ugulino de Araújo, Valdomiro
Lacerda Martins

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN

1. Química Analítica. 2. Luminômetro Fluxo-batelada.
3. Quimiluminescência. 5. Vitamina B12.

UFPB/BC

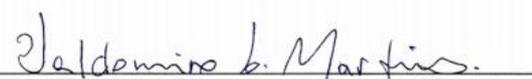
CDU: 543(043)

Dissertação de Mestrado submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

Aprovada pela banca examinadora:



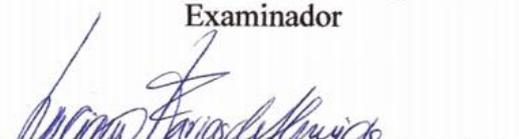
Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Valdomiro Lacerda Martins
2º. Orientador



Prof. Dr. Edvaldo da Nóbrega Gaião
Examinador



Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida
Examinador

Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é "muito" para ser insignificante.

Augusto Branco

Ao meu pai Roberto e a minha mãe Dayse, pelo amor, carinho e incentivo.

A toda minha família.

Com amor e gratidão,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por sempre ter me abençoado, fortalecido e presenteado com dádivas e vitórias a cada dia.
- Aos meus amados pais, Roberto Andrade e Dayse Navarro.
- Aos meus irmãos Robledo Jorge e Renan Henrique pelo apoio e companheirismo.
- Aos meus sobrinhos Ryan Gabriel e Karen Beatriz, presentes de Deus e luzes em minha vida.
- A Lucivânia Oliveira pela paciência e companheirismo sempre.
- Aos Amigos Lucas, Larissa, Enoque, Felipe, Janaina, Suervy e Natalia pela amizade e os bons momentos vividos.
- Ao professor Mário César Ugulino de Araújo pela oportunidade de trabalho, confiança e ensinamentos.
- Aos professores Pablo Nogueira Teles Moreira e Valdomiro Lacerda Martins pelo conhecimento, disponibilidade e paciência dedicada a esse trabalho.
- Aos professores Luciano Farias de Almeida e Edvan Cirino da Silva pelas relevantes contribuições acadêmico-científicas.
- Aos amigos Daniel Jackson, Stéfani Yuri, Wellington Lyra e Paulo Henrique pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Engenheiro Eletrônico Carlos Zurita pela colaboração no desenvolvimento da eletrônica deste trabalho.
- Aos amigos Flaviano, Edilene, Cleilson, Urijatan, Adriano, Francisco, Adamastor, Hebertty, Marcelo, Sófacles e a todos do LAQA, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPQ pela bolsa concedida

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	vx

CAPÍTULO 1	
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Contextualização.....	2
1.2. Objetivo e metas	3
1.2.1. Objetivo geral.....	3
1.2.2. Metas	3
1.3. Quimiluminescência.....	4
1.3.1. Reações quimiluminescentes do luminol	6
1.3.2. O Mecanismo da reação quimiluminescente do luminol.	7
1.3.3. Fatores que influenciam a emissão quimiluminescente	11
1.3.4. Aplicação do luminol para fins analíticos.....	12
1.4. A vitamina B ₁₂	15
1.5. Determinação de vitamina B ₁₂ por quimiluminescência	17
1.6. Instrumentação básica para análises quimiluminescentes.....	19
1.6.1. Sistema de introdução de amostras e reagentes	20

1.6.2. Cella de reacção	21
1.6.3. Sistema de detecção.....	22
1.6.4. Sistema de aquisição de sinais	23
1.7. Métodos automáticos de análises químicas	24
1.7.1. Analisadores em fluxo-batelada	25
1.7.1.1. Sistema de propulsão.....	27
1.7.1.2.. Sistema de condução dos fluidos	28
1.7.1.3. Sistema de comutação	30
1.7.1.4. Câmara de mistura ou reacção	30
1.7.1.5. Sistema de detecção	31
1.7.2. Características dos sistemas FB.....	32
1.8. Analisadores em fluxo-batelada e determinações quimiluminescentes	34

CAPÍTULO 2

2. EXPERIMENTAL.....	36
2.1. Reagentes, soluções e amostras	36
2.2. O Luminômetro fluxo-batelada (LFB)	37
2.2.1. Microcomputador	39
2.2.2. Câmara de mistura	40
2.2.3. Agitador magnético	40
2.2.4. Bomba peristáltica.....	41
2.2.5. Acionador de válvulas	41
2.2.6. Válvulas solenoides	42
2.2.7. Sistema de detecção de sinal	43

2.2.8. Módulo amplificador de sinal quimiluminescente (MASQ)	43
2.2.8.1. Eletrônica do MASQ	43
2.2.8.1.1. Módulo de pré-amplificação.....	45
2.2.8.1.2. Módulo de controle de ganho	46
2.2.8.1.3. Microcontrolador.....	47
2.2.8.1.4. Fonte de alimentação	49
2.2.8.2. Operação do MASQ.....	49
2.2.9. Metodologia de análise.....	52
2.2.11. Procedimento analítico	53
2.2.11.1. Estudo das vazões dos canais das válvulas solenoides.....	53
2.2.11.2 Procedimento de fluxo	53
2.2.11.3. Procedimento e utilização do programa de controle do LFB	55
2.2.11.4. Procedimento de utilização do MASQ	57
2.2.12. Procedimentos para avaliação do desempenho analítico	57

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1. Ajuste da vazão do LFB.....	62
3.2. Estudo dos volumes adicionados à câmara de mistura	66
3.3. Estudo da estabilidade da solução de luminol	67
3.4. Avaliação do desempenho do LFB para amostras sintéticas de cobalto(II) e vitamina B ₁₂	69
3.4.1. Figuras de mérito	73
3.5. Determinação analítica de vitamina B ₁₂ em medicamentos	73

CAPÍTULO 4

4. Conclusão76

CAPÍTULO 5

5. Referências77

LISTA DE FIGURAS

- FFIGURA 1.1.** Mecanismo proposto por ALBERTIN e colaboradores^[13] para a reação quimiluminescente do luminol em meio alcalino e na presença do íon de um metal de transição (M^{n+}), utilizando H_2O_2 como agente oxidante. **8**
- Figura 1.2.** Proposta mecanísitca de Merényi e colaboradores sobre os caminhos da reação quimiluminescente do luminol. **A** representa espéciesceptoras de elétrons e **B** representa nucleófilos. **9**
- Figura 1.3.** Esquema representativo dos tipos de reações quimiluminescentes do luminol, onde **P** representa o produto da reação. Adaptada da Ref. [20]. **13**
- Figura 1.4.** Estrutura molecular da cobalamina. Adaptada da Ref. [57].
..... **16**
- Figura 1.5.** Esquema básico de configuração de um luminômetro. Adaptada da Ref. [20]. **19**
- Figura 1.6.** Sinal analítico proveniente de reações quimiluminescentes. (a) É mostrada a curva da intensidade de quimiluminescência em função do tempo após a mistura dos reagentes para iniciar a reação. A diminuição do sinal analítico ocorre em consequência do consumo dos reagentes e mudanças na eficiência quântica quimiluminescente com o passar do tempo. (b) A curva de calibração é estabelecida em relação às concentrações crescentes ou decrescentes do analito. Adaptada da Ref. [20]. **21**

FIGURA 1.7. Esquema simplificado com os componentes principais de um sistema AFB. (a) câmara de mistura; (b) agitador magnético; (c) válvulas solenoides de três vias; (d) bomba peristáltica; (e) acionador de válvulas; (f) detector; (g) computador. Adaptada da Ref. [75]..... **26**

FIGURA 1.8. Bomba peristáltica comercial utilizada na propulsão dos fluidos em sistemas FBA..... **27**

FIGURA 1.9. Bomba pistão acoplada à câmara de mistura desenvolvido por ALMEIDA e colaboradores^[61,79] para propulsão dos fluidos em um sistema FB. (a) motor de passos (b) câmara de mistura (c) visualização interna da câmara de mistura com o pistão inserido em seu interior. As setas indicam os sentidos de movimento do pistão. **28**

FIGURA 1.10. Tubos de bombeamento para bombas peristálticas. Para bombas com velocidade de rotação fixa, o diâmetro interno desses tubos e a rotação da bomba determinam a ordem de grandeza da vazão..... **29**

FIGURA 1.11. Visualização externa e interna de uma válvula solenoide de três vias utilizadas em sistemas FBA. **30**

FIGURA 1.12. Câmara de mistura de sistemas FB. (a) cavidade; (b) entrada de fluidos; (c) entrada/saída de fluidos..... **31**

FIGURA 2.1. Fotografia da disposição física dos componentes do LFB proposto. (a) Microcomputador; (b) bomba peristáltica; (c) válvulas solenoides; (d) acionador de válvulas; (e) amplificador de sinal; (f) isolamento eletromagnético de luz externa; (g) agitador magnético; (h) detector; (i) câmara de mistura. **38**

FIGURA 2.2. Diagrama esquemático do LFB proposto. (PC) microcomputador; (CBP) canal da bomba peristáltica; (V1-V5) válvulas solenoides; (AV) Acionador de válvulas; (AS) amplificador de sinal; (AM) agitador magnético; (CM) câmara de mistura; (D) detector.	39
FIGURA 2.3. Diagrama esquemático das dimensões da câmara de mistura. (1) Canal de entrada; (2) canal de saída.....	40
FIGURA 2.4. Agitador magnético utilizado no LFB.	40
FIGURA 2.5. Diagrama esquemático do acionador de válvulas. P0 – P6 representam os pinos de saída para a interface de controle e GND é o aterramento do circuito.	41
FIGURA 2.6. Válvula solenoide de três vias da utilizadas no LFB proposto.	42
FIGURA 2.7. Fotodiodo de silício utilizado no sistema de detecção do LFB proposto.....	42
FIGURA 2.8. Resposta espectral típica do fotodiodo utilizado no sistema de detecção do LFB proposto.	43
FIGURA 2.9. Diagrama esquemático representando as quatro partes principais do MASQ: (1) módulo de pré-amplificação, (2) módulo de controle de ganho, (3) microprocessador e (4) fonte de alimentação. ...	44

FIGURA 2.10. Circuito eletrônico do módulo de pré-amplificação do MASQ. **C** = capacitores de poliéster; **R** = resistores; **Q** = transistor; **U1** = circuitos integrados; **D1** = diodo, **D2** = fotossensor; **K1** = relé; **P** = conectores; **GND** = terra..... **45**

FIGURA 2.11.. Circuito eletrônico do módulo de controle de ganho do MASQ. **C** = capacitor de poliéster; **R** = resistores; **U2** e **U3** = circuitos integrados; **D3** = diodo; **GND** = terra..... **46**

FIGURA 2.12. Circuito eletrônico do microprocessador do MASQ. **C** = capacitor de poliéster; **R** = resistores; **U4** = PIC 16F877; **GND** = terra. **48**

FIGURA 2.13. Circuito eletrônico da fonte de alimentação do MASQ. **C** = capacitor de poliéster; **R** = resistores; **Q** = transistores; **U6** e **U7** = circuitos integrados; **GND** = terra. **49**

FIGURA 2.14. Detalhes do painel externo de controle e operação do MASQ. **50**

FIGURA 2.15. Diagrama esquemático do sistema de fluxo do LFB proposto. **AM** – agitador magnético, **CM** – câmara de mistura, **BM** – barra magnética, **D** – detector, **BP** – bomba peristáltica, **V₁** – válvula da água, **V₂** – válvula da amostra, **V₃** – válvula do peróxido de hidrogênio, **V₄** – válvula do luminol, **V₅** – válvula de esvaziamento da câmara de mistura e **L** – descarte. **54**

FIGURA 2.16. Painel de controle do programa usado no LFB proposto. **55**

FIGURA 3.1. Exemplo de uma curva de calibração utilizada nas medidas da precisão das válvulas solenoides, cuja equação da reta foi $y = 0,1886x + 0,0008$ e $R^2 = 1,00$ **62**

FIGURA 3.2. Sinal proveniente da entrada de amostras e reagentes na câmara de mistura nas rotações de 40 rpm (—), 80 rpm (—), 120 rpm (—), 160 rpm (—). **65**

FIGURA 3.3. Sinais analíticos obtidos de 0 a 168 horas de preparo do luminol. A concentração de vitamina B₁₂ corresponde ao intervalo de 2,4 – 12 µg L⁻¹, com DPR's inferiores a 1,5% (n=5). **68**

FIGURA 3.4. Curva analítica para os padrões de cobalto(II), cuja faixa linear compreende o intervalo de 1,0 a 9,0 µgL⁻¹. **70**

FIGURA 3.5. Curva analítica para os padrões de vitamina B₁₂, cuja faixa linear compreende o intervalo de 2,4 a 12,0 µgL⁻¹. **70**

FIGURA 3.6. Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo linear da curva analítica para os padrões de cobalto (II)..... **71**

FIGURA 3.7. Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo linear da curva analítica para os padrões de vitamina B₁₂. **71**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1. Aplicações da quimiluminescência do luminol na determinação de diferentes analitos.	15
TABELA 1.2. Sistemas de detecção utilizados em diversos sistemas FB descritos na literatura.	32
TABELA 2.1. Valores dos canais em relação ao ganho do sinal.	51
TABELA 2.2. Equações para a ANOVA dos dados experimentais adaptados aos modelos lineares determinados pelos métodos dos mínimos quadrados.	59
TABELA 3.1. Valores do desvio padrão e do desvio padrão relativo (DPR) obtidos para a válvula 1 nas quatro diferentes rotações da bomba peristáltica.	63
TABELA 3.2. Valores do desvio padrão e do desvio padrão relativo (DPR) obtidos para a válvula 2 nas quatro diferentes rotações da bomba peristáltica.	63
TABELA 3.3. Valores do desvio padrão e do desvio padrão relativo (DPR) obtidos para a válvula 3 nas quatro diferentes rotações da bomba peristáltica.	64
TABELA 3.4. Valores do desvio padrão e do desvio padrão relativo (DPR) obtidos para a válvula 4 nas quatro diferentes rotações da bomba peristáltica.	64

TABELA 3.5. Valores utilizados no monitoramento do sinal analítico nas quatro diferentes rotações da bomba peristáltica.....	65
TABELA 3.6. Valores obtidos do sinal proveniente da reação quimiluminescente para os volumes inseridos na câmara de mistura.....	66
TABELA 3.7. Parâmetros de fluxo ajustados para a determinação de vitamina B ₁₂ em medicamentos com o sistema LFB.....	67
TABELA 3.8. Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos.	69
TABELA 3.9. Somas e médias quadráticas calculadas pela ANOVA para modelos de calibração obtidos para o cobalto(II) e a vitamina B ₁₂	72
TABELA 3.10. ANOVA para o modelo linear das curvas analíticas para os soluções padrão de cobalto(II) e vitamina B ₁₂	72
TABELA 3.11. Figuras de mérito obtidas para as determinações de cobalto(II) e vitamina B ₁₂ utilizando o LFB proposto.....	73
TABELA 3.12. Resultado da análise de vitamina B ₁₂ e do teste de recuperação.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica
AD	Analógico/digital
AFB	Analizador fluxo-batelada
ANOVA	Análise de variância
AuNPs	Gold nanoparticles
CCD	Charge-coupled device
DPR	Desvio padrão relativo
ET AAS	Espectrometria de absorção atômica eletrotérmica
FB	Fluxo-batelada
FIA	Flow injection analysis
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite
HRP	Horseradish peroxidase
Imáx	Intensidade máxima
IQL	Intensidade da quimiluminescência
LCD	Liquid crystal display
LED	Light emitting diode
LFB	Luminômetro fluxo-batelada
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MASQ	Módulo amplificador de sinal quimiluminescente
PIC	Programmable interrupt controller
PMTs	Photomultiplier tubes
PTFE	Politetrafluoretileno
PVC	Cloreto de polivinila

QL	Quimiluminescência
REM	Radiação eletromagnética
rpm	Rotações por minuto
UV-Vis	Radiação ultravioleta-visível

RESUMO

Título: Um Luminômetro Fluxo-Batelada para Determinação de Vitamina B₁₂ em Medicamentos.

Autor: Renato Allan Navarro Andrade

Neste trabalho foi desenvolvido um luminômetro para análise por quimiluminescência, acoplado a um sistema automático de análise em fluxo-batelada. O desempenho do instrumento desenvolvido foi avaliado por meio da determinação de vitamina B₁₂ em medicamentos. O princípio químico do sistema baseia-se no efeito catalítico do íon cobalto (II) sobre a oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogênio em meio alcalino cujo produto da reação emite radiação eletromagnética na região visível (mais precisamente em 425 nm). O sistema de detecção do instrumento desenvolvido consiste de um fotodiodo de silício e de um módulo para amplificação dos sinais analíticos. O modelo de calibração univariado foi validado por meio da Análise de Variância (ANOVA) e usado posteriormente na quantificação de vitamina B₁₂ em amostras reais. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram 0,11 e 0,36 µg L⁻¹ de vitamina B₁₂. A frequência analítica foi estimada em 90 amostras h⁻¹. A exatidão do instrumento proposto foi atestada por meio de testes de recuperação cujas taxas obtidas foram entre 98 e 102%. O instrumento proposto forneceu resultados com precisão satisfatória, como revelado pelo baixo valor de desvio padrão conjunto. Tais resultados obtidos demonstram que é possível quantificar vitamina B₁₂ utilizando um método simples, econômico, robusto e que produz baixa quantidade de resíduos para o meio ambiente.

Palavras-chave: Luminômetro Fluxo-Batelada, Quimiluminescência, Vitamina B₁₂.

ABSTRACT

Title: A Flow-Batch Luminometer for Determination of Vitamin B₁₂ in Pharmaceutical Formulations.

Author: Renato Allan Navarro Andrade

In this work was developed a luminometer for analysis by chemiluminescence, coupled to a flow-batch analysis automatic system. The performance of the developed instrument was evaluated by means of the determination of vitamin B₁₂ in pharmaceutical formulations. The chemical principle is based on the catalytic effect of cobalt (II) ion over luminol oxidation by hydrogen peroxide in alkaline medium whose reaction product emits electromagnetic radiation in visible region (more precisely at 425 nm). The detection system of the developed instrument consisted of a silicon photodiode and a module for amplification of analytical signals. The univariate calibration model was validated by means of Analysis of Variance (ANOVA) and used later in the quantification of vitamin B₁₂ in real samples. The limits of detection and quantification obtained were 0.11 and 0.36 µg L⁻¹ of vitamin B₁₂. The analytical frequency was estimated in 90 samples h⁻¹. The accuracy of the proposed instrument was attested by means of recovery tests whose obtained recovery rates were between 98 and 102%. The proposed instrument yielded results with satisfactory precision, as revealed by low value of overall standard deviation. Such results demonstrated that is possible to quantify vitamin B₁₂ employing a simple, economic and robust method which generate low amount of waste to the environment.

Keywords: Flow-Batch Luminometer, Chemiluminescence, Vitamin B₁₂.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização

Nas últimas décadas, as espectrometrias de fluorescência, fosforescência, quimiluminescência e bioluminescência têm sido rotineiramente aplicadas a problemas qualitativos e quantitativos de análise em química analítica. Estas técnicas de luminescência molecular apresentam várias características que as tornam úteis para vários tipos de análises, tais como baixos limites de detecção, possibilidade à detecção por meio de um laser ou fibra óptica, aplicabilidade a amostras complexas e geração de vários tipos de informações – espectros de excitação e emissão, tempos de decaimento, dados de polarização – úteis para a identificação de moléculas^[1].

Especificamente, a técnica quimiluminescente está crescendo rapidamente e vem se destacando por oferecer uma alta versatilidade para a determinação de uma grande variedade de espécies, assim como têm permitido a detecção baseada em suas reações evoluir para uma técnica altamente sensível e de baixo custo.

No entanto, quando a técnica quimiluminescente é adotada em consonância com técnicas de automação, as vantagens citadas anteriormente podem ser estendidas, fornecendo informações analíticas confiáveis e rápidas, havendo uma grande aplicação em amostras clínicas, ambientais e industriais, em que vários analitos são determinados em concentrações cada vez menores.

As técnicas mais comumente utilizadas em análises laboratoriais de rotina são lentas e laboriosas, pois envolvem muita manipulação analítica, tais como extração/dissolução da amostra, preparação frequente de soluções e padrões de calibração, entre outros. Além disso, são métodos que requerem grandes quantidades de solventes e reagentes de custo elevado, pessoal qualificado para a manipulação analítica e produzem resíduos prejudiciais ao meio ambiente.

Desta forma, grandes esforços em aperfeiçoar sistemas convencionais e desenvolver novos sistemas, visando atender à crescente demanda analítica, apresentam-se como uma árdua tarefa de pesquisa^[2]. Nesse contexto, a quimiluminescência destaca-se por apresentar características de grande aplicabilidade na determinação e controle da qualidade de um grande número de analitos.

Sendo assim, neste trabalho é proposto o desenvolvimento de um luminômetro de baixo custo utilizando um analisador em fluxo-batelada com detecção baseada em fotodiodo para determinação de vitamina B₁₂ em medicamentos aplicando as vantagens da técnica quimiluminescente.

1.2. Objetivo e metas

1.2.1. Objetivo geral

- Desenvolver um luminômetro com detecção baseada em fotodiodo associado a um sistema automático de análise em fluxo-batelada para determinação quimiluminescente de vitamina B₁₂ em medicamentos.

1.2.2. Metas

- Construir um luminômetro à base de fotodiodo;
- Montar um sistema automático de análise em fluxo-batelada acoplado ao luminômetro;
- Desenvolver um programa para controle e aquisição dos dados analíticos;
- Aplicar o sistema desenvolvido na determinação de vitamina B₁₂ em medicamentos;

1.3. Quimiluminescência

A quimiluminescência é um tipo de luminescência molecular em que a radiação eletromagnética emitida (geralmente na região do visível) é gerada a partir de uma reação química. Este fenômeno pode ser observado quando um dos intermediários ou produtos da reação é formado num estado eletronicamente excitado, que emite radiação eletromagnética (REM) ao retornar ao estado fundamental, ou transferir a sua energia para outra molécula, que uma vez excitada também emite REM.

O processo pelo qual a quimiluminescência é produzida é idêntico à fotoluminescência (fluorescência ou fosforescência), exceto que nenhuma excitação por fonte de luz é necessária. No entanto ao contrário da fotoluminescência, a produção do estado eletronicamente excitado em reações quimiluminescentes depende de processos físicos e químicos, como mistura da solução e da cinética da reação química^[3-5].

Para uma reação química resultar na emissão de radiação, alguns requisitos são essenciais^[7]:

- 1. A reação deve ser exotérmica para liberar energia suficiente para formar o estado eletronicamente excitado.** A energia necessária para produzir uma espécie em seu estado excitado e emitir radiação eletromagnética na região do visível requer cerca de 40 a 71 kcal mol⁻¹. Esta quantidade de energia é geralmente liberada por reações de oxidação, particularmente aquelas que envolvem oxigênio, peróxidos e outros oxidantes fortes.
- 2. O meio reacional deve ser favorável para direcionar energia para a formação de um estado eletronicamente excitado.** No caso da energia química ser perdida na forma de calor, ou através de formas de energia vibracionais ou rotacionais, não ocorrerá reação quimiluminescente.

3. O estado excitado deve ser luminescente ou transferir a sua energia para outra molécula luminescente.

Nos processos luminescentes, a intensidade da emissão de fótons depende da eficiência na geração de moléculas no estado excitado, a qual é representada pela eficiência quântica (ou rendimento quântico), e pela velocidade da reação. Em se tratando de reações quimiluminescentes, a intensidade da emissão pode ser expressa de acordo com a **Equação 1.1**.

$$I_{QL} = \phi_{QL} - \frac{dA}{dt} \quad (1.1)$$

onde I_{QL} é a intensidade da emissão quimiluminescente, em números de fótons emitidos por segundo, Φ_{QL} , é o rendimento quântico da reação quimiluminescente em número de fótons emitidos por molécula excitada e $-dA/dt$, é a taxa de consumo do precursor A .

O rendimento quântico pode ser expresso como o produto de duas eficiências, conforme mostra a **Equação 1.2**.

$$\phi_{QL} = \phi_{EX} \cdot \phi_L \quad (1.2)$$

onde Φ_{EX} é a eficiência da produção de espécies eletronicamente excitadas, expressa pelo número de estados excitados formado por molécula e Φ_L é a eficiência de luminescência das espécies quimiluminescentes^[6,7].

As principais características que tornam as reações quimiluminescentes interessantes para aplicações analíticas são os excelentes limites de detecção que podem ser atingidos e a simplicidade instrumental necessária para o monitoramento da radiação^[8,9].

