



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

## Dissertação de Mestrado

**Sistema Fluxo-Batelada Monossegmentado:  
Determinação Espectrofotométrica de Boro em Plantas**



**Inakã Silva Barreto**

João Pessoa – PB - Brasil

Agosto/2012



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

## Dissertação de Mestrado

# Sistema Fluxo-Batelada Monossegmentado: Determinação Espectrofotométrica de Boro em Plantas

**Inakã Silva Barreto\***

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. Luciano Farias de Almeida**

\* Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

João Pessoa – PB - Brasil

Agosto/2012

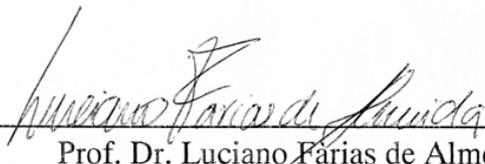
B273s Barreto, Inakã Silva.  
Sistema fluxo-batelada monossegmentado: determinação  
espectrofotométrica de boro em plantas / Inakã Silva Barreto.--  
João Pessoa, 2012.  
102f. : il.  
Orientador: Luciano Farias de Almeida  
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN  
1. Química. 2. Fluxo-batelada. 3. Fluxo monossegmentado  
– análise. 4. Cinética lenta – reações. 5. Determinação de  
boro.

UFPB/BC

CDU: 54(043)

**“Sistema Fluxo-Batelada Monossegmentado:  
Determinação Espectrofotométrica de Boro em Plantas”.**

Dissertação de Mestrado de Inakã Silva Barreto aprovada  
pela banca examinadora em 30 de agosto de 2012:



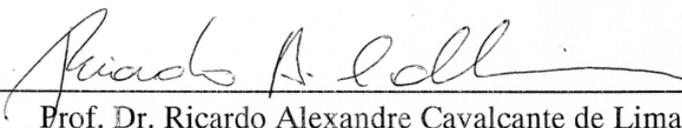
---

Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida  
Orientador/Presidente



---

Prof. Dr. Sérgio Ricardo Bezerra dos Santos  
Examinador



---

Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcante de Lima  
Examinador

“Nem tão longe que eu não possa ver  
Nem tão perto que eu possa tocar  
Nem tão longe que eu não possa crer que um dia chego lá  
Nem tão perto que eu possa acreditar que o dia já chegou”

*A montanha*

Humberto Gessinger - Engenheiros do Hawaii

A minha família.

Dedico.

## Agradecimentos

- À Deus;
- Aos meus pais, Barreto e Socorro, e aos meus irmãos por todo o incentivo e carinho;
- Aos meus mais que companheiros de pesquisa, Marcelo Batista e Stéfani Iury;
- Aos professores Luciano Farias e Mário Ugulino, por terem me acolhido no LAQA e me orientado durante o mestrado;
- Aos professores Pablo Nogueira, Ricardo Alexandre e Sérgio Santos por todos os comentários e sugestões durante a pré-defesa e defesa;
- E a todos os membros do LAQA, pela amizade.

# Sumário

Lista de figuras .....	ix
Créditos das figuras.....	xi
Lista de tabelas .....	xiii
Lista de siglas e abreviaturas .....	xiv
Resumo .....	xv
Abstract .....	xvi
Capítulo 1 .....	1
1. Introdução .....	1
1.1 Caracterização da problemática .....	2
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1 Geral.....	4
1.2.1 Específicos .....	4
1.3 Sistemas automáticos de análise.....	5
1.3.1 Análise em fluxo segmentado (SFA).....	8
1.3.2 Análise por injeção em fluxo (FIA) .....	9
1.3.3 Análise em fluxo monossegmentado (MSFA) .....	10
1.3.4 Análise por injeção sequencial (SIA).....	12
1.3.5 Análise em fluxo com multicomutação (MFA) .....	13
1.3.6 Analisador em fluxo-batelada (FBA) .....	14
1.4 Metodologias analíticas automáticas para determinações que envolvem reações de cinética lenta.....	17
1.5 Determinação de boro em plantas .....	20
1.5.1 Importância da determinação de boro em plantas.....	21
1.5.2 Métodos clássicos para determinação de boro em plantas.....	22
1.5.2.1 Método do azul de metileno .....	22
1.5.2.2 Método da quinalizarina .....	23
1.5.2.3 Método da curcumina.....	23
1.5.2.4 Método da azometina-H .....	24
1.5.3 Metodologias analíticas automáticas em fluxo para determinação de boro em plantas pelo método da azometina-H.....	25
Capítulo 2 .....	28
2. Experimental .....	28

2.1 Reagentes, soluções e amostras.....	29
2.1.1 Preparação dos reagentes e soluções.....	29
2.1.2 Preparação das amostras .....	30
2.2 Sistema fluxo-batelada monossegmentado.....	30
2.2.1 Câmara de mistura .....	32
2.2.2 Agitador magnético.....	33
2.2.3 Bomba peristáltica .....	33
2.2.4 Tubos de bombeamento, transmissão e armazenamento dos fluidos....	34
2.2.5 Válvulas solenoides.....	34
2.2.6 Acionador de válvulas.....	35
2.2.7 Microcomputador.....	36
2.2.8 Sistema de detecção .....	36
2.3 Programa operacional do MSFB.....	36
2.4 Ajuste dos parâmetros do MSFB .....	38
2.4.1 Precisão das válvulas solenoides.....	38
2.4.2 Etapa de limpeza.....	39
2.4.3 Comprimento da bobina de armazenamento .....	39
2.5 Procedimentos do MSFB para determinação do teor de boro.....	40
2.6 Método de referência .....	45
2.7 Procedimentos para avaliação da performance analítica.....	45
<b>Capítulo 3 .....</b>	<b>50</b>
<b>3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>50</b>
3.1 Estudo da precisão das válvulas solenoides.....	51
3.2 Estudo da etapa de limpeza .....	52
3.3 Volume do monossegmento .....	53
3.4 Configurações físicas do MSFB .....	55
3.5 Comportamento cinético da reação .....	57
3.6 Validação da curva analítica para determinação de boro.....	58
3.7 Aplicações analíticas do sistema proposto .....	62
3.8 Comparação entre o MSFB e outros sistemas .....	64
<b>Capítulo 4 .....</b>	<b>66</b>
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>66</b>
4.1 Conclusão .....	67

4.2 Perspectivas.....	68
Referências .....	69
Anexos .....	78

## Lista de figuras

Figura 1.1 – Linha do tempo com os principais analisadores automáticos em fluxo. ....	7
Figura 1.2 - Diagrama esquemático de um sistema de análise em fluxo simples. (a) exemplos de sistemas para propulsão dos fluidos, (b) exemplos de sistemas de injeção, (c) exemplos de sistemas de mistura e (d) exemplos de detectores. .7	
Figura 2.1 – Fotografia do MSFB. (a) recipientes dos fluidos, (b) bomba peristáltica, (c) válvulas solenoides, (d) câmara de mistura, (e) agitador magnético, (f) bobina de armazenamento, (g) espectrofotômetro UV-Vis, (h) notebook e (i) acionador de válvulas e interface. ....	31
Figura 2.2 – Ilustração tridimensional da câmara de mistura empregada. (a) Vista frontal e (b) corte lateral. ....	32
Figura 2.3 - Fotografia de uma bomba peristáltica. ....	33
Figura 2.4 – Fotografia de uma válvula solenoide de três vias. ....	34
Figura 2.5 – Diagrama esquemático da ligação entre o acionador de válvulas e a interface NI USB-6009. ....	35
Figura 2.6 – Interface do programa de controle do MSFB. ....	37
Figura 2.7 – Interface do programa para realizar o estudo de calibração das válvulas solenoides do MSFB. ....	39
Figura 2.8 – Interface do programa para realizar o estudo cinético do MSFB. ...	40
Figura 2.9 – a) Diagrama esquemático MSFB. Bomba peristáltica (BP), válvulas solenoides (V), câmara de mistura (CM), barra magnética (BM), agitador magnético (AM), “loop” de ar (L), bobina de armazenamento (BA), detector espectrofotométrico (DE), amostra (A), reagente (R), tampão (T), descarte (D) e monossegmento (M). b) Diagrama dos tempos (em segundos) usados para as análises das amostras. Onde: $t_A$ , $t_R$ , $t_T$ , $t_M$ e $t_D$ são os tempos de abertura das válvulas $V_A$ , $V_R$ , $V_T$ , $V_M$ e $V_D$ , respectivamente. ....	41
Figura 2.10 – Estágios de formação do monossegmento (a) – (c). ....	43
Figura 2.11 – Curvas analíticas e equações utilizadas nos cálculos de LOD (a) e LOQ (b). ....	47
Figura 3.1 - Variação do sinal espectrofotométrico com a realização de duas limpezas. ....	52
Figura 3.2 – Estágios de formação do monossegmento (a) – (d). ....	53

Figura 3.3 – Ilustração da cela de fluxo utilizada preenchida com o monossegmento. ....	54
Figura 3.4 – Diagrama esquemático da configuração com a bomba peristáltica posicionada antes do detector. ....	55
Figura 3.5 – Diagrama esquemático da configuração utilizando apenas uma única linha para armazenamento e descarte dos fluidos.....	56
Figura 3.6 - Variação média (n=5) do sinal analítico com o tempo de residência da mistura reacional (para o padrão de 1,00 mg L <sup>-1</sup> de boro) na bobina de armazenamento.....	57
Figura 3.7 – Ilustração da bobina de armazenamento. ....	58
Figura 3.8 – Curvas analíticas do método clássico e do MSFB para a determinação de boro. ....	58
Figura 3.9 – Gráficos dos resíduos dos modelos de calibração do método clássico e do MSFB para a determinação de boro. ....	60

## Créditos das figuras

**Figura 1.2** – Adaptada de 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, 116p.

**Figura 1.3** – Adaptada de ANDRADRE, S.I.E. *Um Analisador Fluxo-Batelada Baseado em Imagem Digital para Determinação de Al(III) e Cr(VI) em Águas*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2012. Dissertação de Mestrado, 89p.

**Figura 1.4** – Adaptada de ANDRADE, R.A.N. *Um Luminômetro Fluxo-Batelada para Determinação de Vitamina B<sub>12</sub> em Medicamentos*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2011. Dissertação de Mestrado, 116p.

**Figura 1.5** – Adaptada de FERREIRA, M. *Determinação Espectrofotométrica de Boro em Plantas com Azometina-H, usando Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado*. Campinas, Instituto de Química, UNICAMP, 1987. Dissertação de Mestrado, 100p.

**Figura 2.2** – Adaptada de ANDRADE, R.A.N. *Um Luminômetro Fluxo-Batelada para Determinação de Vitamina B<sub>12</sub> em Medicamentos*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2011. Dissertação de Mestrado, 116p.

**Figura 2.3** – Adaptada de ANDRADE, R.A.N. *Um Luminômetro Fluxo-Batelada para Determinação de Vitamina B<sub>12</sub> em Medicamentos*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2011. Dissertação de Mestrado, 116p.

**Figura 2.4** – Adaptada de ANDRADE, R.A.N. *Um Luminômetro Fluxo-Batelada para Determinação de Vitamina B<sub>12</sub> em Medicamentos*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2011. Dissertação de Mestrado, 116p.

**Figura 2.5** – Adaptada de Adaptada de ANDRADRE, S.I.E. *Um Analisador Fluxo-Batelada Baseado em Imagem Digital para Determinação de Al(III) e Cr(VI) em Águas*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2012. Dissertação de Mestrado, 89p.

**Figura 2.9** – Adaptada de BARRETO, I.S. *et al.* A monosegmented flow-batch system for slow reaction kinetics: Spectrophotometric determination of boron in plants. *Talanta*. **94: 111, 2012.**

**Figura 2. 10** – Adaptada de BARRETO, I.S. *et al.* A monosegmented flow-batch system for slow reaction kinetics: Spectrophotometric determination of boron in plants. *Talanta*. **94: 111, 2012.**

**Figura 2.11** – Adaptada de 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, 116p.

**Figura 3.2** – Adaptada de BARRETO, I.S. *et al.* A monosegmented flow-batch system for slow reaction kinetics: Spectrophotometric determination of boron in plants. *Talanta*. **94: 111, 2012.**

## Lista de tabelas

Tabela 2.1 – ANOVA para o ajuste de um modelo pelo MMQ.....	48
Tabela 3.1 – Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos para a determinação de boro.....	59
Tabela 3.2 – Somas quadráticas e médias quadráticas calculadas (ANOVA), para a determinação de boro. ....	61
Tabela 3.3 – Tabela ANOVA para o modelo linear das curvas analíticas para a determinação de boro. ....	61
Tabela 3.4 – Valores de LOD e LOQ, em $\text{mg L}^{-1}$ , estimados ao nível de 95% de confiança, para a determinação de boro.....	62
Tabela 3.5 – Valores médios das concentrações de boro ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) preditas ( $n=5$ ) das amostras de plantas usando o método clássico e o MSFB. ....	63
Tabela 3.6 – Parâmetros para diferentes sistemas automáticos.....	64

## Lista de siglas e abreviaturas

**ANOVA** – Analysis of variance (análise de variância)

**CFA** - Continuous flow analysis (análise em fluxo contínuo)

**EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético

**FBA** – Flow-batch analysis (análise em fluxo-batelada)

**FIA** – Flow injection analysis (análise por injeção em fluxo)

**FIA** – Flow injection analysis (análise por injeção em fluxo)

**HP** - Hewlett-Packard

**IUPAC** - International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

**LOD** – Limit of detection (limite de detecção)

**LOQ** – Limit of quantitation (limite de quantificação)

**MFA** – Multicommutation in flow analysis (análise em fluxo multicomutado)

**MSFA** – Monosegmented flow analysis (análise em fluxo monossegmentado)

**MSFB** – Monosegmented flow-batch (fluxo-batelada monossegmentado)

**PTFE** - Politetrafluoretileno

**SFA** – Segmented flow analysis (análise em fluxo segmentado)

**SFIA** - Segmental flow-injection analysis (análise por injeção em fluxo segmentar)

**SIA** – Sequential injection analysis (análise por injeção sequencial)

## Resumo

Título: **Sistema Fluxo-Batelada Monossegmentado: Determinação Espectrofotométrica de Boro em Plantas**

Esse trabalho introduz o conceito fluxo-batelada monossegmentado (*monosegmented flow-batch* - MSFB). Esse sistema combina as características favoráveis do sistema fluxo-batelada (*flow-batch analysis* - FBA) e do fluxo monossegmentado (*monosegmented flow analysis* - MSFA), permitindo o uso do FBA em reações de cinética lenta sem prejuízo na sensibilidade ou na frequência de amostragem. O MSFB foi avaliado durante a determinação espectrofotométrica de boro em extrato de plantas, baseado no método que envolve a reação lenta entre o boro e a azometina-H. Todas as soluções padrão foram preparadas *in-line* e todos os processos analíticos foram realizados por simples mudanças nos parâmetros operacionais do *software* de controle do MSFB. O limite de detecção foi estimado em 0,008 mg L<sup>-1</sup>. As medidas foram executadas com frequência analítica de 120 amostras por hora, com precisão satisfatória. O MSFB foi aplicado com sucesso na análise de 10 amostras de extratos plantas e os resultados foram equivalentes aos obtidos pelo método de referência, ao nível de 95% de confiança estatística.

Keywords: Fluxo-batelada; Análise em fluxo monossegmentado; Reações de cinética lenta; Determinação de boro.

## Abstract

Title: **Monosegmented flow-batch system: Spectrophotometric determination of boron in plants**

This work introduces the monosegmented flow-batch (MSFB) analysis concept. This system combines favourable characteristics of both flow-batch and the monosegmented analysers, allowing use of the flow-batch system for slow reaction kinetics without impairing sensitivity or sampling throughput. The MSFB was evaluated during spectrophotometric determination of boron in plant extracts, which is a method that involves a slow reaction between boron and azomethine-H. All standard solutions were prepared in-line, and all analytical processes completed by simply changing the operational parameters in the MSFB control software. The limit of detection was estimated at  $0.008 \text{ mg L}^{-1}$ . The measurements could be performed at a rate of 120 samples per hour with satisfactory precision. The proposed MSFB was successfully applied to analyse 10 plant samples and the results are in agreement with the reference method at a 95% level of confidence.

Keywords: Flow-batch; Monosegmented flow analysis; Slow kinetic reactions; Boron determination.

**Capítulo 1**  
**Introdução**

## 1.1 Caracterização da problemática

A análise química é indispensável em todas as áreas da vida contemporânea e pode ser executada por procedimentos rápidos, simples, precisos e robustos<sup>[1]</sup>. Atualmente, com a preocupação da sustentabilidade na atuação humana, ressaltam-se, particularmente na Química Analítica, procedimentos analíticos que incorporam estratégias de contenção no consumo de reagentes e amostras aliadas a redução de custos operacionais.

Dessa forma, analisadores automáticos estão continuamente surgindo e sendo empregados, com sucesso, na análise de diversas substâncias nas mais distintas matrizes<sup>[2-5]</sup>.

Em 1999, Honorato *et al.*<sup>[6]</sup> propôs um método automático para titulação ácido-base que alia as características dos sistemas em fluxo e dos sistemas em batelada, e o denominou de análise em fluxo-batelada (do inglês: *flow-batch analysis* - FBA).

O FBA possui como um dos principais componentes a câmara de mistura, onde pode ser realizada, sob controle do software, inúmeras etapas da análise, como: a inserção da amostra e dos reagentes, homogeneização, preparação das soluções de calibração, extração e detecção. Diante dessa versatilidade, diversos procedimentos analíticos têm sido descritos e aplicados utilizando o FBA<sup>[5]</sup>.

No entanto, essas aplicações utilizam processos onde a reação se completa rapidamente, sem a necessidade da espera de um tempo prolongado (tempo de residência) antes da detecção do analito. Determinações que empregam reações de cinética lenta até podem ser implementadas no FBA, entretanto a velocidade analítica, ou a sensibilidade do método, acaba sendo prejudicada<sup>[7]</sup>.

Outras metodologias automáticas para análise em fluxo têm sido propostas para reações de cinética lenta, como a análise por injeção em fluxo (FIA)<sup>[8-10]</sup>, análise por injeção sequencial (SIA)<sup>[11,12]</sup>, análise em

fluxo com multicomutação (MFA)<sup>[13]</sup> e a análise em fluxo monossegmentado (MSFA)<sup>[14-16]</sup>.

Dentre eles, pode se destacar o MSFA, que tem como principal característica a adição da amostra entre bolhas de ar ou de um gás inerte, para posterior transporte pelo fluido carregador. Como a amostra é ladeada por bolhas de ar, esse sistema permite um longo tempo de residência da amostra com mínima dispersão, podendo ser alcançada uma elevada sensibilidade analítica, sem prejuízo na frequência de amostragem. Porém, o MSFA apresenta alguns inconvenientes quando comparados aos sistemas FBA, como a homogeneização ineficiente, baixa flexibilidade e versatilidade, necessidade de fluido carregador e inviabilidade do preparo de soluções de calibração.

No presente trabalho, propõe-se um sistema fluxo-batelada monossegmentado (*monosegmented flow-batch system* - MSFB). Esse sistema combina as características favoráveis do FBA e do MSFA, para implementar métodos que envolvem reações de cinética lenta sem perda de sensibilidade ou de frequência analítica, além de minimizar alguns problemas do MSFA. Sendo assim, foi desenvolvido e avaliado um sistema MSFB para determinação do teor de boro em extrato de plantas, usando o método espectrofotométrico da azometina-H.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Geral

Desenvolver um sistema fluxo-batelada monossegmentado para reações de cinética lenta e aplicá-lo à determinação de boro em extrato de plantas pelo método da azometina -H.

### 1.2.1 Específicos

- Desenvolver uma metodologia que viabilize a utilização do sistema fluxo-batelada em reações de cinética lenta;
- Desenvolver o sistema fluxo-batelada monossegmentado (MSFB);
- Desenvolver o programa para gerenciamento das operações do sistema;
- Ajustar os parâmetros de funcionamento do MSFB;
- Aplicar o MSFB na determinação espectrofotométrica de boro em extrato de plantas;
- Avaliar o desempenho analítico do sistema proposto;
- Comparar as características analíticas do MSFB com outros sistemas automáticos em fluxo.

### 1.3 Sistemas automáticos de análise

Métodos analíticos convencionais são comumente desenvolvidos e aplicados em laboratórios e centros de pesquisas de todo o mundo. No entanto, procedimentos analíticos que possibilitem um menor consumo de reagentes e amostras, redução na geração de resíduos, maior sensibilidade, menor custo, elevada frequência de amostragem, menor risco de intoxicação do analista e, além disso, de fácil execução, ainda são fortemente requisitados e aplicados em determinações de rotina, dada a elevada demanda de análises<sup>[1]</sup>.

Dessa forma, nos últimos anos, uma grande parte da Química Analítica tem-se voltado para o desenvolvimento de sistemas automáticos, bem como de metodologias e adaptações para esse fim<sup>[1]</sup>.

Os argumentos para a utilização da automação são bastante variados, sendo comumente empregada para garantir maior segurança do analista no manuseio de substâncias que potencialmente possam oferecer riscos à saúde, reduzir os custos, devido o baixo consumo de reagentes e amostras, executar procedimentos em um menor intervalo de tempo, diminuir o esforço humano, melhorar a precisão das análises, etc.

Os analisadores automáticos podem ser classificados em três grupos:

- analisadores automáticos discretos ou em batelada;
- analisadores automáticos robotizados;
- analisadores automáticos em fluxo.

Os analisadores automáticos discretos, ou em batelada, são versões mecanizadas de métodos clássicos manuais. Geralmente, caracterizam-se por usarem um recipiente individual para cada amostra e por transportar a mistura reacional para o detector através de um sistema mecânico, comumente, em forma de bandeja. Normalmente, as medidas são realizadas após o estabelecimento do equilíbrio químico e físico da reação em estudo, objetivando alcançar a máxima sensibilidade analítica<sup>[17]</sup>.

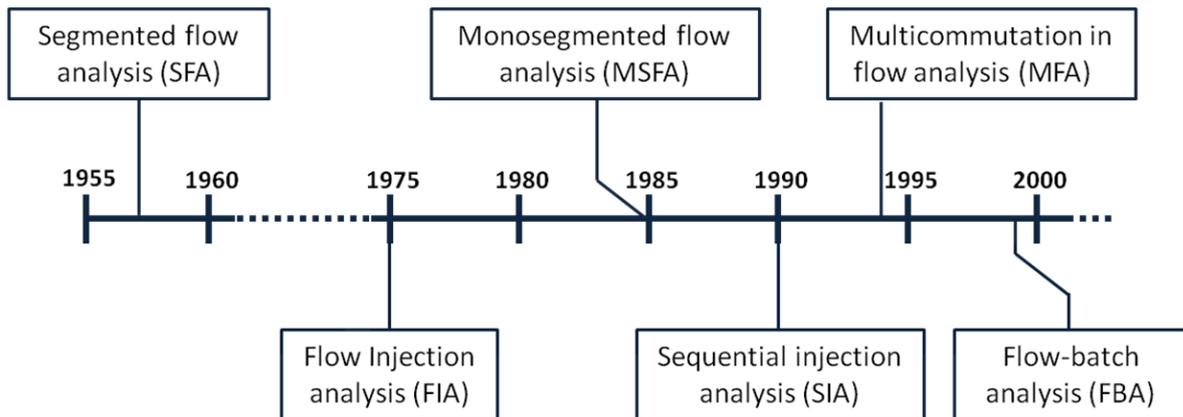
Os analisadores automáticos robotizados são caracterizados por executar as operações analíticas com o auxílio de um braço mecânico

controlado por computador, que mimetiza os procedimentos executados por um operador. A complexidade mecânica e o custo elevado fazem com que esses sistemas possuam diversas limitações na realização de análises automáticas. No entanto, eles desempenham um importante papel em etapas preliminares do procedimento analítico, como em tarefas que envolvam a manipulação de materiais tóxicos ou explosivos<sup>[17]</sup>.

