UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MILTON KATSUMI SASAKI

Projeto e desenvolvimento de um sistema de análises químicas por injeção em fluxo para determinações espectrofotométricas simultâneas de cobre e de níquel explorando cinética diferencial e calibração multivariada

Piracicaba

2011

MILTON KATSUMI SASAKI

Projeto e desenvolvimento de um sistema de análises químicas por injeção em fluxo para determinações espectrofotométricas simultâneas de cobre e de níquel explorando cinética diferencial e calibração multivariada

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Elias Ayres Guidetti Zagatto

Piracicaba

2011

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Sasaki, Milton Katsumi

Projeto e desenvolvimento de um sistema de análises químicas por injeção em fluxo para determinações espectrofotométricas simultâneas de cobre e de níquel explorando cinética diferencial e calibração multivariada / Milton Katsumi Sasaki; orientador Elias Ayres Guidetti Zagatto. - - Piracicaba, 2011.

57 p.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Análise multivariada 2. Espectrofotometria 3. Química analítica instrumental 4. Química analítica quantitativa 5. Quimiometria 6. Reagentes orgânicos I. Título

CDU 543.068.3:543.422.3

À memória de Noboru Sasaki,

zeloso e saudoso pai.

(24/08/1948 – 03/12/2009)

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre foi, e para sempre será, uma das principais forças motoras do meu existir, sem a qual não poderia seguir em frente nesta “coisa” surpreendente chamada vida.

À Universidade de São Paulo e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela infraestrutura e pelo apoio institucional oferecidos para consecução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelos apoios financeiros, sob forma de bolsa e/ou auxílios.

Ao prof. Elias Zagatto, que além da orientação que me ofereceu, foi uma pessoa com quem pude conviver e “crescer” durante este período, marcado por momentos dolorosos de nossas vidas mas, que certamente nos deixou, de alguma forma, mais fortalecidos.

Aos pesquisadores do Laboratório Henrique Bergamin Filho: Prof. Boaventura Reis, Prof. Fábio Rocha, Prof. Francisco Krug, José Ferreira e Prof[a]. Maria Fernanda Giné, pela grata convivência proporcionada, sob forma de discussões e orientações de natureza diversa, além de diálogos informais.

Aos funcionários não docentes deste mesmo Laboratório: Fátima Patreze, Iolanda Rufini (Tatinha), Otávio Matsumoto, Sheila Perdigão (carinhosamente apelidada de “tia”) e Valdemir Barros, pelos apoios em laboratório e pessoal.

A todos os outros funcionários deste Centro que, de forma direta ou indireta, também tiveram contribuições.

Aos companheiros de laboratório: Mário Feres, Paula Fortes, Evandro Alves, Claudineia Rodrigues e Taciana Gomes, além daqueles já citados; com quem pude trabalhar e conviver de forma muito agradável.

Aos demais amigos que afortunadamente colecionei durante o período, no Laboratório: Gabriel Carvalho, Dário Santos, Lidiane Nunes, Marcos Gomes, Flávio Leme, Paulino Souza, Paula Packer, Néstor Aracama, Marcelo Teixeira, Alfredo Suárez, Janete Gonçalves, Tuanne Dias, Andréia Pereira, Alessandra Felix, Carla Kamogawa, Gláucia Vieira e Jeová Miranda; e também além desse: Diego Vendramini, Carlos Santana, Sheila Santos, Christiano Leonardi e Mariana Raviccini.

Às amizades que felizmente consquistei durante meu início na vida acadêmica com: Prof. Cláudio Oliveira, Prof. Willian Costa, Rafael Leite, Juliana Cortez, Ana Cláudia Ortega, Valéria Aquilino, Valquíria Moraes, Alessandra Matsuoka, Priscila Iwamoto, dentre muitas outras.

Acima da nomeação ou da titulação, o que confere valor a uma pessoa é seu caráter e a nobreza de seus ideais.

"O saber humano se espalha para todos os lados, a perder de vista, de modo que nenhum indivíduo pode saber sequer a milésima parte daquilo que é digno de ser sabido."

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Sasaki, M. K. **Projeto e desenvolvimento de um sistema de análises químicas por injeção em fluxo para determinações espectrofotométricas simultâneas de cobre e de níquel explorando cinética diferencial e calibração multivariada.** 2011. 57 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

Análise cinética diferencial explora diferenças em taxas reacionais entre os analitos e um sistema reacional comum; etapas de separação prévia dos analitos podem então ser prescindidas. Sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) se afiguram como uma ferramenta importante para métodos envolvendo essa estratégia, pois permitem um controle preciso da dispersão de reagentes / amostras e da temporização. O objetivo deste trabalho foi então explorar estes dois aspectos favoráveis visando a determinação simultânea de cobre e de níquel, a partir de suas reações com o reagente cromogênico 5-Br-PADAP. Três alíquotas de amostra eram simultaneamente inseridas, por meio de um injetor proporcional, no fluxo transportador reagente (5-Br-PADAP 75 mg L^{-1} + sistema tampão 0,5 mol L^{-1} em ácido acético / acetato, pH 4,7) de um sistema FIA em linha única. Durante o transporte em direção ao detector, as zonas estabelecidas se coalesciam, originando uma zona complexa que era monitorada a 562 nm. Os valores locais máximos e mínimos da função concentração / tempo obtida eram considerados para calibração multivariada utilizando a ferramenta quimiométrica PLS-2 (*partial least squares - 2*). A concentração do reagente, a capacidade tampão, a temperatura, a vazão, os comprimentos do percurso analítico e das alças de amostragem, bem como a distância inicial entre as zonas de amostra estabelecidas foram avaliados para construção dos modelos matemáticos. Estes foram criados a partir de 24 soluções-padrão mistas de Cu^{2+} e Ni^{2+} (0,00-1,60 mg L^{-1} em HNO_3 a 0,1% v/v). Duas variáveis latentes foram suficientes para capturar > 98 % das variâncias inerentes ao conjunto de dados e erros médios das previsões (RMSEP) foram estimados em 0,025 e 0,071 mg L^{-1} para Cu e Ni, salientando a boa precisão do modelo de calibração. O sistema proposto apresenta boas figuras de mérito: fisicamente estável, quando mantido em operação por quatro horas ininterruptas, consumo de 314 µg 5-Br-PADAP por amostra, frequência analítica de 33 amostras por hora (165 dados, 66 determinações) e erros nas leituras em sinais de absorbância tipicamente < 5%. Entretanto, verificou-se a inexatidão das previsões efetuadas pelo modelo proposto, quando comparadas aos resultados obtidos por ICP OES. A partir deste fato, tornam-se necessários maiores estudos referentes a este tipo de matriz, bem como de técnicas de mascaramento dos possíveis interferentes presentes.