A elevada sensibilidade obtida nas técnicas baseadas em reações quimiluminescentes, está associada a vários fatores, principalmente pela ausência da necessidade de uma fonte de radiação, eliminando problemas

devido à dispersão de luz, excitação não seletiva e instabilidade e/ou ruído proveniente deste tipo de componente. Isso possibilita a utilização de maiores diferenças de potencial nas fotomultiplicadoras (detectores usualmente utilizados), aumentando a razão sinal/ruído, e a sensibilidade analítica^[8,9]. Limites de detecção na ordem de femtomol (10^{-15} mol) são possíveis em técnicas quimiluminescentes.

A reação quimiluminescente, que mostra maior potencial para aplicação analítica na fase líquida, é a oxidação do luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) em meio alcalino.

A emissão de luz após a oxidação do luminol é iniciada por um forte agente oxidante e pode se intensificar significativamente sob a ação catalisadora de cátions de metais da primeira série de transição. Isso explica a elevada sensibilidade a microquantidades (μgL^{-1} e ηgL^{-1}) dos constituintes da reação^[8,9,11].

1.3.1. Reações quimiluminescentes do luminol

A reação de oxidação do luminol é uma das reações quimiluminescentes clássicas mais estudadas. Data de 1928 o trabalho pioneiro sobre a reação do luminol publicado por Albrecht^[2,10]. A oxidação do luminol por H_2O_2 em meio alcalino foi a primeira reação quimiluminescente descrita e suas propriedades termodinâmicas e cinéticas continuam sendo intensamente estudadas até os dias de hoje^[2].

O mecanismo dessa reação é considerado um dos mais complexos, e mesmo sendo uma reação clássica, apenas algumas etapas foram estabelecidas, restando ainda aspectos a serem elucidados^[2,9,13,14]. Apesar disso, as aplicações analíticas desta reação têm se mostrado bastante versáteis. Neste contexto, as determinações de metais de transição, e de outros modificadores de reação estão se disseminando e cada vez mais sendo utilizadas em conjunto com métodos enzimáticos e de análise em fluxo^[9,12].

O mecanismo das reações envolvidas em uma metodologia analítica é um importante fator para obtenção da exatidão dos resultados. Porém, em alguns casos, este é difícil de interpretar ou impossível de ser desvendado devido à sua complexidade. Assim, as aplicações analíticas destas reações dependem de estudos qualitativos e aproximações pertinentes (observações experimentais e teóricas) sobre o mecanismo da reação para encontrar parâmetros que estabeleçam alguma relação entre as espécies de interesse e o sinal analítico. A reação luminescente do luminol com o H_2O_2 é um destes sistemas^[9].

1.3.2. O Mecanismo da reação quimiluminescente do luminol.

Vários estudos sobre o mecanismo da reação quimiluminescente do luminol já foram publicados^[2,12-14]. Alguns parâmetros físico-químicos, como constantes de velocidade e dependência do pH reacional, além de estudos sobre a participação de outras espécies, como o íon carbonato, no aumento da luminescência também foram discutidos, a fim de justificar as propostas de mecanismo, porém ainda não há um consenso que abranja todos os intermediários e etapas da reação^[2,11,15-17].

ALBERTIN e colaboradores^[13] elaboraram um esquema para um possível mecanismo da reação quimiluminescente do luminol com o H_2O_2 em meio alcalino na presença de um metal de transição atuando como catalisador da reação. Esse esquema é apresentado na **Figura 1.1**.

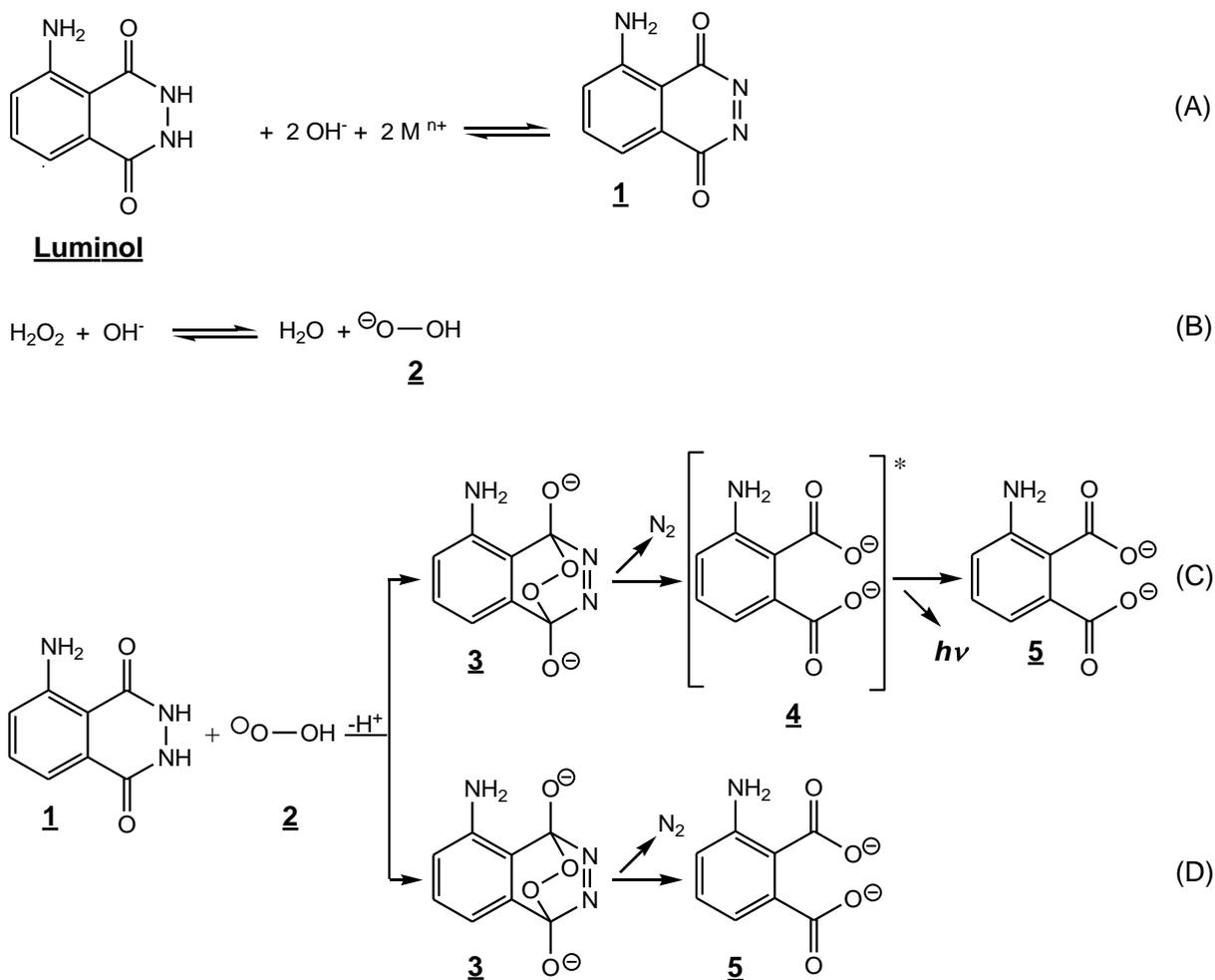


FIGURA 1.1. Mecanismo proposto por ALBERTIN e colaboradores^[13] para a reação quimiluminescente do luminol em meio alcalino e na presença do íon de um metal de transição (M^{n+}), utilizando H_2O_2 como agente oxidante.

Na etapa (A), a ação do íon metálico de transição, que atua como catalisador, sobre a molécula de luminol em meio alcalino leva a formação da diazoquinona (**1**). Na etapa de reação (B) ocorre a formação do ânion peróxido de hidrogênio em meio alcalino (**2**). Duas possíveis rotas de reação para os intermediários (**1**) e (**2**) são apresentadas nas etapas (C) e (D).

A etapa (C) mostra a reação entre os intermediários diazoquinona (**1**) e o ânion peróxido de hidrogênio (**2**) para formar outro intermediário, o endoperoxido (**3**), que em seguida gera o íon 3-amino-ftalato em seu estado eletronicamente excitado (**4**), que irá gerar o íon 3-amino-ftalato

(**5**) em seu estado fundamental e luz. Na etapa (D) há reação entre os intermediários (**1**) e (**2**), produzindo apenas o íon 3-amino-ftalato e N_2 , sem que haja a produção da quimiluminescência.

Para Merényi e colaboradores^[14-17] o processo de oxidação pode ser dividido em duas etapas (**Figura 1.2**):

(i) os caminhos que levam ao intermediário principal, luminol α -hidroxi-peróxido (**10**).

(ii) a decomposição desse intermediário.

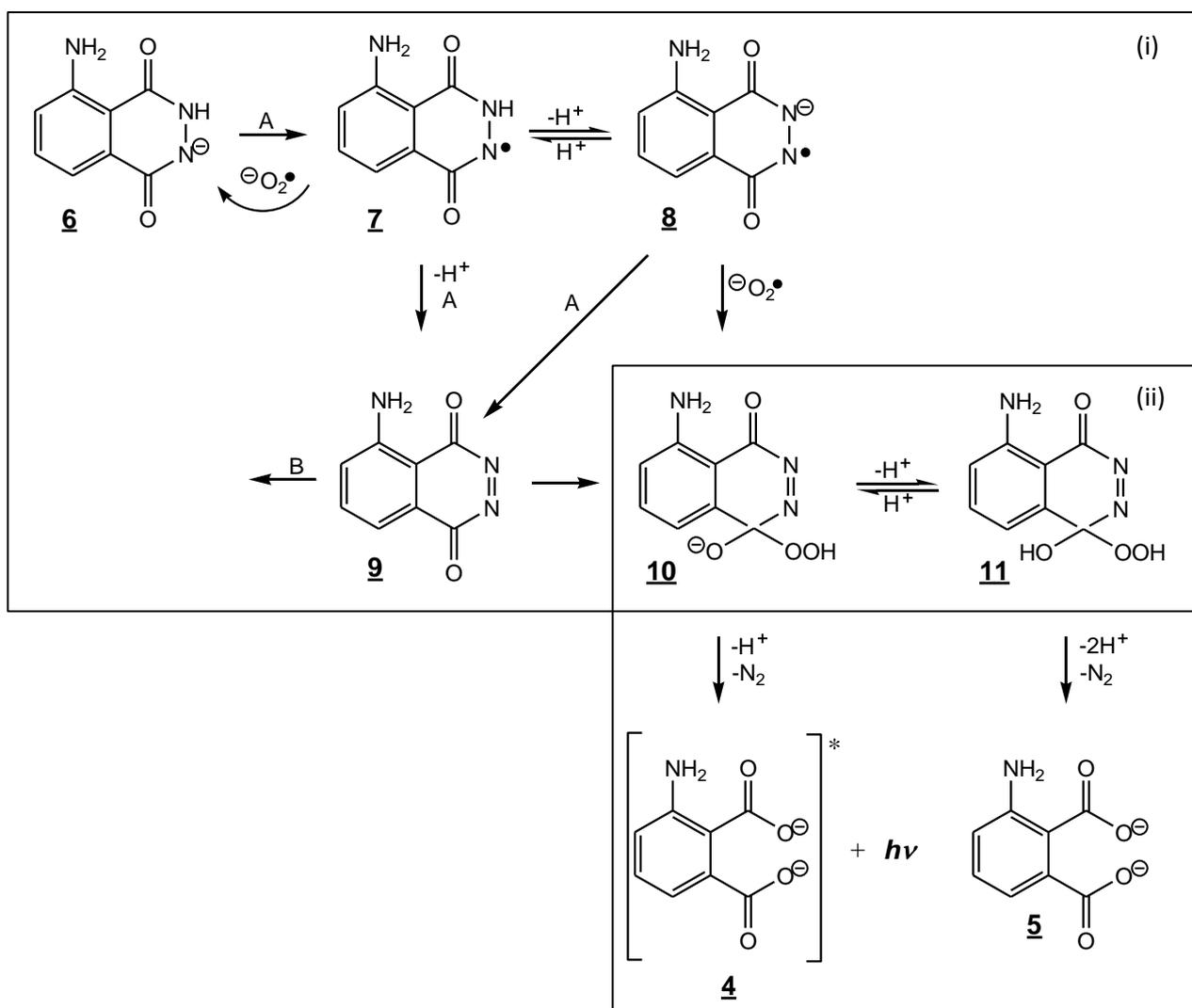


Figura 1.2. Proposta mecanística de Merényi e colaboradores sobre os caminhos da reação quimiluminescente do luminol. **A** representa espécies aceptoras de elétrons e **B** representa nucleófilos.

No início a molécula do luminol, em meio alcalino, está na forma do seu monoânion. O monoânion do luminol (**6**) em reação com uma espécie aceptora de elétrons **A** (radicais livres do luminol, O_2 , cátions de metais de transição e vários de seus complexos) forma o radical luminol (**7**) que estabelece um equilíbrio com sua espécie desprotonada (**8**). A partir de então, Merényi e colaboradores afirmam que existem dois caminhos prováveis à formação do luminol α -hidroxi-peróxido (**10**).

- (i) caminho que aumenta a reação entre HO_2^- e a 3-aminodiazquinona (**9**), regida pela concentração de H_2O_2 no meio;
- (ii) caminho reacional entre o radical (**8**) e o superóxido (O_2^\bullet) regido pela concentração de O_2 no meio.

Uma vez formado o luminol α -hidroxi-peróxido (**10**), este se decompõe ou na forma excitada do íon 3-amino-ftalato (**4**) que se desativa emitindo a radiação, ou converte na sua forma protonada (**11**), que se decompõe no íon 3-amino-ftalato no estado fundamental (**5**), produto final da reação.

Xiao e colaboradores^[18] propuseram outras possibilidades tanto para interação com H_2O_2 , quanto à interação dos cátions metálicos com o luminol e seus intermediários. Fundamentados na aplicação analítica, Xiao e colaboradores, apresentaram três propostas para efeito dos cátions de metais de transição sobre a quimiluminescência do luminol: (i) a ativação de radicais do H_2O_2 ; (ii) a formação do luminol α -hidroxi-peróxido (**10**); e/ou (iii) a decomposição do mesmo. Conforme a proposta (i), a decomposição catalítica do H_2O_2 , provocada pela ação do cátion metálico, levaria à formação do radical $\bullet OH$ que é muito reativo com o luminol e seus intermediários. Na proposta (ii) a formação do principal intermediário (**10**) é iniciada após o íon metálico elétron ou do monoânion do luminol (**6**) ou do radical (**7**) formando a diazoquinona (**9**). Esta proposta coincide com a rota **A** apresentada por Merényi e colaboradores, na **Figura 1.2**.

Em (iii), Xiao e colaboradores sugerem que a decomposição de (**10**) é catalisada por íons de metais de transição e assim agiria diretamente na excitação eletrônica desse intermediário para provocar a luminescência.

Essa proposta não corrobora nem com as propostas de Merényi e nem com as de Albertin e colaboradores.

1.3.3. Fatores que influenciam a emissão quimiluminescente

As determinações quimiluminescentes são fortemente influenciadas por diversos fatores experimentais que afetam o sinal analítico da emissão luminescente^[19]:

- **Volume de amostra:** a emissão de luz é diretamente proporcional ao volume da amostra quando a concentração e a razão dos reagentes não são alteradas;
- **Taxa de reação:** a cinética das reações quimiluminescentes podem se apresentar de forma lenta ou rápida, dependendo do tipo de molécula emissora, do analito e das condições na qual estas reações ocorrem;
- **Concentração dos reagentes:** a concentração do material luminescente afeta diretamente a intensidade da emissão de luz produzida na reação quimiluminescente;
- **Homogeneização dos componentes:** a homogeneização entre os reagentes e a amostra deve ser extremamente reprodutível;
- **pH do meio reacional:** o pH do meio reacional afeta a intensidade da emissão de luz em reações quimiluminescentes;
- **Luz externa:** as reações quimiluminescentes devem ocorrer em ambiente livre da interferência de luz externa para evitar o deslocamento da linha de base.

Se todos os fatores mencionados acima forem controlados, a intensidade do sinal analítico poderá ser relacionada proporcionalmente com a concentração do analito envolvido na reação quimiluminescente, sendo este um princípio básico da análise quantitativa.

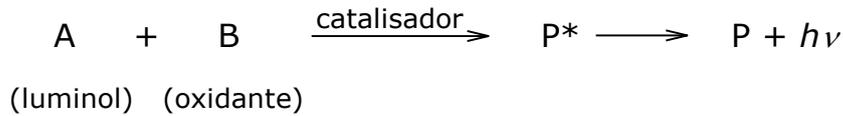
Apesar das grandes dificuldades para elucidar o mecanismo mais provável da reação do luminol e verificar os fatores que influenciam o seu rendimento quântico, esta reação apresenta uma grande potencialidade para o desenvolvimento de novos métodos analíticos. Este comportamento pode ser verificado pelo grande número de artigos científicos envolvendo esse reagente, publicados no decorrer dos últimos 40 anos^[9].

1.3.4. Aplicação do luminol para fins analíticos

A exploração da quimiluminescência do luminol para fins analíticos foi iniciada por volta da década de 50, quando este reagente foi empregado como indicador em reações de titulometria volumétrica^[21,22]. No entanto, somente a partir da década de 70, as reações quimiluminescentes passaram a ter aplicações em análises de rotina. Desde então, o número de reações que produzem quimiluminescência descrito na literatura tem aumentado, particularmente em aplicações em química analítica, biomedicina, análise de alimentos, ambiental e toxicológica^[5,20].

As aplicações da reação quimiluminescente do luminol em química analítica podem ser divididas de acordo com a participação do analito na reação^[2], como pode ser observado no esquema da **Figura 1.3**.

Reação Direta:



Reação Indireta:

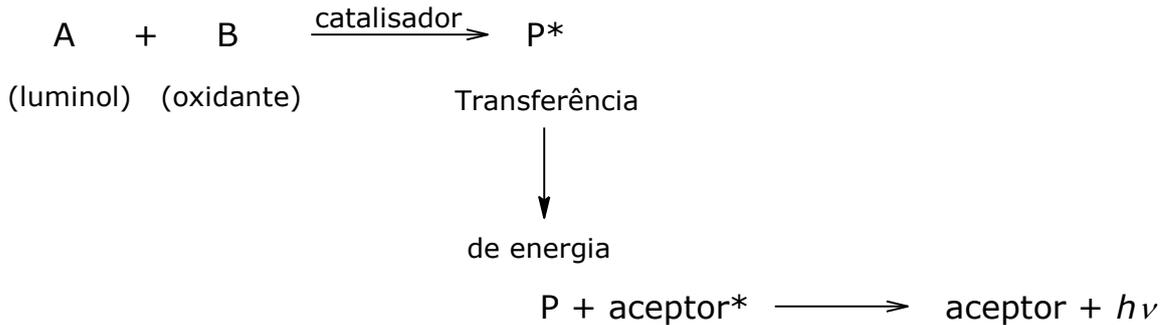


Figura 1.3. Esquema representativo dos tipos de reações quimiluminescentes do luminol, onde **P** representa o produto da reação. Adaptada da Ref. [20].

Na reação direta, o luminol e um oxidante, reagem para formar um produto na presença de um catalisador, do qual uma fração do produto irá formar um estado eletronicamente excitado, que ao retornar ao estado fundamental emitirá REM.

A reação indireta é baseada num processo de transferência de energia da espécie eletronicamente excitada para um acceptor. Neste tipo de reação, o estado eletronicamente excitado do produto da reação quimiluminescente, age como doador de energia para o acceptor, o qual não está diretamente envolvido neste tipo de reação. Ao receber esta energia, o acceptor, forma seu estado eletronicamente excitado e ao retornar para o seu estado fundamental emitirá REM [20].

As aplicações indiretas destacam-se na determinação de substâncias, geradas em reações preliminares e, subsequentemente determinadas pela reação quimiluminescente. Um exemplo dessa aplicação é a determinação de H₂O₂ produzido pela oxidação da espécie de interesse por enzimas, que em seguida participarão da reação

quimiluminescente^[9,19]. Com este tipo de aplicação já foram analisados vários tipos de substratos de enzimas na determinação de H₂O₂ em medicamentos, glicose e colesterol em alimentos^[19], aminoácidos^[23] e DNA^[24].

Nas aplicações diretas, em geral, o analito catalisa a reação quimiluminescente, podendo ser comumente empregado na determinação de metais de transição, ou promove a inibição da radiação quimiluminescente, que é utilizada para a determinação de alguns compostos orgânicos^[9,19].

São conhecidos mais de 30 cátions metálicos que inibem ou catalisam a luminescência, entre eles podemos citar: Al(III), Ag(I), Au(III), Bi(III), Ce(IV), Cd(II), Co(II), Cr(III), Cu(II), Fe(II), Fe(III), Hg(II), Mn(II), Ni(II), Os(III), Pb(II), Pd(II), Sb(II), Sn(II), U(VI), V(III), Zn(II), Zr(IV)^[2,7,11].

As reações quimiluminescentes para fins de análise quantitativa destacam-se por serem técnicas seletivas, precisas e com baixos limites de detecção e quantificação. A quimiluminescência da reação do luminol apresenta aplicabilidade reconhecida para análise de diversos compostos orgânicos, em vários tipos de amostras^[20,25,26]. Na **Tabela 1.1** são apresentadas algumas aplicações envolvendo a reação quimiluminescente do luminol.

TABELA 1.1. Aplicações da quimiluminescência do luminol na determinação de diferentes analitos.

Analito	Amostra	Sistema Químico	Ref.
2,4 diclorofenol	Águas	AuNPs-Luminol-NaOH	[27]
Ácido Ascórbico	Medicamentos	Luminol-Fe(II)-O ₂	[28]
Ácido Mefenâmico	Medicamentos	Luminol-Periodato	[29]
Amicacina	Medicamentos	Luminol-H ₂ O ₂ -Cu(II)	[30]
Antígeno Carcinoembrionário	Plasma humano	Luminol-HRP-H ₂ O ₂	[31]
Captopril	Medicamentos	Luminol-K ₃ [Fe(CN) ₆]	[33]
Cisteína	Medicamentos	Luminol-Cisteína-NaIO ₄	[33]
Cloreto de Oximetazolina	Medicamentos	Luminol-KMnO ₄	[34]
Cortisol	Sangue humano	Luminol-Ag(III)	[35]
Dopamina	Medicamentos	Luminol-K ₃ [Fe(CN) ₆]	[36]
Estradiol	Sangue humano	Luminol-HRP-H ₂ O ₂	[37]
Levofloxacina	Medicamentos, urina humana e sangue	Luminol-Mioglobina	[38]
Lisozima	Clara de ovo	Luminol-AuNPs	[39]
Melanina	Produtos a base de leite	Luminol-H ₂ O ₂	[40]
N-metilcarbamato	Águas e vegetais	Luminol-KMnO ₄	[41]
Omega-Cloroacetofenona	Extratos etanólicos	Luminol-H ₂ O ₂	[42]
Paracetamol	Medicamentos	Luminol-Paracetamol-NaOCl	[43]
Rutino	Urina humana	Luminol-K ₃ [Fe(CN) ₆]	[44]
Sibutramina	Medicamentos	Luminol-Sibutramina	[45]
Terbutalina	Plasma	Luminol-K ₃ [Fe(CN) ₆]	[46]

Assim como ocorreu nas últimas décadas, espera-se que a descoberta de novas reações quimiluminescentes mais seletivas possa elevar potencialmente o número de analitos que poderão ser determinados por essa técnica.

1.4. A vitamina B₁₂

A vitamina B₁₂ é um complexo tetrapirrol de cobalto(II) que desempenha um papel importante na fisiologia humana. O íon de

cobalto(II) presente na vitamina B₁₂ atua no metabolismo do ferro e da síntese da hemoglobina, como também é o constituinte principal em outros compostos biológicos^[11,52]. No sentido amplo, a vitamina B₁₂ compõe um grupo de compostos conhecidos como cobalaminas (**Figura 1.4**), a qual inclui a cianocobalamina, a hidroxocobalamina e as duas formas biológicas encontradas na natureza como cofatores enzimáticos, a metilcobalamina e 5-desoxiadenosilcobalamina^[55-58].

A deficiência de vitamina B₁₂ pode causar anemia perniciosa e neuropatia periférica, causando alterações neurológicas progressivas quando não há tratamento adequado. Pessoas que mantêm uma dieta exclusivamente vegetariana estão mais propícias a este tipo de doença, uma vez que as principais fontes desta vitamina são de origem animal.

A vitamina B₁₂ apresenta características negativas como, a instabilidade em sua concentração quando exposta a luz, temperatura e oxidação. Desta forma, são necessários métodos de análises eficientes para o controle de qualidade desse medicamento.