Os analisadores em fluxo apresentam as características de processamento da amostra e reagente em fluxo contínuo, seccionado ou não por bolhas de ar. De uma forma geral, devido à quantidade crescente de analisadores em fluxo desenvolvidos, a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)<sup>[18,19]</sup> tem recomendado uma classificação de acordo com o processamento da amostra e/ou reagente(s) bem como da característica básica de seu fluxo.

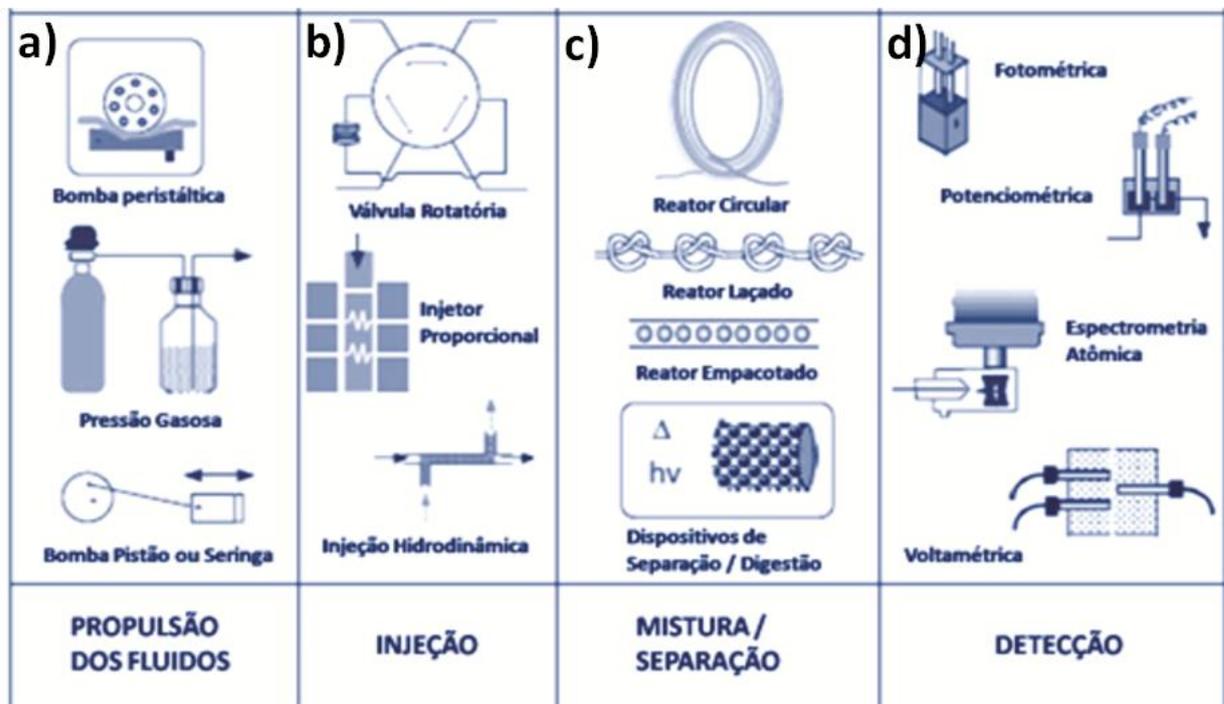
Apesar da importância dos métodos discretos, e sobretudo dos métodos robotizados, na implementação e automatização de procedimentos laboratoriais, os métodos de fluxo registram um acentuado crescimento, tanto em termos de divulgação, como em áreas de aplicação e até em receptividade por parte da comunidade científica<sup>[1-20]</sup>.

Desde o desenvolvimento do primeiro analisador automático em fluxo<sup>[21]</sup>, em 1957, inúmeros analisadores têm sido propostos, como pode ser visto na **figura 1.1**. As diferentes combinações de características, como o tipo de confluência, bombeamento/aspiração de amostras e reagentes e sua segmentação definem as peculiaridades de cada sistema.



**Figura 1.1** – Linha do tempo com os principais analisadores automáticos em fluxo.

Apesar de cada um desses sistemas em fluxo, apresentarem suas peculiaridades, todos eles exibem uma configuração geral em comum, como mostrado na **figura 1.2**.



**Figura 1.2** - Diagrama esquemático de um sistema de análise em fluxo simples. (a) exemplos de sistemas para propulsão dos fluidos, (b) exemplos de sistemas de injeção, (c) exemplos de sistemas de mistura e (d) exemplos de detectores.

A propulsão dos fluidos geralmente é realizada por uma bomba peristáltica, embora vários outros mecanismos possam ser utilizados com esta finalidade, como as bombas pistão (**figura 1.2a**). O controle adequado das alíquotas de reagentes e amostras adicionadas ao sistema é, normalmente, realizado por válvulas solenoides, rotatórias, ou por injetor proporcional (**figura 1.2b**).

Comumente, análises em fluxo exigem acessórios para promover misturas, digestões ou separações. Essas etapas são promovidas por uma bobina de reação que podem ser modificadas de acordo com a reação requerida (**figura 1.2c**). A detecção do(s) analito(s) em um analisador em fluxo pode ser realizada das mais diversas formas (**figura 1.2d**).

Os analisadores elencados na **figura 1.1** serão discutidos nas próximas secções, dando maior atenção ao analisador em fluxo monossegmentado (MSFA) e ao analisador fluxo-batelada (FBA), para melhor entendimento do trabalho proposto.

### 1.3.1 Análise em fluxo segmentado (SFA)

O desenvolvimento do primeiro sistema de análise em fluxo ocorreu em 1957 por Leonard Skeggs<sup>[21]</sup>, um pesquisador de laboratório clínico. Esse sistema, que foi inicialmente denominado de análise em fluxo contínuo (do inglês: *continuous flow analysis* – CFA) e que logo em seguida teve a sua terminologia alterada para análise em fluxo segmentado (do inglês: *segmented flow analysis* - SFA), tem como princípio a segmentação da amostra por bolhas de ar.

Nesse sistema, a amostra é aspirada continuamente, ocorrendo a segmentação por bolhas de ar e logo em seguida a adição do reagente. Dessa forma, a mistura e conseqüente reação ocorrem enquanto os segmentos amostra/reagente seguem em direção ao detector, permitindo assim obter o equilíbrio químico da reação e uma elevada taxa de amostragem. Com as suas características o SFA permite a realização de

diversas determinações químicas com uma técnica analítica relativamente simples.

Esse conceito alcançou uma ampla aceitação, principalmente, no campo das análises clínicas, decorrente do desenvolvimento e comercialização dos *AutoAnalyzer Technicon*. Seu uso em laboratórios clínicos tem diminuído, devido a um movimento em direção a sistemas mais altamente automatizados, que requerem um menor envolvimento do operador e menor consumo de reagente e amostra, fator importante para reações enzimáticas. O SFA é ainda dominante em laboratórios de grande porte, especialmente para determinações utilizando procedimentos extensos ou complexos<sup>[22]</sup>.

### 1.3.2 Análise por injeção em fluxo (FIA)

Em 1975, Ruzicka e Hansen<sup>[23]</sup> introduziram o conceito sistema de análise em fluxo, que ficou conhecido, internacionalmente, pelo acrônimo FIA (do inglês: *flow injection analysis*). Esse processo de análise química, que foi inicialmente desenvolvido no Brasil durante a assessoria do até então perito da Agência Internacional de Energia Atômica Dr. Jaromir Ruzicka à instalação do laboratório de Química Analítica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) tornou-se uma notória ferramenta para automação de procedimentos analíticos em todo o mundo<sup>[24]</sup>.

No processo de análise química por injeção em fluxo, diferentemente do SFA, um volume reprodutível da amostra é inserido, em curto intervalo de tempo, em um fluido carregador não segmentado, onde ocorre a reação até a amostra alcançar o detector.

Os sistemas de FIA possuem diversas vantagens, tais como: possibilidade de realizar estudos cinéticos, baixo consumo de amostra, elevada velocidade analítica e uma instrumentação simples.

No entanto, nesses sistemas como não há segmentação por bolhas de ar, a amostra inevitavelmente sofre dispersão durante o transporte para o detector e os equilíbrios físico e químico muitas vezes não podem ser alcançados. Consequentemente, a sensibilidade do método pode ser inferior à obtida por outros analisadores. A queda na sensibilidade do método ainda pode ser agravada pela mistura, muitas vezes, ineficiente, entre amostra e reagentes.

Outra desvantagem do sistema FIA, quando comparado a outros analisadores, é a sua baixa flexibilidade, pois caso alguma mudança seja necessária, há necessidade de se estudar novamente os inúmeros parâmetros (vazão, nível de dispersão, intercontaminação, etc.) ou até mesmo elaborar uma nova configuração para o analisador.

O FIA foi o sistema em fluxo que causou maior impacto<sup>[11]</sup>, gerando dezenas de obras sobre o tema até os dias atuais. Estas obras incluem livros, manuais e guias práticos sobre os princípios, instrumentação e aplicações. Além disso, milhares de artigos científicos têm sido publicados abordando a técnica de análise em fluxo para diversas metodologias analíticas.

### **1.3.3 Análise em fluxo monossegmentado (MSFA)**

O primeiro sistema genuinamente brasileiro foi desenvolvido por Célio Pasquini no seu trabalho de tese no Instituto de Química da Universidade de Campinas<sup>[25]</sup>, sendo divulgado à comunidade científica internacional em 1985<sup>[14]</sup>.

O sistema em fluxo monossegmentado foi proposto como um híbrido do SFA com o FIA, agregando aspectos importantes dos dois sistemas<sup>[20]</sup>. Como no SFA, devido a presença das bolhas, a dispersão longitudinal é mínima, possibilitando, caso seja necessário, a permanência do segmento no caminho reacional por longos períodos de tempo, sem o risco de contaminação entre as respectivas amostras. Já do FIA traz o

baixo consumo de reagentes e amostras e a elevada precisão das análises.

Assim como no SFA, no MSFA a interposição da amostra e reagentes entre bolhas de ar, possibilita a realização de determinações em que a sensibilidade é cineticamente relacionada. Desta forma, a sensibilidade do método não é prejudicada, mesmo em determinações que envolvem reações de cinética lenta.

Para alcançar uma maior frequência analítica, basta introduzir sequencialmente as amostras, enfileirando os diversos monossegmentos no percurso analítico. Previamente à detecção, as bolhas de ar são removidas e o fluxo resultante, agora contínuo, é imediatamente transportado para cela de fluxo, onde são feitas as leituras do sinal analítico. Convém ressaltar, que com o avanço da instrumentação, essa remoção de bolhas não é uma condição *sine qua non* para captura do sinal, já que esse processo pode ser realizado de forma contínua.

Diversos procedimentos analíticos têm sido desenvolvidos explorando as características do sistema MSFA como, por exemplo, titulação<sup>[25]</sup>, análise de gases<sup>[27,28]</sup> e extração<sup>[29,30]</sup>.

Aqui se faz necessário mencionar uma discussão, acerca da confusão de nomenclatura, levantada por Célio Pasquini, no artigo "Por que ele é Chamado de Análise em Fluxo Monossegmentado"<sup>[31]</sup>. Nesse trabalho, o autor lembra que o sistema MSFA foi originalmente nomeado de MCFA (do inglês: *monosegmented continuous flow analysis*) e esta nomenclatura permaneceu em uso até que as recomendações da IUPAC sobre a classificação e definição de métodos analíticos em fluxo foram publicadas<sup>[18,19]</sup>. Desde então, vários pesquisadores têm reconhecido que a palavra "contínuo" não contribui significativamente para a descrição do processo que ocorre nesse sistema de fluxo, e acolheram o nome recomendado pela IUPAC, *monosegmented flow analysis*, porém outros permanecem no equívoco chamando tal sistema ainda pelo termo MCFA ou dando outras nomenclaturas, como por exemplo SFIA<sup>[32]</sup>.

### 1.3.4 Análise por injeção sequencial (SIA)

A análise por injeção sequencial (SIA) foi idealizado por Ruzicka e Marshall em 1990<sup>[33]</sup> com o intuito de simplificar mecanicamente os sistemas FIA e superar alguns inconvenientes dessa técnica, como a necessidade de fluido carregador contínuo e a necessidade de uma nova configuração física para determinações distintas.

Desta forma, o SIA veio como forma de facilitar a implementação dos métodos em fluxo no monitoramento *on-line* de processos industriais, onde robustez e a calibração automática são exigidas<sup>[33]</sup>.

Nos sistemas SIA, volumes de amostra e reagentes são aspirados sequencialmente, empregando uma bomba peristáltica ou como é mais comum uma bomba pistão. Uma válvula seletora (válvula SIA), com vários canais de entrada (de seis a dez) e um único de saída, é utilizada para o direcionamento de volumes pré-determinados de reagentes e amostra para o interior do coletor onde pode ocorrer a homogeneização, separação e mistura das soluções. Em seguida, a direção do fluxo é invertida e a mistura reacional é direcionada para o detector.

A simplicidade e a versatilidade aliada à robustez geraram um crescimento exponencial de aplicações analíticas nos sistemas SIA<sup>[1]</sup>. Outras qualidades, para essa ascensão, poderiam ser mencionadas, como o baixo consumo de amostra, e a redução na quantidade de resíduos por análise.

Contudo, é importante salientar que o SIA, devido às características operacionais do dispositivo de injeção utilizado, apresenta a desvantagem de realizar as análises com uma baixa frequência analítica, quando comparado a outros analisadores, visto que as aspirações das soluções são realizadas de forma sequencial.

### 1.3.5 Análise em fluxo com multicomutação (MFA)

Em meados da década de 90, outro pesquisador brasileiro, propôs uma metodologia analítica automática baseada em sistemas de fluxo multicomutado. Esse sistema foi batizado de análise em fluxo multicomutado (MFA)<sup>[34]</sup>.

A principal característica do sistema desenvolvido por Boaventura Reis é a inserção de pequenas alíquotas da amostra e do reagente de forma consecutiva e alternada, originando uma amostragem binária. Essa formação de zonas reacionais favorece o processo de homogeneização entre a amostra e o reagente, não influenciando na velocidade analítica<sup>[3]</sup>.

Trabalhos<sup>[3]</sup> evidenciam uma série de vantagens do emprego da amostragem binária nos sistemas de análises em fluxo e entre essas se destacam o aumento da precisão e da sensibilidade analítica, além da diminuição no volume de reagente por análise, acarretando, conseqüentemente, uma redução na quantidade de resíduo gerado.

Apesar das qualidades proporcionadas pela análise em fluxo multicomutado, o MFA não tem encontrado por parte da comunidade científica a aceitação desejada, talvez pelo seu caráter de novidade, já que esse sistema guarda grandes semelhanças com sistemas já comercialmente consagrados, como o FIA<sup>[35]</sup>. Essa falta de receptividade foi comentada por Santos<sup>[35]</sup>, que atribui essa falta de robustez às válvulas solenoides disponíveis comercialmente e a dificuldade em encontrar circuitos eletrônicos comerciais para o acionamento das válvulas, o que obriga a sua confecção.

De qualquer forma, a multicomutação tem ganhado o seu espaço entre as metodologias de análise em fluxo, já sendo uma técnica em fluxo reconhecida pela IUPAC.

### 1.3.6 Analisador em fluxo-batelada (FBA)

Em 1999, Honorato *et al.*<sup>[6]</sup> propuseram um sistema automático para viabilizar a execução de titulações, empregando o método de Fibonacci para detectar o ponto final. Na ocasião, estudou-se a acidez nos vinhos brancos por titulação com NaOH utilizando indicador de púrpura de metacresol.

Esse sistema foi batizado de analisador em fluxo-batelada (do inglês: *flow-batch analyser* – FBA), uma vez que incorpora as principais características dos analisadores em fluxo, como por exemplo, o transporte dos reagentes e das amostras e o monitoramento do sinal analítico, com os analisadores em batelada, já que o processamento da amostra é realizado em uma câmara antes de ser submetido à detecção.

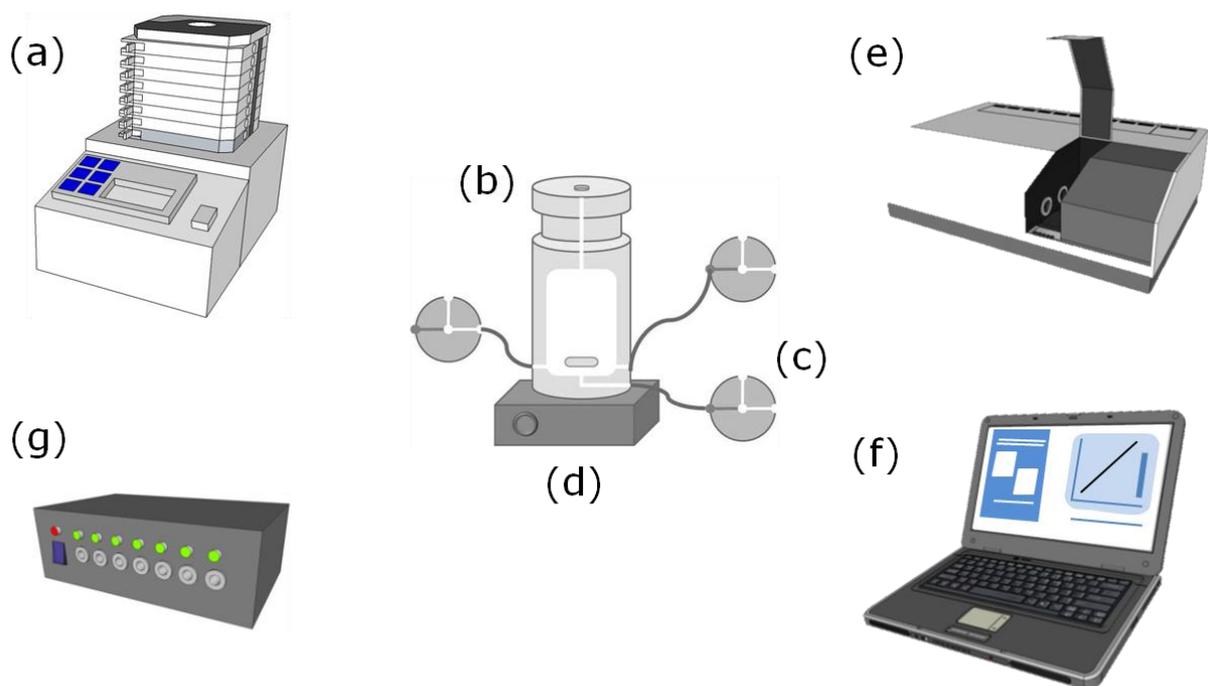
Como pode ser visto no esquema ilustrativo apresentado na **figura 1.3**, o FBA é constituído basicamente das seguintes partes:

- Sistema de propulsão: para efetuar a propulsão dos fluidos no FBA, geralmente é utilizado uma bomba peristáltica (**figura 1.3a**), devido a sua capacidade de impulsionar os líquidos por vários canais simultaneamente, mantendo a vazão constante.
- Sistema de adição dos fluidos: no FBA, volumes predefinidos e precisos de reagentes e amostras, adicionados ou aspirados da câmara de mistura, são controlados pelas válvulas solenoides (**figura 1.3c**). Outros sistemas de comutação podem ser empregados, como válvulas pinça, válvulas SIA, microbombas (que executam a função da válvula e do sistema de propulsão), etc;
- Câmara de mistura: a câmara de mistura ou câmara reacional (**figura 1.3b**) é uma das principais características do FBA. É constituída por uma pequena peça cilíndrica, geralmente de Teflon<sup>®</sup> ou acrílico, com volume interno variável de 0,5 a 2,0 mL. Nessa câmara de mistura ocorre a maior parte dos procedimentos analíticos, como por exemplo, a adição, homogeneização, pré-tratamento, reações, acondicionamento dos fluidos, preparo de soluções de calibração, detecção do analito, etc. A eficiente

mistura dos fluidos pode ser alcançada pela utilização de uma pequena barra magnética no interior da câmara, sendo o movimento da barra magnética estimulado pelo campo gerado pelo acionamento de um agitador magnético (**figura 1.3d**);

- Sistema de detecção: o dispositivo empregado para detecção (**figura 1.3e**) vai depender do método empregado na análise, podendo até, caso necessário, acoplar o detector à câmara;

- Sistema de controle: todo o controle do sistema é realizado com o auxílio do computador (**figura 1.3f**), garantindo velocidade e precisão nas análises. Para o controle das válvulas é utilizado um acionador de válvulas (**figura 1.3g**).



**Figura 1.3** – Esquema ilustrativo dos principais componentes do FBA. (a) bomba peristáltica, (b) câmara de mistura, (c) válvulas solenoides, (d) agitador magnético, (e) sistema de detecção, (f) computador e (g) acionador de válvulas.

A combinação desses acessórios garante características intrínsecas dos analisadores em fluxo (alta velocidade analítica, baixo consumo de amostra e reagentes, baixo custo de montagem e facilidade de automatização) e dos analisadores em batelada (universalidade de

aplicações, robustez e versatilidade) fornecendo ao analisador fluxo-batelada, 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.

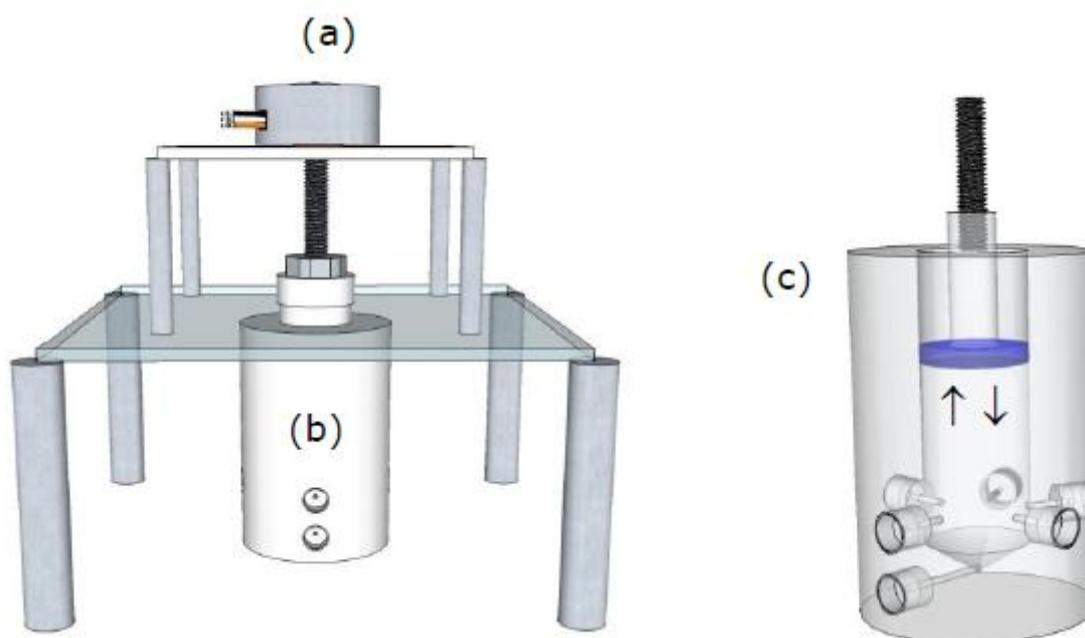
Apesar do FBA ter sido originalmente concebido para realizar titulações, o tempo demonstrou que esse sistema tem um escopo bastante diferente dos anteriormente propostos e que essa estratégia analítica poderia ser aplicada à outros processos analíticos.

Várias metodologias analíticas têm sido abordadas nesses últimos 12 anos<sup>[5]</sup>, explorando as características do FBA.