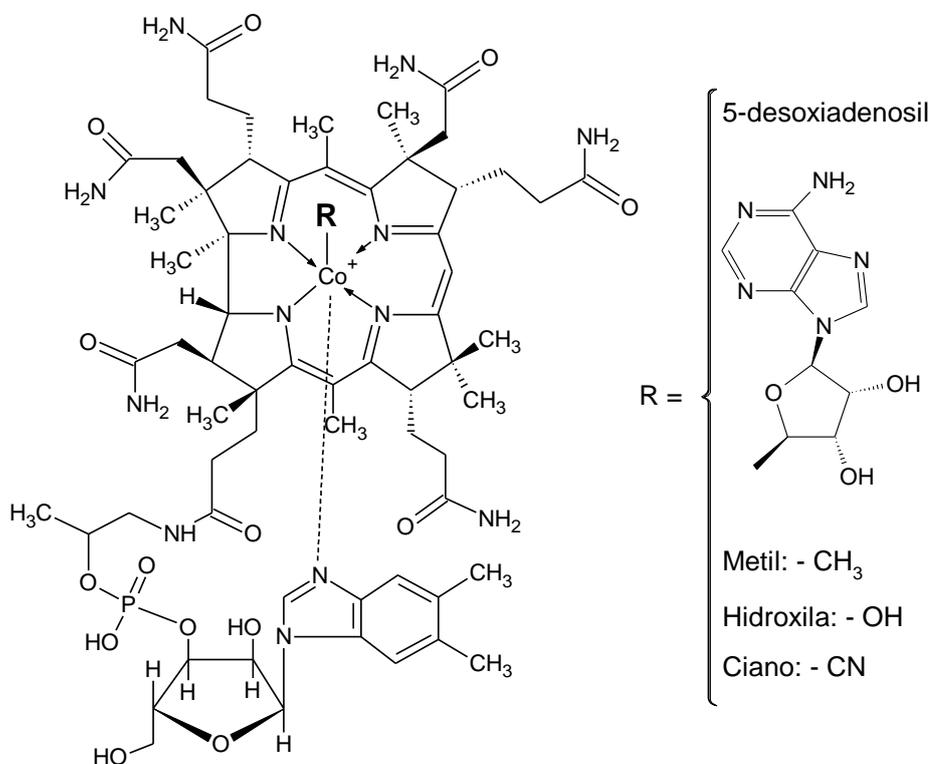


Figura 1.4. Estrutura molecular da cobalamina. Adaptada da Ref. ^[57].

1.5. Determinação de vitamina B₁₂ por quimiluminescência

Diferentes metodologias são propostas para a determinação de vitamina B₁₂, tais como aqueles que usam ensaios microbiológicos^[47], fluorimetria^[49], cromatografia^[51], espectrofotometria^[48], espectrometria de absorção atômica^[50] e etc.

Por apresentar grande sensibilidade, boa seletividade e requerer instrumentação simples, a quimiluminescência vem se tornando uma alternativa atraente para determinação da vitamina B₁₂ em alimentos, medicamentos e fluidos biológicos^[11,43,52,53].

Para esse sistema quimiluminescente o íon cobalto(II), pode ser extraído da vitamina B₁₂ por hidrólise ácida, que posteriormente desempenha a função de catalisar a reação de oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogênio. Essa reação demonstra-se extremamente sensível a pequenas quantidades do íon cobalto(II), o que torna pertinente a análise da vitamina B₁₂ a baixos limites de detecção^[11].

QIN e colaboradores^[52] apresentaram um novo sensor quimiluminescente para vitamina B₁₂ em medicamentos combinado a um sistema de análise por injeção em fluxo (do inglês, *Flow Injection Analysis*, FIA), tendo como sistema de detecção uma fotomultiplicadora. O sistema químico baseou-se no efeito catalítico do Co(II) (liberado por acidificação, e posteriormente imobilizado eletrostaticamente em uma coluna de troca iônica) na reação entre o luminol e o peróxido de hidrogênio, que foi gerado através de um eletrodo negativo de oxigênio dissolvido na célula de fluxo. O sensor respondeu linearmente a uma faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ – 10 mg L^{-1} e o limite de detecção foi de $3,5 \times 10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$ de vitamina B₁₂. A frequência de analítica foi de 60 determinações h⁻¹ e um desvio padrão relativo menor que 3,5%.

SONG e HOU^[53] desenvolveram um sistema FIA para determinações quimiluminescentes de vitamina B₁₂. Neste trabalho, verificou-se que o cobalto(II), liberado a partir da vitamina B₁₂, catalisa consideravelmente a reação quimiluminescente entre o luminol e o oxigênio dissolvido. A intensidade quimiluminescente foi proporcional à concentração de

vitamina B₁₂ em uma faixa de concentração de $2,0 \times 10^{-10}$ – $1,2 \times 10^{-6}$ g L⁻¹, com limite de detecção de $5,0 \times 10^{-11}$ g L⁻¹. A emissão quimiluminescente foi detectada por uma fotomultiplicadora alimentada a 750 V. Esse sistema apresentou uma alta frequência analítica, realizando 120 determinações h⁻¹ e um desvio padrão relativo inferior a 5,0%. O método desenvolvido também foi aplicado para determinação de vitamina B₁₂ em produtos farmacêuticos, plasma sanguíneo, gema de ovo e tecidos de peixes.

AKBAY e GÖK^[54] propuseram um método para determinar vitamina B₁₂ em medicamentos através de medidas quimiluminescentes utilizando um sistema FIA com detecção baseada em fotomultiplicadora. O sistema proposto também foi baseado no efeito catalítico do Co(II) presente na vitamina B₁₂ na reação entre o luminol e o peróxido de hidrogênio em meio básico. A intensidade quimiluminescente foi proporcional à concentração de vitamina B₁₂ na faixa de 8,68 – 86,9 µg L⁻¹, com um limite de detecção de 0,89 µg L⁻¹. Nesse procedimento, um volume total de amostras e reagentes de 6,5 mL por análise foi usado.

PULGARÍN e colaboradores^[56] desenvolveram um método sensível para determinação de vitamina B₁₂ utilizando um sistema FIA acoplado a um fotodetector baseado em CCD (do inglês, *Charge-Coupled Device*). O princípio para determinação da vitamina B₁₂ é baseado no efeito catalisador do cobalto(II) na reação quimiluminescente entre o luminol e o íon percarbonato, como fonte de peróxido de hidrogênio, em meio alcalino. A intensidade da emissão foi proporcional à concentração da vitamina B₁₂, apresentando uma curva de calibração de segunda ordem no intervalo de concentração de 10 – 5000 µg L⁻¹, com limite de detecção de 9,3 µg L⁻¹. A frequência de analítica foi de 60 determinações h⁻¹.

1.6. Instrumentação básica para análises quimiluminescentes

A intensidade do sinal analítico, que é a radiação emitida a partir de reações químicas ou bioquímicas, está relacionada com a concentração das espécies participantes na reação, onde a quantidade da radiação emitida é proporcional à concentração de uma determinada espécie. Por este motivo, a medida da radiação emitida é um indicador da quantidade de analito presente na amostra e os instrumentos básicos para estas medidas são denominados luminômetros.

Uma das vantagens mais importantes da quimiluminescência como técnica analítica é a simplicidade instrumental, que em alguns casos é similar à utilizada por outros métodos ópticos, como espectrofotometria e fluorescência. Entretanto, os equipamentos são geralmente mais simples devido à ausência de fontes de radiação externas e de dispositivos para a discriminação de comprimentos de onda.

A instrumentação básica para técnicas quimiluminescentes inclui como componentes principais: uma cela de reação ou reator, livre da interferência de luz externa; um dispositivo para introduzir e misturar os reagentes e a amostra; um detector de luz; e um sistema de aquisição e processamento de sinais^[20,59]. A **Figura 1.5** mostra um diagrama esquemático básico de um luminômetro.

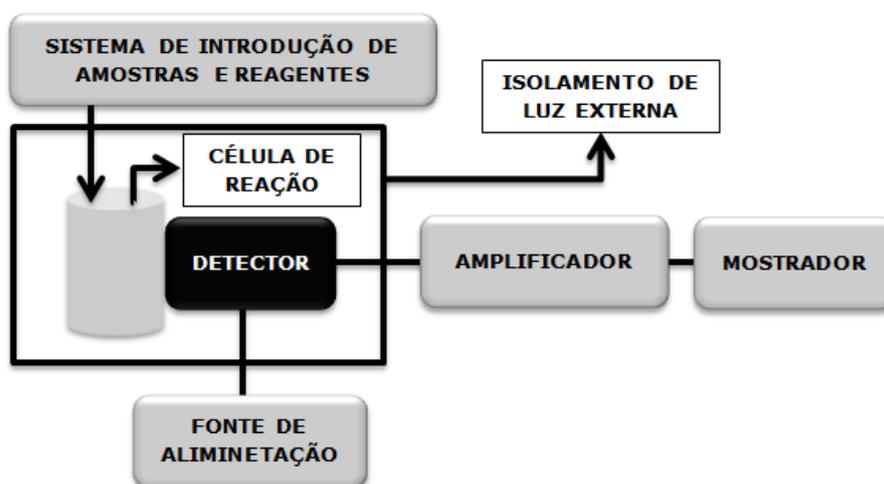


Figura 1.5. Esquema básico de configuração de um luminômetro. Adaptada da Ref. [20].

1.6.1. Sistema de introdução de amostras e reagentes

Dependendo da configuração do instrumento e do método de introdução da amostra e dos reagentes, é possível classificar os sistemas em^[60-62]:

- **sistema com amostragem contínua:** são caracterizados pelo uso de um fluxo contínuo dos fluidos. Nesse tipo de sistemas as amostras são inseridas no percurso analítico através de um bombeamento contínuo, consumindo quantidades relativamente altas de amostra.
- **sistema com amostragem discreta:** cada amostra preserva sua integridade em um recipiente, onde são mecanicamente transportadas para várias zonas do analisador de forma sequencial. Cada amostra é conduzida ao detector do instrumento, onde os sinais são registrados. Nesta forma de amostragem, as amostras estão sempre retornando aos seus recipientes.

Em geral, os instrumentos utilizados na realização de determinações quimiluminescentes utilizam um sistema discreto para introdução das amostras e dos reagentes. Normalmente, um injetor automático é utilizado para esta função, tornando os volumes a serem introduzidos na cela de reação mais reprodutíveis. A mistura da amostra com os reagentes são alcançados pela força da injeção dos fluidos, embora uma barra magnética de agitação e um agitador possam ser utilizados, possibilitando, dessa forma, que todo o perfil da intensidade quimiluminescente *versus* o tempo de reação seja monitorado. O sinal analítico pode ser tomado como a intensidade máxima (altura do pico) ou pela integral da área total da curva quimiluminescente, como mostra a **Figura 1.6.**

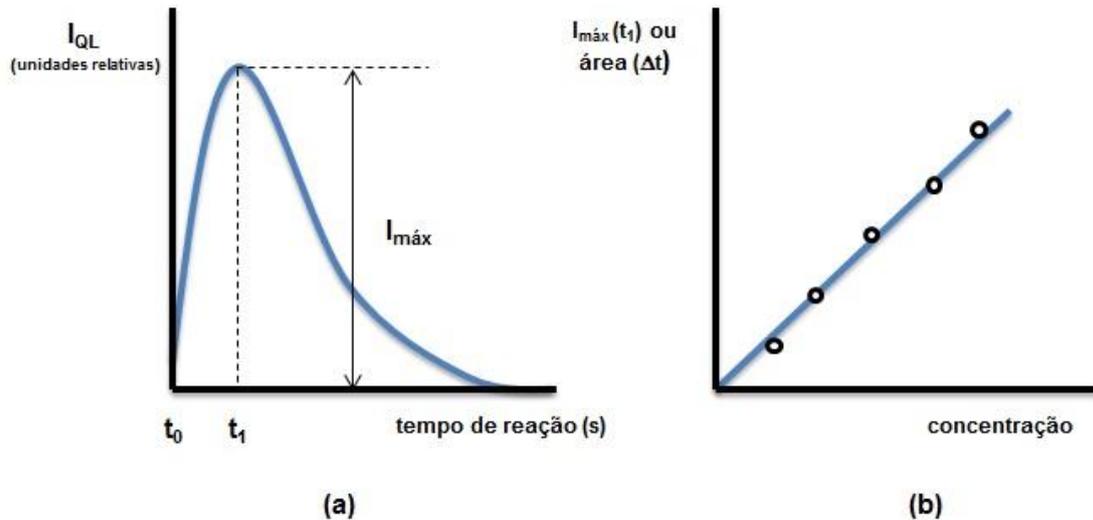


Figura 1.6. Sinal analítico proveniente de reações quimiluminescentes. (a) É mostrada a curva da intensidade de quimiluminescência em função do tempo após a mistura dos reagentes para iniciar a reação. A diminuição do sinal analítico ocorre em consequência do consumo dos reagentes e mudanças na eficiência quântica quimiluminescente com o passar do tempo. (b) A curva de calibração é estabelecida em relação às concentrações crescentes ou decrescentes do analito. Adaptada da Ref. [20].

1.6.2. Cella de reação

A cela de reação é o dispositivo onde ocorre praticamente toda a mistura entre os reagentes e amostra. Dependendo da reação quimiluminescente é possível utilizar diferentes tipos de celas, procurando sempre maximizar a intensidade do sinal analítico.

A cela de reação é um fator crítico em técnicas quimiluminescentes devido à magnitude da intensidade do sinal analítico ser proporcional ao volume da cela^[20]. Isso acontece porque a quantidade de fluoróforos, que são as espécies químicas responsáveis pela emissão de luz, está diretamente ligada ao volume da cela, ou seja, quanto maior o volume, maior será o número de espécies fluoróforas e, conseqüentemente, maior será a intensidade de emissão da radiação.

A localização e a distância da cela em relação ao detector também são variáveis que precisam ser consideradas para garantir a reprodutibilidade das medidas.

Normalmente é possível utilizar celas de reação de qualquer material que permita a passagem da luz na faixa do visível e seja compatível com a amostra, tais como o vidro, quartzo, acrílico e polietileno. Estes materiais permitem que uma maior quantidade de radiação chegue ao detector, resultando em uma melhor sensibilidade^[20].

Alguns modelos de celas de fluxo têm sido explorados em sistemas quimiluminescentes^[63,64] como as celas *fountain*^[65], *droplet*^[66], *bundle*^[67] e *vortex*^[68], porém, estes tipos de celas de reação ainda não alcançaram uma aceitação geral, devido à sua complexidade de fabricação e a atual falta de evidências de vantagens significativas sobre a sensibilidade do sinal analítico^[63]. Alternativamente, celas em forma de espiral^[64] tem sido comumente utilizado em determinações quimiluminescentes, a fim de melhorar a mistura e aumentar o volume dentro da zona de detecção. No entanto, apesar de procedimentos bastante sensíveis serem implementados com estes dispositivos, sua aplicação apresenta algumas limitações como: (i) a mistura é iniciada antes da amostra e reagentes entrarem cела de reação; (ii) os tubos utilizados são geralmente translúcidos, em vez de totalmente transparentes e (iii) apresentar problemas com a dispersão e a reflexão da radiação^[63].

1.6.3. Sistema de detecção

Segundo CAMPBELL^[73] existem três requisitos básicos para que um detector seja utilizado na instrumentação de medidas quimiluminescentes:

1. resposta do detector deve estar diretamente relacionada à intensidade da luz emitida, tendo uma resposta linear dentro de uma ampla faixa de concentração;
2. Deve ser sensível, pelo menos, na faixa espectral de 400 – 600 nm. O ideal é que se estenda por todo espectro visível;

3. A velocidade de resposta do detector deve ser muito maior que a velocidade da reação quimiluminescente.

Em instrumentos destinados a medidas quimiluminescentes, como os luminômetros, a luz é detectada por meio de dispositivos fotossensíveis através da geração de uma fotocorrente. Fotodiodos e tubos fotomultiplicadores (do inglês: *Photomultiplier Tubes*) ou simplesmente fotomultiplicadoras, são os dispositivos de detecção comumente utilizados em luminômetros comerciais. Melhorias realizadas nos fotodiodos têm os tornado eficazes para algumas aplicações devido a sua pequena dimensão e baixo consumo de energia. Esses atributos tornam a sua utilização atraente especialmente para desenvolvimento de luminômetros portáteis. No entanto, os PMTs são mais utilizados devido a sua eficiência em amplificar o efeito de um único fóton incidente. Esta amplificação ocorre muito rapidamente e é praticamente isenta de ruídos elétricos gerados externamente. Isso torna os PMTs adequados para detecção em baixos níveis de luz^[74].

Outro modo de detecção é o uso de dispositivos de carga acoplada que vem sendo apresentado como uma alternativa inovadora para melhorar a seletividade requerida na maioria das determinações analíticas. Esses dispositivos permitem obter perfis espectrais completos, aumentando as informações a partir da reação quimiluminescente^[56].

1.6.4. Sistema de aquisição de sinais

O sistema de detecção produz uma corrente (que é convertida em tensão na maioria das aplicações) proporcional à intensidade luminosa, que em seguida é amplificada e então é registrada. Muitas vezes, após a amplificação o sinal de leitura dos transdutores analógicos é convertido em sinal digital, uma vez que o domínio digital permite que o sinal possa ser tratado com mais precisão através de um programa de computador.

Esse mesmo programa pode controlar facilmente todos os parâmetros instrumentais, como também pode armazenar e manipular a resposta analítica.

1.7. Métodos automáticos de análises químicas

Nas últimas décadas tem-se assistido a um crescente interesse por parte dos laboratórios analíticos, em desenvolver métodos automáticos de análise com o propósito de simplificarem os procedimentos analíticos, de forma a realizarem um número cada vez maior de determinações analíticas, mantendo os custos em valores aceitáveis. Além disso, a implementação de metodologias automáticas apresentam algumas outras vantagens, tais como^[75,76]:

- **Baixa intervenção humana.** Substituição do operador em tarefas de rotina ou perigosas, como por exemplo, aquelas que envolvem a manipulação de substâncias tóxicas ou explosivas, resultando em maior segurança e prevenção de erros subjetivos;
- **Aprimoramento do desempenho analítico,** particularmente em relação ao aumento significativo na precisão e exatidão dos resultados;
- **Gestão de reagentes químicos.** Minimiza o consumo de reagentes químicos, implicando na diminuição dos custos por análise, como também na redução da produção de resíduos gerados.

As análises químicas automatizadas têm encontrado aplicações em diversas áreas, mas foi na área de análises clínicas onde a elevada demanda diária por diagnósticos rápidos, de qualidade e para várias espécies químicas incentivou a sua implantação e consolidação da

automação analítica em nível mundial. Hoje grande parte das análises químicas e bioquímicas de rotina e demanda em laboratórios industriais, governamentais, ambientais, farmacêuticos, forenses e acadêmicos são realizados em sistemas parcialmente ou totalmente automáticos^[75,76].

1.7.1. Analisadores em fluxo-batelada

No final da década de 90, Honorato e colaboradores^[77] promoveram o desenvolvimento dos Analisadores em Fluxo-Batelada (AFB) como uma nova estratégia para automação de processos de análise química. Estes sistemas foram caracterizados como um híbrido dos sistemas automáticos em batelada e em fluxo, portando, desta forma, grande parte das vantagens analíticas de ambos.

No AFB, as amostra(s) e reagente(s) são bombeados ou aspirados para uma câmara de mistura a partir do tempo de abertura de válvulas solenoides. Nesta câmara ocorre a homogeneização destas substâncias, que é realizada por meio de uma barra magnética de agitação e um agitador. Após o processamento a reação, a mistura é bombeada para o detector. Em alguns casos, a detecção é realizada dentro da própria câmara de mistura.

Todo o processo acima descrito pode ser rapidamente realizado usando quantidades mínimas de amostra e reagentes, com grande precisão e exatidão. Nos analisadores em fluxo-batelada, todo o procedimento de controle é efetuado com auxílio de um microcomputador, que garante a reprodutibilidade e velocidade nas aplicações^[11,75,78].

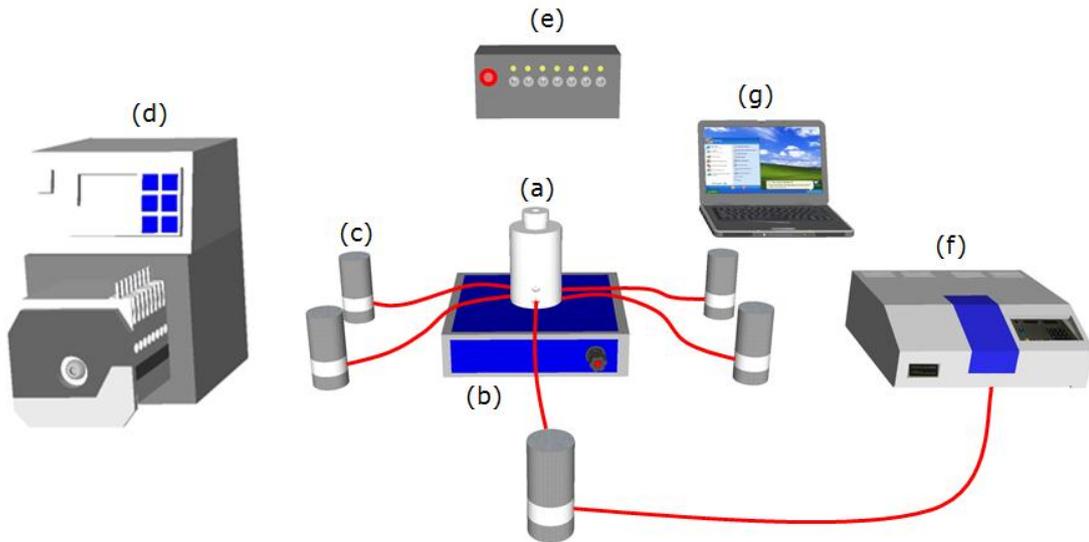


FIGURA 1.7. Esquema simplificado com os componentes principais de um sistema AFB. (a) câmara de mistura; (b) agitador magnético; (c) válvulas solenoides de três vias; (d) bomba peristáltica; (e) acionador de válvulas; (f) detector; (g) computador. Adaptada da Ref. [75].

Na **Figura 1.7** é apresentado um diagrama esquemático que mostra os componentes comumente utilizados para as várias operações unitárias no processo de análise em fluxo. Um sistema AFB típico consiste normalmente de cinco partes essenciais:

1. Um **sistema de propulsão**, que impulsiona os fluidos por todo o percurso analítico do sistema.
2. Um **sistema de condução dos fluidos** conectando fisicamente todos os elementos que compõem o percurso analítico.
3. Um **sistema de comutação**, que utiliza válvulas solenoides de três vias para direcionamento dos fluidos ora para a câmara de mistura, ora para os respectivos recipientes de origem.
4. Uma **câmara de mistura ou reação**, onde adições de alíquotas de amostra, reagentes, soluções de calibração, tampão, diluentes, indicadores, etc., são feitas através do sistema em fluxo.

- Um **sistema de detecção**, permitindo o monitoramento de uma dada propriedade da amostra ou de seu produto, fornecendo informações qualitativas e/ou quantitativas sobre a matriz.

1.7.1.1. Sistema de propulsão

As bombas peristálticas (**Figura 1.8**) são as unidades de propulsão de fluidos mais comumente utilizadas em sistemas FB devido a sua capacidade multicanal. Isso favorece o bombeamento de várias linhas de amostra(s) e reagente(s) de forma simultânea, mantendo a vazão constante e perfeitamente reproduzível. Bombas peristálticas modernas podem ser controladas por microcomputador e diferentes vazões podem ser estabelecidas durante uma mesma medida analítica.



FIGURA 1.8. Bomba peristáltica comercial utilizada na propulsão dos fluidos em sistemas AFB.

Recentemente, ALMEIDA e colaboradores^[61,79] desenvolveram um sistema AFB utilizando uma bomba pistão acoplada à câmara de mistura para propulsão dos fluidos (**Figura 1.9**). Nesse tipo de analisador, a propulsão é promovida dentro da própria câmara de mistura devido à ação de um pistão pneumático inserido no seu interior. O funcionamento desse sistema é baseado na diferença de pressão dentro da câmara de mistura pelo movimento do pistão. O acoplamento entre o motor de

passos e o pistão forma a unidade de propulsão do analisador, que funciona de forma similar a uma bomba seringa.

Os volumes dos fluidos que são aspirados para a câmara de mistura são controlados pelo tempo de acionamento das válvulas solenoides, que atuam como interruptoras de fluxo, e pela rotação de um motor de passos, responsável pelo movimento do pistão, que é controlado por meio de um microcomputador.

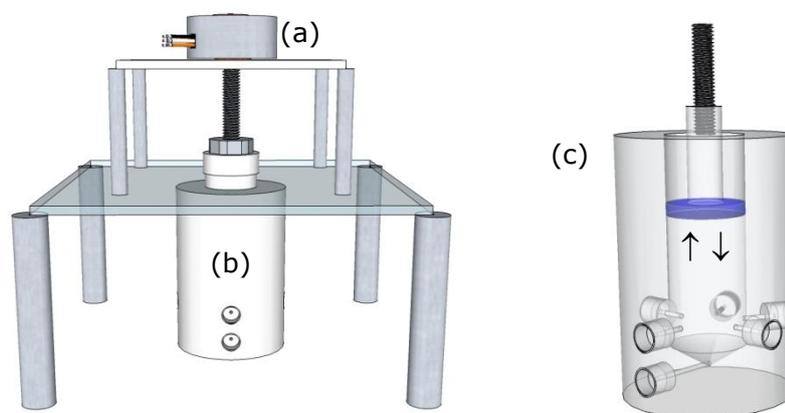


FIGURA 1.9. Bomba pistão acoplada à câmara de mistura desenvolvido por ALMEIDA e colaboradores^[61,79] para propulsão dos fluidos em um sistema FB. (a) motor de passos (b) câmara de mistura (c) visualização interna da câmara de mistura com o pistão inserido em seu interior. As setas indicam os sentidos de movimento do pistão.

Essa relevante contribuição permite o desenvolvimento de sistemas FB de baixo custo, sem perdas de sensibilidade e reprodutibilidade, mantendo a robustez, flexibilidade e relativa portabilidade.

1.7.1.2. Sistema de condução dos fluidos

Os arranjos para condução de fluidos mais comuns de sistemas FB são geralmente compreendidos de tubos com diâmetro interno de 0,2 a 2,5 mm.

Os principais tipos de tubos utilizados em sistemas FB são ditos tubos de bombeamento (normalmente empregados em bombas peristálticas) e tubos de condução.

Para a propulsão dos fluidos, tubos flexíveis estão disponíveis em diferentes materiais, dependendo do tipo de fluido a ser impelido^[80]. Dois colares são geralmente colocados perto das extremidades de cada tubo da bomba, os quais servem como pontos de ligação entre os arreios da bomba e ajudam a identificar o diâmetro interno e, portanto, a vazão a partir do código de cores dos colares (**Figura 1.10**).

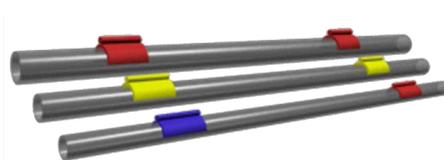


FIGURA 1.10. Tubos de bombeamento para bombas peristálticas. Para bombas com velocidade de rotação fixa, o diâmetro interno desses tubos e a rotação da bomba determinam a ordem de grandeza da vazão.

A incompatibilidade entres os tubos de bombeamento com ácidos e bases concentradas e solventes orgânicos geralmente força a calibração periódica do sistema FB ou a utilização de tubos resistentes a estes reagentes. A adsorção física dos analitos orgânicos em tubo de PVC (cloreto de polivinila, comercializado com o nome de Tygon[®]) é outra limitação prática comumente descrita^[81]. Já para a condução dos fluidos, alguns tubos, como os de PTFE (politetrafluoretileno, comercializado com o nome de Teflon[®]) são utilizados por serem quimicamente inertes. Contudo, tubos de Tygon[®] também são adequados para uma ampla variedade de reagentes. Quando o bombeamento de solventes orgânicos é requerido, tubos de Solvaflex[®] ou Viton[®] devem ser empregados^[78].

1.7.1.3. Sistema de comutação

Visando o desenvolvimento da instrumentação analítica para sistemas de análise em fluxo, Reis e colaboradores^[82] propuseram o uso de válvulas solenoides de três vias (**Figura 1.11**), que são dispositivos discretos de inserção de fluidos, e são controladas independentemente por meio de um microcomputador. Esse processo permite automatizar os procedimentos analíticos através do controle na inserção de alíquotas de amostras e soluções de forma intercalada ou sequencial^[83-84].



FIGURA 1.11. Visualização externa e interna de uma válvula solenoide de três vias utilizadas em sistemas AFB.

Os sistemas FB por fazer uso da comutação apresentam a vantagem de não necessitarem de uma reconfiguração física do sistema, permitindo apenas que se altere o funcionamento do módulo de análise sem alterar a configuração do mesmo.

1.7.1.4. Câmara de mistura ou reação

A câmara de mistura é um componente fundamental em um sistema FB. Neste dispositivo ocorre a maior parte dos procedimentos analíticos, como mistura, homogeneização, reação e condicionamento dos fluidos e preparo de soluções de calibração.

Uma câmara de mistura (**Figura 1.12**) consiste de uma pequena peça cilíndrica, geralmente feito de Teflon[®] ou acrílico, com volume interno variável, de aproximadamente 0,50 a 2,00 mL, onde se encontram os canais de entrada e saída dos volumes dos fluidos utilizados.

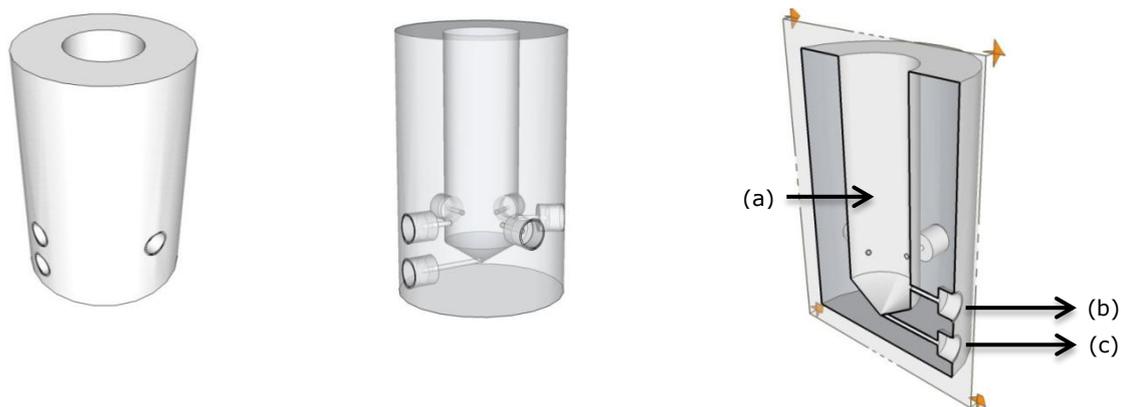


FIGURA 1.12. Câmara de mistura de sistemas FB. (a) cavidade; (b) entrada de fluidos; (c) entrada/saída de fluidos.

Através do uso da câmara de mistura é possível que as amostras e/ou reagentes sejam processados em batelada. Assim, as medidas podem ser realizadas com a máxima sensibilidade, pois os equilíbrios físico e químico do processo analítico podem ser alcançados.

1.7.1.5. Sistema de detecção

Um sistema de análise em fluxo permite utilizar diferentes dispositivos de detecção, dependendo do tipo de análise química ou da quantidade de analito a ser investigada. Nesse contexto, uma característica marcante do analisador FB é a sua versatilidade quanto ao seu acoplamento a diversas formas de detecção, conforme apresentado na **Tabela 1.2.**

TABELA 1.2. Sistemas de detecção utilizados em diversos sistemas FB descritos na literatura.

Analito	Amostra	Sistema de detecção	Ref.
Albumina e proteínas totais	Plasma sanguíneo	Fotométrica	[85]
Alumínio	Tecidos de plantas	Espectrofotométrica	[86]
Bromo	Produtos petroquímicos	Coulométrica/Biamperométrica	[87]
Cloro	Alvejantes	Biamperométrica	[88]
Cobre	Cachaça	AAS	[89]
Cu, Cr e Pb	Gasolina e nafta	GF AAS	[90]
Cu ²⁺ , Mn ²⁺ e Zn ²⁺	Polivitaminas	Espectrofotometria UV-vis	[91]
Cu ²⁺ , Sn ²⁺ e Pb ²⁺	Polivitaminas	Turbidimétrica/Nefelométrica	[92]
Ferro	Ligas metálicas e minérios de ferro	Espectrofotométrica	[93]
Ferro	Etanol hidratado	AAS	[94]
Ferro	Medicamentos	Fotométrica	[95]
Ferro (III)	Águas estuarinas	Espectrofotométrica	[96]
Fósforo	Tônicos fortificantes	Fotométrica	[97]
Glutamato monossódico	Alimentos	Nefelométrica	[98]
Levodopa e carbidopa	Medicamentos	Espectrofotométrica	[99]
Manganês	Água mineral	ET AAS	[79]
Metronidazol	Medicamentos	Espectrofotométrica	[100]
Sódio	Álcool combustível	Fotometria de chama	[101]
Taninos	Chás	Fotométrica e turbidimétrica	[75]

1.7.2. Características dos sistemas FB

A combinação de características intrínsecas dos analisadores em fluxo (alta velocidade analítica, baixo consumo de amostra e reagentes, baixo custo relativo de montagem e facilidade de automatização) e dos analisadores em batelada (universalidade de aplicações, robustez e versatilidade) fornece ao AFB figuras de mérito como: altas precisão e velocidade analítica; baixo custo por análise; baixo consumo, manipulação e contaminação de reagentes e amostras; e geração de pouco resíduo para o meio ambiente.

De maneira geral, os sistemas FB apresentam as seguintes características^[61]:

- funcionam apenas sob rigoroso controle via microcomputador, garantindo grande precisão no controle do tempo de acionamento das válvulas solenoides e, conseqüentemente, nos volumes dos fluidos adicionados na câmara;
- métodos clássicos bem estabelecidos são bem mais fáceis de serem automatizados usando estes sistemas do que através de outros sistemas de análise em fluxo;
- oferecem muita flexibilidade à aplicação de várias metodologias, as quais podem ser modificadas de forma conveniente para um determinado tipo de amostra. Por exemplo, pode-se trabalhar em uma faixa muito ampla de concentração, mudando apenas os parâmetros operacionais em seus programas de controle;
- são analisadores muito versáteis porque permitem a implementação de diferentes procedimentos analíticos, modificando-se apenas o programa de controle, sem alterar as configurações físicas do sistema;
- devido à associação das vantagens intrínsecas dos sistemas discretos (batelada) e dos analisadores em fluxo, qualquer metodologia pode, em princípio, ser implementada usando um AFB, ou seja, eles apresentam um caráter universal.

Os sistemas FB têm sido utilizados para realizar diferentes procedimentos analíticos como: titulações^[93,100], pré-tratamento da amostra para ajustá-la ao pH^[86,102] ou à salinidade adequada do meio de análise^[96], adições de padrão^[89,101], preparação de soluções padrão e misturas para calibração univariada^[61,90] ou multivariada^[92].

1.8. Analisadores em fluxo-batelada e determinações quimiluminescentes

Recentemente alguns trabalhos envolvendo o uso de sistemas FB com detecção quimiluminescente foram desenvolvidos para determinação de alguns analitos específicos.

MOREIRA^[11] propôs em seu trabalho a utilização de um planejamento experimental para otimização da reação entre o luminol e o peróxido de hidrogênio, visando desenvolver um sistema quimiluminescente em fluxo-batelada para determinação de Vitamina B₁₂ em medicamentos. Um espectrofluorímetro com um tubo fotomultiplicador foi utilizado para detecção do sinal quimiluminescente. A faixa de intensidade do sinal analítico foi obtida no intervalo de concentração de 5,0 – 2560 µg L⁻¹ de vitamina B₁₂, com limite de detecção 0,89 µg L⁻¹.

GRÜNHUT e colaboradores^[103] desenvolveram um sistema de análise em fluxo-batelada empregando detecção quimiluminescente para determinação de noradrenalina, dopamina e epinefrina em fármacos. O método baseou-se no efeito inibidor das catecolaminas mencionadas acima em um sistema químico envolvendo o luminol e hexacianoferrato (III) de potássio em meio alcalino. A detecção do sinal analítico foi realizada por uma fotomultiplicadora, registrando a emissão de fótons a 425 nm. O sistema FB proposto apresentou ser um método de análise simples, de baixo custo, versátil e de alta sensibilidade analítica. O tipo de analisador utilizado permitiu a preparação automática de soluções padrão e o processo analítico pode ser realizado alterando-se apenas alguns parâmetros operacionais do programa do AFB. A intensidade de quimiluminescência foi registrada nas faixas de concentração de 4,5 – 10,6 µg L⁻¹ de noradrenalina; 8,0 – 18,8 µg L⁻¹ de dopamina e 14,7 – 34,3 µg L⁻¹ de epinefrina, com limites de detecção de 1,1 µg L⁻¹; 2,1 µg L⁻¹ e 3,3 µg L⁻¹, respectivamente.

CAPÍTULO 2

EXPERIMENTAL

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes, soluções e amostras

A descontaminação de vidrarias, recipientes e da câmara de mistura foi realizada utilizando uma solução de HNO_3 10% em um banho ultrassônico (UltraSonic Cleaner, Unique, modelo USC-1800A) durante 10 minutos. Água sempre recém-destilada e posteriormente deionizada por um sistema de purificação Milli-Q Plus[®] (Millipore, Bedford, MA), com resistividade específica de 18,2 $\text{M}\Omega$ cm a 25 °C, foi utilizada em todas as soluções.

- **Solução de luminol**

Uma solução de luminol ou 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona ($\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$, Sigma 97% P.A.) de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução de 0,0913 g em 500 mL de solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH (Synth 97% P.A.) e mantida sob refrigeração a 8 °C.

- **Solução de peróxido de hidrogênio**

Foi preparada uma solução de peróxido de hidrogênio com concentração $1,6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a partir da diluição de 162 μL de H_2O_2 (30 % m/v, Merck) em 100 mL de NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

- **Solução de hidróxido de sódio**

Uma solução estoque de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio (Synth 97% P.A.) foi preparada através da dissolução de 4,1237 g em 1 L de água deionizada. A partir desta solução estoque foram preparadas soluções de trabalho a partir de adequadas diluições.

- **Solução de ácido clorídrico**

Foi preparado uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorídrico pela diluição de 8,28 mL de HCl (Merck 37% P.A.) em 1 L de água deionizada.

- **Amostra de cobalto sintética**

Foi preparada uma solução estoque de 100 mg L^{-1} de cloreto de cobalto (II) hexahidratado (Synth 97% P.A.) a partir da dissolução de 0,4120 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 1 L de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Partindo dessa solução, as seguintes soluções padrão foram preparadas: 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e $9,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

- **Amostra de vitamina B₁₂**

Uma solução estoque de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de vitamina B₁₂ na forma de cloridrato de hidroxocobalamina (Sigma 96% P.A.) foi preparada a partir da dissolução de 1,0 mg de $\text{C}_{68}\text{H}_{89}\text{CoN}_{13}\text{O}_{15}\text{P} \cdot \text{HCl}$ em 1 L de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A partir dessa solução foram preparadas as seguintes soluções de trabalho a partir de adequadas diluições: 2,4; 4,8; 7,2; 9,6 e $12,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

2.2. O Luminômetro fluxo-batelada (LFB)

Uma fotografia do LFB proposto é mostrada na **Figura 2.1**, onde se pode observar os componentes empregados na montagem e como estes estão fisicamente dispostos no sistema. O LFB é constituído por um microcomputador, uma câmara de mistura, uma bomba peristáltica, cinco válvulas solenoides de três vias, um acionador de válvulas, um agitador magnético e um sistema de aquisição, amplificação e tratamento de sinais.

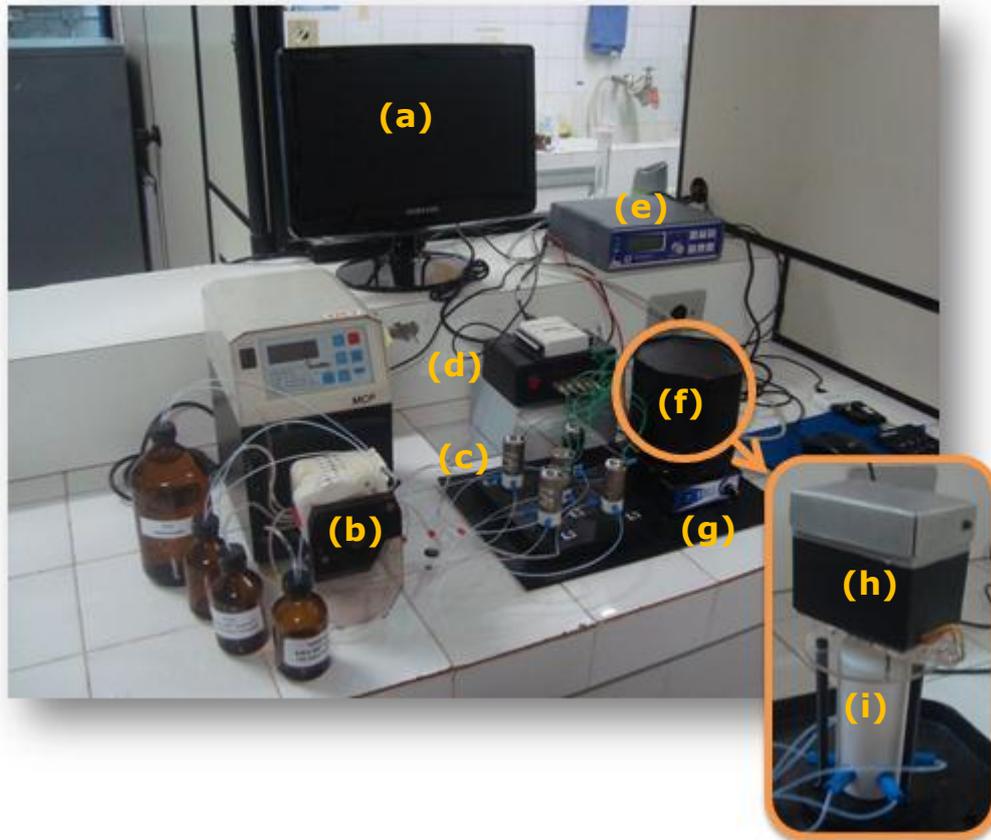


FIGURA 2.1. Fotografia da disposição física dos componentes do LFB proposto. (a) microcomputador; (b) bomba peristáltica; (c) válvulas solenoides; (d) acionador de válvulas; (e) amplificador de sinal; (f) isolamento eletromagnético e de luz externa; (g) agitador magnético; (h) detector; (i) câmara de mistura.

Um diagrama esquemático para melhor compreensão dos principais componentes do LFB é mostrado na **Figura 2.2**. Cada um dos componentes descritos e suas funções serão discutidos com mais detalhes nas subseções a seguir.

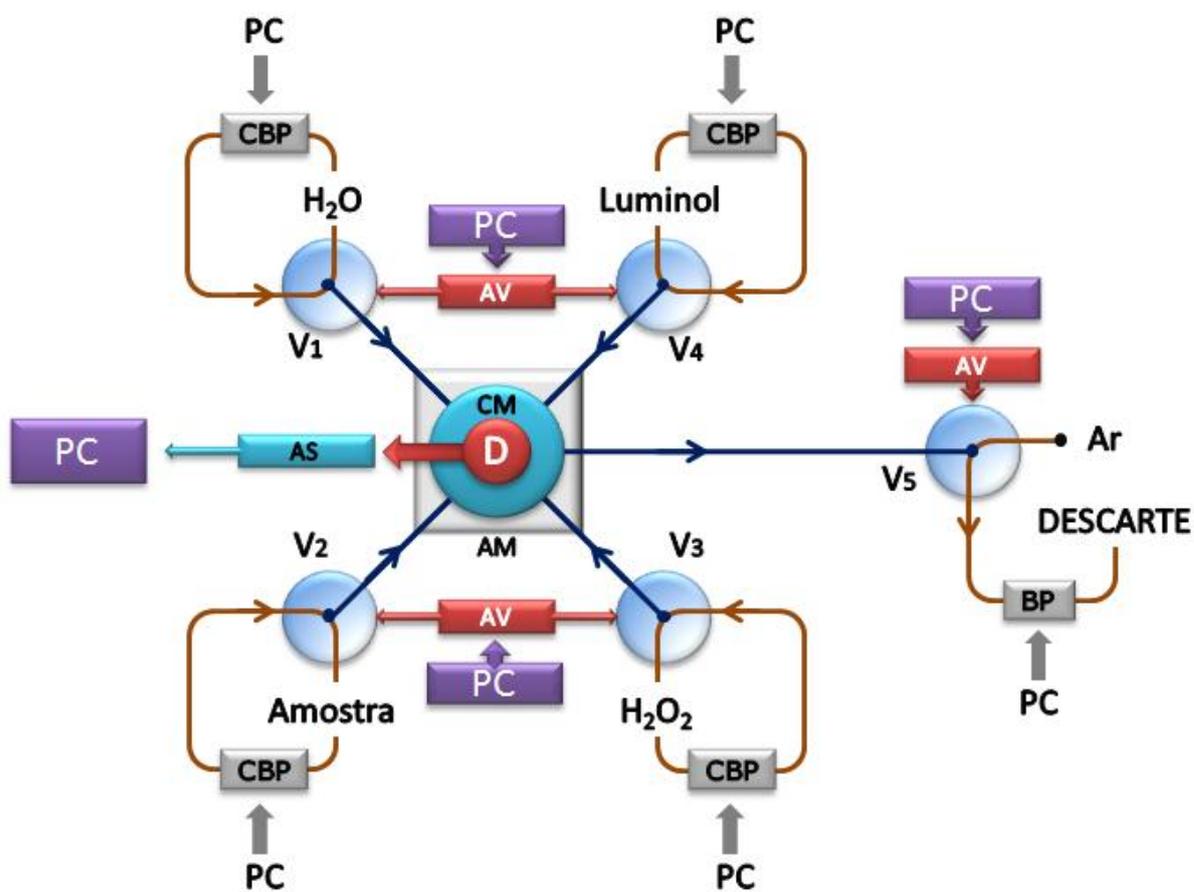


FIGURA 2.2. Diagrama esquemático do LFB proposto. (PC) microcomputador; (CBP) canal da bomba peristáltica; (V1-V5) válvulas solenoides; (AV) Acionador de válvulas; (AS) amplificador de sinal; (AM) agitador magnético; (CM) câmara de mistura; (D) detector.

2.2.1. Microcomputador

Os dispositivos que constituem o LFB proposto foram acoplados a um microcomputador com processador Intel[®] Core2Duo de 2.2 GHz e memória RAM de 2 Gb através de uma interface de controle. O interfaceamento permite controlar todo o sistema, desde os comandos enviados ao acionador de válvulas até o monitoramento dos sinais produzidos pelo detector. Para gerenciar o sistema foi desenvolvido um programa em *LabVIEW*[®] 5.1, que será discutido na [Seção 2.2.11.3](#).

2.2.2. Câmara de mistura

Para promover uma melhor homogeneização entre a amostra e os reagentes o sistema LFB utiliza uma câmara de mistura. Esta câmara é constituída por um cilindro de PTFE (Teflon[®]) contendo cinco canais de entrada e um canal de saída, com um volume interno de 2 mL.

O diagrama esquemático apresentando as dimensões da câmara de mistura é mostrado na **Figura 2.3**.

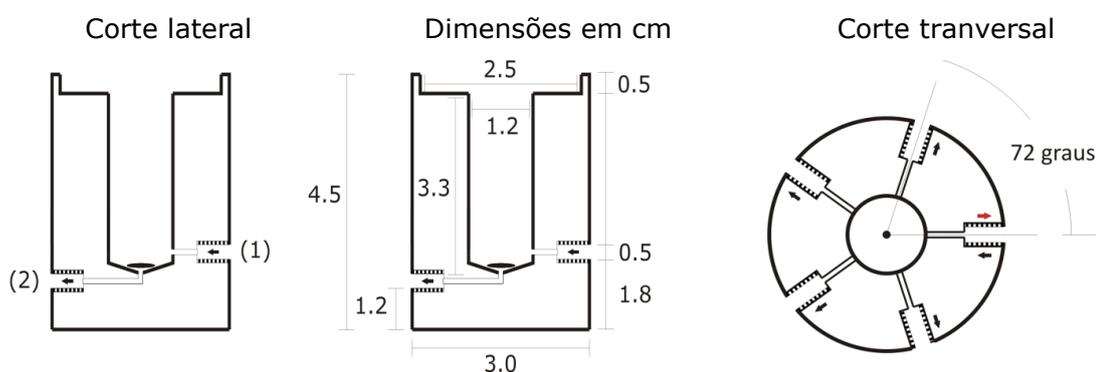


FIGURA 2.3. Diagrama esquemático das dimensões da câmara de mistura. (1) Canal de entrada; (2) canal de saída.