Estratégias de pré-tratamento de amostras, como extração líquido-líquido<sup>[36]</sup> e digestão<sup>[37]</sup>, análises *screening*<sup>[38]</sup>, titulações<sup>[39]</sup>, adição de padrão<sup>[40]</sup> e abordagens explorando quimiluminescência<sup>[41]</sup>, fluorescência<sup>[36]</sup>, turbidimetria<sup>[42]</sup> e nefelometria<sup>[43]</sup> já foram desenvolvidas. Diversas formas de detecção também podem ser integradas à câmara de mistura, como exemplo, recentemente, Andrade *et al.* sugeriram o uso da *webcam* como forma de detecção no FBA<sup>[44]</sup>.

Variações na configuração básica do FBA têm sido realizadas. ALMEIDA e colaboradores<sup>[45]</sup> desenvolveram um sistema FBA utilizando uma bomba pistão acoplada à câmara de mistura para propulsão dos fluidos (Ver **figura 1.4**). Nesse tipo de dispositivo 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 a câmara de mistura 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 1.4** – Bomba pistão acoplada à câmara de mistura para propulsão dos fluidos em um sistema FBA. (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.

Outra modificação, foi a miniaturização do FBA, usando a técnica de litografia UV em polímero comercial uretana-acrilato para construção da câmara de mistura<sup>[46]</sup>.

Apesar do FBA ser uma técnica relativamente recente, comparado aos outros analisadores em fluxo, suas potencialidades já vêm sendo reconhecidas no meio científico, sendo inclusive mencionadas em livros-texto da área<sup>[1,20]</sup>. Iñón e Tubino<sup>[47]</sup>, chega até a classificar o FBA junto dos outros analisadores, discutidos nas secções anteriores, já reconhecidos pela IUPAC.

#### **1.4 Metodologias analíticas automáticas para determinações que envolvem reações de cinética lenta**

Os recentes avanços na área de instrumentação e das técnicas analíticas possibilitaram a aplicação da análise automática em fluxo a uma

diversidade de matrizes (biológicas, industriais, clínicas, ambientais, geológicas, etc.). Inúmeras dessas determinações envolvem em seu processo uma reação lenta entre o analito e o reagente, dessa forma, um longo período de tempo é necessário para alcançar o equilíbrio químico da reação.

Aqui iremos discutir algumas metodologias automáticas em fluxo desenvolvidas para implementar esses métodos.

Apesar de reações que exigem um longo tempo de residência serem de difícil implementação nos analisadores FIA, alguns trabalhos mostraram ser possível a realização desse procedimento<sup>[8,9]</sup>.

O problema dos analisadores FIA aplicados à reações de cinética lenta é a exigência de uma bobina de reação longa, acarretando uma elevada dispersão o que irá resultar em uma baixa sensibilidade do método empregado.

Alterações no procedimento automático do FIA convencional podem ser realizadas, como por exemplo, a utilização do modo *stopped flow*, mas a taxa de amostragem é drasticamente reduzida, pois o sistema de propulsão é desligado enquanto o desenvolvimento da reação química acontece<sup>[10,48,49]</sup>.

Essa desvantagem pode ser superada através do uso de multicanais em paralelo, onde a mistura de amostra e reagentes são incubadas simultaneamente, para que o equilíbrio da reação seja alcançado antes da captura do sinal analítico<sup>[50-52]</sup>. Para este fim, uma válvula de distribuição direciona a mistura amostra/reagentes armazenando-a em um dos canais em paralelo.

O artifício de aprisionamento de zonas (do inglês: *zone trapping*) também pode ser utilizado para contornar as aparentes dificuldades do FIA nesse tipo de análise<sup>[53]</sup>. Essa técnica envolve a remoção da porção central de uma zona de amostra processada do caminho analítico, para deixá-la em repouso durante um período pré-estabelecido de tempo sob condições definidas, e depois reintroduzi-la no fluxo transportador. Assim, um desenvolvimento mais completo da reação química, com consequente

aumento da sensibilidade, é conseguido sem parar o fluxo, utilizar válvulas multicanaís ou bobinas paralelas.

Semelhantemente, ao FIA, o conceito de multicomutação também pode ser empregado para realizar procedimentos com reações de cinética lenta<sup>[13,54]</sup> com a vantagem de promover uma melhor homogeneização entre a amostra e o reagente.

Sistemas que se mostram mais adequados para executar metodologias que envolvem reações químicas de cinética lenta são os que apresentam fluxo segmentados, destacando-se o MSFA<sup>[1]</sup>. Essa técnica permite armazenar os segmentos da mistura amostra/reagente no caminho reacional, dessa forma o equilíbrio químico é alcançado enquanto a mistura segue para o detector.

A técnica de fluxo monossegmentado também tem sido explorada em combinação aos sistemas SIA. Nessa abordagem a execução do experimento é ainda mais simplificado, sem a necessidade de determinação dos coeficientes de dispersão, uma vez que o monossegmento formado entre duas bolhas de ar pode ser pensado como um pequeno frasco volumétrico em que quantidades precisas de padrão e os reagentes são adicionados<sup>[55,56]</sup>.

Com o intuito de explorar o SIA na determinação de creatinina em amostras de urina humana, Dasgupta et al. propôs um sistema que utilizava quatro detectores em paralelo<sup>[12]</sup>, dessa forma, as misturas reacionais eram armazenadas para posterior detecção.

Reações de cinética lenta também podem ser exploradas no FBA, porém a taxa de amostragem ou a sensibilidade acaba sendo afetada. A princípio, há três formas de executar esse procedimento no fluxo-batelada convencional:

I) Esperar o equilíbrio da reação ocorrer na câmara de mistura – nesse procedimento após a adição e homogeneização dos fluidos, a mistura reacional permaneceria na CM até alcançar o estado de equilíbrio exigido pelo método. Decorrido esse tempo, o conteúdo da CM seria direcionado para detecção e uma nova análise poderia ser executada,

após a limpeza do analisador. No entanto, com esse procedimento, apesar de se obter um máximo do sinal analítico, a frequência de amostragem seria inevitavelmente prejudicada.

II) Armazenar as amostras já preparadas – Nessa montagem operacional as misturas amostra/reagentes geradas no sistema seriam armazenadas em recipientes desvinculados da CM (em béqueres, por exemplo). Com isso, uma alta frequência analítica, mesmo respeitando o tempo da reação química, seria obtida. Essa metodologia, resolveria o problema anterior, ou seja, boa sensibilidade e frequência analítica seria alcançada, no entanto é inviável estocar inúmeras amostras até a reação se completar. Convém ressaltar que, além de precisar de muitos recipientes, após passar o tempo de reação da primeira amostra, as outras viriam em seguida com um intervalo igual ao da preparação das misturas reacionais, ou seja, alguns segundos. Poderia se pensar em acoplar um amostrador ao FBA, no entanto a complexidade de automação, a falta de portabilidade, além do maior custo do aparelho seriam inevitáveis.

III) Explorar gradiente de concentração – A técnica de gerar gradiente de concentração foi descrita por Souza *et al.*<sup>[7]</sup>. Nessa ocasião, o FBA, na sua forma convencional, foi aplicado à determinação espectrofotométrica de albumina e proteínas totais em soro sanguíneo, usando os métodos do biureto e do verde de bromocresol, respectivamente. Nessa metodologia, a frequência analítica não é tão alta como nos sistemas segmentados, além disso outras desvantagens são observadas, como a perda na sensibilidade quando comparado aos sistemas em batelada.

## 1.5 Determinação de boro em plantas

Para demonstrar as potencialidades do sistema proposto, optou-se por aplicá-lo na determinação espectrofotométrica de boro em plantas pelo método da azometina-H. Basicamente, dois motivos determinaram a

escolha: Primeiramente, devido a relevância da determinação desse analito em plantas. O segundo e o mais importante, decorre do próprio método que envolve uma reação de cinética lenta, o que era fundamental para nossas discussões.

Nas seções abaixo, serão discutidos esses pontos com maiores detalhes.

### 1.5.1 Importância da determinação de boro em plantas

Nas últimas décadas, a necessidade de se alcançar uma elevada produtividade agrícola para suprir o rápido crescimento da população mundial, contribuiu para a prática de adubação do solo com fertilizantes químicos. Dentre os diversos nutrientes incorporados ao solo por essa técnica, está o boro, por ser o micronutriente mais móvel no solo, sendo facilmente lixiviado<sup>[57]</sup>.

O boro é um elemento de extrema importância no desenvolvimento das plantas<sup>[57,58]</sup>. Sua faixa de concentração é da ordem de algumas partes por milhão (ppm), com um intervalo de concentração relativamente pequeno entre níveis de deficiência e de toxicidade<sup>[59]</sup>.

O excesso ou deficiência deste micronutriente causa sérios danos às plantas, podendo comprometer gravemente a produtividade de uma cultura. Em excesso, o boro pode causar a morte precoce ou a necrose de partes da planta<sup>[60]</sup>, já a deficiência pode causar a paralisação do crescimento e a morte da extremidade da haste principal da planta. Folhas deformadas, quebradiças e com coloração amarronzada nas extremidades, interrupção no crescimento das raízes, pequeno número de flores e baixa produtividade de frutos, são outros sintomas evidentes<sup>[62]</sup>.

Acontece que esses sintomas, provocados por dosagens desproporcionais de boro, só aparecem quando a planta já se encontra bem danificada, sendo muitas vezes confundidos com os danos causados por insetos ou viroses<sup>[62]</sup>.

Desta forma, análises periódicas do solo e das plantas são fundamentais no controle da produtividade de uma determinada cultura. Para viabilizar o controle contínuo e adequado do teor de boro nessas matrizes um grande número de análises é exigido periodicamente.

### **1.5.2 Métodos clássicos para determinação de boro em plantas**

Dado a importância da determinação do teor de boro para a produtividade de uma cultura, diversos métodos têm sido descritos na literatura, conforme comentado por Carrero<sup>[63]</sup>.

Determinações espectrofotométricas e técnicas mais recentes como a espectroscopia de emissão e absorção atômica com chama, espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, análises de ativação neutrônica, espectrometria de fluorescência de raio-X, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de massas com fonte de plasma, vêm sendo empregadas na determinação desse elemento<sup>[63]</sup>.

No entanto, as metodologias mais utilizadas são as que se baseiam na formação de complexos coloridos, produtos da reação do ácido bórico com um reagente orgânico específico, usando como forma de detecção a espectrofotometria no visível.

A seguir, discutiremos os métodos que mais se destacam para determinação da concentração de boro em plantas.

#### **1.5.2.1 Método do azul de metileno**

O método conhecido por azul de metileno consiste na formação do complexo entre o ácido fluorobórico ( $\text{HBF}_4$ ) e o reagente. O complexo é extraído com um solvente orgânico e então medido a 658 nm. Esse

método possui o inconveniente de utilizar ácidos concentrados, como o ácido fluorídrico e o ácido sulfúrico, que são precursores da espécie  $\text{HBF}_4$ . O método do azul de metileno possui, ainda, como desvantagem, a baixa precisão nas análises<sup>[62]</sup>.

### 1.5.2.2 Método da quinalizarina

O método da quinalizarina para determinação de boro foi inicialmente estudado por Goward e Wiederkehr<sup>[64]</sup>.

Em ácido sulfúrico concentrado a quinalizarina apresenta uma coloração violeta azulada, quando em presença de ácido bórico, mediante aquecimento, ocorre a formação de um complexo azul. O solvente, neste caso o ácido sulfúrico concentrado, funciona como agente desidratante, fazendo com que esta reação se complete.

Esse método apresenta alguns inconvenientes como desvios da lei de Beer, sobreposição dos espectros do reagente e do complexo boro-quinalizarina e a sensibilidade do reagente à água<sup>[64]</sup>. Outra desvantagem do método da quinalizarina é que a sensibilidade deste procedimento pode sofrer alterações, dependendo da concentração do ácido sulfúrico, usado como desidratante. Como interferentes, os íons de metais de transição, os nitratos, o íon fluoreto e os agentes oxidantes são os principais.

Desde 1984 o método da quinalizarina encontra-se descrito na literatura como o método oficial de análise na AOAC *Official Methods of Analysis* para determinação de boro em plantas<sup>[65]</sup>.

### 1.5.2.3 Método da curcumina

Os métodos que usam a curcumina<sup>[66]</sup> como reagente colorimétrico podem ser divididos em dois grupos: o que usa o complexo

rubrocurcumina e o que faz uso do complexo rosocianina. Ambos os complexos apresentam uma coloração vermelha, mas são quimicamente distintos.

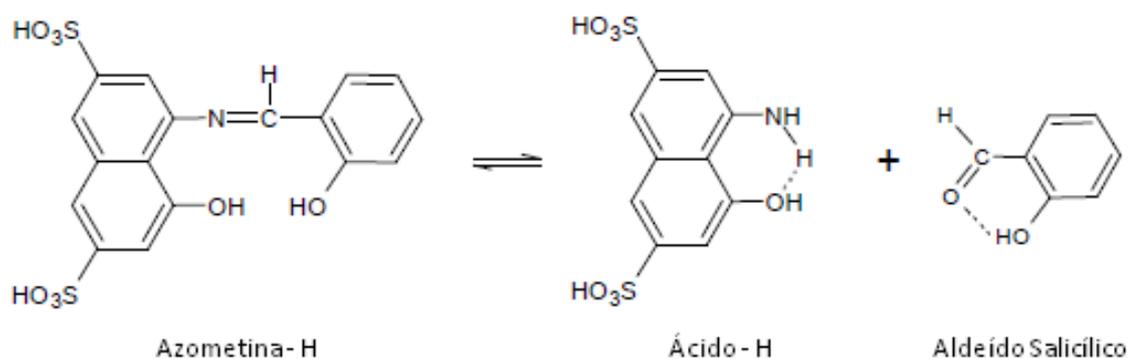
O complexo rubrocurcumina é formado pela reação entre o ácido bórico, ácido oxálico e a curcumina, em ácido acético. Este complexo é extremamente sensível à umidade, gerando uma baixa reprodutibilidade do método.

Já a resocianina é formada em solução fortemente ácida e praticamente isenta de água. Este complexo é mais estável que o anterior e apresenta uma alta absorvidade molar, aproximadamente duas vezes maior que o complexo rubrocurcumina, tornando assim o mais adequado, entre os dois, à análise de boro em plantas<sup>[67]</sup>.

#### 1.5.2.4 Método da azometina-H

Azometina-H foi primeiramente sugerido por Capelle em 1961<sup>[68]</sup> e tem sido o reagente mais utilizado para determinação de boro em águas naturais, de solos e de plantas<sup>[69]</sup>. O aspecto que contribui para essa preferência na utilização da azometina-H está no meio reacional aquoso, que é mais simples e mais sensível, quando comparado a outros métodos colorimétricos<sup>[70]</sup>. Além disso, não sofre interferência da maioria dos íons presentes nas concentrações usuais em extratos de solos e de plantas<sup>[71]</sup>.

O reagente azometina-H é o produto da condensação entre o ácido 4-amino-5-hidroxi-2,7-naftalenodissulfônico (ácido H) e o aldeído salicílico. Em solução aquosa a azometina-H se apresenta com uma coloração amarelada e se dissocia como mostrado na **figura 1.5**.



**Figura 1.5** – Reação de dissociação da azometina-H.

Nesse equilíbrio, o ácido bórico age como catalisador, acelerando a reação de condensação, ou seja, na presença de ácido bórico o equilíbrio é deslocado para a esquerda, aumentando a concentração de azometina-H, conseqüentemente, a solução fica com um amarelo mais intenso. Resumindo, a intensidade da cor aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração de boro na amostra e apresenta o máximo de absorção a 420 nm.

Outros reagentes têm sido estudados e propostos para serem utilizados na determinação espectrofotométrica de boro, porém, devido às condições experimentais serem de difícil implementação, exaustivas e lentas, além de sofrerem a ação de um número maior de interferentes, esses métodos não tiveram grande aceitação nos laboratórios<sup>[72-74]</sup>.

### 1.5.3 Metodologias analíticas automáticas em fluxo para determinação de boro em plantas pelo método da azometina-H

Determinações analíticas, realizadas através de metodologias clássicas, de uma forma geral, apresentam alguns inconvenientes, como:

- manuseio constante de recipientes para troca de amostras e de soluções padrão, o que inibe o analista de trabalhar com substâncias tóxicas, radioativas e explosivas;

- baixa velocidade analítica, por demandar um tempo relativamente longo para executar todos os procedimentos da análise;
- o elevado consumo de reagentes, gerando, conseqüentemente, uma elevada quantidade de resíduos prejudiciais ao meio ambiente;
- execução cansativa e laboriosa, necessitando de um alto esforço humano;
- elevado custo por análise, devido ao grande consumo de reagentes.

Esses pontos tornam-se ainda mais preocupantes quando a determinação em interesse é uma análise de rotina, como a determinação do boro em plantas.

Diante disso, a determinação espectrofotométrica de boro em plantas tem sido bastante explorada nos analisadores automáticos. Várias metodologias automáticas em fluxo contínuo foram propostas, principalmente, aplicadas ao método da azometina-H. Essa preferência pela automação do método da azometina-H, em detrimento dos outros, deve-se às características experimentais da reação desse.

Reagentes como a quinalizarina e carmina exigem a utilização de ácido sulfúrico concentrado e o método da curcumina necessita da evaporação à secura e extração do resíduo, limitando ou dificultando a automação do processo<sup>[67]</sup>.

O primeiro estudo para automatização do procedimento de determinação de boro em plantas, usando o reagente colorimétrico azometina-H, foi realizado por Basson e colaboradores em 1969<sup>[75]</sup>. A metodologia foi descrita utilizando um *AutoAnalyzer Technicon* padrão. Nesse trabalho, os autores, além de estudarem a especificidade dos reagentes, analisaram, a interferência de vários íons. Em 1974, também em um *AutoAnalyzer*, agora empregando fluxo segmentado, os autores do trabalho anteriormente citado, propuseram uma nova metodologia<sup>[76]</sup>.

Posteriormente, Zagatto *et al*<sup>[8]</sup> desenvolveram um sistema em que a amostra era injetada com o uso de um injetor proporcional. Entretanto, esse método, devido à dispersão, apresentou baixa sensibilidade. Anos depois, o mesmo autor desenvolveu um novo sistema<sup>[10]</sup> que utilizava a

técnica de *stopped-flow*, minimizando alguns inconvenientes do sistema anterior. Nessa metodologia, em específico, um comutador foi utilizado para que a bomba peristáltica pudesse trabalhar continuamente enquanto a amostra estivesse parada na cela de fluxo. Dessa forma, uma melhor sensibilidade foi alcançada.

Como trabalho de dissertação de mestrado<sup>[14,67]</sup>, Mônica Ferreira, aplicou o sistema segmentado por bolhas de ar, o MSFA à análise de boro. Para melhorar a agitação, empregou-se uma microcâmara, onde a amostra, reagente e tampão eram misturados e expulsos continuamente para preencherem uma alça de amostragem. Esse sistema trouxe inúmeras vantagens quando comparado aos anteriores.

A inserção da amostra entre bolhas minimiza a dispersão, dessa forma, as repetições nas injeções podem ser realizadas em um curto intervalo de tempo, mudando apenas a posição do injetor proporcional, e um ganho na sensibilidade também pode ser evidenciado.

Um sistema em fluxo, baseado em multicomutação e explorando a técnica de *multizone trapping* também foi desenvolvido<sup>[13]</sup>. Com a configuração apresentada, o sistema, composto de cinco válvulas solenoides *three-way* e uma de *four-way*, permitiu que três zonas de amostras pudessem ser armazenadas, sequencialmente, nas bobinas, para alcançar o equilíbrio químico da reação. Apesar de três bobinas de reação terem sido utilizadas, uma baixa velocidade de análise foi obtida (apenas 35 determinações por hora).

Em geral, todos os sistemas, anteriormente referidos, quando comparados ao analisador fluxo-batelada, apresentam os seguintes inconvenientes:

- mistura ineficiente entre amostra e reagentes;
- necessidade de fluido carregador;
- dificuldade de produzir as soluções de calibração *in-line*;
- baixa versatilidade e robustez.

**Capítulo 2**  
**Experimental**

## 2.1 Reagentes, soluções e amostras

Para realização de todo o processo analítico utilizou-se água previamente destilada e deionizada, apresentando condutividade maior ou igual a  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  (sistema de deionização Milli-Q Plus Ultra-Pure Water System–Millipore). Os reagentes usados foram todos de grau analítico.

As soluções, incluindo as amostras e padrões, foram preparadas e armazenadas em frascos de polietileno de alta densidade. Todas as soluções foram preparadas anteriormente às análises.

### 2.1.1 Preparação dos reagentes e soluções

Solução estoque de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  de boro foi preparada dissolvendo-se  $0,0574 \text{ g}$  de ácido bórico (Synth) em água. A solução resultante foi aferida, com água deionizada, a um litro.

Para o método de referência (método clássico), as soluções padrão, de concentrações entre  $0,10 \text{ mg L}^{-1}$  a  $1,00 \text{ mg L}^{-1}$  de boro, foram obtidas a partir de diluições adequadas da solução estoque. Para o sistema proposto, as soluções padrão foram preparadas dentro da câmara de mistura, a partir de uma solução de trabalho de  $3,00 \text{ mg L}^{-1}$  de boro obtida por diluição apropriada da solução estoque.

A solução do reagente azometina-H (Merck) foi preparada a partir da dissolução, sob agitação, de  $0,9000 \text{ g}$  desse sal e  $2,0000 \text{ g}$  de ácido ascórbico em água. Após a completa homogeneização da mistura, a solução resultante foi aferida a  $100,0 \text{ mL}$ .

Como já demonstrado em outros trabalhos<sup>[74]</sup> a reação do boro com azometina-H é susceptível a interferências de outros elementos e requer um meio tamponado. Dessa forma, neste trabalho utilizou-se, conforme indicado<sup>[67]</sup>, uma solução tampão contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA).

A solução tampão-mascarante foi preparada por dissolução de 14,00 g de acetato de amônio (Vetec), 10,00 g de acetato de potássio (Vetec), 4,00 g de ácido nitrilotriacético (Synth) e 10,00 g de EDTA (Vetec) em água, após a homogeneização o volume foi completado à 1 L. Em seguida, o pH dessa solução foi ajustado a 8,2 por adição de ácido acético glacial (Synth).

### 2.1.2 Preparação das amostras

As amostras de plantas, mais precisamente alface, foram adquiridas em supermercados da cidade de João Pessoa-PB.

Folhas dos alfaces foram colocados em cadinhos de porcelana e levadas ao aquecimento (500 °C) numa mufla, durante 3 horas. Em seguida, as amostras calcinadas foram retiradas e deixadas para esfriarem à temperatura ambiente no dessecador. 1,0000 g, das cinzas resultantes de cada amostra, foi pesado e dissolvido em 50,0 mL de uma solução de ácido nítrico 10% (v/v). A mistura obtida foi filtrada, transferida para um balão volumétrico de 100,0 mL cujo volume foi aferido com água deionizada.