2.2.3. Agitador magnético

A homogeneização da mistura é alcançada pelo movimento rotatório de uma barra magnética revestida de Teflon[®] dentro da câmara de mistura. O movimento da barra magnética é estimulado pelo campo magnético de um agitador desenvolvido no próprio laboratório.



FIGURA 2.4. Agitador magnético utilizado no LFB.

2.2.4. Bomba peristáltica

Uma bomba peristáltica Ismatec[®], modelo IPC, equipada com 8 canais e 12 roletes foi utilizada para propulsão dos fluidos por intermédio de tubos de bombeamento de Tygon[®] com diâmetro interno de 1,14 mm. Para o transporte dos reagentes, amostras e água, foram utilizados tubos de Teflon[®] com 0,8 mm de diâmetro interno.

2.2.5. Acionador de válvulas

Um acionador de válvulas, cujo circuito eletrônico é mostrado na **Figura 2.5**, foi desenvolvido para controlar a abertura das válvulas solenoides. Este dispositivo é baseado em um circuito integrado ULN 2003, que é um arranjo de transistores do tipo *Darlington* capaz de controlar até sete canais simultaneamente e de forma independente, com capacidade total de corrente de 500 mA.

Os circuitos de acionamento das válvulas são programados para, quando receberem uma tensão maior que 3,8 V em suas entradas, enviarem um pulso elétrico de 12V. Uma corrente de 150 mA é gerada durante o pulso, fornecendo, assim, uma potência suficiente para acionar as válvulas solenoides. A comunicação entre o acionador de válvulas e o microcomputador é realizada através da interface de controle NI USB – 6009, da *National Instruments*[®] via porta USB do microcomputador.

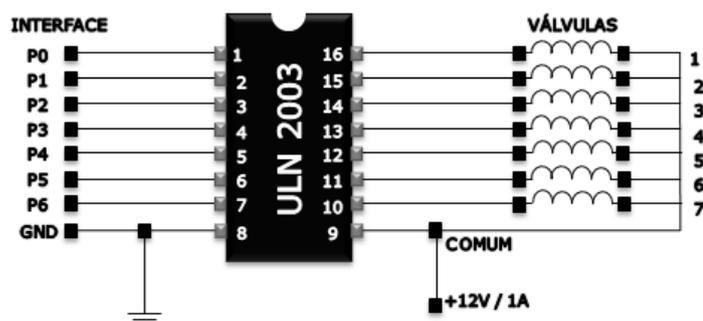


FIGURA 2.5. Diagrama esquemático do acionador de válvulas. P0 – P6 representam os pinos de saída para a interface de controle e GND é o aterramento do circuito.

2.2.6. Válvulas solenoides

No LFB foram utilizadas cinco válvulas solenoides de três vias da Cole Parmer[®], modelo RZ 01540-11, **Figura 2.6**, com a finalidade de comutar os fluidos no percurso analítico. Através deste dispositivo é possível direcionar os volumes das amostras e reagentes a serem introduzidos na câmara de mistura. As válvulas solenoides são controladas por um microcomputador, utilizando um acionador de válvulas combinado a uma interface de controle.



FIGURA 2.6. Válvula solenoide de três vias da utilizadas no LFB proposto.

2.2.7. Sistema de detecção de sinal

O detector utilizado no LFB proposto foi um fotodiodo de silício com área sensível de 10 mm² (OSD 100-6, *Centronic*), **Figura 2.7**.

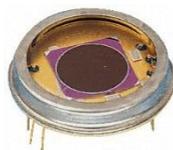


FIGURA 2.7. Fotodiodo de silício utilizado no sistema de detecção do LFB proposto.

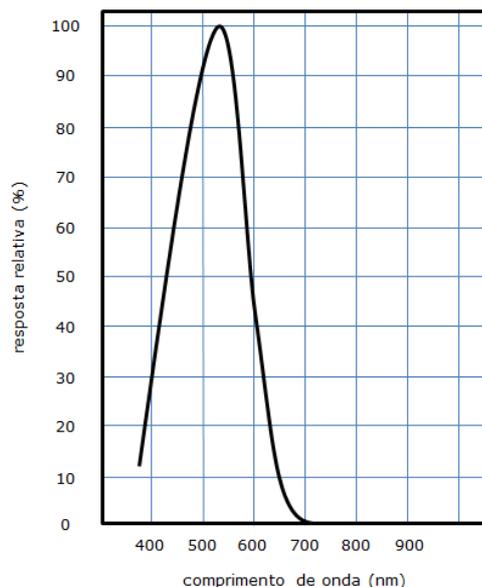


FIGURA 2.8. Resposta espectral típica do fotodiodo utilizado no sistema de detecção do LFB proposto.

Na **Figura 2.8** é mostrada a resposta espectral do fotodiodo que abrange praticamente toda a região espectral do visível, atingindo seu máximo em 550 nm. Esta característica propicia que este dispositivo seja utilizado para aplicações fotométricas e quimiluminescentes em geral.

2.2.8. Módulo amplificador de sinal quimiluminescente (MASQ)

Este dispositivo é necessário para que o sinal proveniente da reação quimiluminescente detectado pelo fotodiodo seja amplificado, tornando possível alcançar níveis de concentração significativamente baixos.

2.2.8.1. Eletrônica do MASQ

O circuito eletrônico é responsável pela amplificação e digitalização dos sinais oriundos do detector. Estas funções realizadas pelo controlador de interface programável, PIC (do inglês: *Programmable Interrupt Controller*) são necessárias para minimizar o ruído e, conseqüentemente, garantir uma melhor razão sinal/ruído.

Os sinais analógicos produzidos durante as medidas são enviados para um conversor analógico/digital (AD) existente no PIC 16F877, onde são convertidos em sinais digitais, os quais são posteriormente filtrados e processados. Os sinais depois de digitalizados são enviados pelo microcontrolador a um módulo LCD (do inglês: *Liquid Crystal Display*) com os valores do sinal analítico após a conversão realizada pelo programa de controle do PIC.

Para melhor compreensão do funcionamento do MASQ, um esquema é apresentado em quatro partes principais (**Figura 2.9**): módulo de pré-amplificação, módulo de controle de ganho, microcontrolador e fonte de alimentação.

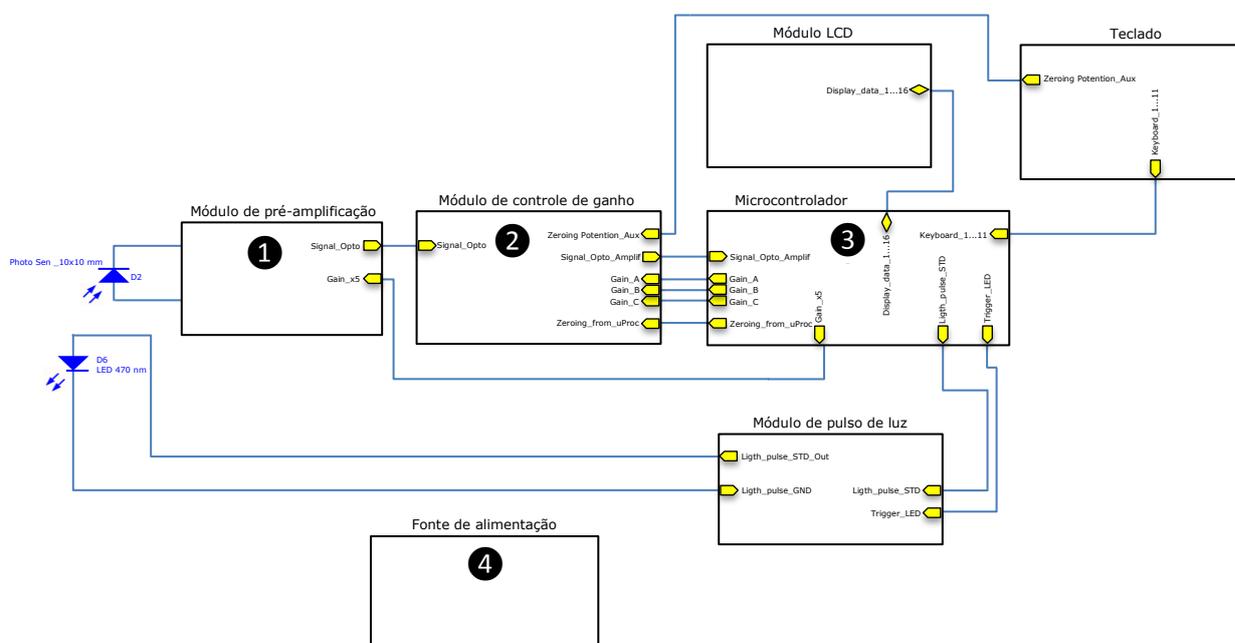


FIGURA 2.9. Diagrama esquemático representando as quatro partes principais do MASQ: (1) módulo de pré-amplificação, (2) módulo de controle de ganho, (3) microcontrolador e (4) fonte de alimentação.

2.2.8.1.1. Módulo de pré-amplificação

Na **Figura 2.10** é apresentado o circuito eletrônico do módulo de pré-amplificação do MASQ. Este módulo é acoplado à câmara de mistura

do sistema FB proposto. O sinal luminoso emitido pela reação quimiluminescente é captado pelo fotossensor D2 e pré-amplificado. Para conseguir uma elevada sensibilidade com baixo ruído e baixo *offset* utilizou-se o circuito integrado AD823.

Todo o circuito eletrônico foi acomodado em uma caixa metálica, a qual promove uma blindagem eletromagnética, evitando a captação de interferências provenientes da rede de 60 Hz ou de outras fontes de interferência, como motores, lâmpadas fluorescentes, transmissores de rádio, TV e telefones celulares.

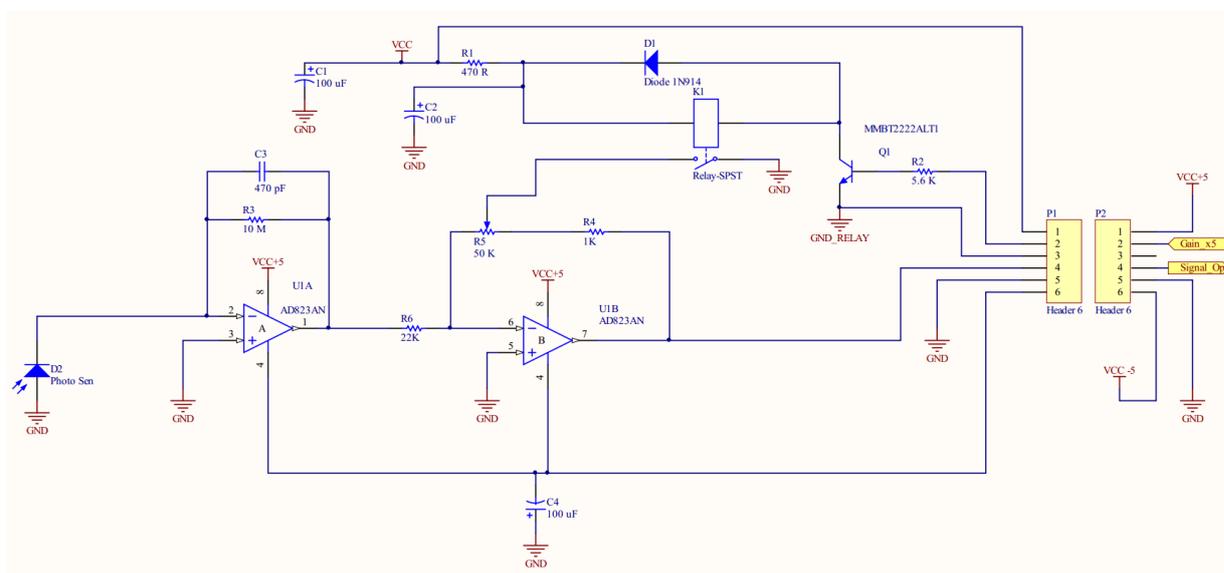


FIGURA 2.10. Circuito eletrônico do módulo de pré-amplificação do MASQ. **C** = capacitores de poliéster; **R** = resistores; **Q** = transistor; **U1** = circuitos integrados; **D1** = diodo, **D2** = fotossensor; **K1** = relé; **P** = conectores; **GND** = terra.

O relé K1 pode ser acionado remotamente pelo microcontrolador, que incrementa o ganho neste estágio, multiplicando por cinco o valor oriundo do fotossensor, aumentando assim o ganho do sistema quando necessário.

O sinal amplificado é enviado para o próximo módulo através da linha "Signal_Opto" e recebe o sinal de comando de ganho pela linha "Gain_x5" do microcontrolador.

2.2.8.1.2. Módulo de controle de ganho

Neste módulo também se utilizou um circuito integrado AD823, que tem por função amplificar novamente o sinal recebido via linha "Signal_Opto" até um nível satisfatório para realizar os experimentos. O ganho do circuito é controlado digitalmente pelo microcontrolador através das linhas "Gain_A, _B e _C" do circuito integrado CD4051B, que atua com uma chave analógica de uma entrada e oito posições, o que configura o AD823 em oito faixas de ganho selecionáveis. Na **Figura 2.11** é mostrado o circuito eletrônico do módulo de controle de ganho.

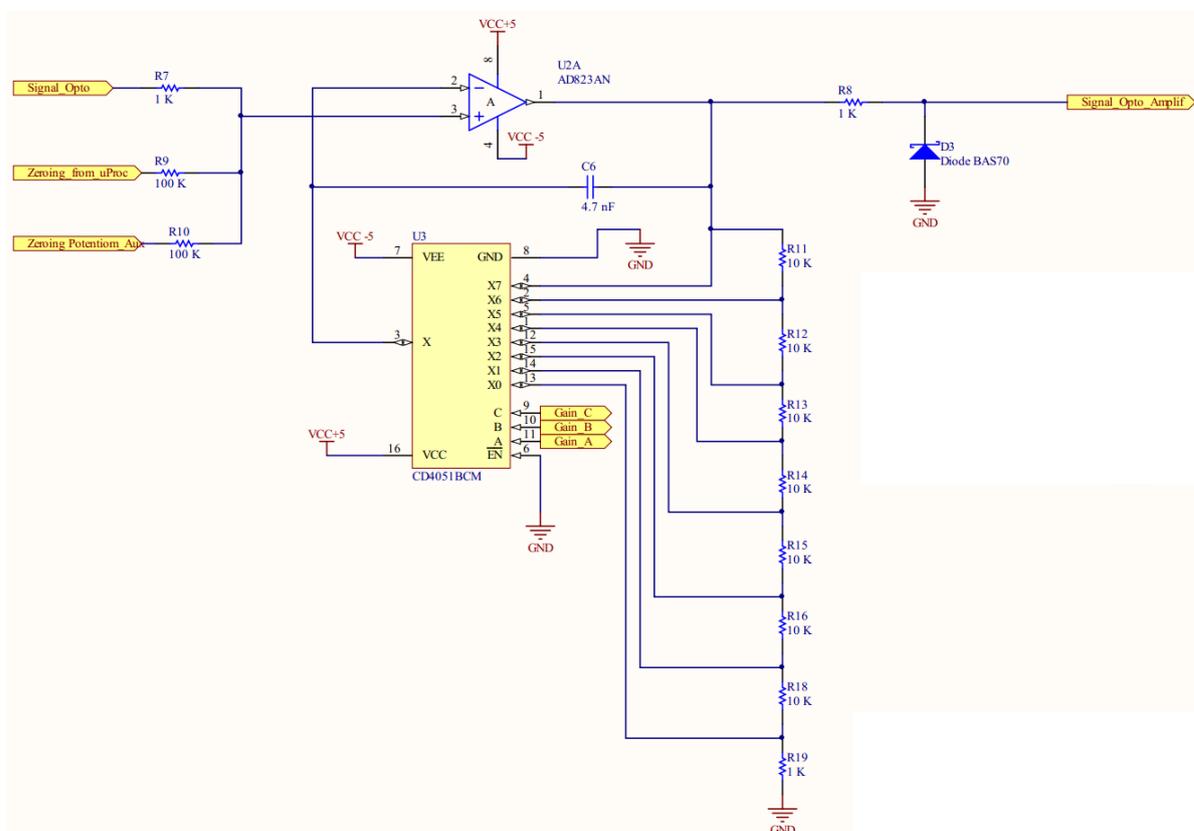


FIGURA 2.11.. Circuito eletrônico do módulo de controle de ganho do MASQ. C = capacitor de poliéster; R = resistores; U2 e U3 = circuitos integrados; D3 = diodo; GND = terra.

Neste módulo é realizada a compensação total de todos os *offsets* existentes (zerando a linha de base do MASQ) no módulo de pré-amplificação e no próprio módulo de controle de ganho. Esse procedimento é realizado de forma automática via linha "Zeroing_from_uProc" proveniente do microcontrolador ou de forma

manual pelo potenciômetro localizado no painel frontal do instrumento via linha de controle "Zeroing Potentiom_Aux".

2.2.8.1.3. Microcontrolador

O PIC 16F877 foi o microcontrolador utilizado no MASQ. Este dispositivo é responsável pelo controle do equipamento e tem as seguintes funções principais:

- Realizar a conversão dos sinais de analógica para digital e das tensões de *offset* presentes na saída do amplificador;
- Medir e memorizar as tensões de *offset* de cada faixa de ganho;
- Verificar a amplitude máxima do sinal resultante de saída do módulo de controle de ganho;
- Controlar o disparo do sinal luminoso de referência através do D6 – LED 470 nm, no módulo de pulso de luz;
- Controlar a potência do D6 – LED 470 nm, gerando uma sequência de pulsos luminosos de amplitude e largura conhecidas, apropriadas para cada faixa de ganho;
- Controlar o módulo LCD, responsável por mostrar as informações de amplitude do sinal, faixa de ganho de trabalho e o estado do sistema através do barramento "Display_data_1...16";
- Receber os comandos via teclado no painel do aparelho e fazer a interface com um computador externo para controle remoto do ganho;
- Gerar uma tensão DC apropriada através da modulação por largura de pulso para cada faixa de ganho e memorizar este valor a fim de que possa cancelar os offsets que estejam sendo usados no momento;
- Quando opera no modo automático de ganho, se verificado que o sinal resultante esta abaixo de um valor pré-estabelecido (30% de 1024, que é o número total de graus de conversão pelo AD do

PIC16F877), o ganho é aumentado automaticamente. Caso o sinal ultrapasse o nível máximo (80% de 1024), o ganho é reduzido automaticamente.

A **Figura 2.12** mostra o circuito eletrônico do microcontrolador.

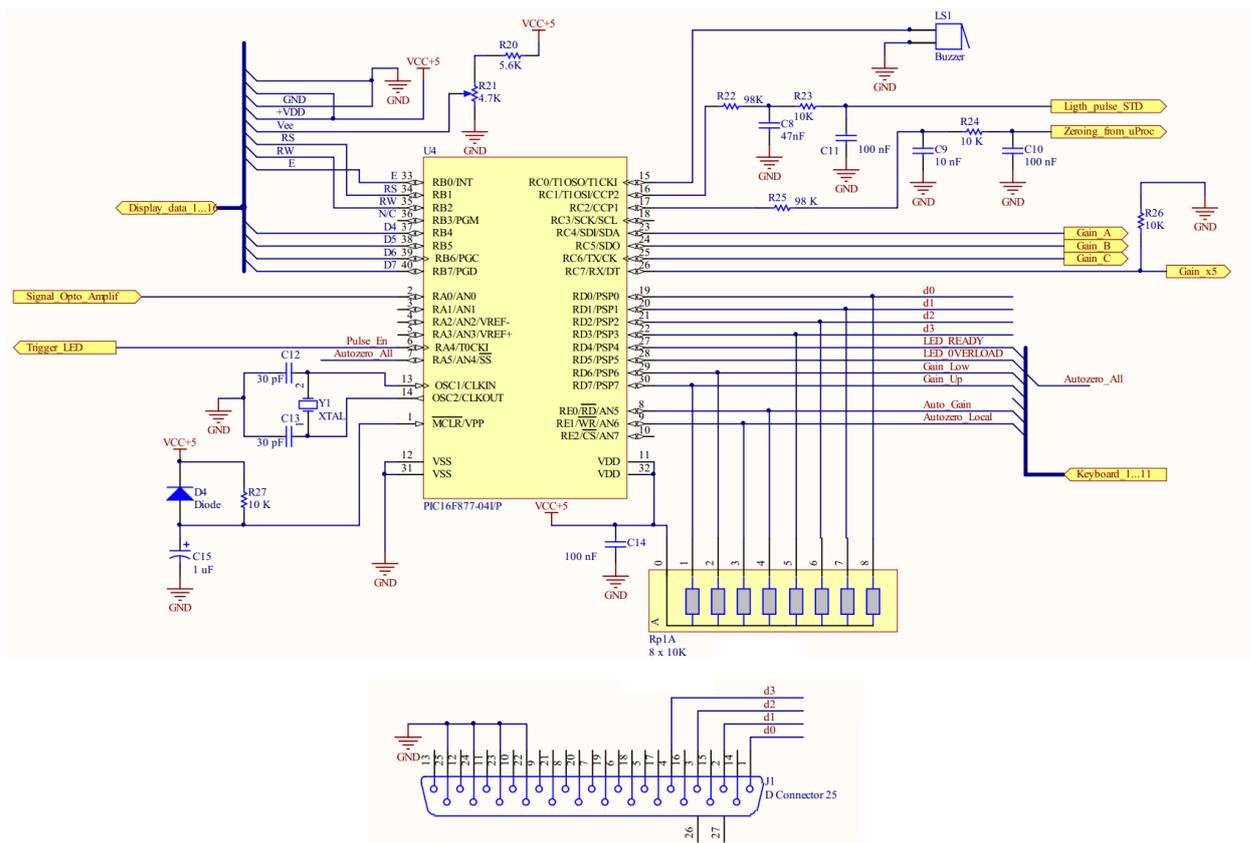


FIGURA 2.12. Circuito eletrônico do microcontrolador do MASQ. **C** = capacitor de poliéster; **R** = resistores; **U4** = PIC 16F877; **GND** = terra.

2.2.8.1.4. Fonte de alimentação

Na **Figura 2.13** é mostrado o circuito eletrônico da fonte de alimentação. O circuito integrado LM7805 fornece uma tensão contínua e estabilizada em +5 volts. Para fornecer uma tensão negativa estável utilizou-se o circuito integrado LM2904 e o transistor *darlington* TIP122.

Para maior estabilidade de todo o sistema é importante que as tensões positiva e negativa da fonte de alimentação sejam simétricas,

assim, se a fonte de +5 V aumentar ou diminuir, simultaneamente a fonte negativa aumenta ou diminui na mesma proporção. Este *tracking* é realizado realimentando os circuitos através dos resistores R38 e R39.

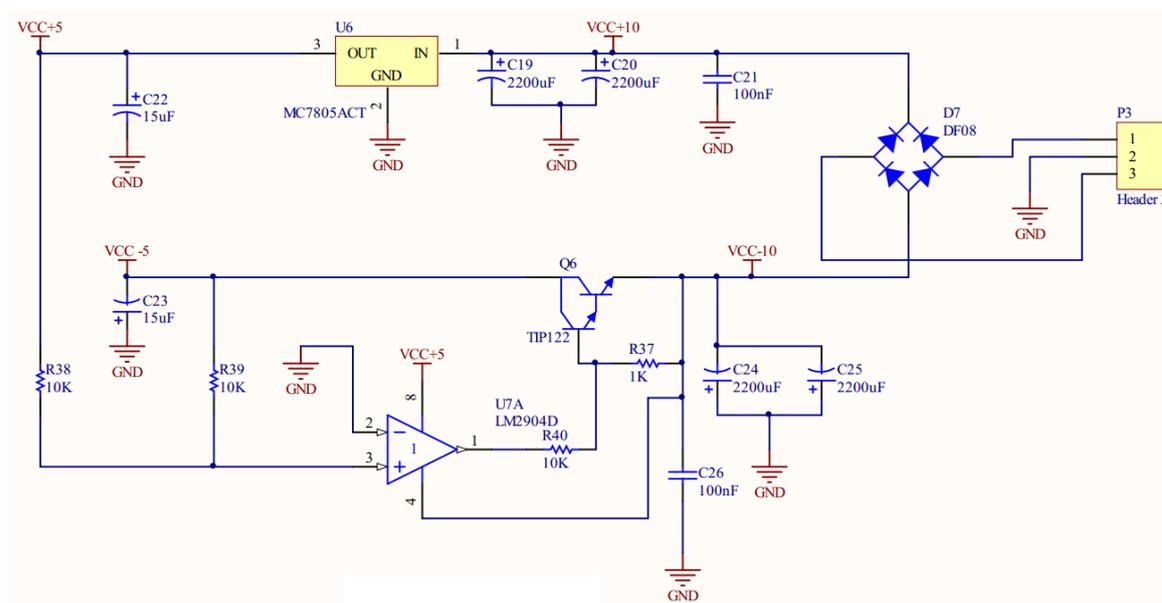


FIGURA 2.13. Circuito eletrônico da fonte de alimentação do MASQ. **C** = capacitor de poliéster; **R** = resistores; **Q** = transistores; **U6** e **U7** = circuitos integrados; **GND** = terra.

2.2.8.2. Operação do MASQ

No painel de controle do MASQ são encontradas as opções de operação, onde são acompanhadas e controladas via tela de LCD, conforme pode ser visto na **Figura 2.14**.

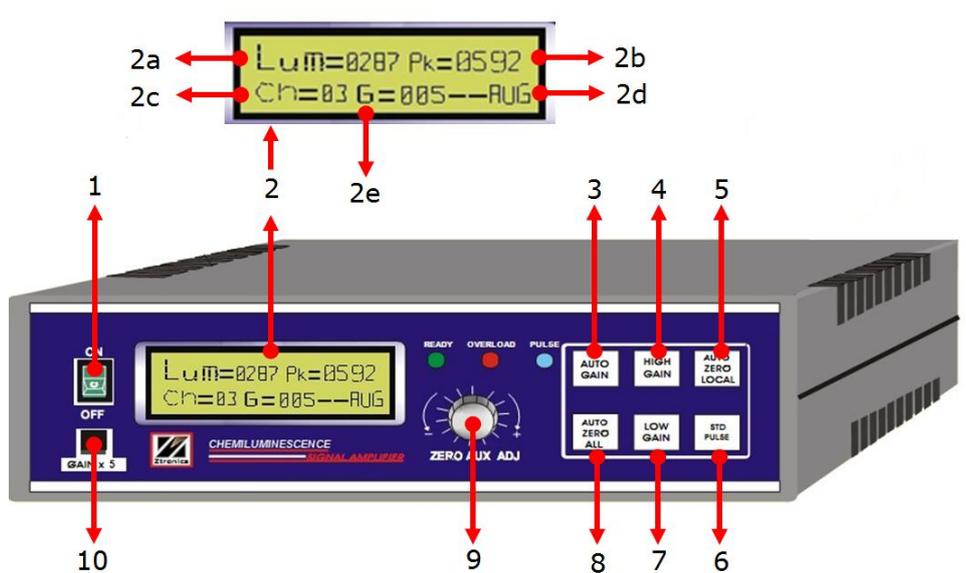


FIGURA 2.14. Detalhes do painel externo de controle e operação do MASQ.

A seguir são descritas as opções de operação do MASQ:

1. On/off – chave liga/desliga.

2. tela de LCD

2a. Lum – Amplitude do sinal ou valor da linha de base. Os valores mostrados compreendem o intervalo de **0000** para o valor mínimo e **1023** para o valor máximo.

2b. Pk – Amplitude máxima ou pico máximo registrado. Caso o valor de 1023 seja ultrapassado, o LED vermelho acenderá indicando sobrecarga do sinal.

2c. Ch – Canal do ganho. O ganho indica quantas vezes o sinal foi aumentado. Existem oito faixas selecionáveis de ganho no intervalo de 1 a 100, apresentadas na [Tabela 2.1](#). Os valores do ganho ainda podem ser multiplicados por cinco, quando o "GAIN x 5" está acionado. O instrumento suporta no máximo um aumento de 500 vezes o valor do sinal.

TABELA 2.1. Valores dos canais em relação ao ganho do sinal.

Canal	Ganho	Ganho x 5
00	01	05
01	02	10
02	05	25
03	10	50
04	20	100
05	30	150
06	50	250
07	100	500

2d. Indica se está sendo utilizado algum dos seguintes recursos:

- **"Aug"** - Indica que está sendo utilizado o ganho automático.
- **"Pot"** - Indica que para zerar a linha de base será necessário o auxílio do potenciômetro.
- **"Aux"** - Indica que o ajuste está em andamento.

2e. G - indica quantas vezes o sinal está sendo amplificado.

3. tecla *AUTO GAIN* - Programa o instrumento para ajustar o ganho de sinal de forma automática.

4. tecla *HIGH GAIN* - Altera para uma faixa maior de ganho de sinal.

5. tecla *AUTO ZERO LOCAL* - O instrumento realiza o ajuste do zero da linha de base apenas na faixa de ganho de sinal que está sendo utilizado.

6. tecla *AUTO ZERO ALL* - O instrumento realiza o ajuste do zero da linha de base em todas as faixas de ganho de sinal.

7. tecla *LOW GAIN* - Altera para uma faixa menor de ganho de sinal.

8. tecla *LIGHT PULSE* - Esta opção permite que o instrumento envie três pulsos ao LED que se encontra acoplado ao detector. A resposta destes pulsos é observada na forma de sinal na tela de LCD do MASQ e

permite verificar se o detector está respondendo adequadamente. A utilização deste recurso é indicado por um LED azul.

9. zero auxiliar - Ajusta o zero da linha de base manualmente, nos casos em que o instrumento não consegue realizar esta operação automaticamente.

10. GAIN x 5 – Multiplica o ganho de sinal por 5.

2.2.9. Metodologia de análise

Dentre os vários catalisadores utilizados para viabilizar a quimiluminescência do luminol, o íon Co(II) é o mais utilizado em aplicações analíticas e demonstrativas. Não apenas por permitir baixos níveis de detecção, mas também por apresentar uma relação linear entre o sinal e a concentração para intervalos de concentração de várias ordens de magnitude^[11]. Diante dessas vantagens, este íon foi o catalisador empregado para avaliar o desempenho do LFB proposto. A vitamina B₁₂ na forma de cloridrato de hidroxocobalamina, por ter em sua constituição o íon Co(II), foi eleito como analito a ser investigado.

A metodologia analítica proposta baseou-se na relação linear da reação quimiluminescente do luminol, tendo como oxidante o peróxido de hidrogênio e o íon Co(II) presente na vitamina B₁₂ como catalisador.

2.2.11. Procedimento analítico

Antes de iniciar as análises de vitamina B₁₂ foi necessário realizar alguns procedimentos para ajuste dos parâmetros de funcionamento do sistema proposto, conforme são descritos a seguir.

2.2.11.1. Estudo das vazões dos canais das válvulas solenoides

A precisão da medida do volume que foi adicionado à câmara de mistura foi estimada a partir da pesagem de alíquotas de água em seus canais correspondentes utilizando uma balança analítica (Shimadzu, modelo AY220). Estas alíquotas foram obtidas por meio da aspiração de água e da ativação de cada válvula solenoide em diferentes tempos de acionamento. O volume expelido pelo canal de saída da válvula solenoide que é conectado à câmara de mistura era cuidadosamente coletado em um recipiente previamente tarado para ser pesado em seguida.

A estimativa dos volumes foi feita baseando-se na relação entre o tempo de abertura da válvula e o volume desejado.

2.2.11.2 Procedimento de fluxo

O sistema de fluxo desenvolvido para o LFB é constituído por: uma bomba peristáltica que atua na propulsão dos fluidos; um agitador magnético, responsável pela homogeneização da amostra e dos reagentes no interior da câmara de mistura; cinco válvulas solenoides de três vias interligadas a uma câmara de mistura por tubos de Teflon[®], como mostra o diagrama esquemático da **Figura 2.15**.

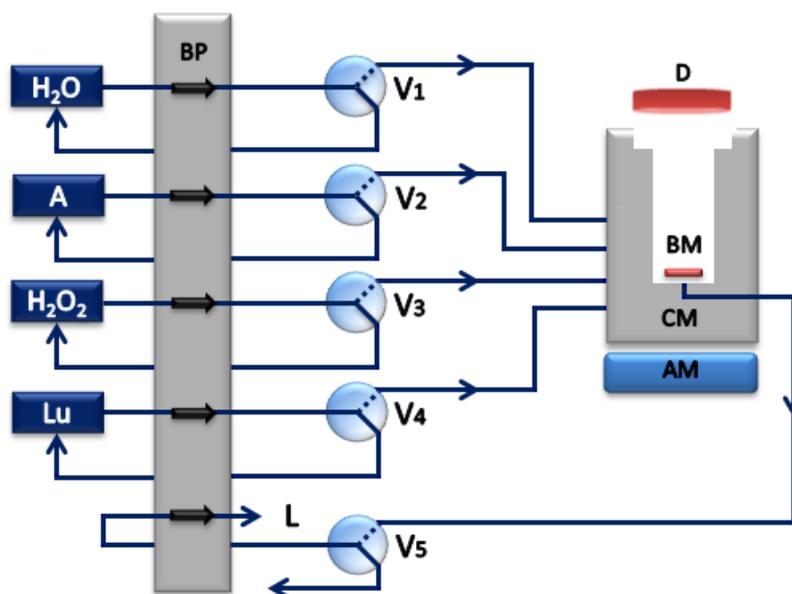


FIGURA 2.15. Diagrama esquemático do sistema de fluxo do LFB proposto. **AM** – agitador magnético, **CM** – câmara de mistura, **BM** – barra magnética, **D** – detector, **BP** – bomba peristáltica, **V₁** – válvula da água, **V₂** – válvula da amostra, **V₃** – válvula do peróxido de hidrogênio, **V₄** – válvula do luminol, **V₅** – válvula de esvaziamento da câmara de mistura e **L** – descarte.

Os volumes de água, amostra, peróxido de hidrogênio e luminol que entram na câmara de mistura são controlados pelo tempo de acionamento das válvulas solenoides, as quais atuam apenas como interruptoras de fluxo.

O LFB proposto opera em uma sequência básica que consiste nas seguintes etapas:

- Etapa inicial: todas as válvulas encontram-se desativadas. Neste modo a amostra e os reagentes permanecem em fluxo intermitente, fazendo com que estes retornem aos seus respectivos recipientes de origem.
- Etapa de enchimento da câmara de mistura: as válvulas solenoides V_1 , V_2 , V_3 e V_4 são acionadas, permitindo a entrada dos fluidos na câmara de mistura de forma sequencial.

- Etapa de esvaziamento da câmara de mistura: nesta etapa apenas a válvula V_5 é acionada, permitindo que todo conteúdo que se encontra na câmara de mistura seja enviado para o recipiente de descarte.
- Etapa de limpeza da câmara de mistura: a válvula V_1 é acionada, permitindo que a câmara de mistura seja preenchida com quantidade de água suficiente para promover a limpeza de forma eficiente. Em seguida, a válvula V_5 é acionada realizando o esvaziamento da câmara de mistura.

2.2.11.3. Procedimento e utilização do programa de controle do LFB

O programa utilizado para o gerenciamento do sistema desenvolvido neste trabalho foi escrito em ambiente *LabView*[®] 5.1 da *National Instruments*[®], **Figura 2.16**. Através desse programa é possível receber e enviar dados via porta USB do microcomputador quando conectado a uma interface de controle.

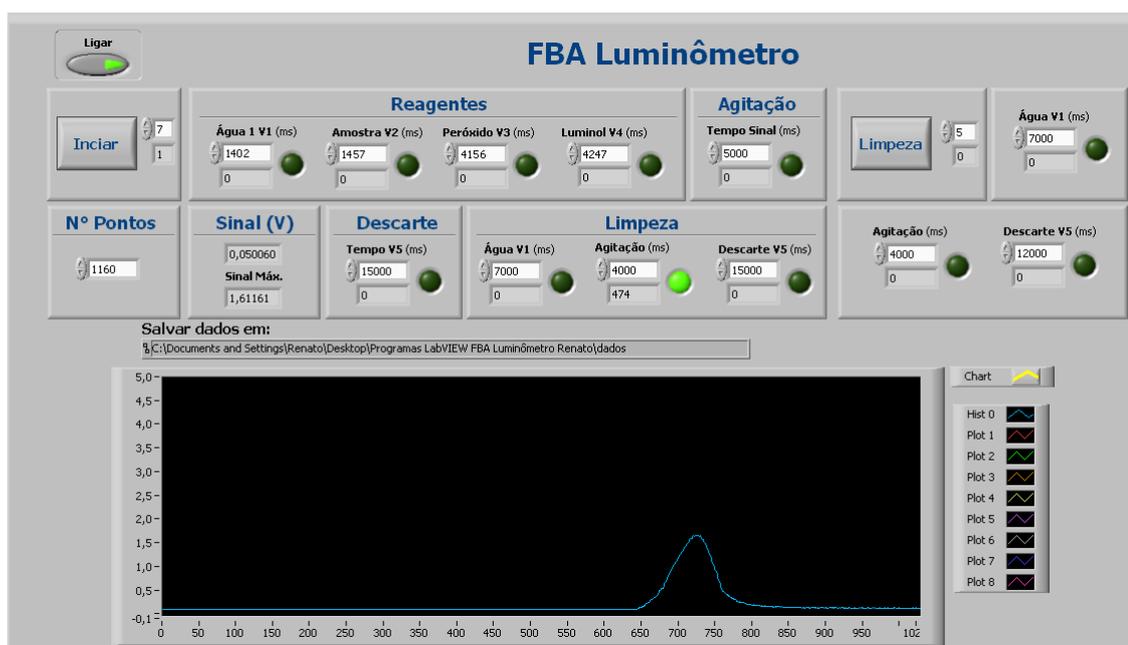


FIGURA 2.16. Painel de controle do programa usado no LFB proposto.

O programa para gerenciamento de controle do LFB proposto apresenta as seguintes funções:

- **controle do tempo de acionamento das válvulas solenoides** – Os tempos definidos para cada etapa foram estabelecidos na escala de milissegundos de acordo com o procedimento descrito na **Seção 2.2.11.1**.
- **leitura do sinal analítico** – O programa permite o monitoramento do sinal proveniente do sistema de detecção. A faixa de leitura utilizada por esse programa compreende o intervalo de 0 a 5 Volts.
- **número de pontos** – esta opção indica o número de sinais por análise a serem capturados, armazenados e plotados no gráfico mostrado programa.
- **controle de rotação da bomba peristáltica** – a velocidade com que os fluidos entram na câmara de mistura é controlada individualmente para cada válvula solenoide, podendo ser alterada quando necessário. A comunicação entre a bomba peristáltica e o microcomputador é realizada via porta serial RS 232.
- **estudo das vazões dos canais das válvulas solenoides** – Para determinar o tempo de abertura das válvulas solenoides foi realizado um estudo prévio da vazão de cada uma das válvulas solenoides.
- **procedimentos analíticos** – O programa permite executar as operações necessárias para o procedimento analítico, onde é possível selecionar o número de replicatas, limpeza e o tempo de agitação.

O enchimento dos canais é uma operação que deve ser realizada no início de cada análise. Para executar esta operação o analista deve introduzir na caixa especificada para as válvulas V_1 , V_2 , V_3 e V_4 o tempo de 7 segundos e, em seguida, acionar o comando "INICIAR". Esse tempo é suficiente para preenchimento de todos os canais.

Para iniciar uma análise o analista deve configurar os tempos de abertura das válvulas solenoides, bem como o tempo de agitação e o número de repetições. O número de rotações da bomba peristáltica deve ser controlado diretamente no diagrama de blocos do programa de gerenciamento de controle.

O sinal proveniente da reação quimiluminescente é monitorado durante todo o tempo em que as válvulas V_1 , V_2 , V_3 e V_4 permanecem acionadas.

No final de cada análise, um arquivo de dados é gerado e armazenado em local estabelecido.

Uma vez configurados os parâmetros operacionais, o analista poderá dar início aos procedimentos para as análises de vitamina B₁₂.

2.2.11.4. Procedimento de utilização do MASQ

Utilizando as operações básicas do MASQ descritas na **Seção 2.2.8.2** foram realizados os seguintes procedimentos para a execução das análises deste trabalho.

Primeiramente o MASQ foi ligado na chave **on/off**. Em seguida, foi selecionado o valor referente ao ganho de sinal desejado através das **teclas high gain** ou **low gain**. Então, o instrumento foi ajustado para zerar a linha de base apenas na faixa de ganho de sinal selecionado através da **tecla AUTO ZERO LOCAL**. O LED verde foi acionado indicando que o instrumento estava calibrado e pronto para o uso.

Um estudo prévio foi realizado para determinar qual o melhor ganho a ser utilizado para as medidas de vitamina B₁₂. Esse estudo foi baseado no ganho que apresentou o limite de detecção mais baixo e compreendesse a maior faixa linear para as amostras de vitamina B₁₂. Logo, para este trabalho foi utilizado o ganho "03", implicando que o sinal foi amplificado dez vezes.

2.2.12. Procedimentos para avaliação do desempenho analítico

A determinação de vitamina B₁₂ foi realizada por meio de curvas analíticas univariadas, através do qual se obteve uma relação linear entre a concentração de soluções padrão da vitamina B₁₂ e a medida do sinal analítico. As curvas analíticas foram obtidas utilizando a média do valor máximo do sinal analítico de cinco replicatas, expressa em volts.

O sistema químico empregado para avaliar o desempenho do LFB proposto foi otimizado por MOREIRA^[11] através de um planejamento fatorial 2⁴, cujos parâmetros são descritos a seguir:

- 1,0x10⁻³ mol L⁻¹ de luminol em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH;
- 1,6x10⁻² mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio em 5,0x10⁻³ mol L⁻¹ de NaOH;
- amostra em 0,1 mol L⁻¹ de HCl;
- ordem de entrada na câmara: H₂O/amostra/H₂O₂/luminol;
- pH em 12,2.

Para avaliar o desempenho analítico do sistema LFB foram realizados procedimentos estatísticos para a estimativa das figuras de mérito.

A sensibilidade do método foi definida pelos limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ). O limite de detecção corresponde a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental utilizada, enquanto o limite de quantificação corresponde à concentração mais baixa que pode ser quantificada dentro dos limites de reprodutibilidade das medidas pelo método empregado^[105].

Para cada curva analítica, os limites de detecção e quantificação foram estimados conforme as **Equações 2.1** e **2.2**:

$$LOD = \frac{3 \cdot S_b}{\beta} \quad (2.1)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot S_b}{\beta} \quad (2.2)$$

onde β é a inclinação da curva analítica estimada pela regressão linear através do método dos mínimos quadrados e S_b é o desvio padrão do branco para 20 medidas. Assim como a sensibilidade de calibração foi definido pelo valor da inclinação da curva analítica (β). Também foi avaliada a frequência analítica e a quantidade de amostras e reagentes gastos por medida efetuada.

Em análises químicas, o modelo de calibração pode ser usado para estimar a concentração do analito de maneira satisfatória apenas se for capaz de descrever o comportamento dos valores experimentais. Portanto, o modelo predito não pode apresentar evidências de falta de ajuste e deve refletir uma significativa regressão estatística. Desta forma, a validação do modelo de calibração é geralmente realizada por meio de uma análise de variância (ANOVA)^[104,106]. A **Tabela 2.2** apresenta as equações para ANOVA de dados experimentais adaptados para modelos lineares pelo método dos mínimos quadrados (MMQ).

TABELA 2.2. Equações para a ANOVA dos dados experimentais adaptados aos modelos lineares determinados pelos métodos dos mínimos quadrados.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)
Regressão	$SQ_{reg} = \sum n_i [(Y_e)_i - Y_m]^2$	$p - 1$	$MQ_{reg} = \frac{SQ_{reg}}{p - 1}$
Resíduo	$SQ_r = \sum \sum [Y_{ij} - (Y_e)_i]^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$
Falta de Ajuste	$SQ_{faj} = \sum n_i [(Y_e)_i - Y_{im}]^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum \sum [Y_{ij} - Y_{im}]^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$

O índice **i** indica o nível da variável X; o índice **j** refere-se às medidas repetidas da variável Y em um dado nível de X; **p** = número de parâmetros do polinômio do modelo de calibração; **n** = número total de medidas; **m** = número de níveis da variável independente X.

A validação de modelos lineares pela aplicação do método dos mínimos quadrados consiste na análise dos resíduos, falta de ajuste e

significância da regressão. Na análise dos resíduos deixados pelo modelo, verifica-se o comportamento dos erros de previsão em relação aos dados experimentais. Nos gráficos dos resíduos é possível identificar o tipo de erro associado aos dados. Dessa forma, se os resíduos apresentam algum perfil ou estrutura teremos a presença de um erro experimental associado aos dados obtidos. Entretanto, se os resíduos se distribuírem aleatoriamente em torno do zero, têm-se apenas erros aleatórios.

O teste de falta de ajuste compara os resíduos do modelo para determinações realizadas em vários níveis da variável **X**, média quadrática de falta de ajuste (MQ_{faj}) com os resíduos das análises das medidas autênticas nesses mesmos níveis, média quadrática do erro puro (MQ_{ep}). Se razão $(MQ_{faj})/(MQ_{ep})$ for menor que o valor do ponto da distribuição F referente aos graus de liberdade de MQ_{faj} e MQ_{ep} para um determinado nível de confiança, temos um modelo que não apresenta falta de ajuste;

No teste de significância de regressão os resíduos deixados pelo modelo com relação à média dos valores de **Y**, média quadrática da regressão (MQ_{reg}) são comparados com os resíduos do modelo com relação aos dados experimentais (MQ_{ep}). Se a razão $(MQ_{reg})/(MQ_{ep})$ é maior que o valor do ponto da distribuição F referente aos graus de liberdade de MQ_{reg} e MQ_{ep} para um determinado nível de confiança, o modelo estará melhor ajustado aos dados experimentais.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ajuste da vazão do LFB

Como mencionado na **Seção 2.2.11.1** foram construídas curvas de calibração correlacionando a quantidade de massa do fluido injetado em função do tempo, como pode ser visto no exemplo da **Figura 3.1**.

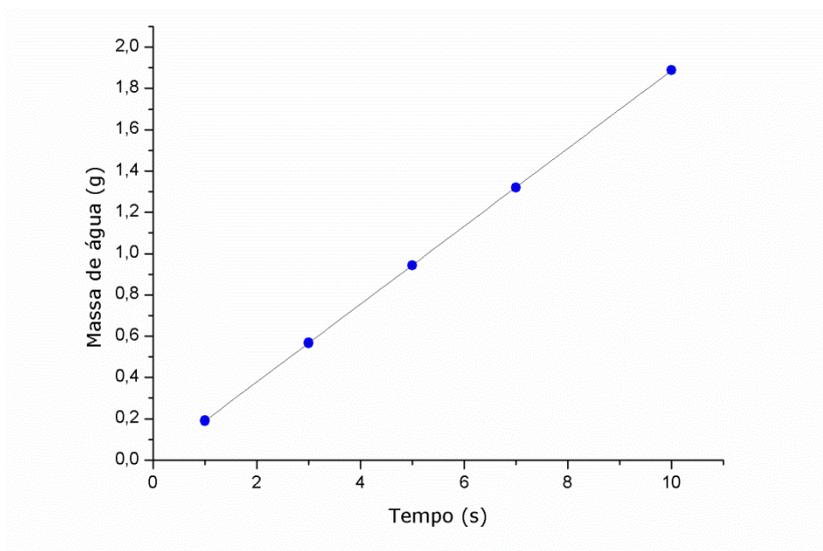


FIGURA 3.1. Exemplo de uma curva de calibração utilizada nas medidas da precisão das válvulas solenoides, cuja equação da reta foi $y = 0,1886x + 0,0008$ e $R^2 = 1,00$.

Com a equação da reta da curva de calibração é possível estimar o volume desejado através da densidade da água a 25 °C.

Como o tempo de abertura das válvulas solenoides é proporcional ao volume inserido à câmara de mistura e varia de acordo com a vazão em cada canal, em todos os procedimentos descritos de agora em diante será empregado o termo tempo em vez de volume de amostra ou reagentes.

A partir do que foi descrito acima todos os volumes mencionados nos procedimentos de análise foram estabelecidos mediante estudo das vazões e tempos de acionamento das válvulas solenoides. O propósito desse estudo foi obter o consumo mínimo de reagentes e amostras, como também uma velocidade analítica adequada e precisão dos volumes introduzidos na câmara de mistura.

Para cada válvula solenoide foram realizadas medidas empregando quatro diferentes velocidades de rotação da bomba peristáltica: 40, 80, 120 e 160 rotações por minuto (rpm), com intervalos de abertura de válvula de 1, 3, 5, 7 e 10 segundos.

Nas **Tabelas 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4** são mostrados os valores dos desvios padrão e relativo, estimados para os tempos de abertura (1 a 10 segundos) para cada uma das válvulas solenoides e para as diferentes velocidades de rotação da bomba peristáltica mencionadas anteriormente.