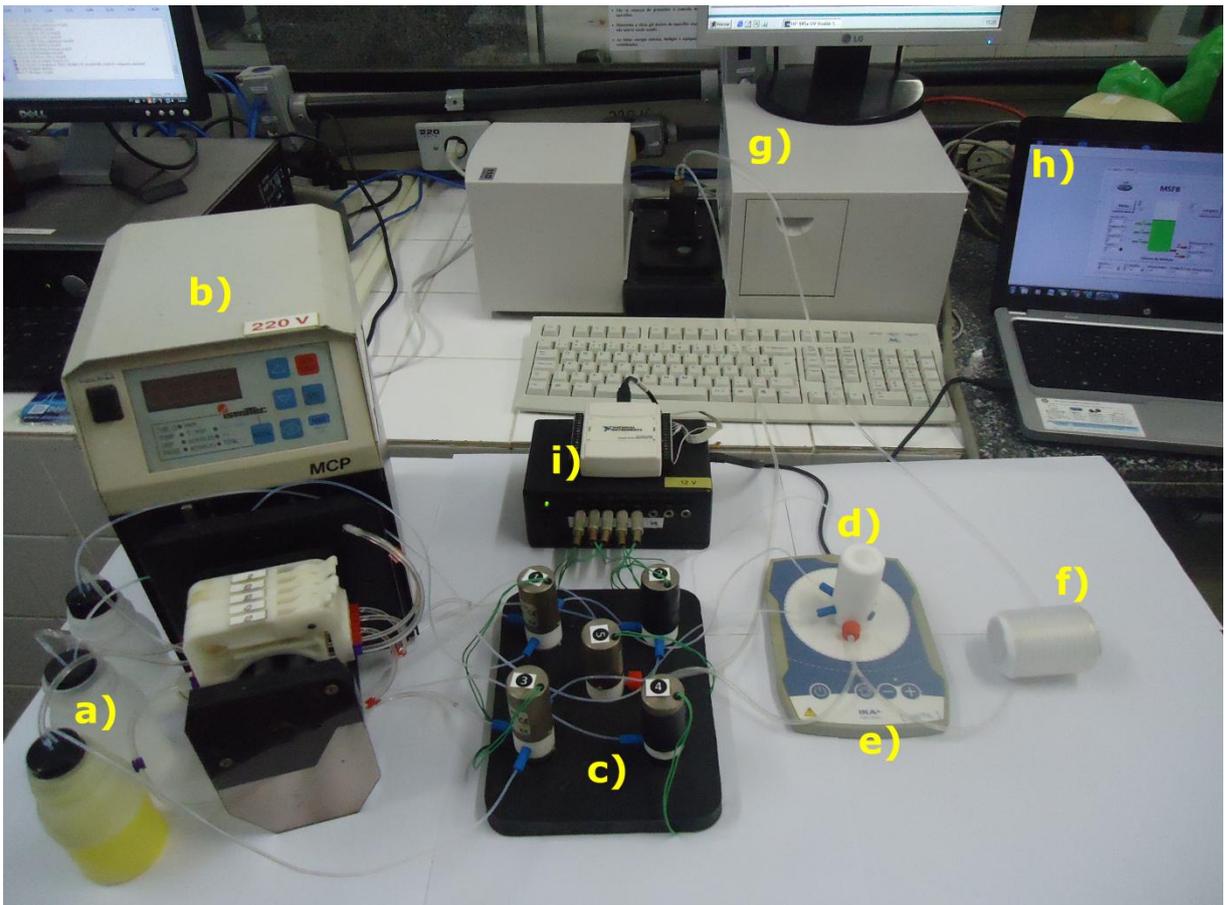
## 2.2 Sistema fluxo-batelada monossegmentado

Na construção do sistema fluxo-batelada monossegmentado para determinação de boro em extrato de plantas foram utilizados:

- uma câmara de mistura;
- um agitador magnético;
- uma bomba peristáltica;
- tubos de bombeamento, transmissão e armazenamento dos fluidos;
- cinco válvulas solenoides;

- um acionador de válvulas *lab made*;
- uma interface;
- um microcomputador;
- um espectrofotômetro UV-Vis.

Na **figura 2.1** é mostrada uma fotografia do sistema com as indicações dos seus componentes, que serão especificados e comentados nos tópicos seguintes.



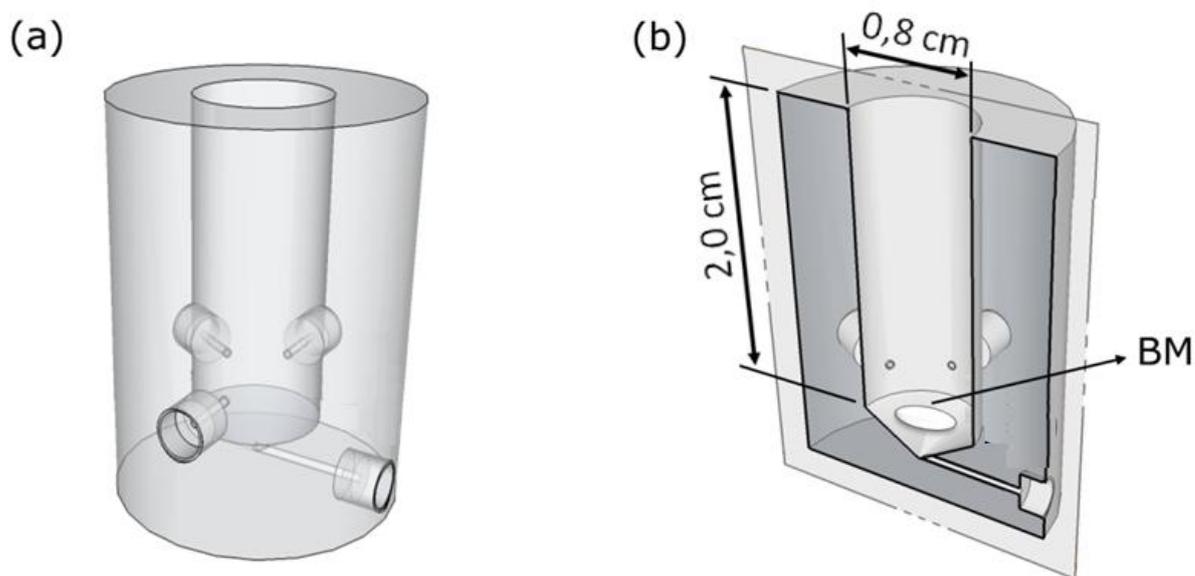
**Figura 2.1** – Fotografia do MSFB. (a) recipientes dos fluidos, (b) bomba peristáltica, (c) válvulas solenoides, (d) câmara de mistura, (e) agitador magnético, (f) bobina de armazenamento, (g) espectrofotômetro UV-Vis, (h) notebook e (i) acionador de válvulas e interface.

### 2.2.1 Câmara de mistura

Para efetuar uma homogeneização mais eficiente entre o reagente e a amostra, além de preparar as soluções padrão, o MSFB utiliza uma câmara de mistura.

A câmara é constituída por um cilindro de PTFE (politetrafluoretileno, comercialmente conhecido como Teflon<sup>®</sup>) contendo três canais de entrada e um canal de saída, com um volume interno de aproximadamente 1 mL, **figura 2.2.**

No seu interior foi posto uma pequena barra magnética (BM), revestida de Teflon<sup>®</sup>, empregada para promover uma constante homogeneização das soluções, a partir do acionamento do agitador magnético.



**Figura 2.2** – Ilustração tridimensional da câmara de mistura empregada. (a) Vista frontal e (b) corte lateral.

### 2.2.2 Agitador magnético

Para promover a rotação da barra magnética, presente no interior da câmara de mistura, foi utilizado um agitador magnético da *Lab Disc*, modelo *White*.

### 2.2.3 Bomba peristáltica

Uma bomba peristáltica (**figura 2.3**) Ismatec<sup>®</sup>, modelo IPC, equipada com 8 canais e 6 roletes, foi utilizada para propulsão dos fluidos ou ar por intermédio dos tubos de bombeamento.



**Figura 2.3** - Fotografia de uma bomba peristáltica.

Durante a análise das amostras todas as adições das soluções utilizaram a bomba peristáltica com vazão de  $151,5 \pm 1,6 \mu\text{L s}^{-1}$  ( $n = 20$ ) em todos os canais. É importante ressaltar, que a vazão dos fluidos é ajustada quando menores concentrações das soluções padrão são requeridas, para garantir a adição de pequenos volumes da solução de trabalho com precisão.

### 2.2.4 Tubos de bombeamento, transmissão e armazenamento dos fluidos

Para bombeamento dos fluidos sempre foram empregados tubos de Tygon<sup>®</sup>, com diâmetro interno de 1,14 mm. Para o transporte do reagente, tampão, amostras/padrão, foi utilizado tubos de Teflon<sup>®</sup> com 0,8 mm de diâmetro interno. Para o armazenamento dos segmentos uma bobina foi confeccionada com tubo de Teflon<sup>®</sup> de 2 mm de diâmetro interno e 240 cm de comprimento.

### 2.2.5 Válvulas solenoides

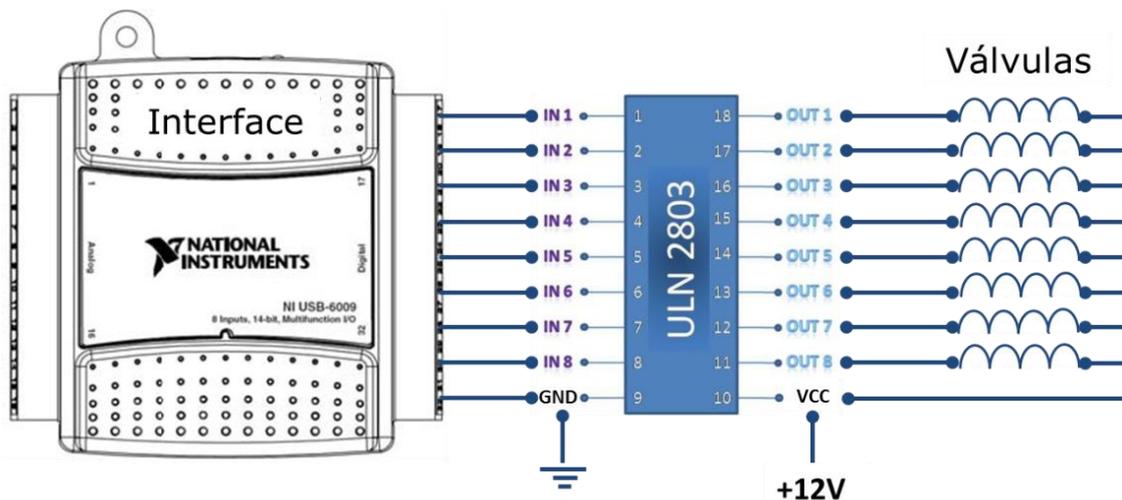
Na construção do sistema proposto cinco válvulas solenoides *three-way* da Cole Parmer<sup>®</sup> (modelo RZ 01540-11) (**figura 2.4**), foram empregadas para direcionamento dos fluidos. Três dessas válvulas foram utilizadas para adição do reagente, tampão e amostra/padrão, uma para a formação do monossegmento e outra para descarte. Essas válvulas solenoides foram controladas por um microcomputador, utilizando um acionador de válvulas combinado a uma interface de controle. O acionamento pode ser simultâneo ou sequencial, dependendo do tipo de análise.



**Figura 2.4** – Fotografia de uma válvula solenoide de três vias.

## 2.2.6 Acionador de válvulas

Um acionador de válvulas foi construído no laboratório para controlar a abertura e o fechamento das válvulas solenoides. O acionador é baseado em um circuito integrado ULN2803, fabricado pela Toshiba, que é um arranjo de oito transistores do tipo *Darlington*, apropriados para suportar alta tensão e corrente. O uso desse dispositivo possibilita o controle simultâneo, ou independente, de até 8 portas de saída. Na **figura 2.5** é apresentado o diagrama esquemático da ligação entre o acionador de válvulas e a interface NI USB-6009, da *National Instruments*®.



**Figura 2.5** – Diagrama esquemático da ligação entre o acionador de válvulas e a interface NI USB-6009.

As válvulas solenoides são alimentadas com uma tensão de 12 V, e são acionadas quando o ULN2803 recebe uma tensão superior a 3,8 V em suas portas de entrada, gerando uma corrente de 150 mA nas portas de saída, onde estão conectadas as válvulas. O comando de acionamento é realizado via notebook, que utiliza uma interface de controle NI USB-6009, a qual é conectada às portas de entrada do ULN2803 presente no acionador de válvulas.

Dessa forma, todas as válvulas solenoides são acionadas a partir do nível lógico (1 ou 0) de um dos *bits* enviados pelas linhas de comunicação da porta digital de saída da interface de controle.

### 2.2.7 Microcomputador

Um notebook com processador Intel® Pentium® Dual-Core™, HD de 320 GB e memória de 2 GB (sistema operacional Windows 7®) foi utilizado para controle e gerenciamento do sistema.

### 2.2.8 Sistema de detecção

Para a realização das medidas de absorbância foi empregado um espectrofotômetro UV-Vis *Hewlett-Packard* (HP) com arranjo de diodos, modelo 8453. Para o método de referência foi utilizada uma cubeta de quartzo com um volume interno de aproximadamente 4,0 mL e um caminho ótico de 10 mm. Para a realização da metodologia automática proposta, uma cela de fluxo de quartzo (*Hellma QS 1000*) com 10 mm de caminho ótico foi empregada. Para ambos os procedimentos as medidas foram realizadas em 420 nm.

## 2.3 Programa operacional do MSFB

Para controle do sistema automático desenvolvido neste trabalho escreveu-se, em linguagem gráfica, utilizando o software *LabVIEW* 5.1 da *National Instruments* um programa de gerenciamento. O programa desenvolvido permite o usuário realizar o controle das etapas da análise, incluindo o tempo de abertura das válvulas dos reagentes, amostra e descarte, formação do monossegmento, etc.

Os tempos de abertura das válvulas são proporcionais aos volumes adicionados na câmara de mistura. Para isso, é realizado um estudo prévio de calibração, discutido na secção seguinte.

Durante o procedimento analítico, o usuário pode acompanhar, em tempo real, os processos realizados durante a execução da análise, observando a interface do programa desenvolvido (**figura 2.6**).



**Figura 2.6** – Interface do programa de controle do MSFB.

O tempo de abertura das válvulas da amostra ( $V_A$ ), do reagente ( $V_R$ ), do tampão ( $V_T$ ), do monossegmento ( $V_M$ ) e do descarte ( $V_D$ ) são configurados em suas respectivas caixas de controle digital. O analista pode implementar técnicas como a curva analítica, bastando apenas configurar os parâmetros de tempo de abertura das válvulas de acordo com o procedimento desejado.

Na interface do programa de controle também é possível controlar o número de replicatas, a rotação da bomba peristáltica e o número de limpezas desejadas.

Para executar o procedimento de limpeza da câmara de mistura, o operador deve especificar o tempo de acionamento da válvula  $V_T$  e o número de ciclos de limpeza em suas respectivas caixas de controle e só depois acionar o botão “Limpeza”.

## 2.4 Ajuste dos parâmetros do MSFB

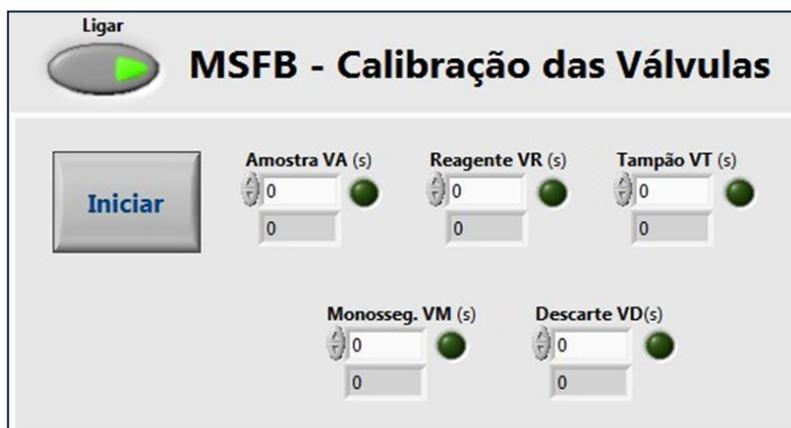
Após a montagem física do sistema fluxo-batelada monossegmentado, foi realizado um estudo visando obter os parâmetros de operação para a determinação do teor de boro em plantas.

### 2.4.1 Precisão das válvulas solenoides

Como todos os volumes adicionados ou aspirados no MSFB são realizados pelo acionamento das válvulas solenoides, faz-se necessário descobrir a relação de tempo de acionamento com o volume adicionado ou aspirado envolvido no processo, ou seja, determinar a vazão em cada linha de fluxo, para depois definir os tempos de acionamento.

A vazão em cada linha de fluxo foi determinada pelos volumes de água coletados e medidos em massa numa balança analítica (Scientech modelo SA210) segundo os tempos de abertura de válvula de 1 a 7 segundos.

O programa de gerenciamento do MSFB desenvolvido apresenta uma interface (**figura 2.7**) que possibilita que este procedimento seja realizado com maior facilidade. Na interface do programa é possível configurar o tempo de abertura e o acionamento de cada válvula isoladamente.



**Figura 2.7** – Interface do programa para realizar o estudo de calibração das válvulas solenoides do MSFB.

### 2.4.2 Etapa de limpeza

Nos estudos preliminares, também foi analisado a quantidade de limpezas necessárias para prevenir possíveis intercontaminações durante o processo de análise. Esse estudo foi realizado empregando a reação da azometina-H com o padrão de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de boro.

### 2.4.3 Comprimento da bobina de armazenamento

O tamanho da bobina de armazenamento foi fundamentado no estudo cinético da reação. Dessa forma, respeita-se o equilíbrio químico da reação, que é lenta, e uma máxima sensibilidade é alcançada.

Para facilitar a realização desse estudo, utilizamos o programa desenvolvido em ambiente *LabView*, onde é possível controlar o intervalo de tempo entre as medidas de absorbância e o número de espectros requeridos.

A interface para o gerenciamento do programa é apresentada na figura abaixo.



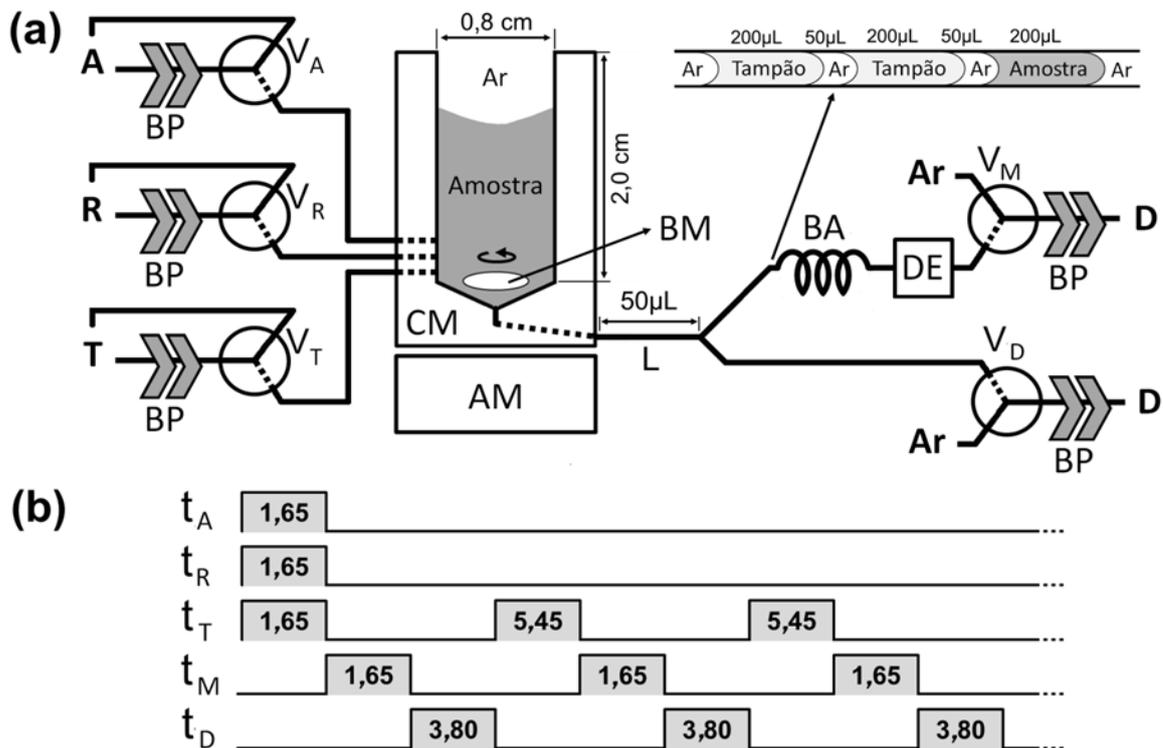
**Figura 2.8** – Interface do programa para realizar o estudo cinético do MSFB.

## 2.5 Procedimentos do MSFB para determinação do teor de boro

A **figura 2.9a** representa o diagrama esquemático do MSFB utilizado para determinar teores de boro em extratos de plantas pelo método da azometina-H. A configuração física do sistema permaneceu inalterada durante todos os procedimentos analíticos.

Antes de iniciar qualquer procedimento analítico, é necessário uma etapa de preenchimento dos canais. As soluções devem ser bombeadas e recirculadas aos seus respectivos reservatórios. Para isso, as válvulas  $V_A$ ,  $V_R$ ,  $V_T$  são simultaneamente acionadas durante 1,50 s e as soluções utilizadas na determinação (amostra ou solução padrão de trabalho, reagente e tampão) são bombeadas em direção à câmara de mistura (CM) preenchendo todos os canais localizados entre as válvulas e a CM.

Em seguida, a válvula de formação do monossegmento ( $V_M$ ) é acionada para garantir o descarte da solução presente na CM e preencher toda a bobina de armazenamento (BA). Esse procedimento de enchimento do caminho reacional garante uma aspiração mais constante, conseqüentemente, o volume dos monossegmentos se reproduz.



**Figura 2.9** – a) Diagrama esquemático MSFB. Bomba peristáltica (BP), válvulas solenoides (V), câmara de mistura (CM), barra magnética (BM), agitador magnético (AM), "loop" de ar (L), bobina de armazenamento (BA), detector espectrofotométrico (DE), amostra (A), reagente (R), tampão (T), descarte (D) e monossegmento (M). b) Diagrama dos tempos (em segundos) usados para as análises das amostras. Onde:  $t_A$ ,  $t_R$ ,  $t_T$ ,  $t_M$  e  $t_D$  são os tempos de abertura das válvulas  $V_A$ ,  $V_R$ ,  $V_T$ ,  $V_M$  e  $V_D$ , respectivamente.

As adições da amostra ou solução padrão de trabalho (A), reagente (R) e tampão (T) na CM foram realizadas pelo acionamento das válvulas  $V_A$ ,  $V_R$  e  $V_T$ , respectivamente. A homogeneização das soluções na CM é constantemente realizada por uma barra magnética (BM), sob a ação do agitador magnético (AM).

Para preparação *in-line* do branco na CM, as válvulas  $V_R$  e  $V_T$  são simultaneamente acionadas por 1,65 s e 3,30 s, respectivamente. A preparação *in-line* das soluções de calibração (0,10-1,00 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico) na CM foram realizadas utilizando uma solução de trabalho de 3,00 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico, que foi preparada por diluição adequada de uma solução estoque de 10,00 mg L<sup>-1</sup>. Nestas preparações, as válvulas  $V_A$ ,

$V_R$  e  $V_T$  são simultaneamente acionadas e a solução padrão de trabalho, reagente e tampão são enviados para a CM.