TABELA 3.1. Valores do desvio padrão e do desvio padrão relativo (DPR) obtidos para a válvula 1 nas quatro diferentes rotações da bomba peristáltica.

Válvula 1		1s	3s	5s	7s	10s	R ²
40 rpm	Desv.Pad.	0,0085	0,0082	0,0046	0,0083	0,0036	1,0000
	DPR (%)	18,0907	5,5444	1,8706	2,4018	0,7238	
80 rpm	Desv.Pad.	0,0087	0,0098	0,0086	0,0057	0,0055	1,0000
	DPR (%)	9,0585	3,4017	1,7892	0,8350	0,5627	
120 rpm	Desv.Pad.	0,0013	0,0028	0,0068	0,0103	0,0111	1,0000
	DPR (%)	0,8876	0,6478	0,9466	1,0216	0,7748	
160 rpm	Desv.Pad.	0,0041	0,0049	0,0030	0,0060	0,0094	1,0000
	DPR (%)	2,1772	0,8600	0,3177	0,4512	0,4937	

TABELA 3.2. Valores do desvio padrão e do desvio padrão relativo (DPR) obtidos para a válvula 2 nas quatro diferentes rotações da bomba peristáltica.

Válvula 2		1s	3s	5s	7s	10s	R ²
40 rpm	Desv.Pad.	0,0096	0,0024	0,0024	0,0063	0,0099	0,9999
	DPR (%)	21,3088	1,6422	1,0020	1,8684	2,0500	
80 rpm	Desv.Pad.	0,0086	0,0091	0,0184	0,0067	0,0085	0,9999
	DPR (%)	9,1024	3,2216	3,9392	1,0061	0,8905	
120 rpm	Desv.Pad.	0,0028	0,0078	0,0051	0,0090	0,0093	0,9999
	DPR (%)	2,0049	1,8437	0,7212	0,9279	0,6670	
160 rpm	Desv.Pad.	0,0056	0,0069	0,0038	0,0085	0,0058	1,0000
	DPR (%)	3,0628	1,2411	0,4074	0,6555	0,3149	

TABELA 3.3. Valores do desvio padrão e do desvio padrão relativo (DPR) obtidos para a válvula 3 nas quatro diferentes rotações da bomba peristáltica.

Válvula 3		1s	3s	5s	7s	10s	R ²
40 rpm	Desv.Pad.	0,0107	0,0105	0,0063	0,0012	0,0085	1,0000
	DPR (%)	21,6684	6,8886	2,4658	0,3376	1,6781	
80 rpm	Desv.Pad.	0,0078	0,0088	0,0036	0,0072	0,0091	1,0000
	DPR (%)	7,8346	2,9542	0,7256	1,0381	0,9147	
120 rpm	Desv.Pad.	0,0068	0,0058	0,0048	0,0057	0,0061	1,0000
	DPR (%)	4,6215	1,3086	0,6580	0,5535	0,4161	
160 rpm	Desv.Pad.	0,0098	0,0047	0,0033	0,0069	0,0170	1,0000
	DPR (%)	5,1529	0,8102	0,3452	0,5106	0,8746	

TABELA 3.4. Valores do desvio padrão e do desvio padrão relativo (DPR) obtidos para a válvula 4 nas quatro diferentes rotações da bomba peristáltica.

Válvula 4		1s	3s	5s	7s	10s	R ²
40 rpm	Desv.Pad.	0,0108	0,0101	0,0079	0,0082	0,0088	1,0000
	DPR (%)	21,8875	6,8899	3,1949	2,3711	1,7880	
80 rpm	Desv.Pad.	0,0071	0,0020	0,0054	0,0096	0,0054	1,0000
	DPR (%)	7,3183	0,6821	1,1189	1,4159	0,5576	
120 rpm	Desv.Pad.	0,0048	0,0052	0,0069	0,0062	0,0097	1,0000
	DPR (%)	3,3893	1,2053	0,9617	0,6151	0,6833	
160 rpm	Desv.Pad.	0,0039	0,0039	0,0040	0,0079	0,0058	1,0000
	DPR (%)	2,0519	0,6808	0,4246	0,5957	0,3052	

A partir dos resultados obtidos pelo estudo da vazão foi constatado que 160 rpm é a velocidade de rotação da bomba peristáltica que apresenta os menores desvios padrão relativo.

Vale salientar que também foi observado o comportamento da reação quimiluminescente nas quatro diferentes velocidades de rotação da bomba peristáltica mencionadas anteriormente. Na **Tabela 3.5** são mostrados os volumes adicionados na câmara de mistura, assim como os tempos de acionamento das válvulas solenoides utilizados no

monitoramento do sinal analítico para as diferentes rotações da bomba peristáltica.

TABELA 3.5. Valores utilizados no monitoramento do sinal analítico nas quatro diferentes rotações da bomba peristáltica.

Válvula	Amostras e Reagentes	Volume (μL)	40 rpm	80 rpm	120 rpm	160 rpm
			tempo (ms)			
1	H ₂ O	250	4977	2539	1728	1318
2	amostra	250	5100	2585	1800	1322
3	H ₂ O ₂	500	9763	4996	3404	2525
4	luminol	500	10079	5175	3510	2648

A **Figura 3.2** ilustra o sinal proveniente da reação quimiluminescente obtido para as diferentes velocidades de entrada das amostras e reagentes na câmara de mistura.

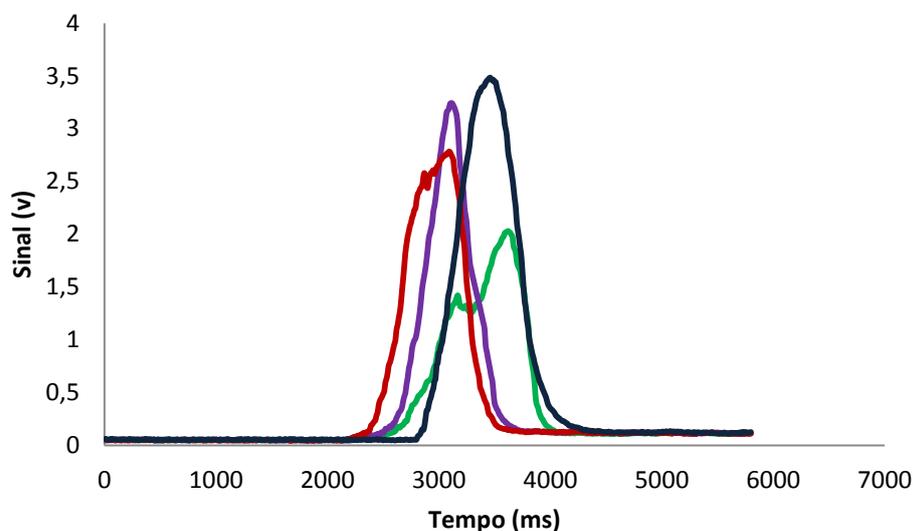


FIGURA 3.2. Sinal proveniente da entrada de amostras e reagentes na câmara de mistura nas rotações de 40 rpm (—), 80 rpm (—), 120 rpm (—), 160 rpm (—).

Como pode ser observado, a velocidade com que a amostra e reagentes são inseridos na câmara de mistura também é um fator que contribui para o favorecimento da reação quimiluminescente.

Desta forma, por apresentar os mais baixos desvios padrão relativo e priorizando o máximo de sinal obtido, foi adotado 160 rpm da bomba peristáltica durante a inserção dos volumes de amostras e reagentes na câmara de mistura do LFB.

3.2. Estudo dos volumes adicionados à câmara de mistura

O estudo dos volumes inseridos na câmara de mistura foi realizado visando obter sempre o máximo de sinal, como também um consumo mínimo de amostras e reagentes e um baixo volume de resíduo gerado por análise. O estudo desse parâmetro foi conduzido de forma univariada, ou seja, fazendo-se variar apenas um parâmetro, enquanto se mantinham constantes os valores restantes. Para obtenção dos resultados apresentados na **Tabela 3.6** foi utilizado uma amostra padrão de $70 \mu\text{g L}^{-1}$ de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

TABELA 3.6. Valores obtidos do sinal proveniente da reação quimiluminescente para os volumes inseridos na câmara de mistura.

Amostra e Reagentes	ENSAIOS					
	1	2	3	4	5	6
	VOLUMES (μL)					
Água	250	250	250	125	125	125
Amostra	250	250	250	125	125	125
H_2O_2	750	500	375	750	500	375
Luminol	750	500	375	750	500	375
Vol. Total	2000	1500	1250	1750	1250	1000
SINAL (volts) (n = 5)	2,6207	2,0867	1,8543	0,9367	0,8190	0,8117
Desv. Pad	0,0287	0,0137	0,0126	0,0127	0,0115	0,0229
DPR (%)	1,0962	0,6542	0,6786	1,3603	1,4081	2,8158

Embora apresente o maior valor de sinal detectado, o **ensaio 1** não se enquadra nos aspectos relacionados anteriormente, pois dentre os seis

ensaios é o que apresentou maior consumo de reagentes e maior volume de resíduo gerado. Já o **ensaio 2** apresentou um menor valor do desvio padrão relativo, como também um desempenho satisfatório em relação ao sinal analítico. Diante disso, todas as medidas foram realizadas com o volume o da câmara de mistura sendo de 1,5 mL. Na **Tabela 3.7** são mostrados os parâmetros de fluxo ajustados que foram empregados na avaliação do desempenho do LFB por meio da determinação de vitamina B₁₂.

TABELA 3.7. Parâmetros de fluxo ajustados para a determinação de vitamina B₁₂ em medicamentos com o sistema LFB.

Válvula	Volume (µL)	Tempo de abertura (ms)	Rotação da bomba peristáltica (rpm)
V1	250	1318	160
V2	250	1322	160
V3	500	2525	160
V4	500	2648	160
V5	-	8000	200

3.3. Estudo da estabilidade da solução de luminol

Um estudo foi realizado para avaliar a influência da estabilidade do luminol na reação vitamina B₁₂/H₂O₂/luminol, uma vez que a solução de luminol afeta diretamente o sinal analítico com o passar do tempo, implicando no aumento ou diminuição da sensibilidade nas medidas.

Esse estudo foi realizado ao longo de sete dias utilizando cinco padrões de vitamina B₁₂ em diferentes concentrações e o sistema químico descrito na **Seção 2.2.12**.

As medidas dos padrões de vitamina B₁₂ foram realizadas em cinco replicatas utilizando sempre a mesma solução de luminol, enquanto o peróxido de hidrogênio sempre foi preparado no momento das medidas.

Na **Figura 3.3** são mostrados os resultados obtidos durante o tempo de estudo da estabilidade do luminol.

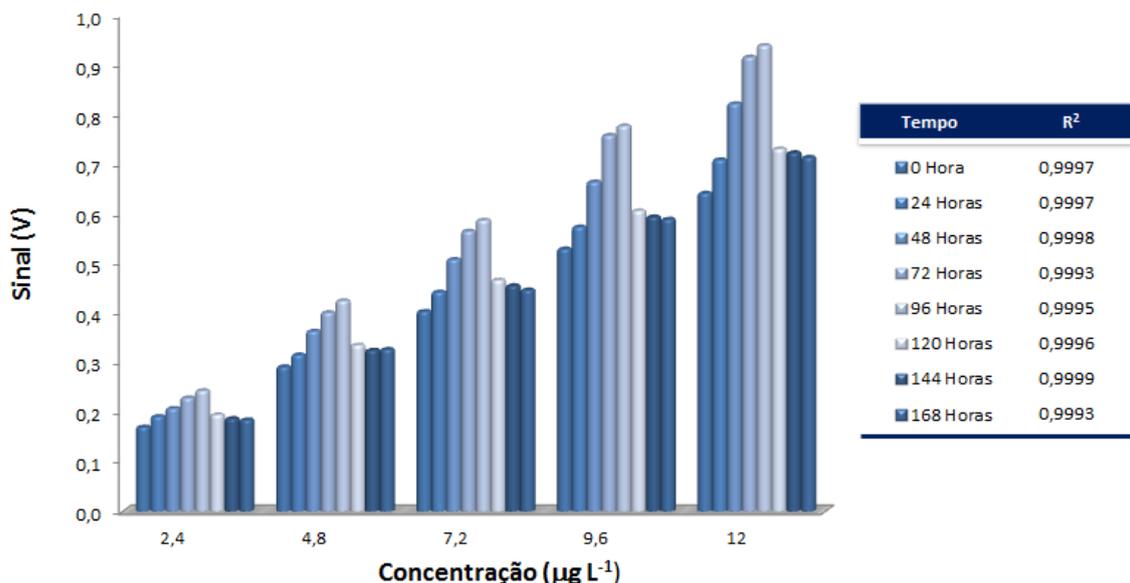


FIGURA 3.3. Sinais analíticos obtidos de 0 a 168 horas de preparo do luminol. A concentração de vitamina B₁₂ corresponde ao intervalo de 2,4 – 12 µg L⁻¹, com DPR's inferiores a 1,5% (n=5).

Ficou evidenciado que a estabilidade do luminol é um fator de relevância na reação da vitamina B₁₂/H₂O₂/luminol, acarretando no aumento ou diminuição da sensibilidade analítica com o decorrer do tempo. Embora tenha havido alteração do sinal analítico nesses intervalos de tempo, a linearidade da reação quimiluminescente proposta sempre foi mantida. Vale ressaltar que na literatura existem diferentes metodologias para a preparação do luminol, mas nenhuma faz menção sobre a estabilidade química de sua solução^[19].

Mediante esses resultados, todas as análises neste trabalho foram realizadas com a solução de luminol estabilizada por 96 horas.

3.4. Avaliação do desempenho do LFB para amostras sintéticas de cobalto(II) e vitamina B₁₂

Os parâmetros dos modelos obtidos pela regressão linear através do método dos mínimos quadrados, bem como os limites dos intervalos de confiança para os valores populacionais dos modelos a um nível de confiança de 95%, são apresentados na **Tabela 3.8**.

TABELA 3.8. Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos.

Analito	Modelo $\hat{Y} = \alpha + \beta X$	
	$\alpha \pm t_{13} \cdot \text{erro padrão} (\alpha)$	$\beta \pm t_{13} \cdot \text{erro padrão} (\beta)$
Cobalto (II)	0,054 ± 0,035	0,218 ± 0,006
vitamina B₁₂	0,045 ± 0,014	0,058 ± 0,002

Como os intervalos de confiança para os modelos obtidos não incluem o zero, os parâmetros dos modelos são estatisticamente significativos.

Os graus de liberdade da **Tabela 3.8** foram definidos em função de:

- **Número de parâmetros do polinômio** = 2 (polinômio de primeiro grau, $\hat{Y} = \alpha + \beta X$);
- **Número total de medidas** = 15 (3 réplicas autênticas em 5 níveis de concentração das amostras);
- **Número de níveis da variável independente X** = 5 (níveis de concentração da amostra).

Nas **Figuras 3.4** e **3.5** são mostradas que as curvas analíticas obtidas exibem um comportamento linear entre a resposta analítica e a concentração de suas respectivas soluções padrão.

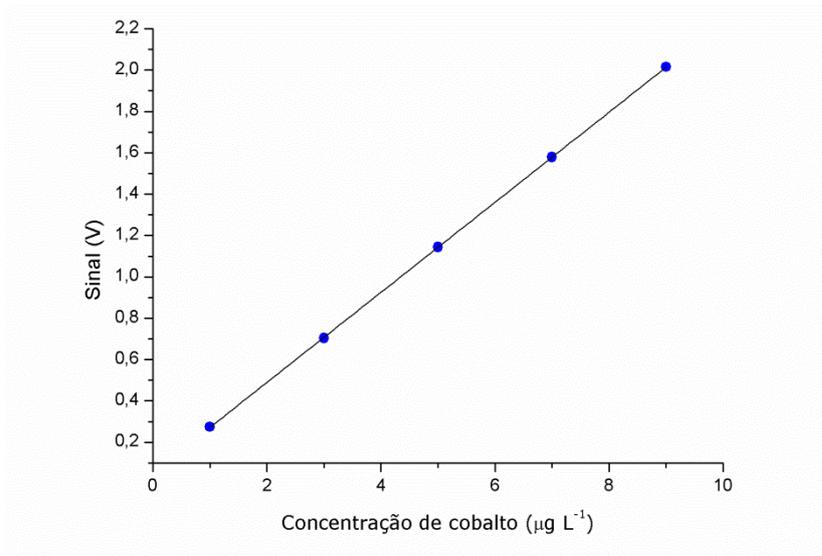


FIGURA 3.4. Curva analítica para os padrões de cobalto(II), cuja faixa linear compreende o intervalo de 1,0 a 9,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

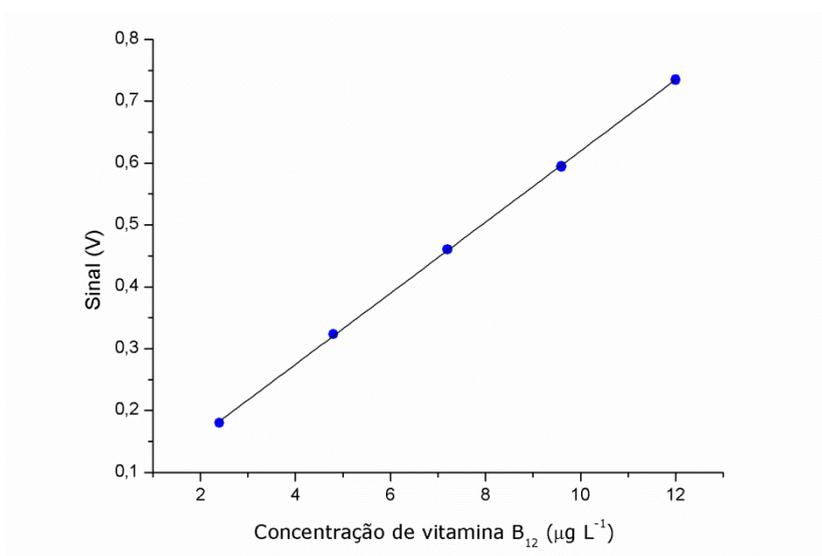


FIGURA 3.5. Curva analítica para os padrões de vitamina B₁₂, cuja faixa linear compreende o intervalo de 2,4 a 12,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

O gráfico dos resíduos deixado pelos modelos de calibração é apresentado nas **Figuras 3.6 e 3.7**. Ao se observar os resíduos, pode-se notar que estes são distribuídos aleatoriamente, significando que não há nenhuma estrutura sistemática que evidencie uma eventual falta de ajuste. No entanto, a análise dos gráficos dos resíduos constitui um critério subjetivo, onde este, não pode ser um único procedimento para concluir que os modelos não apresentam falta de ajuste. Para isso,

recorreu-se à ANOVA para verificar se existe falta de ajuste e avaliar a significância estatística da regressão linear.

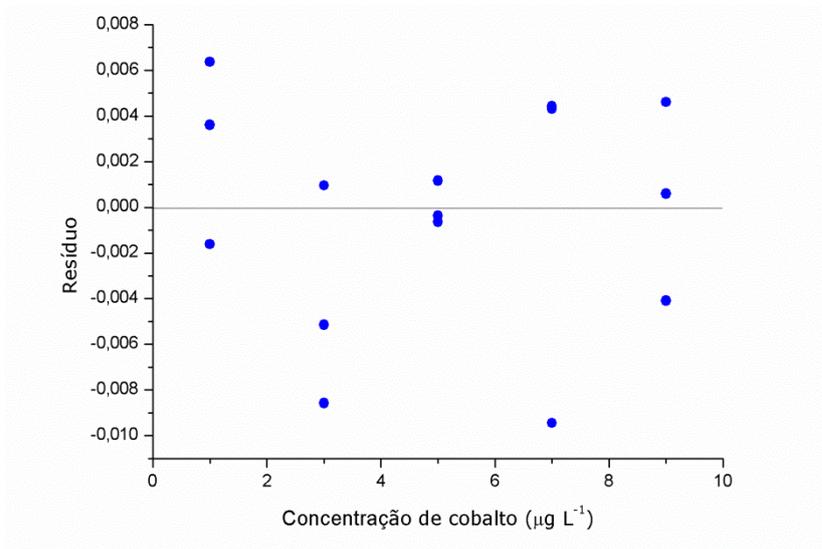


FIGURA 3.6. Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo linear da curva analítica para os padrões de cobalto (II).

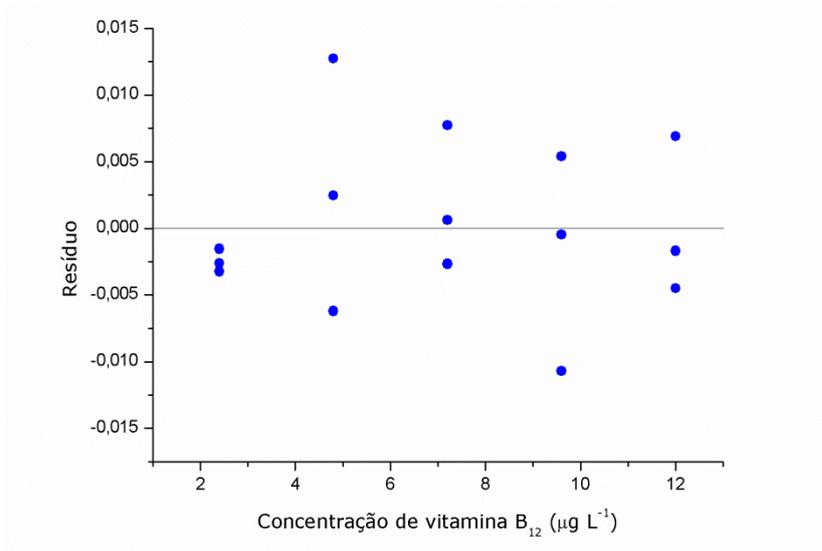


FIGURA 3.7. Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo linear da curva analítica para os padrões de vitamina B₁₂.

Definidos os graus de liberdade, as médias quadráticas foram calculadas a partir das somas quadráticas de acordo com equações da **Tabela 2.2** e os valores obtidos são mostrados na **Tabela 3.9**.

TABELA 3.9. Somas e médias quadráticas calculadas pela ANOVA para modelos de calibração obtidos para o cobalto(II) e a vitamina B₁₂.

Analito	Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática
Cobalto(II)	Regressão	1	5,69	5,69
	Resíduo	13	$3,25 \times 10^{-4}$	$2,50 \times 10^{-5}$
	Falta de ajuste	3	$7,82 \times 10^{-5}$	$2,61 \times 10^{-5}$
	Erro puro	10	$2,46 \times 10^{-4}$	$2,46 \times 10^{-5}$
vitamina B₁₂	Regressão	1	$5,71 \times 10^{-1}$	$5,71 \times 10^{-1}$
	Resíduo	13	$5,09 \times 10^{-4}$	$3,91 \times 10^{-5}$
	Falta de ajuste	3	$6,72 \times 10^{-5}$	$2,24 \times 10^{-5}$
	Erro puro	10	$4,41 \times 10^{-4}$	$4,41 \times 10^{-5}$

Após o cálculo das médias quadráticas, estes valores foram utilizados nos testes de falta de ajuste e de significância da regressão, cujos resultados encontram-se na **Tabela 3.10**. No que se refere aos valores de MQ_{faj}/MQ_{ep} , estes são menores que o ponto da distribuição F a um nível de 95% de confiança, considerando os mesmos graus de liberdade para ambos os casos. Dessa forma, não há evidência de falta de ajuste para o modelo linear. A **Tabela 3.10** revela também que as regressões lineares são significativas. De fato, os valores de MQ_{reg}/MQ_r são maiores que o ponto da distribuição F considerando os mesmos graus de liberdade e o nível de 95% de confiança.

TABELA 3.10. ANOVA para o modelo linear das curvas analíticas para os soluções padrão de cobalto(II) e vitamina B₁₂.

Analito	Cobalto(II)	vitamina B ₁₂
MQ_{faj}/MQ_{ep}	1,06	0,51
MQ_{reg}/MQ_r	$2,28 \times 10^5$	$1,46 \times 10^4$
Graus de Liberdade	Falta de ajuste	3 e 10 respectivamente
	Significância de regressão	1e 13 respectivamente
$F_{v1,v2}$ a 95%	Falta de ajuste	3,71
	Significância de regressão	4,67

Os resultados mostrados na **Tabela 3.10** mostram que não há evidência estatística de falta de ajuste, ou seja, os modelos obtidos

apresentam regressões significativas. Portanto, as curvas analíticas correspondentes podem ser usadas para fins de quantificação.

3.4.1. Figuras de mérito

Conforme mencionado na **Seção 2.2.12**, foram calculadas as figuras de mérito para avaliar o desempenho do LFB proposto. Os valores obtidos para o LOD, LOQ e a sensibilidade das curvas analíticas, bem como a frequência analítica são apresentados na **Tabela 3.11**.

TABELA 3.11. Figuras de mérito obtidas para as determinações de cobalto(II) e vitamina B₁₂ utilizando o LFB proposto.

Parâmetro	Cobalto (II)	vitamina B ₁₂
LOD (μgL^{-1})	0,029	0,109
LOQ (μgL^{-1})	0,096	0,362
Sensibilidade analítica	0,218	0,058
Frequência analítica (h^{-1})	90	90

3.5. Determinação analítica de vitamina B₁₂ em medicamentos

Para avaliar o desempenho analítico do LFB proposto, assim como a metodologia desenvolvida, foi empregada a curva analítica validada pelo modelo de calibração da vitamina B₁₂.

Os medicamentos analisados se encontravam na forma de soluções injetáveis de cloridrato de hidroxocobalamina, cuja concentração informada pelo fabricante era de 7.500 μgL^{-1} . A composição química do medicamento analisado não apresenta nenhum excipiente que pudesse interferir nos resultados das análises.

A **Tabela 3.12** apresenta os resultados obtidos na determinação de vitamina B₁₂ em medicamentos utilizando o teste de recuperação.

TABELA 3.12. Resultado da análise de vitamina B₁₂ e do teste de recuperação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amostra	Método Proposto (μgL^{-1})	Recuperação (%)
1	7.499,6 \pm 1,0	101
2	7.499,8 \pm 1,6	100
3	7.500,3 \pm 0,6	101
4	7.498,4 \pm 0,6	98
5	7.500,6 \pm 0,9	102
6	7.498,1 \pm 1,5	99
Desvio padrão conjunto	1,0	-

A recuperação obtida pelo método proposto concorda com o conteúdo nominal descrito nas embalagens da vitamina B₁₂. Estes resultados indicam que os excipientes descritos na bula deste medicamento, a citar álcool benzílico e cloreto de sódio, não interferem na determinação proposta.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido um luminômetro de baixo custo utilizando a metodologia fluxo-batelada para determinação de vitamina B₁₂ em medicamentos.

A análise das amostras de cobalto sintético e vitamina B₁₂ pelo LFB proposto auxiliou satisfatoriamente na avaliação do instrumento proposto, permitindo a realização de 90 análises h⁻¹, com um consumo de 1 mL de reagentes e de 250 µL de amostra por análise. Os resultados do desempenho analítico apontaram para a viabilidade prática do uso do luminômetro desenvolvido para análises quimiluminescentes.

A avaliação do desempenho do instrumento proposto foi realizada por meio de análises baseadas na calibração univariada, tratadas através da ANOVA, demonstrando que o método pode ser aplicado para quantificação de vitamina B₁₂ em medicamentos.

O LFB desenvolvido apresentou, dentre outras vantagens, a simplicidade instrumental de operação e manutenção, o baixo consumo de reagentes e amostras e, conseqüentemente, baixa geração de resíduos, elevada robustez e boa frequência analítica. Assim, o sistema de análise proposto pode ser considerado como uma alternativa promissora para o controle da qualidade de medicamentos à base de vitamina B₁₂.

Além da análise de medicamentos, os resultados obtidos mostram que, assim como a metodologia analítica, o LFB desenvolvido poderá ser aplicado à determinação de analitos quimiluminescentes em outros tipos de amostras, como ambientais e alimentícias, desde que esteja associada a um processo de extração eficaz. Para tal feito, nenhuma reconfiguração física do sistema será necessária. A possibilidade de se aplicar o método analítico e o instrumento desenvolvido a diferentes tipos de amostras demonstra a sua versatilidade.

CAPÍTULO 5

REFERÊNCIAS

5. REFERÊNCIAS

- [1] BAEYENS, W. R. G.; et al. *Chemiluminescence-based detection: principles and analytical applications in flowing streams and in immunoassays*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **17: 941, 1998**.
- [2] FERREIRA, E. C.; ROSSI, A. V. *A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise*. Química Nova. **25: 1003, 2002**.
- [3] CALATAYUD, J. M. *Flow injection analysis of pharmaceuticals*. Bristol: Taylor & Francis, **2003**.
- [4] KOLEV, S. D.; MCKELVIE, I. D. *Advances in flow injection analysis and related techniques, volume 54 (Comprehensive Analytical Chemistry)*. Amsterdam: Elsevier, **2008**.
- [5] CALOKERINOS, A.C.; DEFTEREOS, N.T.; BAEYENS, W.R.G. *Chemiluminescence in drug assay*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **13: 1063, 1995**.
- [6] SANTOS, L. H. M. L. M. *Análise automática de gentamicina por quimiluminescência*. Porto, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, **2008**. Dissertação de Mestrado.
- [7] GARCÍA-CAMPAÑA, A.M.; BAEYENS, W.R.G. *Principles and recent analytical applications of chemiluminescence*. Analysis. **28: 686, 2000**.
- [8] ROBARDS, K.; WORSFOLD, P. J. *Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence*. Analytical Chimica Acta. **266: 147, 1992**.
- [9] FERREIRA, E. C. *Aplicações analíticas do estudo da reação quimiluminescente de luminol*. Campinas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, **2001**. Dissertação de Mestrado

[10] SANTOS, R.M.S.; SANTOS, M.F. e COSTA, M.F.D., *Quimiluminescência e bioluminescência*. Química Nova, **16: 200, 1993**.

[11] MOREIRA, P. N. T. *Planejamento e otimização de um método quimiluminescente para determinação de vitamina B12 usando um sistema fluxo-batelada*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, **2009**. Tese de doutorado.

[12] GUNDERMANN, K. D.; MCCAPRA, F. *Chemiluminescence in organic chemistry*. Berlin: Springer Verlag, **1987**.

[13] ALBERTIN, R.; et al. *Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos demonstração para a sala de aula*. Química Nova. **21: 772, 1998**.

[14] MERÉNYI, G.; LIND, J.; ERIKSEN, T. E. *Luminol chemiluminescence: chemistry, excitation, emitter*. Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence. **5: 53. 1990**.

[15] MERÉNYI, G.; LIND, J.; ERIKSEN, T. E. *The equilibrium reaction of the luminol radical with O₂ and the one-electron-reduction potential of 5 aminophthalazine-1,4-dione*. Journal Physical Chemistry. **88: 2320, 1984**.

[16] MERÉNYI, G.; LIND, J.; ERIKSEN, T. E. *Nucleophilic-addition to diazoquinones-formation and breakdown of tetrahedral intermediates in relation to luminol chemiluminescence*. Journal of the American Chemical Society. **108: 7716, 1986**.

[17] MERÉNYI, G.; LIND, J.; ERIKSEN, T. E. *Oxidation potential of luminol-is the autoxidation of singlet organic-molecules an outer-sphere electron transfer*. Journal Physical Chemistry. **94: 748, 1990**.

[18] XIAO, C. et al. *Study of enhancement effects in the chemiluminescence method for Cr(III) in the ng L-1 range*. Analytical Chimica Acta. **415: 209, 2000**.

[19] LEITE, O. D. *Desenvolvimento e aplicação de procedimentos envolvendo reações quimiluminescentes em fluxo para a determinação de analitos de interesse alimentício, farmacêutico e bioquímico*. Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR, **2005**. Tese de doutorado

[20] GARCÍA-CAMPAÑA, A.M.; BAEYENS, W.R.G. *Chemiluminescence in analytical chemistry*. New York: Marcel Dekker, **2001**.

[21] KENNY F.; KURTZ, R. B. *Luminol as a chemiluminescent indicator in acid-base titrations with a dark-chamber titrimeter*. Analytical Chemistry. **23: 339, 1951**.

[22] KENNY F.; KURTZ, R. B. *Dark-chamber titrimeter for chemiluminescent indicator titrations in colored solutions*. Analytical Chemistry. **23: 383, 1951**.

[23] PREUSCHOFF, F. et al. *Chemiluminescence l-lysine determination with immobilized lysine oxidase by flow injection analysis*. Analytical Chimica Acta. **208: 185, 1993**.

[24] CI, Y. -X.; et al. *Chemiluminescence investigation of the interaction of metalloporphyrins with nucleic-acids*. Analytical Chimica Acta. **282: 695, 1993**.

[25] MERVARTOVÁ, K.; POLÁŠEK, M. CALATAYUD, J. M. *Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **45: 367, 2007**.

[26] LIU, M.; LIN, Z.; LIN, L. -M. *A Review on applications of chemiluminescence detection in food analysis*. Analytica Chimica Acta. **670: 1, 2010**.

[27] FENG, Q. Z.; LI, H. F.; ZHANG, Z. Y.; LIN, J. M. *Gold nanoparticles for enhanced chemiluminescence and determination of 2,4-dichlorophenol in environmental water samples*. Analyst. **136: 2156, 2011**.

- [28] LI, B. X.; WANG, D. M.; XU, C. L.; ZHANG, Z. J. *Flow-Injection Simultaneous Chemiluminescence Determination of Ascorbic Acid and L-Cysteine with Partial Least Squares Calibration*. *Microchimica Acta*. **149: 205, 2005**.
- [29] ZISIMOPOULOS, E. G.; et al. *Indirect chemiluminescence-based detection of mefenamic acid in pharmaceutical formulations by flow injection analysis and effect of gold nanocatalysts*. *Talanta*. **79: 893, 2009**.
- [30] FERNANDEZ, J. M. R.; et al. *Chemiluminescence determination of amikacin based on the inhibition of the luminol reaction catalyzed by copper*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **36: 969, 2005**.
- [31] XIN, T. B.; et al. *Microplate Chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of carcinoembryonic antigen in human serum*. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. **36: 1056, 2008**.
- [32] DU, J. X.; LI, Y. H.; LU, J. R. *Flow injection chemiluminescence determination of captopril based on its enhancing effect on the luminol-ferricyanide/ferrocyanide reaction*. *Luminescence*. **17: 165, 2002**.
- [33] LAU, C. W.; et al. *Determination of cysteine in a pharmaceutical formulation by flow injection analysis with a chemiluminescence detector*. *Analytica Chimica Acta*. **514: 45, 2004**.
- [34] GARCIA-CAMPANA, A. M.; et al; *Flow injection analysis of oxymetazoline hydrochloride with inhibited chemiluminescence detection*. *Analytica Chimica Acta*. **516: 245, 2004**.
- [35] SHI, H. M.; et al. *Determination of cortisol in human blood sera a new Ag(III) complex-luminol chemiluminescence system*. *Analytical Biochemistry*. **387: 178, 2009**.

- [36] NALEWAJKO, E.; RAMÍREZ, R. B.; KOJLO, A. *Determination of dopamine by flow-injection analysis coupled with luminol-hexacyanoferrate(III) chemiluminescence detection*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical. Analysis. **36: 219, 2004.**
- [37] XIN, T. B.; et al. *Determination of estradiol in human serum using magnetic particles-based chemiluminescence immunoassay*. Analytica Chimica Acta. **627: 277, 2008.**
- [38] SHAO, X. D. ; LI, Y.; LIU, Y. Q.; SONG, Z. H. *Rapid determination of levofloxacin in pharmaceuticals and biological fluids using a new chemiluminescence system*. Journal of Analytical Chemistry. **66: 102, 2011.**
- [39] JI, Z. P. ; WANG, J.; HAN, J.; HU, X. Y. *Detection of lysozyme by flow injection chemiluminescence*. Chinese Journal of Analytical Chemistry. **39: 1100, 2011.**
- [40] ZENG, H. J.; et al. *Determination of melamine by flow inject analysis based on chemiluminescence system*. Food Chemistry. **127:842, 2011.**
- [41] HUERTA-PEREZ, J. F.; Garcia-Campana, A. M. *Determination of N-methylcarbamate pesticides in water and vegetable samples by HPLC with post-column chemiluminescence detection sing the luminol reaction*. Analytica Chimica Acta. **630: 194, 2008.**
- [42] DRUZHININ, A. A.; ZHIROV, A. A.; ISHUTIN, V. A. NEMKOV, S. A. *Chemilumiescence determination of omega-chloroacetophenone*. Journal of Analytical Chemistry. **65: 1126, 2010.**
- [43] OLIVEIRA, G. G.; et al. *Determinação de paracetamol pela inibição da reação quimiluminescente do luminol-hipoclorito de sódio em um sistema de análise em fluxo empregando o conceito de multicomutação*. Química Nova. **32: 1755, 2009.**

[44] SONG, Z.; WANG L. *Chemiluminescence Investigation of Detection of Rutin in Medicine and Human Urine Using Controlled-Reagent-Release Technology*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **49: 5697, 2001.**

[45] WANG, S. W.; et al. *Determination of sibutramine with a new sensor based on luminol electrochemiluminescence*. Journal of Luminescence. **131: 1515, 2011.**

[46] HE, D. Y.; et al. *Micro flow sensor on a chip for the determination of terbutaline in human serum based on chemiluminescence and a molecularly imprinted polymer*. Talanta. **69: 1215, 2006.**

[47] COOPER, B.A. *Studies with a more rapid method of Vitamin B12 assay utilizing euglena gracilis*. Journal of Clinical Pathology. 12:153, 1959.

[48] KARSILAYAN, H. *Quantitation of vitamin B12 by first-derivative absorption spectroscopy*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **52: 1163, 1996.**

[49] LI, H. -B.; CHENF. *Determination of vitamin B12 in pharmaceutical preparations by a highly sensitive fluorimetric method*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry. **368: 836, 2000.**

[50] AKATSUKA, K.; ATSUYA, I. *Determination of vitamin B12 as cobalt by electrothermal atomic absorption spectrometry using the solid sampling technique*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry. **335: 200, 1989.**

[51] LUO, X.; et al. *HPLC-ESI-MS analysis of Vitamin B12 in food products and in multivitamins-multimineral tablets*. Analytica Chimica Acta. **562: 185, 2006.**

[52] QIN, W.; ZHANG, Z.; LIU H. *Chemiluminescence flow sensor for the determination of vitamin B12*. *Analytica Chimica Acta*. **357: 127, 1997**.

[53] SONG, Z.; HOU, S. *Sub-picogram determination of vitamin B12 in pharmaceuticals and human serum using flow injection with chemiluminescence detection*. *Analytica Chimica Acta*. **488: 71, 2003**.

[54] AKBAY, N.; GÖK, E. *Determination of vitamin B12 using a chemiluminescence flow system*. *Journal of Analytical Chemistry*. **63: 1073, 2008**.

[55] KUMAR, S. S.; CHOUHAN, R. S.; THAKUR. M. S. *Enhancement of chemiluminescence for vitamin B12 analysis*. *Analytical Biochemistry*. **388: 312, 2009**.

[56] PULGARÍN, J. A. M.; BERMEJO, L. F. G.; GARCÍA, M .N. S. *Flow injection chemiluminescence determination of vitamin b12 using on-line UV-persulfate photooxidation and charge coupled device detection*. *Luminescence*. doi: 10.1002/bio.1266, **2011**.

[57] SUÁREZ-SUÁREZ, A; TOVAR-SÁNCHEZ, A.; ROSSELLÓ-MORA, R. *Determination of cobalamins (hydroxo-, cyano-, adenosyl- and methylcobalamins) in seawater using reversed-phase liquid chromatography with diode-array detection*. *Analytica Chimica Acta*. **701: 81, 2011**.

[58] MARTENS, J. H.; BARG H.; WARRREN M. J.; JAHN D. *Microbial production of vitamin B12*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **58: 275, 2002**.

[59] BORGES, E. P.; FERNANDES, E. N.; ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F. *Desenvolvimento de um dispositivo de baixo custo para medidas por quimiluminescência*. *Química Nova*. **25: 1191, 2002**.

[60] ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. *Classificação dos métodos de análises em fluxo (Recomendações - IUPAC 1994)*. *Química Nova*. **22: 143, 1999**.

[61] ALMEIDA, L. F. *Um analisador fluxo-batelada com bomba pistão aplicado à preparação de soluções de calibração e microemulsões: determinação de metais em água mineral e gasolina por GF AAS*. Recife, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPE, **2007**. Tese de doutorado.

[62] ZAGATTO, E. A. G.; et al. *Information essential for characterizing a flow-based analytical system (IUPAC Technical Reported)*. Pure and Applied Chemistry. **74: 585, 2002**.

[63] TERRY, J. M. et al. *Chemiluminescence detector with a serpentine flow cell*. Analytical Chemistry. **80: 9817, 2008**.

[64] MOHR S. et al. *Precision milled flow-cells for chemiluminescence detection*. Analyst. **134: 2169, 2009**.

[65] SCUDDER, M. K.; POLLEMA, C. H.; RUZICKA, J. *The fountain cell: a tool for flow-based spectroscopies*. Analytical Chemistry. **64: 2657, 1992**.

[66] WEN, Y. et al. *Droplet detector for the continuous flow luminol-hydrogen peroxide chemiluminescence system*. Analyst. **134: 354, 2009**.

[67] CAMPÍNS-FALCÓ, P.; TORTAJADA-GENARO L. A.; BOSCH-REIG F. *A new flow cell design for chemiluminescence analysis*. Talanta. **55: 403, 2001**.

[68] IBÁÑEZ-GARCIA, N. et al. *Vortex configuration flow cell based on low-temperature cofired ceramics As a compact chemiluminescence microsystem*. Analytical Chemistry. **80: 5320, 2008**.

[69] LEITE, O. D.; FATIBELLO-FILHO, O.; ROCHA, F. R. P. *Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência*. Química Nova. **27: 337, 2004**.

- [70] ZHANG, W.; DANIELSON, D. *Characterization of a micro spiral flow cell for chemiluminescence detection*. *Microchemical Journal*. **75: 255, 2003**.
- [71] SEITZ, W.R.; VAN DYKE, K. *Chemiluminescence and bioluminescence analysis: fundamentals and biomedical applications*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. **13: 1, 1981**.
- [72] REIS, B. F. *Uma cela de fluxo feita em acrílico para espectrofotometria em sistemas de análise química por injeção em fluxo*. *Química Nova*. **17: 228, 1994**.
- [73] CAMPBELL, A.K. *Chemiluminescence: Principles and applications in biology and medicine*. VCH / Ellis Horwood, **1988**.
- [74] VAN DYKE, K. *Bioluminescence and chemiluminescence: instruments and applications, Vol. I*. CRC Press, **1985**.
- [75] LIMA, M. B. *Um micro flow-batch para determinação fotométrica e turbidimétrica de taninos em amostras de chás*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, **2010**. Dissertação de Mestrado.
- [76] HOLLER, F. J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S. R.; *Princípios de análise instrumental*. Porto Alegre: Bookman, **2009**.
- [77] HONORATO, R. S, et al. *A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end search*. *Analytica Chimica Acta*. **396: 91, 1999**.
- [78] DINIZ, P. H. G. D. *Determinação do Teor de NaCl, KCl e Glicose em Medicamentos Injetáveis por Fotometria Usando Exploração do Efeito Schlieren em Sistemas FIA e PLS1*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, **2010**. Dissertação de Mestrado.

[79] ALMEIDA, L. F.; et al. *A flow-batch analyzer with piston propulsion applied to automatic preparation of calibration solutions for Mn determination in mineral waters by ET ASS*. *Talanta*. **73: 906, 2007**.

[80] PRADOS-ROSALES, R. C.; LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. *Propelling devices: the heart of flow injection approaches*. *Analytica Chimica Acta*. **461: 169, 2002**.

[81] YEBRA-BIURRUN, M. C. *Flow injection analysis of marine samples*. New York: Nova Science, **2009**

[82] REIS, B. F. et al. *Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests*. *Analytica Chimica Acta*. **293: 129, 1994**.

[83] DA SILVA, J. A. F.; LAGO, C. L. *Módulo eletrônico de controle para válvulas solenoide*. *Química Nova*. **25: 842, 2002**.

[84] MIRANDA, J. C. *Desenvolvimento de um equipamento portátil e de sistema de análises em fluxo empregando multicomutação. Determinação fotométrica de ferro em águas de rios*. Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, **2011**. Dissertação de Mestrado.

[85] SOUZA, M. C.; et al. *Kinetics independent spectrometric analysis using non-linear calibration modelling and exploitation of concentration gradients generated by a flow-batch system for albumin and total protein determination in blood serum*. *Talanta*. **82: 1027, 2010**.

[86] HONORATO, R. S.; CARNEIRO, J. M.T.; ZAGATTO, E. A. G. *Spectrophotometric flow-batch determination of aluminum in plant tissues exploiting a feedback mechanism*. *Analytica Chimica Acta*. **441: 309, 2001**.

[87] PASQUINI, C.; AQUINO, E. V.; REBOUÇAS, M. V.; GONZAGA, F. B. *Robust flow-batch coulometric/biamperometric titration system:*

Determination of bromine index and bromine number of petrochemicals. Analytica Chimica Acta. **600: 84, 2007.**

[88] NACSIMENTO, V.B.; et al. *Automatic determination of chlorine without standard solutions using a biamperometric flow-batch analysis system.* Talanta. **81: 609, 2010.**

[89] ALMEIDA, L. F.; et al. *Implementation of an automatic standard addition method in a flow-batch system: application to copper determination in an alcoholic beverage by atomic absorption spectrometry.* Analytica chimica Acta. **486: 143, 2003.**

[90] CUNHA, F. A. S. *Uma metodologia automatizada por fluxo-bataleda para a preparação de microemulsões de gasolina e de nafta para determinação de íons metálicos por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.* João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, **2010.** Dissertação de Mestrado.

[91] VISANI, V.; et al. *Flow-batch analyser for preparation of calibration standard mixtures in simultaneous multicomponent spectrometric analysis.* Eclética Química. **32: 37, 2009.**

[92] FORMIGA, F.M.; et al. *Um turbidímetro/nefelômetro de fluxo acoplado a um sistema flow-batch para screening analisys automática de cátions em medicamentos.* Controle & Instrumentação. **83: 65, 2003.**

[93] HONORATO, R. S.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, R. A. C.; ARAÚJO, M. C. U. *Prior assay as an approach to flow titrations. Spectrophotometric determination of iron in allows and ores.* Analytica Chimica Acta. **416: 231, 2000.**

[94] SILVA, J. E. et al. *A flow-batch internal standard procedure for iron determination in hydrated ethanol fuel by flame atomic absorption spectrometry.* Talanta. **70: 522, 2006.**

[95] FILHO, S. S. M. *Microfabricação de um analisador em fluxo-batelada (micro flow-batch) à base de polímero fotocurável uretano-acrilato*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, **2010**. Dissertação de Mestrado.

[96] CARNEIRO, J. M. T.; DIAS, A. C. B.; ZAGATTO, E. A. G.; HONORATO, R. S. *Spectrophotometric catalytic determination of Fe(III) in estuarine waters using a flow-batch system*. *Analytica chimica Acta*. **455: 327, 2002**.

[97] NETO, O. D. P. *Determinação de fósforo em tônicos fortificantes por fotometria de chama usando um titulador fluxo-batelada*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, **2011**. Dissertação de Mestrado.

[98] ACEBAL, C. C.; et al. *A new automated approach to determine monosodium glutamate in dehydrated broths by using the flow-batch methodology*. *Talanta*. **81: 116, 2010**.

[99] GRÜNHUT, M.; et al. *Flow-batch technique for the simultaneous enzymatic determination of levodopa and carbidopa in pharmaceuticals using PLS and successive projections algorithm*. *Talanta*. **75: 950, 2008**.

[100] MEDEIROS, E. P.; et al. *Multicommutated generation of concentration gradients in a flow-batch system for metronidazole spectrophotometric determination in drugs*. *Analytica chimica Acta*. **511: 113, 2004**.

[101] ALMEIDA, L. F.; et al. *An automatic flow-batch standard-addition method for sodium in alcohol fuel by flame photometry*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **14: 249, 2003**.

[102] CARNEIRO, J. M. T.; et al. *Individual sample conditioning in flow analysis. Determination of n-total in plant materials*. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. **368: 496, 2000**.

[103] GRÜNHUT, M.; et al. *Flow-batch analyzer for the chemiluminescence determination of catecholamines in pharmaceutical preparations*. Analytical Letters. **44: 67, 2011**.

[104] BARROS NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos*. 3ª Ed. Campinas: Editora Unicamp, **2007**.

[105] BRITO, N. M.; et al. *Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão*. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente. **13: 129, 2003**.

[106] PIMENTEL, M. F; NETO, B. B. *Calibração: uma revisão para químicos analíticos*. Química Nova. **19: 3, 1996**.

[107] BURNS, D. T. DANZER, K.; TOWNSHED, A. *Recommendations for use of term "recovery" in analytical procedures*. IUPAC. **2001**.