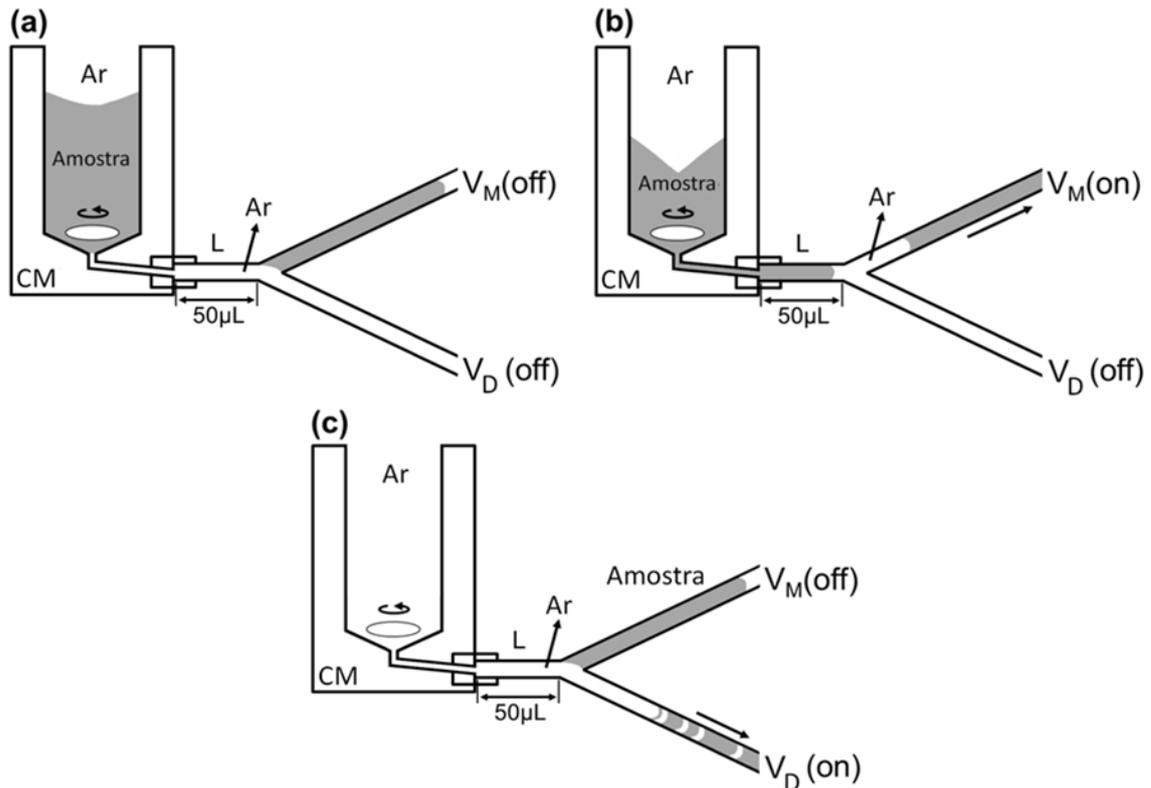
A válvula  $V_R$  é acionada por 1,65 s e o acionamento das válvulas  $V_A$  e  $V_T$  variam de acordo com a concentração da solução padrão a ser preparada.

O procedimento para determinação da amostra é semelhante à preparação das soluções de calibração. A diferença é que a amostra é usada em vez da solução de trabalho e os tempos de acionamento da válvula  $V_A$  e  $V_T$  se mantêm constante. O diagrama de tempo para a análise da amostra é mostrado na **figura 2.9b**.

Para a formação do monossegmento referente ao branco, solução de calibração ou amostra, a válvula  $V_M$  é acionada por 1,65 s. Esse tempo promove a aspiração de 50  $\mu\text{L}$  de ar presente no "loop" (L) mais 200  $\mu\text{L}$  de fluido (presente na CM) para a BA. Em seguida, ocorre o acionamento da válvula  $V_D$  por 3,80 s, que promove o descarte do fluido remanescente na CM e preenchimento de L com ar.

Deve-se atentar que o tempo de acionamento da válvula  $V_D$  é extrapolado, no sentido que aspira mais conteúdo que o volume remanescente na CM, logo uma nova bolha de ar é armazenada em L a cada novo monossegmento formado.

Na **figura 2.10** são apresentadas as fases de formação do monossegmento da amostra.



**Figura 2.10** – Estágios de formação do monossegmento (a) – (c).

A **figura 2.10a** ilustra a etapa de adição e homogeneização dos fluidos (amostra, reagente e tampão) na CM. Na **figura 2.10b** é mostrada a formação inicial do monossegmento da amostra, o que ocorre após o acionamento da válvula  $V_M$ . A etapa de formação do monossegmento da amostra (**figura 2.10c**) termina quando  $50\ \mu\text{L}$  de ar, mais  $200\ \mu\text{L}$  de amostra é aspirado para a bobina de armazenamento (BA). Logo em seguida, a válvula  $V_D$  é acionada e o fluido remanescente na CM é descartado.

A etapa de limpeza da CM e da BA é realizada adicionando tampão na CM, através do acionando da válvula  $V_T$  por 5,45 s. Logo depois, a válvula  $V_M$  é acionada por 1,65 s aspirando  $50\ \mu\text{L}$  de ar (presente em L) e  $200\ \mu\text{L}$  de tampão (presente no CM) para a BA, promovendo a formação do monossegmento ar-tampão na BA. O excesso de tampão na CM é descartado e o "loop" (L) é novamente preenchido com ar, através do acionamento da válvula  $V_D$  por 3,80 s. A etapa de limpeza é realizada

duas vezes, a fim de eliminar o risco de intercontaminação dos monossegmentos.

A medição do sinal analítico é executada quando o monossegmento da amostra/padrão ou branco atinge a célula de fluxo, preenchendo o seu percurso óptico com 200  $\mu\text{L}$  de fluido. Neste momento, a válvula  $V_M$  está desligada, parando, conseqüentemente, o fluxo no interior da BA e mantendo as bolhas de ar completamente fora do caminho óptico. Dessa forma, não é necessário remover as bolhas de ar, pois elas não irão interferir nas medições de absorbância.

Finalmente, a absorbância em 420 nm é registrada em estado estacionário do monossegmento. É importante salientar, que durante a medição de qualquer sinal analítico um novo monossegmento está sendo preparado concomitantemente dentro da CM. Assim, nem a taxa de amostragem, nem a sensibilidade são prejudicadas.

A válvula  $V_M$  é controlada pelo tempo de 1,65 s. Este valor representa o tempo necessário para um monossegmento (200  $\mu\text{L}$  de fluido e 50  $\mu\text{L}$  de ar) ser aspirado para a BA. Dado que a vazão dos fluidos e o volume entre a CM e a BA são constantes, o tempo entre a adição na CM e a captura do sinal também é constante. O sincronismo entre os tempos de acionamento das válvulas  $V_M$  e  $V_D$ , permite que a absorbância seja sempre medida em fluxo parado (no presente trabalho, 5 minutos após a mistura) e sem interferência da porção de ar do monossegmento. Logo, a utilização de optos no caminho reacional para a detecção dos monossegmentos, normalmente empregada<sup>[77]</sup>, nessa configuração não é necessária, o que simplifica o sistema MSFB.

Vale a pena notar que, quando o número de amostras a serem analisadas termina, vários monossegmentos de limpeza (ar-tampão) são continuamente preparados e adicionados na BA até a medição da última amostra. Este procedimento é importante para manter a BA sempre preenchida, evitando possíveis alterações na taxa de aspiração com conseqüentes perdas no sincronismo de tempo entre as medidas de

absorbância. Entretanto, água destilada também pode ser usada para a preparação dos monossegmentos de limpeza, ao invés da solução tampão.

## 2.6 Método de referência

Como método de referência foi utilizado o método clássico da azometina-H<sup>[68]</sup>, a fim de comparar os resultados analíticos obtidos pela metodologia automática proposta.

A análise de cada amostra foi realizada em quintuplicata e as concentrações foram estimadas a partir da equação obtida da curva analítica, estatisticamente validada.

## 2.7 Procedimentos para avaliação da performance analítica

Neste trabalho, os procedimentos estatísticos usados para a validação dos modelos de calibração e estimativa das figuras de mérito são descritos sucintamente a seguir.

A avaliação estatística do desempenho do sistema proposto (MSFB), em termos da sensibilidade, faixa dinâmica e dos valores de LOD e LOQ, foi realizada envolvendo a determinação do teor de boro em extrato de plantas. Os resultados foram comparados com os obtidos por intermédio de um espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis comercial segundo o método de referência descrito na secção anterior.

Para as determinações foram realizados testes de análise de variância (ANOVA) para validar os modelos lineares baseados no método dos mínimos quadrados (MMQ). Em seguida, foram construídas as curvas analíticas e os testes *F* para falta de ajuste e de significância estatística da regressão foram aplicados aos modelos lineares com base nos resultados da ANOVA. Além disso, foram obtidos os intervalos de confiança em relação aos parâmetros do modelo que foram estimados.

De acordo com a IUPAC, a sensibilidade de calibração de um método instrumental é dada pela inclinação da curva analítica, expressando a capacidade de um instrumento ou de um método, discriminar concentrações de analito com pequenas diferenças na concentração do analito<sup>[78]</sup>.

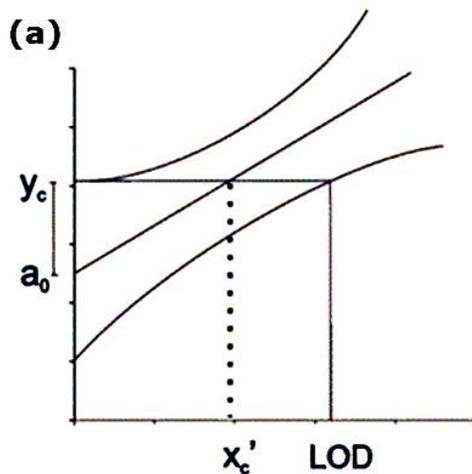
Os limites de detecção (*limit of detection* - LOD) e limites de quantificação (*limit of quantification* - LOQ) são definidos como segue. O LOD corresponde à menor concentração da espécie de interesse (analito) que pode ser detectada pela técnica instrumental utilizada, enquanto o LOQ corresponde à mínima concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de reprodutibilidade das medidas pelo método empregado<sup>[78,79]</sup>.

Existem basicamente duas formas de se estimar o LOD e o LOQ e as suas escolhas, geralmente, devem levar em consideração a técnica analítica utilizada, bem como o grau de confiabilidade estatística necessária. São eles: o método da relação sinal/ruído e o método dos parâmetros da curva analítica<sup>[80]</sup>.

O método da relação sinal/ruído, que utiliza de 20 a 30 medidas do sinal do branco, é amplamente utilizado devido a sua rapidez e simplicidade dos cálculos estatísticos. O método da estimativa do limite de detecção e quantificação baseado em parâmetros da curva analítica apresenta maior confiabilidade estatística e robustez, pois leva em consideração o intervalo de confiança da regressão<sup>[80]</sup>. Neste caso, o LOD e o LOQ são estimados a partir do intervalo de confiança e pode ser medido a 95% de confiança estatística. Tais estimativas foram realizadas por intermédio de uma planilha eletrônica para validação de métodos analíticos univariados, disponível na internet<sup>[81]</sup>.

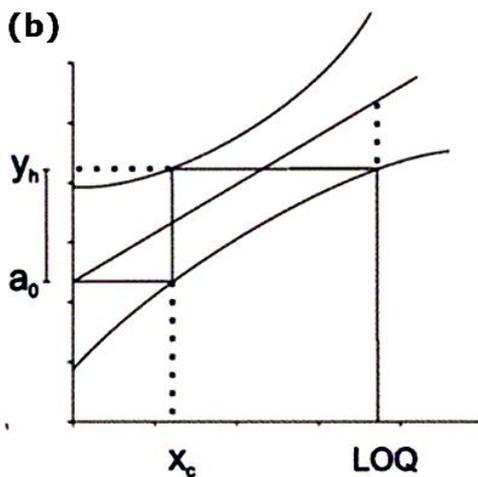
A **figura 2.11** ilustra os parâmetros e equações utilizados para a realização dos cálculos estatísticos para previsão de LOD e LOQ. A estimativa do sinal analítico a partir da equação da regressão apresenta um erro padrão e o produto desse erro pelo valor da distribuição *t* de Student adequado permite calcular o intervalo de confiança da curva

analítica (**figura 2.11a**), que apresenta a forma de duas linhas hiperbólicas acima e abaixo da curva. O intercepto da hipérbole superior, do intervalo de confiança, é denominado  $y_c$  e a sua projeção na hipérbole inferior é uma estimativa da concentração mínima, que pode ser medida com um grau de confiança estatística evidenciado, sendo o limite de detecção do método (LOD). As equações apresentadas (**figura 2.11a**) descrevem os cálculos de  $y_c$  e do limite de detecção.



$$y_c = a_0 + s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$LOD = 2 \cdot \frac{s_y \cdot t}{a_1} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$



$$y_h = a_0 + 2 \cdot s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(x_c - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$x_c = \left(\frac{s_y \cdot t}{a_1}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$LOQ = \left(\frac{y_h - a_0}{a_1}\right) + \left(\frac{s_y \cdot t}{a_1}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

**Figura 2.11** – Curvas analíticas e equações utilizadas nos cálculos de LOD (a) e LOQ (b).

Pelo método dos parâmetros da curva analítica, o limite de quantificação (LOQ) também é determinado da mesma forma de LOD. Como observado na **figura 2.11b**  $x_c$  é o valor da concentração,  $x$ , no ponto onde o valor de  $a_0$  intercepta a reta de regressão e  $y_h$  é o valor da

projeção de  $x_c$  no limite superior. Os cálculos estatísticos de  $y_h$ ,  $x_c$  e LOQ podem ser efetuados pela utilização das equações apresentadas na **figura 2.11b**.

No entanto, o modelo de calibração, somente pode ser usado para estimar a concentração do analito, se for capaz de descrever o comportamento dos valores experimentais de maneira satisfatória. Portanto, o modelo obtido não pode apresentar evidências de falta de ajuste e deve refletir uma regressão estatística significativa. Dessa forma, a validação do modelo de calibração geralmente é realizada por meio de uma ANOVA<sup>[82]</sup>.

A **tabela 2.1** apresenta as equações para ANOVA de dados experimentais adaptados para modelos obtidos pelo método dos mínimos quadrados (MMQ).

**Tabela 2.1** – ANOVA para o ajuste de um modelo pelo MMQ.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (gl)	Média Quadrática (MQ)
<b>Regressão</b>	$\sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	$p - 1$	$SQ_{reg}/(p-1)$
<b>Resíduo</b>	$\sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	$n - p$	$SQ_r/(n-p)$
<b>Falta de Ajuste</b>	$\sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	$m - p$	$SQ_{faj}/(m-p)$
<b>Erro Puro</b>	$\sum \sum [y_{ij} - y_{im}]^2$	$n - m$	$SQ_{ep}/(n-m)$

Onde: índice **i** indica o nível da variável  $x$ ; 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, obtidos pela aplicação do método dos mínimos quadrados, consiste na análise dos resíduos, falta de ajuste e significância estatística da regressão. Na análise de 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 ou estrutura sistemática não descrita pelo modelo. Dessa forma, se os resíduos apresentam algum perfil ou estrutura teremos a presença de uma falta de ajuste apresentada pelo

modelo. Entretanto, se os resíduos se distribuírem aleatoriamente em torno de zero teremos apenas erros aleatórios.

O teste de falta de ajuste compara, para os vários níveis da variável  $x$ , a média quadrática da falta de ajuste ( $MQ_{faj}$ ) com a média quadrática devida ao erro puro ( $MQ_{ep}$ ). Assim, se a razão  $(MQ_{faj})/(MQ_{ep})$  for menor que o valor do ponto de distribuição  $F$ , referentes aos graus de liberdade de  $MQ_{faj}$  e  $MQ_{ep}$  e para um nível de 95% de confiança, temos um modelo sem falta de ajuste. Neste caso, as duas médias quadráticas refletirão apenas os erros aleatórios associados aos dados. Caso contrário, o modelo apresenta falta de ajuste e necessita ser reestimado e revalidado<sup>[79]</sup>.

No teste de significância da regressão, compara-se a razão entre a média quadrática devido à regressão ( $MQ_{reg}$ ) e a média quadrática residual ( $MQ_r$ ) com o valor do ponto da distribuição  $F$  referente aos graus de liberdade de  $MQ_{reg}$  e  $MQ_r$  a um certo nível de confiança estatística. Em geral, emprega-se um nível de 95% de confiança. Se a referida razão for maior que o valor de  $F$  (de pelo menos cinco vezes como recomendado na literatura<sup>[79]</sup>), conclui-se que a regressão é estatisticamente significativa. Do contrário, não se pode admitir a existência de uma relação funcional (linear, quadrática, etc) entre as variáveis que possa ser descrita pelo modelo<sup>[79]</sup>.

**Capítulo 3**  
**Resultados e**  
**Discussão**

Neste capítulo serão discutidos os resultados obtidos para ajuste do sistema MSFB desenvolvido, bem como da performance analítica. O ajuste dos parâmetros do sistema MSFB abordam os estudos de calibração das válvulas, número de limpezas necessárias para evitar a intercontaminação das amostras, o volume dos monossegmentos e o comprimento da bobina de armazenamento dos monossegmentos. Com relação à performance analítica são apresentadas as curvas analíticas do método proposto e de referência com as respectivas validações, para posterior aplicação às amostras reais.

### 3.1 Estudo da precisão das válvulas solenoides

Conforme descrito na **secção 2.4.1**, logo após a montagem do sistema faz-se necessário a realização da calibração das válvulas solenoides para descobrir a relação de tempo de acionamento com o volume adicionado ou aspirado.

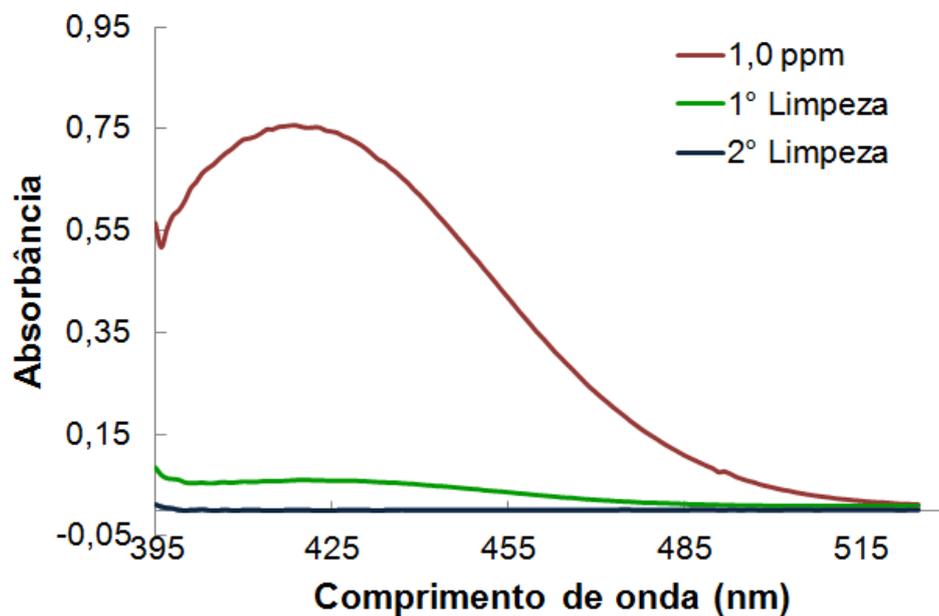
Observando os resultados obtidos nessa etapa, optou-se por trabalhar com uma velocidade rotacional da bomba peristáltica de 125 rpm o equivalente a uma vazão de  $151,5 \pm 1,6 \mu\text{L s}^{-1}$  ( $n=20$ ). Essa vazão foi mantida constante durante as etapas de adição e aspiração dos fluidos, na realização das análises e das limpezas.

Após a realização de uma grande quantidade de análises, recomenda-se calibrações periódicas, devido a problemas relacionados aos desgastes dos tubos de bombeamento. Estes desgastes podem alterar as vazões dos canais, tornando inválida a relação entre tempo de acionamento e adição/aspiração do fluido, o que afeta a exatidão das análises.

### 3.2 Estudo da etapa de limpeza

Outra etapa importante no ajuste de qualquer FBA é determinar a quantidade de limpezas necessárias, de forma a garantir uma mínima contaminação entre as respectivas amostras.

Como pode ser visto na **figura 3.1**, duas limpezas são suficientes para eliminar o risco de intercontaminação dos monossegmentos de amostras.

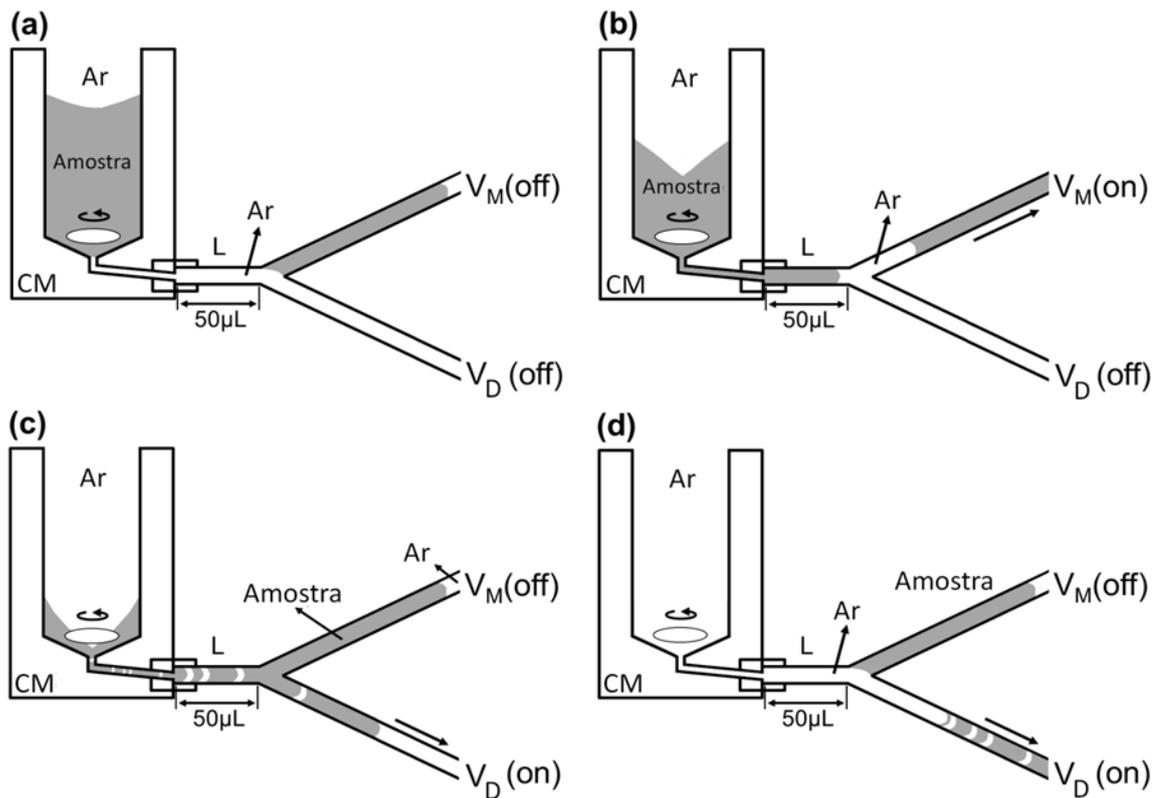


**Figura 3.1** - Variação do sinal espectrofotométrico com a realização de duas limpezas.

Apesar de ter sido observado que duas limpezas seriam suficientes, mesmo utilizando água, durante as análises optou-se por utilizar tampão, evitando assim, a utilização de mais uma válvula solenoide, pois, essa solução já participa do procedimento analítico.

### 3.3 Volume do monossegmento

Na **figura 3.2** são apresentados os estágios de formação dos monossegmentos no MSFB.



**Figura 3.2** – Estágios de formação do monossegmento (a) – (d).

Enquanto ocorre a preparação de outro monossegmento, as válvulas  $V_M$  e  $V_D$  permanecem desativadas ( $off$ ) (**figura 3.2a**).

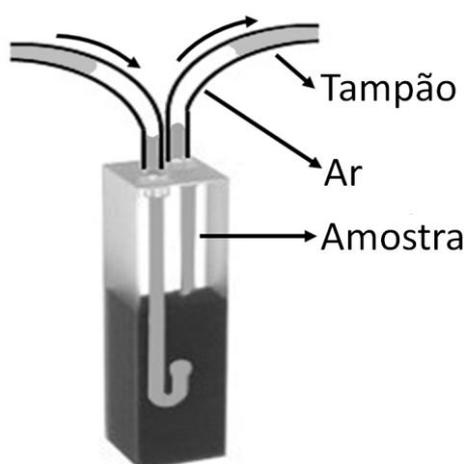
Finalizada a adição dos fluidos, na câmara de mistura, a válvula  $V_M$  é acionada ( $on$ ) aspirando a bolha de ar presente em L e a solução da câmara para a bobina de armazenamento (**figura 3.2b**).

Durante o desenvolvimento do experimental, observou-se que caso todo o volume da câmara de mistura fosse direcionado para a bobina de armazenamento, os monossegmentos saiam "quebrados" além do tamanho da bobina aumentar significativamente.

Tal observação durante a formação dos monossegmentos provém, possivelmente, da agitação contínua dos fluidos pela barra magnética. Como representado na **figura 3.2c**, devido à presença do vórtex, há a possibilidade do ar entrar, antes que todo o volume seja direcionado para a bobina de armazenamento, ocorrendo a quebra dos monossegmentos.

Sendo assim, optamos por direcionar apenas a “frente do segmento” (200  $\mu$ L) para o caminho reacional. O volume de fluido remanescente é então descartado e uma nova bolha de ar é posicionada em L pelo acionamento da válvula  $V_D$  (**figura 3.2d**).

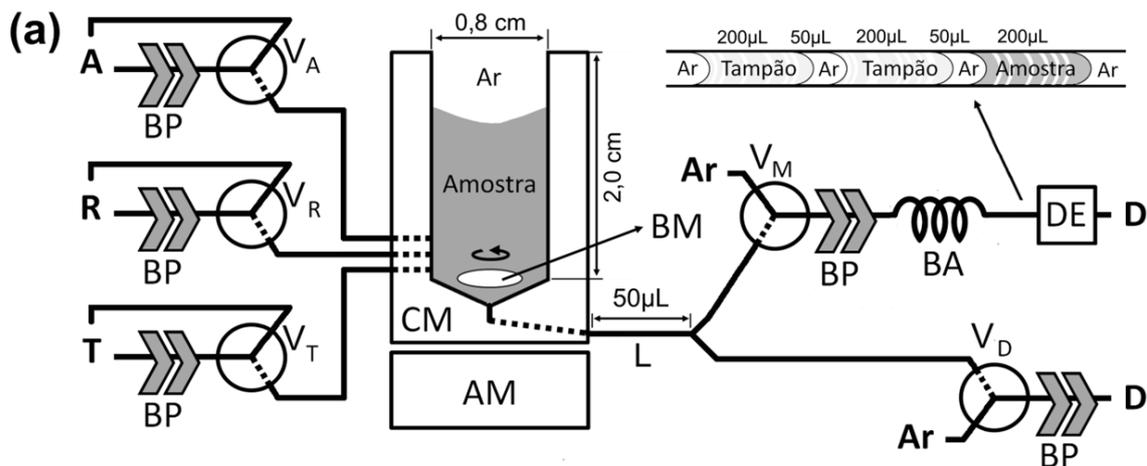
O volume do segmento de amostra, padrão ou tampão, foi definido em 200  $\mu$ L, de forma a garantir o total preenchimento do caminho óptico. Como se observa na **figura 3.3**, o volume selecionado do monossegmento é suficiente para preencher o caminho óptico da cela de fluxo utilizada, permitindo ainda uma quantidade de amostra externa a cubeta, para o caso de ocorrer pequenas variações na aspiração do monossegmento. Dessa forma, o sistema se mostra mais robusto e menos susceptível à captura de sinais analíticos com bolhas no caminho óptico, o que seria indesejável.



**Figura 3.3** – Ilustração da cela de fluxo utilizada preenchida com o monossegmento.

### 3.4 Configurações físicas do MSFB

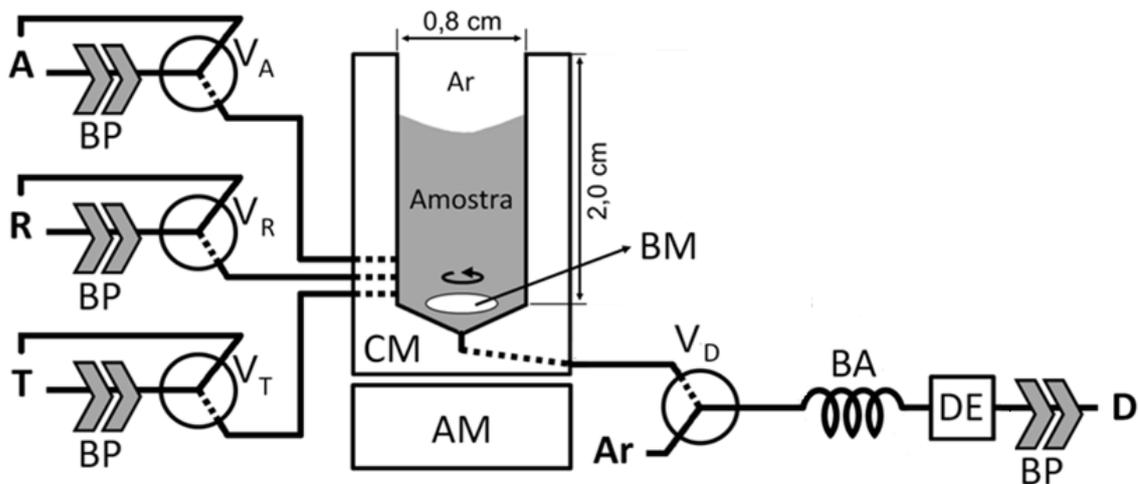
Outro ponto interessante de ser comentado é o posicionamento da bomba peristáltica (ver **figura 3.4**). No decorrer do experimental, observou-se que quando o sistema de propulsão era posto antes da cela de fluxo, os segmentos eram fragmentados, semelhante ao ocorrido na formação dos monossegmentos (secção anterior).



**Figura 3.4** – Diagrama esquemático da configuração com a bomba peristáltica posicionada antes do detector.

Diante do exposto, para garantir a uniformidade dos segmentos, o posicionamento da bomba peristáltica após o detector é uma condição imprescindível. Durante todos os procedimentos analíticos, essa configuração foi obedecida.

Outra configuração física estudada para o MSFB é demonstrada na **figura 3.5**.



**Figura 3.5** – Diagrama esquemático da configuração utilizando apenas uma única linha para armazenamento e descarte dos fluidos.

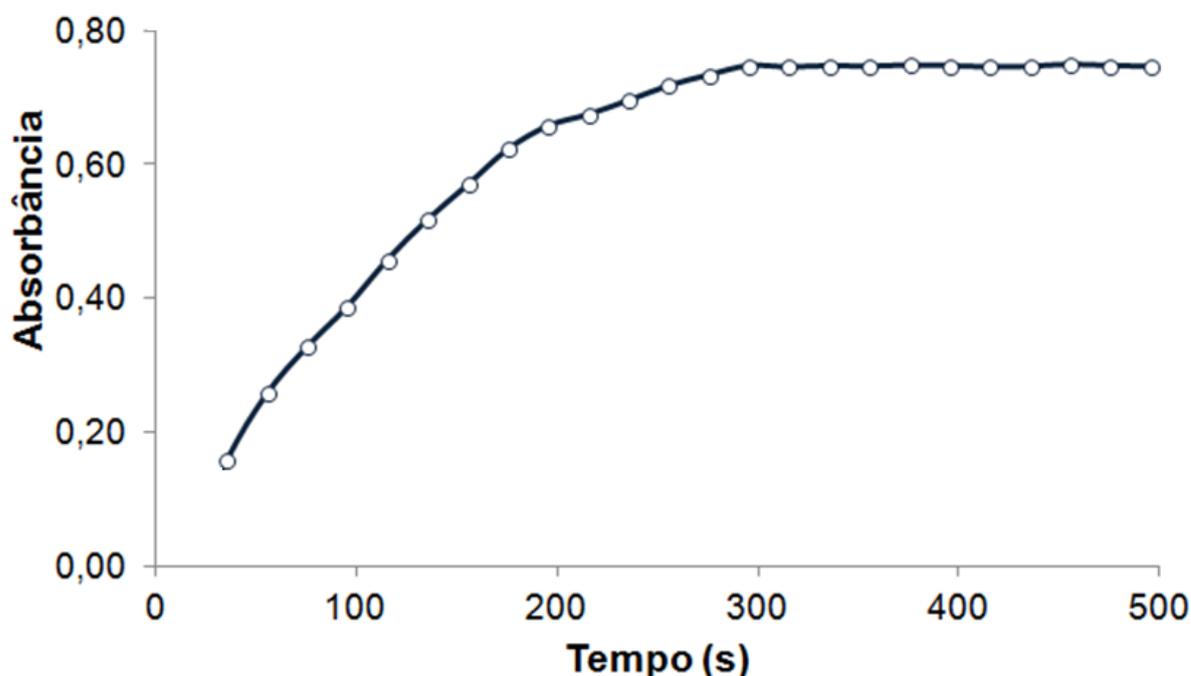
Nessa forma de montagem, todo o volume da câmara de mistura era direcionado para a bobina de armazenamento e em seguida o sinal analítico capturado. O ponto crítico dessa configuração é a reprodutibilidade dos segmentos, pois, conforme demonstrado na **secção 3.3** quando o volume da câmara de mistura é descartado o conteúdo final é variavelmente segmentado, podendo haver a presença de bolha no caminho óptico no momento da detecção. Além disso, durante a preparação da amostra, padrão ou branco a válvula  $V_D$  encontra-se desativada (aspirando ar para a bobina de armazenamento), procedimento que aumenta significativamente o tamanho da bobina de armazenamento.

Optou-se, conforme já descrito na **secção 2.5**, utilizar mais uma válvula solenoide, assim, garantimos a formação reprodutível dos segmentos e a necessidade de uma bobina de armazenamento de pequeno comprimento, quando comparado com a configuração da **figura 3.5**.

### 3.5 Comportamento cinético da reação

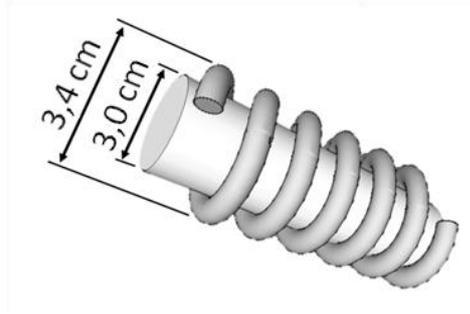
Durante a realização do estudo cinético, utilizando o programa demonstrado na **secção 2.4.3**, optou-se por realizar medidas a cada 20 segundos.

A partir da observação do comportamento cinético (**figura 3.6**), verificamos que a reação da azometina-H com o boro se completa após 300 segundos (cinco minutos).



**Figura 3.6** - Variação média (n=5) do sinal analítico com o tempo de residência da mistura reacional (para o padrão de  $1,00 \text{ mg L}^{-1}$  de boro) na bobina de armazenamento.

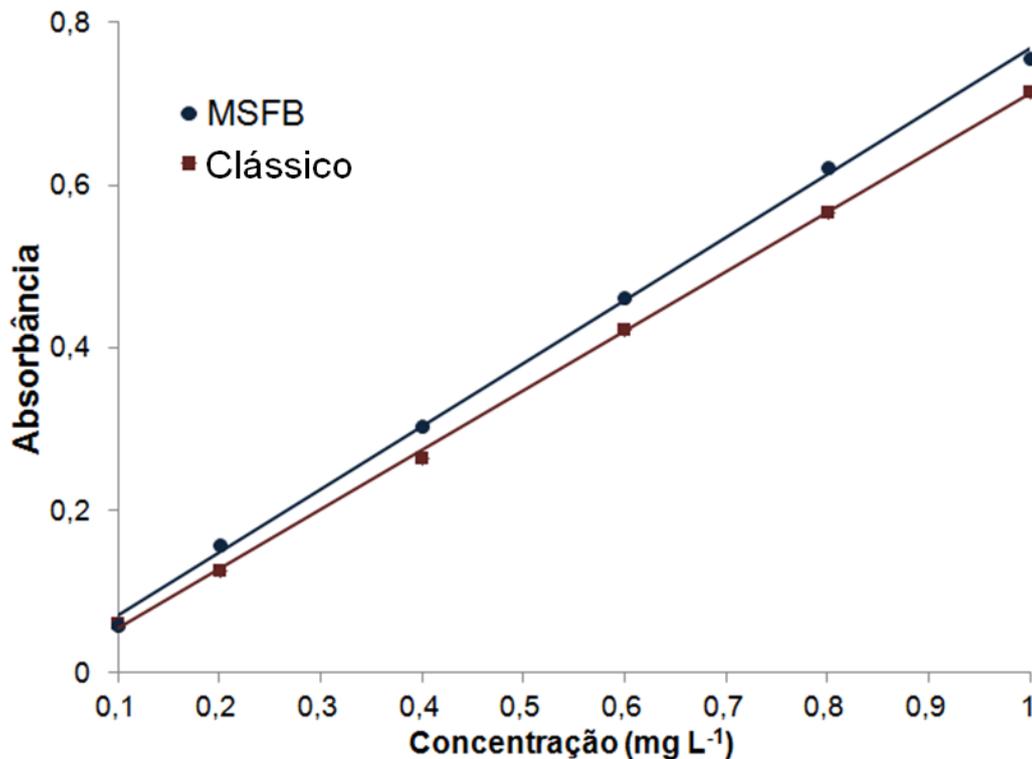
Com esse resultado, o comprimento da bobina de armazenamento, para que o equilíbrio da reação fosse alcançado, utilizando um tubo de Teflon<sup>®</sup> 2 mm de diâmetro interno, foi de 240 cm (ver **figura 3.7**).



**Figura 3.7** – Ilustração da bobina de armazenamento.

### 3.6 Validação da curva analítica para determinação de boro

Tendo investigado a faixa linear para a determinação de boro em extratos de plantas, construiu-se a curva analítica para a faixa de concentrações de 0,1 a 1 mg L<sup>-1</sup>, em quintuplicatas. As curvas analíticas construídas a partir da utilização do método automático proposto (MSFB) e do método clássico são mostradas na **figura 3.8**.



**Figura 3.8** – Curvas analíticas do método clássico e do MSFB para a determinação de boro.

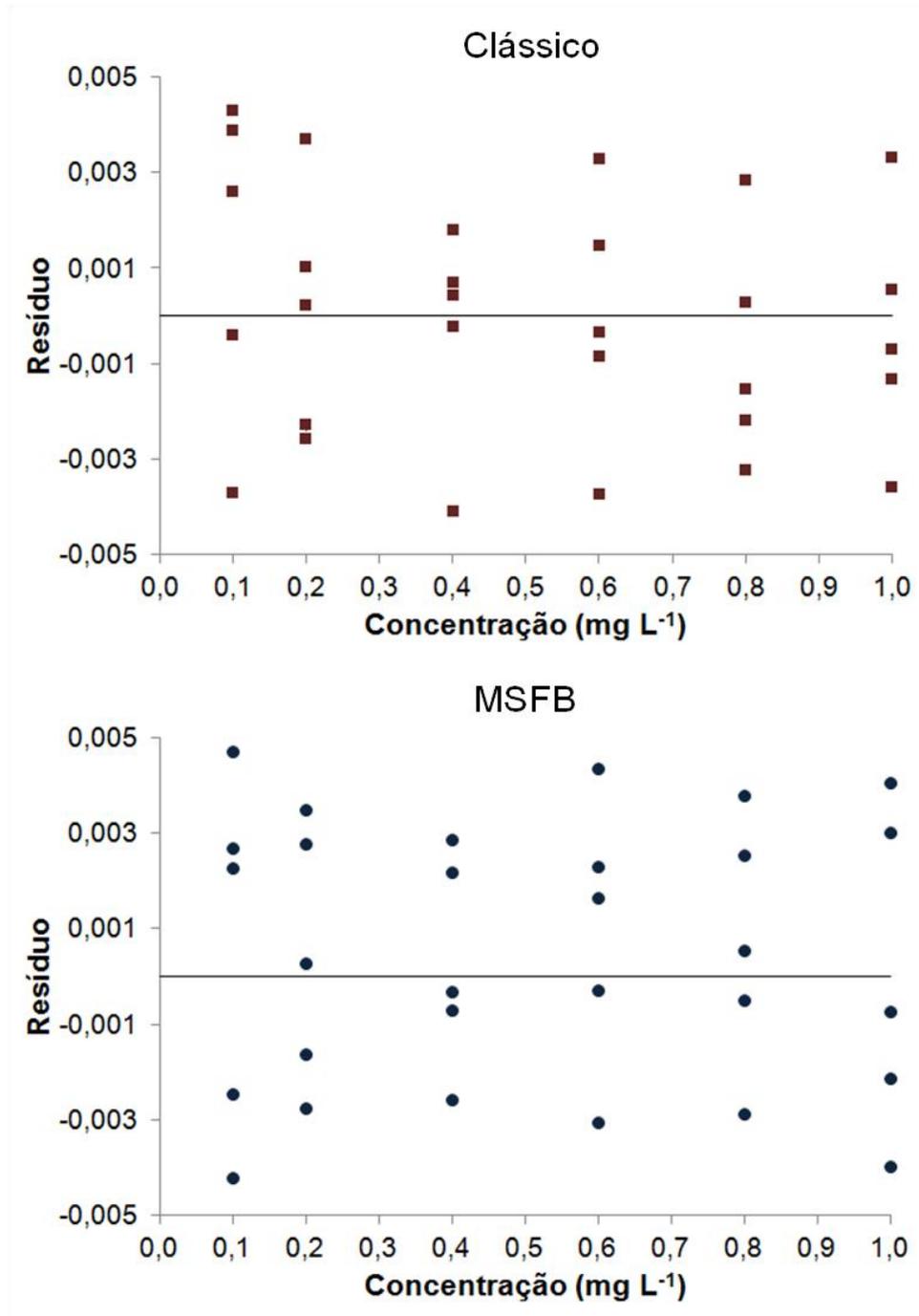
As curvas analíticas obtidas, aplicando ambos os métodos foram construídas a partir dos níveis de concentração 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00 mg L<sup>-1</sup> de boro. A **figura 3.8** mostra que as curvas analíticas apresentam um comportamento linear entre as respostas analíticas e a concentração de boro nas soluções padrão. Essa inferência baseada, inicialmente, em uma inspeção visual, é confirmada adiante pela análise gráfica dos resíduos deixados pelos modelos e corroborada pelos resultados da ANOVA apresentados em seguida.

Os parâmetros dos modelos de calibração, obtidos por regressão linear pelo modelo dos mínimos quadrados, considerando o nível de confiança de 95%, e os limites dos intervalos de confiança para os valores populacionais são apresentados na **tabela 3.1**. Os intervalos de confiança não contêm o valor zero, os parâmetros estimados para todos os modelos de calibração são estatisticamente significativos.

**Tabela 3.1** – Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos para a determinação de boro.

Instrumento	Modelo: $\hat{y} = \alpha + \beta x$	
	$\alpha \pm t_{13} \times \text{erro puro}(\alpha)$	$\beta \pm t_{13} \times \text{erro puro}(\beta)$
Clássico	- 0,0119 ± 0,003	0,7092 ± 0,002
MSFB	- 0,0061 ± 0,002	0,7741 ± 0,002

A **figura 3.9** mostra os gráficos dos resíduos deixados pelos modelos de calibração. Pode-se observar a distribuição de maneira aleatória dos resíduos ao longo da faixa dinâmica estudada, não apresentando nenhum perfil sistemático, indicando que o modelo construído está bem ajustado.



**Figura 3.9** – Gráficos dos resíduos dos modelos de calibração do método clássico e do MSFB para a determinação de boro.

Os resultados da ANOVA, empregados para corroborar a validação dos modelos de calibração, utilizando o MSFB e o método clássico, são apresentados nas **tabelas 3.2** e **3.3**. Definidos os graus de liberdade, as médias quadráticas foram calculadas a partir das somas quadráticas por meio das equações apresentadas na **tabela 3.2** e os valores obtidos são mostrados na **tabela 3.3**.

**Tabela 3.2** – Somas quadráticas e médias quadráticas calculadas (ANOVA), para a determinação de boro.

Fonte	SQ		MQ	
	Clássico	MSFB	Clássico	MSFB
Reg. (1)	$5,23 \times 10^{-1}$	$6,18 \times 10^{-1}$	$5,23 \times 10^{-1}$	$6,18 \times 10^{-1}$
Res. (16)	$4,14 \times 10^{-6}$	$6,12 \times 10^{-6}$	$2,59 \times 10^{-6}$	$3,83 \times 10^{-6}$
F. Aj. (4)	$4,02 \times 10^{-5}$	$6,05 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,51 \times 10^{-5}$
E. P. (12)	$1,31 \times 10^{-5}$	$7,20 \times 10^{-6}$	$1,09 \times 10^{-5}$	$6,00 \times 10^{-6}$

Os resultados dos testes de falta de ajuste e significância de regressão são mostrados na **tabela 3.3**. Em ambos os casos, os valores  $MQ_{faj}/MQ_{ep}$  são menores que o ponto de distribuição  $F$ , considerando um nível de 95% de confiança e os mesmos graus de liberdade. Assim, não há evidências de falta de ajuste para os modelos lineares apresentados na **tabela 3.1**. Além disso, dado que os valores  $MQ_{reg}/MQ_r$  são muito maiores que os pontos de distribuição  $F$  (para os mesmos graus de liberdade e confiança estatística), as equações dos modelos são altamente significativas.

**Tabela 3.3** – Tabela ANOVA para o modelo linear das curvas analíticas para a determinação de boro.

		Clássico	MSFB
<b>MQ<sub>faj</sub>/MQ<sub>ep</sub></b>		0,918	2,521
<b>MQ<sub>reg</sub>/MQ<sub>r</sub></b>		$2,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
<b>G.L.</b>	Falta de Ajuste	4 e 12 respectivamente	
	Signif. da Regressão	1 e 16 respectivamente	
<b>Fv1/v2</b>	Falta de Ajuste	3,26	
<b>a 95%</b>	Signif. da Regressão	4,49	

Após a validação das curvas analíticas, foram estimados os valores de LOD e LOQ para a metodologia proposta e a de referência. Os resultados, apresentados na **tabela 3.4**, revelam que os valores obtidos para o método de referência são semelhantes ao do MSFB. Na verdade, isso já era esperado, visto que o método (azometina-H) e o sistema de detecção (espectrofotômetro HP) utilizados são os mesmos para ambas as metodologias.

**Tabela 3.4** – Valores de LOD e LOQ, em mg L<sup>-1</sup>, estimados ao nível de 95% de confiança, para a determinação de boro.

	Clássico	MSFB
<b>LOD</b>	0,008	0,008
<b>LOQ</b>	0,028	0,027

### 3.7 Aplicações analíticas do sistema proposto

Após as análises das soluções padrões e a validação das curvas analíticas obtidas a partir de ambos os procedimentos, dez amostras diferentes de alface foram analisadas para determinação de boro em extratos de plantas usando a metodologia automática e a metodologia clássica.

As determinações foram feitas sempre em quintuplicatas e os resultados são apresentados na **tabela 3.5**.

**Tabela 3.5** – Valores médios das concentrações de boro ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) preditas ( $n=5$ ) das amostras de plantas usando o método clássico e o MSFB.

Amostras	Clássico	DPR %	MSFB	DPR %
1	14,7 ± 0,2	0,81	14,3 ± 0,2	0,83
2	18,1 ± 0,3	0,98	18,8 ± 0,1	0,32
3	40,7 ± 0,2	0,29	41,2 ± 0,3	0,43
4	32,1 ± 0,1	0,18	31,7 ± 0,2	0,37
5	32,8 ± 0,1	0,18	33,6 ± 0,1	0,18
6	13,9 ± 0,3	1,28	13,5 ± 0,1	0,44
7	16,2 ± 0,1	0,37	16,0 ± 0,2	0,74
8	9,1 ± 0,1	0,65	8,7 ± 0,1	0,68
9	7,3 ± 0,2	1,63	7,8 ± 0,3	2,28
10	4,1 ± 0,1	1,45	4,3 ± 0,2	2,76

Como pode ser visto na **tabela 3.5**, uma boa concordância dos resultados obtidos através da metodologia clássica e pelo MSFB foi alcançada. Observando os valores do desvio padrão relativo (DPR %) <sup>[83]</sup> percebemos uma variação semelhante. Além disso, a aplicação do teste t-pareado revelou não existir diferença estatisticamente significativa ao nível de 95% de confiança.

Quanto à exatidão, o sistema proposto permitiu quantificar boro em extratos de plantas com erros relativos médios de 2,1%. Esse valor atesta uma boa concordância entre os valores obtidos por ambos os procedimentos.

A avaliação da performance do analisador proposto, nas análises envolvendo calibração univariada, apontam a viabilidade prática e a confiabilidade nas medidas realizadas no MSFB para o analito alvo da quantificação.

O tempo de análise de cada amostra no MSFB, somando com as duas etapas de limpezas, foi de aproximadamente 30 s, o que permite efetuar 120 determinações por hora.

### 3.8 Comparação entre o MSFB e outros sistemas

O sistema proposto foi comparado com outros sistemas automáticos em fluxo já descritos na literatura.

A **tabela 3.6** apresenta algumas características analíticas do MSFB, MFA e do MSFA, descritos na literatura para determinação de boro em extratos de plantas pelo método da azometina-H.

**Tabela 3.6** – Parâmetros para diferentes sistemas automáticos.

	MSFA <sup>[14]</sup>	MFA <sup>[13]</sup>	MSFB
<b>Limite de detecção (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,02	0,47	0,008
<b>Frequência analítica (h<sup>-1</sup>)</b>	120	35	120
<b>Volume do monossegmento (µL)</b>	350	600	200
<b>Fluido carregador</b>	Presente	presente	ausente
<b>Preparação dos padrões</b>	<i>off-line</i>	<i>off-line</i>	<i>in-line</i>

Como pode ser observado, o MSFB obteve um limite inferior de detecção de 0,008 mg L<sup>-1</sup>, ou seja, seu LOD foi 2,5 vezes menor do que o relatado para o MSFA<sup>[14]</sup> e 58 vezes menor que o do MFA<sup>[13]</sup>. O tempo de análise de cada amostra no MSFB, somando com as duas etapas de limpezas, foi de aproximadamente 30 s, sendo a sua frequência analítica semelhante à do MSFA e 3,4 vezes maior que a do MFA. Outras características vantajosas do sistema proposto é a ausência de fluido

carregador, baixo consumo de amostra e preparação *in-line* das soluções de calibração.

# Capítulo 4

# Conclusão

## 4.1 Conclusão

Um novo sistema automático, o fluxo-batelada monossegmentado (MSFB), que combina as características favoráveis do FBA e do MSFA foi desenvolvido com sucesso. O sistema permitiu o uso do fluxo-batelada para reações de cinética lenta, sem prejudicar a sensibilidade ou a frequência de amostragem. O sistema foi aplicado na determinação espectrofotométrica de boro em extratos de plantas, método o qual envolve uma reação lenta entre o boro e a azometina-H. Todos os resultados das análises mostraram-se estatisticamente satisfatórios, e foram devidamente validados.

Em geral, o MSFB apresenta melhores características analíticas, como limite de detecção e taxa de amostragem, que outros sistemas automáticos. Outras vantagens do sistema proposto, quando comparado a anteriores, é a facilidade de preparar as soluções de calibração *in-line* e a baixa geração de resíduos por análise, devido à ausência do fluido carregador.

Caso o procedimento em estudo, necessite de outras etapas subsequentes às adições dos fluidos na câmara de mistura (como, aquecimento, adição de outro reagente a mistura inicial, etc.) outros dispositivos ou componentes podem ser adicionados ao sistema, como, por exemplo, câmaras de mistura, válvulas, tubos, dentre outros.

Dessa forma, o sistema MSFB une os atributos favoráveis do FBA, como a versatilidade, flexibilidade e robustez, com as características inerentes do MSFA, como a possibilidade de armazenar as amostras sem perda da frequência analítica, mostrando-se como um sistema potencialmente útil para automação de métodos analíticos.

## 4.2 Perspectivas

Tendo em vista as vantajosas características apresentadas do sistema fluxo-batelada monossegmentado (MSFB) na determinação de boro em extratos de plantas, esta pesquisa tem como perspectivas:

- aplicar o sistema proposto em outras determinações analíticas que envolvam reações de cinética lenta.

- empregar o sistema fluxo-batelada com bomba-pistão (PFBA) acoplada à câmara de mistura para propulsão dos fluidos, desenvolvido por Almeida e colaboradores<sup>[45]</sup>, para formação dos segmentos. Testes com o PFBA já foram realizados e mostraram resultados promissores, encontrado-se em estágio de desenvolvimento.

- adaptar o MSFB ao micro-fluxo-batelada<sup>[46]</sup> para implementar processos analíticos com um consumo ainda menor de reagentes e amostras, acarretando conseqüentemente uma redução na geração de resíduos.

- é importante salientar que, apesar de no presente trabalho o sistema MSFB ter sido proposto para viabilizar uso do analisador fluxo-batelada em determinações que envolvam reações de cinética lenta, pretende-se aplicá-lo em determinações que requerem outras etapas após à adição dos fluidos na câmara de mistura, como por exemplo, aquecimento, adição de um novo reagente, etc.

- também se estuda a possibilidade de explorar as funcionalidades específicas do MSFB para efetuar a síntese de nanocristais semicondutores coloidais (conhecidos como *quantum dots*) e aplica-lós na análise química de substâncias traço.

# Referências

1. TROJANOWICZ, M (editor). *Advances in Flow Analysis*. Weinheim: Wiley-VCH. 2008.
2. BARNETT, N.W.; LENEHAN, C.E.; LEWIS, S.W. Sequential injection analysis: an alternative approach to process analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, **18**: 346, 1999.
3. ROCHA, F.R.P. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. *Anal. Chim. Acta*, **468**: 119, 2002.
4. BURGUERA, J.L.; BURGUERA, M. Pretreatment of oily samples for analysis by flow injection - spectrometric methods. *Talanta*, **83**: 691, 2011.
5. DINIZ, P.H.G.D. *et al.* Flow-batch analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, **35**: 39, 2012.
6. HONORATO, R.S. *et al.* A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. *Analytica Chimica Acta*, **396**: 91, 1999.
7. 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.
8. KRUG, F.J. *et al.* Flow injection spectrophotometric determination of boron in plant material with azomethine-H. *Anal. Chim. Acta*, **125**: 29, 1981.
9. ZHENGJUN, G. *et al.* Flow injection kinetic spectrophotometric determination of trace amounts of Se(IV) in seawater. *Talanta*, **66**: 1012, 2005.
10. ARRUDA, M.A.Z.; ZAGATTO, E.A.G. A simple stopped-flow method with continuous pumping for the spectrophotometric flow-injection determination of boron in plants. *Anal. Chim. Acta*, **199**: 137, 1987.
11. STADEN, J.K.F.; TSANWANI, M.M. Determination of boron as boric acid in eye lotions using a sequential injection system. *Talanta*, **58**: 1103, 2002.

12. OHIRA, S.; KIRK, A.B.; DASGUPTA, P.K. Automated measurement of urinary creatinine by multichannel kinetic spectrophotometry. *Anal. Biochem*, **384**: 238, 2009.
13. TUMANG, C.A. *et al.* Multicommutation in flow analysis exploiting a multizone trapping approach: spectrophotometric determination of boron in plants. *Anal. Chim. Acta*. **374**: 53, 1998.
14. ANDRADE, J.C. *et al.* Spectrophotometric determination of boron in plants using monosegmented continuous flow analysis. *Analyst*. **113**: 289, 1988.
15. PASQUINI, C.; OLIVEIRA, W.A. Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium(VI), ammonia and phosphorus. *Anal. Chem*. **57**: 2575, 1985.
16. NOGUEIRA, A.R.A. *et al.* Multi-site detection in flow analysis: Part 2. Monosegmented systems with relocating detectors for the spectrophotometric determination of boron in plants. *Anal. Chim. Acta*. **276**: 121, 1993.
17. FACCHIN, I. *Extração Líquido-Líquido em Sistema de Fluxo Monossegmentado*. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Química, UNICAMP, 1996. Tese de Doutorado, 188p.
18. VAN DER LINDEN, W.E. *Pure Appl. Chem.* 1994 , 66 , 2494.
19. ZAGATTO, E.A.G. *et al.* Information essential for characterizing a flow-based analytical system, International Union of Pure and Applied Chemistry. **74**: 585, 2002.
20. KOLEV, S.D. MCKELVIE, I.D. (Editores), *Comprehensive Analytical Chemistry. Advances in flow injection analysis and related techniques*. Amsterdam: Elsevier. 2008.
21. SKEGGS, L.T. An automatic method for colorimetric analysis. *Amer. J. Clin. Pathol.* **28**: 311, 1957.
22. COVERLY, S. *Encyclopedia of Analytical Science*, 2<sup>a</sup> ed., Elsevier, Norderstedt, p210, 2005.

23. RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal. Chim. Acta.* **781: 145, 1975.**
24. REIS, B.F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. *Quim. Nova.* **19: 51, 1996.**
25. PASQUINI, C. *Instrumentação e metodologia para análise em fluxo contínuo. Desenvolvimento de um entalpímetro de fluxo, de um sistema monosegmentado e construção de um circuito retentor de picos.* Campinas, Programa de Pós-Graduação em Química, UNICAMP, 1984. Tese de Doutorado, 123p.
26. AQUINO, E.V.; ROHWEDDER, J.J.R.; PASQUINI, C. A monosegmented-flow Karl Fischer titrator. *Talanta.* **71: 1288, 2007.**
27. SILVA, M.D.H. *et al.* Determination of gaseous species by monosegmented flow systems. Volumetric determination of oxygen and carbon dioxide. *Anal. Chim. Acta.* **349: 377, 1997.**
28. SILVA M.D.H.; ROHWEDDER J.J.R.; PASQUINI C. Determination of CO<sub>2</sub> in gaseous samples using a monosegmented flow system and conductimetric detection. *Anal. Chim. Acta.* **366: 223, 1998.**
29. FACCHIN, I. *et al.* Single-phase liquid-liquid extraction in monosegmented continuous-flow systems. *Anal. Chim. Acta.* **285: 287, 1994.**
30. FACCHIN, I.; PASQUINI, C. Two-phase liquid-liquid extraction in monosegmented flow analysis. Determination of cadmium with 1-(2'-pyridylazo) naphthol. *Anal. Chim. Acta.* **308: 231, 1995.**
31. PASQUINI, C. Why it is called monosegmented flow analysis. *J. Braz. Chem. Soc.* **10: 527, 1999.**
32. TIAN, L.C. *et al.* Segmental flow-injection analysis: device and applications. *Anal. Chim. Acta.* **238: 183, 1990.**
33. RUZICKA, J.; MARSHALL, G. D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Anal. Chim. Acta.* **237: 329, 1990.**

34. REIS, B.F. *et al.* Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron plant digests. *Anal. Chim. Acta.* **293: 129, 1994.**
35. SANTOS, J.L.M. *Sistemas de fluxo multicomutado aplicados à análise de produtos farmacêuticos.* Porto, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, 2000. Tese de doutorado, 250p.
36. LIMA, M.B. *et al.* Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction. *Talanta.* **89: 21, 2012.**
37. DOMÍNGUEZ, M.A. *et al.* Automatic flow-batch system for cold vapor atomic absorption spectroscopy determination of mercury in honey from argentina using online sample treatment. *J. Agric. Food Chem.* **60: 4812, 2012.**
38. LIMA, R.A.C. *et al.* Hardness screening of water using a flow-batch photometric system. *Anal. Chim. Acta.* **518: 25, 2004.**
39. OLIVEIRA, S.C. *et al.* A coulometric flow cell for in-line generation of reagent, titrant or standard solutions. *Microchem. J.* **82: 220, 2006.**
40. 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.**
41. GRÜNHUT, M. *et al.* Flow-batch analyzer for the chemiluminescence determination of catecholamines in pharmaceutical preparations. *Anal. Letter.* **44: 67, 2011.**
42. LIMA, M.B. *et al.* Turbidimetric and photometric determination of total tannins in tea using a micro-flow-batch analyzer. *Talanta.* **88:717, 2011.**
43. 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.**

44. ANDRADE, S.I.E. *et al.* A digital image-based flow-batch analyzer for determining Al(III) and Cr(VI) in water. *Microchem. J.* (2012), doi: 10.1016/j.microc.2012.03.029.
45. 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.**
46. MONTE-FILHO, S.S. *et al.* Flow-batch miniaturization. *Talanta*. **86: 208, 2011.**
47. IÑÓN, F.A., TUBINO, M.B. in: Trojanowicz, M. (Editor), *Advances in Flow Analysis*. Weinheim: Wiley-VCH. 2008, p. 6.
48. VALCARCEL, M.; LUQUE DE CASTRO, M.D., *Flow Injection Analysis. Principles and Applications*, Horwood, Chichester, 1987, p.257.
49. RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Stopped flow and merging zones - a new approach to enzymatic assay by flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*. **106: 207, 1979.**
50. RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. *Flow Injection Analysis*, 2- ed., John Wiley and Sons, New York, 1988.
51. NOUROS, P.G.; GEORGIU, C.A.; POLISSIOU, M.G. Direct parallel flow injection multichannel spectrophotometric determination of olive oil peroxide value. *Anal. Chim. Acta*. **389: 239, 1999.**
52. THOMAIDIS, N.S.; GEORGIU, C.A. Direct parallel flow injection multichannel spectrophotometric determination of olive oil iodine value. *Anal. Chim. Acta*. **405: 239, 2000.**
53. KRUG, F.J. *et al.* Zone trapping in flow injection analysis : Spectrophotometric determination of low levels of ammonium ion in natural waters. *Anal. Chim. Acta*. **151: 39, 1983.**
54. LAPA, R.A.S.; LIMA, J.L.F.C.; SANTOS, J.L.M. Dual-stopped-flow spectrophotometric determination of amiloride hydrochloride in a multicommutated flow system. *Anal. Chim. Acta*. **407: 225, 2000.**
55. SILVA, M.S.P.; GALHARDO, C.X.; MASINI, J.C. Application of sequential injection-monosegmented flow analysis (SI-MSFA) to

- spectrophotometric determination of sulfide in simulated waters samples. *Talanta*. **60: 45, 2003**.
- 56.** SILVA, M.S.P.; MASINI, J.C. Exploiting monosegmented flow analysis to perform in-line standard additions using a single stock standard solution in spectrophotometric sequential injection procedures. *Anal. Chim. Acta*. **466: 345, 2002**.
- 57.** SUN, D.H.; WATERS, J.K.; MAWHINNEY, T.P. Determination of total Boron in Soils by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using microwave-assisted digestion. *Commun Soil Sci. Plant Anal*. **12: 2493, 1998**.
- 58.** RERKASEM, B.; JAMJOD, S.; Boron deficiency in wheat: a review. *Field Crops Research*. **89: 171, 2004**.
- 59.** BRADFORD, G.R. "Boron" IN: CHAPMAN, H.D. (ed), *Diagnostic Criteria for Plants and Soils*, Quality Printing Company, Inc., Texas, 1965, p-33-61.
- 60.** SHA, R.N.; BROWN, P.H., Techniques for boron determination and their application to the analysis of plant and soil. *Plant and Soil*. **193: 15, 1997**.
- 61.** SILVA, F.R.; FERREYRA, H.F. Avaliação de extratores de boro em solos do estado do Ceará. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*. **22: 471, 1998**.
- 62.** SHORROCKS, V.M. Boron Deficiency: Its Prevention and Cure, Technical Service and Development Department, Borax Consolidated Limited, Londres-Inglaterra, 1985.
- 63.** CARRERO, P. *et al.* On-line generation and hydrolysis of methyl borate for the spectrophotometric determination of boron in soil and plants with azomethine-H. *Talanta*. **68: 374, 2005**.
- 64.** GOWARD, G.W.; WIEDERKEHR, V.R. Spectrophotometric Determination of Boron. *Anal. Chem*. **35: 1542, 1963**.
- 65.** HORWITZ, W. Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC, Washington, 1984.

66. BRAHAM, R.S. "Boron" IN: KOLTHOFF, I.M. e ELVING, J.P. (ed). *Treatise on Analytical Chemistry*, parte II, volume 10, John Wiley & Sons, Inc., 1978, 101p.
67. FERREIRA, M. *Determinação Espectrofotométrica de Boro em Plantas com Azometina-H, usando Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentado*. Campinas, Instituto de Química, UNICAMP, 1987. Dissertação de Mestrado, 100p.
68. CAPELLE, R.. Colorimetric Micro-determination of Boron in Aqueous Media with derivatives of H and K-acids Containing Axo-or Imino-Groups. *Anal. Chim. Acta.* **24: 555, 1961.**
69. MATSUO, H. *et al.* <sup>11</sup>B NMR study on the interaction of boric acid with azomethine-H. *Polyhedron.* **23: 955, 2004.**
70. WOLF, B. The determination of boron in soil extracts, plant materials, composts, manures, water and nutrient solutions. *Soil Science and Plant Analysis.* **2: 363, 1971.**
71. FERREIRA, G. B. *et al.* Interferência de ferro na dosagem de boro no solo com azometina-H em soluções extratoras ácidas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* **37: 1311, 2002.**
72. DYRSSEN, D.; NOVIKOV, Y.; UPPSTROM, L. Studies on the chemistry of the determination of boron with curcumin. *Anal. Chim. Acta* **60: 139, 1972.**
73. GARCIA, I.L.; CORDOBA, M.H.; SANCHEZ-PEDRONO, C. Sensitive method for the spectrophotometric determination of boron in plants and waters using crystal violet. *Analyst.* **110: 1259, 1985.**
74. NOSE, K.; ZENKI, M. Flow injection spectrophotometric determination of boron with D-sorbitol using Methyl Orange as an indicator. *Analyst.* **116: 711, 1991.**
75. BASSON, W.D.; BOHMER, R.G.; STANTON, D.A. An Automated Procedure for the Determination of Boron in Plant Tissue. *Analyst.* **94: 1135, 1969.**

- 76.** BASSON, W.D.; PILLE, P.P.; DU PREEZ, A.L.. Automated "in situ" Preparation of Azomethine-H and the Subsequent Determination of Boron in Aqueous Solutions. *Analyst*. **99: 168, 1974.**
- 77.** RAIMUNDO, I.M.; PASQUINI, C. Automated Monosegmented Flow Analyser. Determination of Glucose, Creatinine and Urea. *Analyst*. **122: 1039, 1997.**
- 78.** HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. Princípios de análise instrumental, 6ª ed., Porto Alegre, Bookman, **2009.**
- 79.** Guidance for industry. Q2B validation of analytical procedures: methodology. 1ª ed.: International Conference on Harmonisation, **1996.**
- 80.** RIBEIRO, F.A.L. *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados, *Quim. Nova*. **31: 164, 2008.**
- 81.** FERREIRA, M.M.C. Planilha Eletrônica para Validação de Métodos Analíticos Univariados, disponível em: <<http://lqta.iqm.unicamp.br/portugues/downloads/validar.xls>>. Acessado em **18/06/2012.**
- 82.** PIMENTEL, M.F.; NETO, B.B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos, *Quim. Nova*. **19: 268, 1996.**
- 83.** SKOOG, D.A. *et al.* Fundamentos de Química Analítica, 8ª ed., Thomson, São Paulo, **2006.**

# **Anexos**



## A monosegmented flow-batch system for slow reaction kinetics: Spectrophotometric determination of boron in plants

Inakã S. Barreto, Stéfani Iury E. Andrade, Marcelo B. Lima, Edvan C. Silva, Mário César U. Araújo, Luciano F. Almeida\*

Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química, João Pessoa, PB, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 December 2011  
Received in revised form 29 February 2012  
Accepted 2 March 2012  
Available online 7 March 2012

#### Keywords:

Flow-batch system  
Monosegmented flow analyser  
Slow kinetic reactions  
Boron determination

### ABSTRACT

This work introduces the monosegmented flow-batch (MSFB) analysis concept. This system combines favourable characteristics of both flow-batch and the monosegmented analysers, allowing use of the flow-batch system for slow reaction kinetics without impairing sensitivity or sampling throughput. The MSFB was evaluated during spectrophotometric determination of boron in plant extracts, which is a method that involves a slow reaction between boron and azomethine-H. All calibration solutions were prepared in-line, and all analytical processes completed by simply changing the operational parameters in the MSFB control software. The limit of detection was estimated at  $0.008 \text{ mg L}^{-1}$ . The measurements could be performed at a rate of 120 samples per hour with satisfactory precision. The proposed MSFB was successfully applied to analyse 10 plant samples and the results are in agreement with the reference method at a 95% level of confidence.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In 1999 Honorato et al. [1] introduced the concept of the flow-batch analyser (FBA). Flow-batch analysers are automated systems that use an instantaneous stop chamber and integrate batch and flow methods by using programmed multi-commutation [2]. The main component is the mixing chamber (MC) where the whole analytical process including; fluids addition, sample pretreatment, homogenization, precipitation, extraction, preparation of calibration solutions, and detection, takes place under the total control of the software [1–4]. The sample is processed with less: manipulation, consumption of reagents and samples, waste and chance for human error. Classical (discrete) methods can be performed with precision, accuracy and speed similar to other flow analysis methods.

Flexible and versatile flow-batch systems have been developed for differing applications such as: screening analysis [5], titration [6], analyte addition [7], internal standard solution addition [8]. Flow-batch has been used for prior assays [9]; for developing titration concentration gradients [10], and concentration gradients for

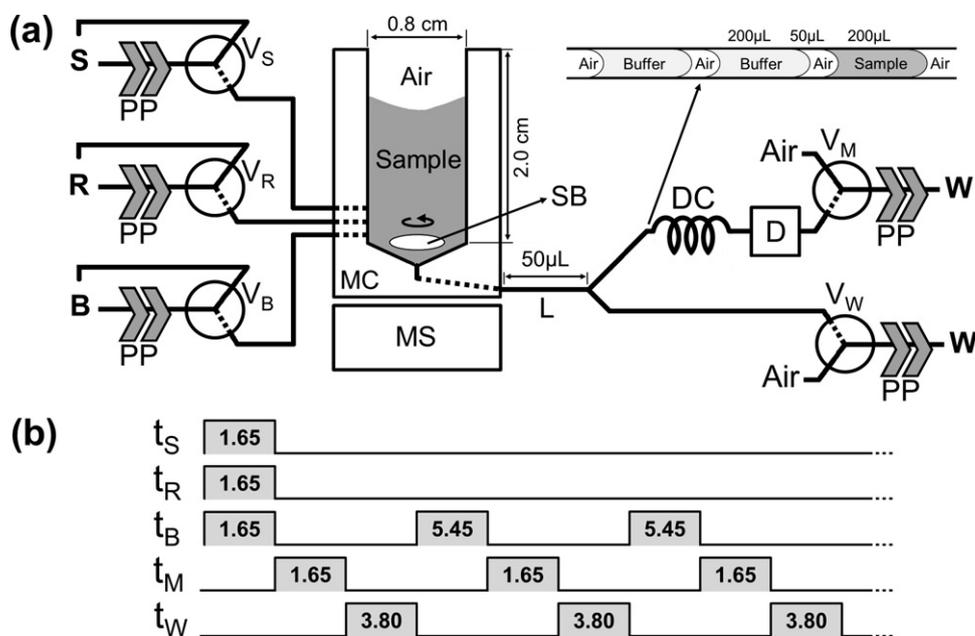
nonlinear calibrations [11]. Other applications include enzymatic reactions [12], chemiluminescence [2], nephelometrics [13], in-line coulometric generation of standards and titrants [14]. Liquid-liquid extractions [15] as well as in-line uni- [12] and multivariate [11] calibrations have also been accomplished. Flow-batch systems have also been miniaturised [16,17].

A determination involving slow reaction kinetics has been implemented using an FBA [11], without impairing the sampling throughput. However, the system presented poor sensitivity when compared to the traditional batch method. Other automatic systems have been proposed for slow reaction kinetics in flow injection analysis (FIA) [18,19], stopped-flow FIA [20], sequential injection analysis (SIA) [21,22], multicommutation in flow analysis (MFA) [23], monosegmented continuous flow analysis (MCFA) [24] and monosegmented flow analysis (MSFA) [25,26]. Among them stands out the MSFA, which allows a longer residence time for the sample (minimal dispersion), without affecting the sampling throughput. However, MSFAs are automated systems with less flexibility and versatility compared to FBA.

In this study we proposed a monosegmented flow-batch (MSFB) which combines the favourable characteristics of the FBA and MSFA and allows implementation of methods involving slow reaction kinetics without impairing the sensitivity or sampling throughput. The proposed MSFB was evaluated using the determination of boron in plant extracts using the azomethine-H spectrophotometric method [27].

\* Corresponding author at: Department of Chemistry, CCEN, Federal University of Paraíba, Caixa Postal 5093, CEP 58051-970, Joao Pessoa, Brazil.  
Tel.: +55 83 3216 7438; fax: +55 83 3216 7437.

E-mail addresses: [lucianoalmeida@pq.cnpq.br](mailto:lucianoalmeida@pq.cnpq.br), [luciano@quimica.ufpb.br](mailto:luciano@quimica.ufpb.br) (L.F. Almeida).



**Fig. 1.** (a) The MSFB diagram, (b) timing diagram for sample analysis. Mixing chamber (MC), peristaltic pump (PP), magnetic stirrer (MS), “loop” for introduction of air (L), delay coil (DC), spectrophotometric detector (D), solenoid valves ( $V_S$ ,  $V_R$ ,  $V_B$ ,  $V_M$  and  $V_W$ ), standard working solution or sample (S), reagent (R), buffer (B) and waste (W).  $t_S$ ,  $t_R$ ,  $t_B$ ,  $t_M$  and  $t_W$  are the time intervals (in seconds) for switching valves  $V_S$ ,  $V_R$ ,  $V_B$ ,  $V_M$  and  $V_W$ .

## 2. Experimental

### 2.1. Apparatus

A model 8453 Hewlett-Packard (HP) diode array UV–vis spectrophotometer, equipped with cuvette (Hellma QS 1000 quartz flow cell with 10 mm optical path) was used for the absorbance measurements at 420 nm employing both proposed and reference methods.

### 2.2. Reagents and solutions

All reagents were of analytical grade and freshly distilled and deionised water ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) was used to prepare all solutions. The solutions, including samples and standards, were prepared and stored in high-density polyethylene flasks.

Stock solution of  $10.0 \text{ mg L}^{-1}$  boron was prepared by dissolving the appropriate mass of boric acid (Synth) in water. Solutions of boron standards with lower concentrations were obtained by accurate dilutions of the stock solution with deionised water.

Azomethine H (Merck) stock solution was prepared from the pure product by dissolving 0.9000 g of salt and 2.0000 g ascorbic acid using 100.0 mL of water. The buffer–masking reagent was prepared by dissolving 14.00 g of ammonium acetate (Vetec), 10.00 g of potassium acetate (Vetec), 4.00 g of nitrilotriacetic acid (Synth) and 10.00 g EDTA (Vetec) in water. The pH 8.2 used was obtained by addition of glacial acetic acid (Synth).

### 2.3. Sample preparation

The plant samples were heated in an oven at  $500^\circ \text{C}$  for 3 h. Afterwards they were cooled in a desiccator, and 1.0000 g from each sample was weighed and dissolved in 50 mL of nitric acid 10% (v/v). The mixture was filtered, transferred to a 100.0 mL polyethylene volumetric flask and completed with distilled–deionised water.

### 2.4. Monosegmented flow–batch system

A schematic diagram of the MSFB used for spectrophotometric determination of boron is shown in Fig. 1a.

The MSFB consists of five three-way solenoid valves ( $V_S$ ,  $V_R$ ,  $V_B$ ,  $V_M$  and  $V_W$ ) model EW-01540-13 (Cole Parmer); polyethylene tubing connectors with 0.8 mm id; a peristaltic pump (PP) model 78002-00 (Ismatec). A flow rate of  $151.5 \pm 1.6 \mu\text{L s}^{-1}$  ( $n=20$ ) was always employed.

The labmade mixing chamber (MC) was built in Teflon with about 1.0 mL of total volume. The mixture/homogenization of solutions was performed by a stirring bar (SB) located inside the MC driven by a magnetic stirrer (MS). A  $750 \mu\text{L}$  total volume was used for each analysis. Before spectrophotometric detection (D), a 240 cm Teflon tube (2.0 mm internal diameter) was used as a delay coil (DC) in order to incubate the monosegments and to allow a slow kinetic reaction to occur.

A microcomputer connected with an interface (USB6009, National Instruments) was used to control the MSFB. The controlling software was developed in LabVIEW 7.1 (National Instruments). The MSFB software controls additions of solutions in MC, the monosegmented formation and incubation.

### 2.5. Monosegmented flow–batch procedure

Before starting the analytical procedure, working solutions for each channel are pumped and re-circulated to their respective reservoirs (Fig. 1a). Then the valves  $V_S$ ,  $V_R$ , and  $V_B$  are simultaneously switched ON for a time interval of 1.50 s and the working solutions (S, R, and B) are pumped towards the MC to fill the channels between the valves and the chamber. Then immediately, the discard valve  $V_W$  is opened for 5.0 s and then any solution inside the MC is emptied using the peristaltic pump (PP) for aspiration. This channels filling procedure is very important and must be carried out whenever there is a change of the reservoir liquids.

The additions of the sample or standard working solution (S), reagent (R) and buffer (B) into the MC were performed switching ON valves  $V_S$ ,  $V_R$  and  $V_B$ , respectively. The homogenization of the

solutions in the MC is constantly performed by a stirring bar (SB) under the action of the magnetic stirrer (MS).

For in-line blank preparation in the MC, valves  $V_R$  and  $V_B$  are simultaneously switched ON for 1.65 s and 3.30 s, respectively. Reagent and buffer are brought into the MC. The in-line preparation of calibration solutions ( $0.10$ – $1.00 \text{ mg L}^{-1}$  of boric acid) in the MC were performed using a standard working solution of  $3.00 \text{ mg L}^{-1}$  of boric acid, which itself was prepared by adequate dilution of a stock solution of  $10.00 \text{ mg L}^{-1}$ . In these preparations, valves  $V_S$ ,  $V_R$  and  $V_B$  are simultaneously switched ON and standard working solution, reagent and buffer are sent into the MC. The valve  $V_R$  is switched ON for 1.65 s and the valves  $V_S$  and  $V_B$  are switched ON for times, which vary in proportion to the standard solution concentration being prepared.

The procedure for in-line preparation of the sample is similar to the preparation of calibration solutions. The difference is that the samples are used instead of the standard working solution. The timing diagram for sample analysis is shown in Fig. 1b.

For monosegment formation of blank, calibration solution, or sample (air–sample–air), valve  $V_M$  is switched ON for 1.65 s, time for aspiration of about  $50 \mu\text{L}$  air (present in L) plus about  $200 \mu\text{L}$  of fluid (present in the MC) to the DC. Afterwards, the excess of fluid in the MC is discarded and the “loop” (L) is filled with air by switching ON valve  $V_W$  for 3.80 s.

In Fig. 2 the formation stages of monosegmented sample are represented. Fig. 2a illustrates the step of addition and homogenization of the fluids (sample, reagent and buffer) in the MC. In Fig. 2b is shown early formation of the sample monosegment, which occurs after the valve  $V_M$  to be switched ON. The formation of the sample monosegment is finished in Fig. 2c when  $50 \mu\text{L}$  of air plus  $200 \mu\text{L}$  of sample is aspirated to the delay coil (DC). Soon afterwards, the valve  $V_W$  is switched ON and the excess of fluid in the MC is discarded.

The cleaning step of the MC and DC is carried by switching ON valve  $V_B$  for 5.45 s, to add buffer to the MC. Soon afterwards,  $V_M$  is switched ON for 1.65 s time for aspiration of about  $50 \mu\text{L}$  air (present in L) and about  $200 \mu\text{L}$  of buffer (present in the MC) to the DC, formatting the air–buffer–air monosegment in the DC. The buffer excess in the MC is discarded and the “loop” (L) is filled with air by switching ON valve  $V_W$  for 3.80 s. This step is carried out twice in order to ensure the cleaning of both the MC and the DC.

Analytical signal measurement is performed when sample, calibration solution or blank monosegment reaches the flow cell, fulfilling its optical path with  $200 \mu\text{L}$  of processed fluid. At this moment, the valve  $V_M$  is switched OFF, stopping the flow inside the inline DC to keep air bubbles completely out of the optical path. It is not necessary to remove the bubbles because they will not interfere on absorbance measurements. Finally, the absorbance at  $420 \text{ nm}$  is recorded in steady state (and during the pre-determined sampling time) for further data treatment. During any analytical signal measurement a new monosegment is prepared concomitantly inside the MC and thus, neither sampling throughput nor sensitivity is impaired.

The valve  $V_M$  is controlled by time. This value (1.65 s) represents the time necessary for one monosegment ( $200 \mu\text{L}$  fluid, and  $50 \mu\text{L}$  air) to be drawn into the DC. Since the volume between the MC and D, and the rate of flow are constant, the reaction time provided for by the DC is also held constant. The synchronised time settings for valve  $V_M$  and valve  $V_W$  then permit that absorbance from the sample, blank or calibration solution is always stop flow mode measured at 5 min from mix, without interference of the air portion of the monosegment. The normal use of opto-switches for detection of the monosegment [29] at the flow cell in this arrangement is not necessary, which simplifies the MSFB manifold.

It is worth noting that when the number of samples to be analysed are finished, several cleaning monosegments (air–buffer–air) are continuously prepared and added to delay coil until

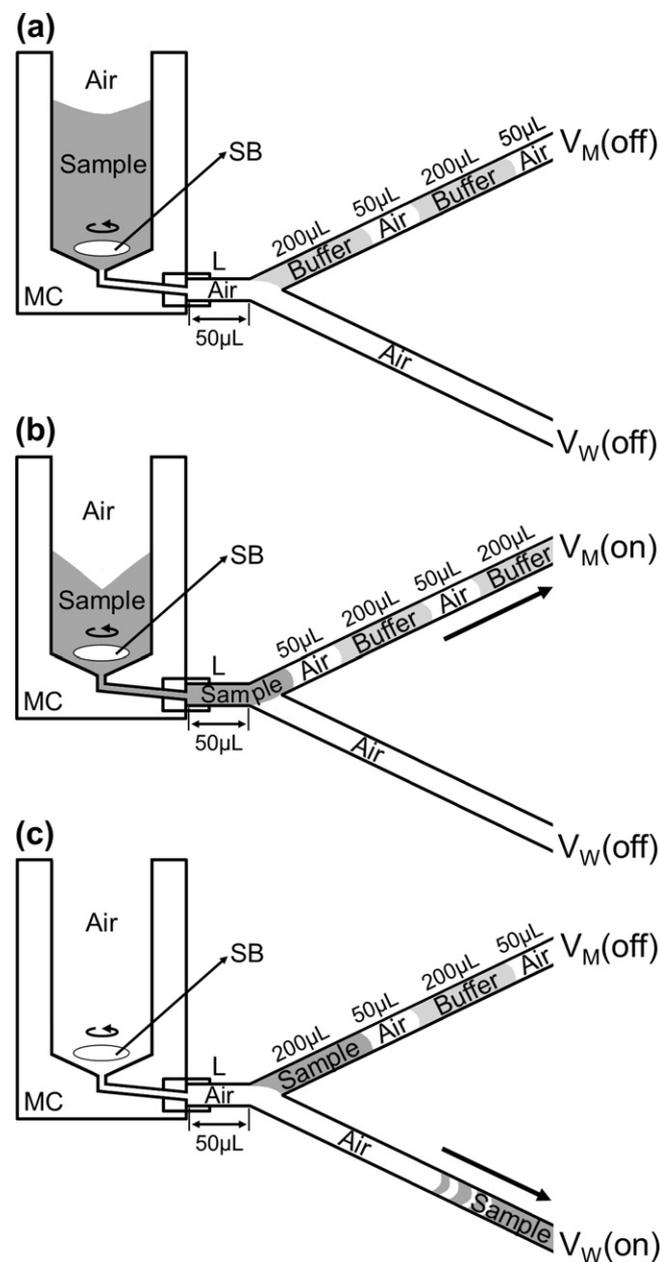


Fig. 2. Stages of formation of monosegment. (a)–(c)  $V_M$  and  $V_W$ , solenoid valves monosegmented and waste, respectively; MC, mixing chamber; SB, stirring bar; L, “loop” for introduction of air.

measurement of the absorbance yielded by the last sample. This procedure is important to keep residence coil always feed in a systematic way, avoiding possible changes in the flow aspiration rate through detector and consequent losses in the timing synchronism among absorbance measurements. Notwithstanding, distilled water may be also used instead buffer solution for the preparation of cleaning monosegments.

## 2.6. Analytical procedure of the reference method

For comparison, the proposed MSFB performance was evaluated against a manual reference UV–vis spectrophotometric azomethine-H method analyzing the plant extract samples. Calibration solutions were prepared from  $0.1$  to  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  [27]. The analytical signals were measured at a maximum absorbance of around  $420 \text{ nm}$ . The analysis of each sample was performed in

**Table 1**

Results for boron determination in plant extract ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) using the proposed MSFB and the spectrophotometric reference method. The values of uncertainty have been estimated by using the expression  $\pm t_{N-1}s/\sqrt{N}$ , where  $N$  is the number of replicate measurements,  $t_{N-1}$  is the statistic parameter often called Student's  $t$  (with  $N=5$ , at 95% level of confidence) and  $s$  is the standard deviation.

Samples	MSFB system	Reference method
1	14.3 $\pm$ 0.2	14.7 $\pm$ 0.2
2	18.8 $\pm$ 0.1	18.1 $\pm$ 0.3
3	41.2 $\pm$ 0.3	40.7 $\pm$ 0.2
4	31.7 $\pm$ 0.2	32.1 $\pm$ 0.1
5	33.6 $\pm$ 0.1	32.8 $\pm$ 0.1
6	13.5 $\pm$ 0.1	13.9 $\pm$ 0.3
7	16.0 $\pm$ 0.2	16.2 $\pm$ 0.1
8	8.7 $\pm$ 0.1	9.1 $\pm$ 0.1
9	7.8 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 0.2
10	4.3 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.1

quintuplicate and the concentrations were calculated from the analytical curve.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Monosegmented flow-batch features

The length of the delay coil was set at 240 cm of tube (2.0 mm internal diameter), enough to permit the reaction of boron with azomethine-H to reach equilibrium when the monosegment (air-sample-air) is being transported towards to detection. This corresponds to a residence time of 300 s.

The use of two consecutive steps of cleaning with the buffer monosegment (between bubbles) was perfectly adequate, because no carry over was observed.

#### 3.2. Analytical application

A good analytical curve was obtained with the MSFB system for the determination of boron in plant extract samples by the azomethine-H method. The regression equation was  $A=0.0061+0.7741C$ ; where  $A$  is the analytical response and  $C$  is the analyte concentration in  $\text{mg L}^{-1}$  of boron. The squared linear correlation coefficient,  $r^2$  was 0.998 in the range between 0.10 and  $1.00 \text{ mg L}^{-1}$ . The calibration curve was statistically validated by variance analysis (ANOVA), showing no lack of fit at a 95% confidence level. The limit of detection (LOD) was  $0.008 \text{ mg L}^{-1}$ . The LOD for the method was calculated based on the criteria established by IUPAC [28], the LOD was evaluated as three times the standard deviation of the blank measurement.

Table 1 presents the results obtained for the proposed MSFB and those obtained for the reference spectrophotometric method. They show a good agreement between the obtained values by using both methods, attesting the accuracy of MSFB. Actually, at a confidence level of 95%, no statistical difference was observed between them when the paired  $t$ -test was applied. In terms of precision, the obtained values by the proposed and reference methods were similar. The overall standard deviation ( $n=5$ ) obtained in the determinations for both methods was  $0.6 \text{ mg kg}^{-1}$ . The MSFB presented an analytical frequency of 120 samples per hour for the azomethine-H method.

Table 2 presents some analytical features of the proposed MSFB and others automated systems, selected by authors, described in the literature for determination of boron in plant extract samples by the azomethine-H method. The proposed MSFB has a lower limit of detection ( $\text{LOD}=0.008 \text{ mg L}^{-1}$ ). It was observed that its LOD was 2.5 times lower than that reported for MCFA [24] and 58 times lower than that for MFA [23]. The sampling rate of the MSFB was similar to MCFA, and 3.4 times higher than MFA. The elimination

**Table 2**

Parameters from different automatic systems.

	MCFA [24]	MFA [23]	MSFB
Detection limit ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0.02	0.47	0.008
Sampling rate ( $\text{h}^{-1}$ )	120	35	120
Volume of monosegment ( $\mu\text{L}$ )	350	600	200
Carrier fluid	Present	Present	Absent
Preparation of calibration solutions	Off-line	Off-line	In-line

of a carrier fluid, in-line preparation of calibration solutions, and a lower volume of monosegment than previous automated systems are further advantages.

### 4. Conclusion

A novel automated system, the MSFB, which combines the favourable characteristics of flow-batch and monosegmented analysers was successfully developed. The system enabled the use of a flow-batch system for slow kinetic reactions without impairing either sensitivity or sampling throughput. The system was applied for spectrophotometric determination of boron in plant extracts, which involve a slow reaction between boron and azomethine-H.

In general, the MSFB presents better analytical features than either MCFA or MFA [23,24] automated systems, i.e. detection limit, sampling rate, elimination of the carrier fluid, preparation in-line of calibration solutions, and a lower volume of monosegment.

In the case of the MSFB system is used in applications that requires other analytical procedures, after the additions in the mixing chamber, (sequential treatments required before the sample is detected) other devices or components can be simply added to the system (such as mixing chambers, valves, tubes and delay coils). Thus, the MSFB system presents the favourable characteristics as flexibility, versatility and robustness as a traditional flow-batch system, and has potential for other use in determinations.

### Acknowledgement

The authors would like to thank the Brazilian agencies (CNPq and CAPES) for research fellowships and scholarships.

### References

- [1] R.S. Honorato, M.C.U. Araújo, R.A.C. Lima, E.A.C. Zagatto, R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, Anal. Chim. Acta 396 (1999) 91–97.
- [2] M. Grünhut, V.L. Martins, M.E. Centurión, M.C.U. Araújo, B.S.F. Band, Anal. Lett. 44 (2011) 67–81.
- [3] S.D. Kolev, I.D. McKelvie, Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques, First ed., Elsevier, Hungary, 2008.
- [4] E.A.G. Zagatto, J.M.T. Carneiro, S. Vicente, P.R. Fortes, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, J. Anal. Chem. 64 (2009) 524–532.
- [5] R.A.C. Lima, S.R.B. Santos, R.S. Costa, G.P.S. Marcone, R.S. Honorato, V.B. Nascimento, M.C.U. Araújo, Anal. Chim. Acta 518 (2004) 25–30.
- [6] S.C.B. Oliveira, E.C.S. Coelho, T.M.G. Selva, F.P. Santos, M.C.U. Araújo, F.C. Abreu, V.B. Nascimento, Microchem. J. 82 (2006) 220–225.
- [7] J.E. da Silva, F.A. da Silva, M.F. Pimentel, R.S. Honorato, V.L. da Silva, M.C.B.S.M. Montenegro, A.N. Araújo, Talanta 70 (2006) 522–526.
- [8] V.B. Nascimento, T.M.G. Selva, E.C.S. Coelho, F.P. Santos, J.L.S. Antônio, J.R. Silva, E.N. Gaião, M.C.U. Araújo, Talanta 81 (2010) 609–613.
- [9] R.S. Honorato, E.A.G. Zagatto, R.A.C. Lima, M.C.U. Araújo, Anal. Chim. Acta 416 (2000) 231–237.
- [10] E.P. Medeiros, E.C.L. Nascimento, A.C.D. Medeiros, J.G. Veras Neto, E.C. Silva, M.C.U. Araújo, Anal. Chim. Acta 511 (2004) 113–118.
- [11] M.C. Souza, V.L. Martins, L.F. Almeida, O.D. Pessoa Neto, E.N. Gaião, M.C.U. Araújo, Talanta 82 (2010) 1027–1032.
- [12] M. Grünhut, M.E. Centurión, W.D. Frago, L.F. Almeida, M.C.U. Araújo, B.S.F. Band, Talanta 75 (2008) 950–958.
- [13] C.C. Acebal, M. Insausti, M.F. Pistonesi, A.G. Lista, B.S.F. Band, Talanta 81 (2010) 116–119.
- [14] C. Pasquini, E.V. Aquino, M.V. Rebouças, F.B. Gonzaga, Anal. Chim. Acta 600 (2007) 84–89.
- [15] M.B. Lima, M. Insausti, C.E. Domini, M.F. Pistonesi, M.C.U. Araújo, B.S.F. Band, Talanta 89 (2012) 21–26.

- [16] M.B. Lima, S.I.E. Andrade, D.P. Harding, M.F. Pistonesi, B.S.F. Band, M.C.U. Araújo, *Talanta* 88 (2012) 717–723.
- [17] S.S. Monte-Filho, M.B. Lima, S.I.E. Andrade, D.P. Harding, Y.N.M. Fagundes, S.R.B. Santos, S.G. Lemos, M.C.U. Araújo, *Talanta* 86 (2011) 208–213.
- [18] F.J. Krug, J. Mortatit, L.C.R. Pessenda, E.A.G. Zagatito, H. Bergamin, *Anal. Chim. Acta* 125 (1981) 29–35.
- [19] G. Zhengjun, Z. Xinshen, C. Guohe, X. Xinfeng, *Talanta* 66 (2005) 1012–1017.
- [20] M.A.Z. Arruda, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 199 (1987) 137–145.
- [21] J.K.F. Staden, M.M. Tsanwani, *Talanta* 58 (2002) 1103–1108.
- [22] S. Ohira, A.B. Kirk, P.K. Dasgupta, *Anal. Biochem.* 384 (2009) 238–244.
- [23] C.A. Tumang, G.C. Luca, R.N. Fernandes, B.F. Reis, F.J. Krug, *Anal. Chim. Acta* 374 (1998) 53–59.
- [24] J.C. Andrade, M. Ferreira, N. Baccan, O.C. Bataglia, *Analyst* 113 (1988) 289–293.
- [25] C. Pasquini, W.A. Oliveira, *Anal. Chem.* 57 (1985) 2575–2579.
- [26] A.R.A. Nogueira, S.M.B. Brienza, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, A.N. Araújo, *Anal. Chim. Acta* 276 (1993) 121–125.
- [27] R.R. Spencer, D.E. Erdmann, *Environ. Sci. Technol.* 13 (1979) 954–956.
- [28] A.D. McNaught, W. Andrew, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, second ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1997.
- [29] I.M. Raimundo, C. Pasquini, *Analyst* 122 (1997) 1039–1044.