Palavras-chave: Análises químicas por injeção em fluxo. Análise cinética diferencial. Regressão parcial por mínimos quadrados. Espectrofotometria UV-Vis.

ABSTRACT

Sasaki, M. K. **Project and development of a flow-injection system for simultaneous spectrophotometric determination of copper and nickel exploiting differential kinetics and multivariate calibration.** 2011. 57 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

Differential kinetic analysis exploits the differences in reaction rates between the analytes and a common reactant system; prior steps of analyte separation can then be waived. Flow-injection systems (FIA) are considered as an important tool for methods involving such a strategy because they allow precise control of sample / reagent dispersion and timing. The aim of this work was then to exploit these two favorable aspects for the simultaneous determination of copper and nickel using the 5-Br-PADAP chromogenic reagent. Three sample aliquots were simultaneously inserted by means of a proportional injector into reagent carrier stream (75 mg L^{-1} 5-Br-PADAP + 0.5 mol L^{-1} acetic acid / acetate, pH 4.7) of a single-line FIA system. During transport towards detection, the established zones coalesce themselves, resulting in a complex zone that was monitored at 562 nm. The local maximum and minimum values of the concentration / time obtained function were considered for multivariate calibration using the PLS-2 (partial least squares - 2) chemometric tool. The reagent concentration, buffering capacity, temperature, flow rate and lengths of the analytical path, sampling loops and initial distance between plugs were established and evaluated for the construction of mathematical models. To this end, 24 Cu^{2+} and Ni^{2+} (0.00 - 1.60 mg L^{-1}, also 0.1% v/v HNO_3) mixed standard solutions were used. Two latent variables were enough to capture > 98% of the variance inherent in the data set and average prediction errors (RMSEP) were estimated as 0.025 and 0.071 mg L^{-1} for Cu and Ni, emphasizing the good precision the calibration model. The proposed system presents good figures of merit: physical stability when kept in operation for four uninterrupted hours, consumption of 314 mg 5-Br-PADAP per sample, sample throughput of 33 h^{-1} (165 data, 66 determinations) and error readings in absorbance signals typically <5%. However, inaccuracy of the predictions made by the proposed model when compared to results obtained by ICP OES was noted. Thus, further studies involving this type of matrix, as well as masking techniques of potential interferences present, are recommended.

Keywords: Flow injection analysis. Differential kinetic analysis. Partial least squares regression. UV-Vis spectrophotometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Decomposição de matrizes..... 20

Figura 2 - Configurações comumente utilizadas em sistemas FIA para determinações multicomponetes explorando cinética reacional..... 22

Figura 3 - Estrutura do 5-Br-PADAP..... 26

Figura 4 - Espectros de absorção 33

Figura 5 - Diagrama de fluxos do sistema proposto..... 34

Figura 6 - Registro do desenvolvimento das reações mono-analito com paragem de fluxo..... 39

Figura 7 - Registro típico da zona complexa gerada por inserção das alíquotas de amostra..... 39

Figura 8 - RMSEP para os modelos de calibração..... 44

Figura 9 - RMSECV por variável latente para o modelo escolhido..... 44

Figura 10 - Detecção de amostras anômalas..... 47

Figura 11 - Correlações entre concentrações esperadas e previstas na etapa de validação..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações de Cu^{2+} e de Ni^{2+} nas soluções empregadas para as etapas de calibração e de validação dos modelos..... 30

Tabela 2 - Faixas de concentrações dos constituintes das amostras de ligas metálicas..... 31

Tabela 3 - Condições experimentais para os modelos de calibração..... 45

Tabela 4 - Número de variáveis latentes, porcentagens de variância capturadas, RMSECV e RMSEP..... 46

Tabela 5 - Valores previstos, reais e de erros obtidos na etapa de validação..... 48

Tabela 6 - Resultados comparativos 49

Tabela 7 - Carta de seletividade para o modelo proposto..... 49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 11
2. REVISÃO DA LITERATURA..... 13
2.1. Métodos cinéticos..... 13
2.2. Cinética diferencial em sistemas de análises químicas por injeção em fluxo..... 20
2.3. O reagente 5-Br-PADAP..... 26
3. EXPERIMENTAL..... 28
3.1. Material..... 28
3.2. Soluções..... 29
3.3. Amostras..... 30
4. MÉTODO..... 32
4.1. Diagrama de fluxos..... 32
4.2. Influência dos principais parâmetros envolvidos..... 34
4.2.1. Natureza da solução-tampão e concentração de 5-Br-PADAP..... 34
4.2.2. Temperatura de aquecimento da bobina reacional..... 35
4.2.3. Vazão..... 35
4.2.4. Comprimentos das alças de amostragem e das bobinas..... 35
4.3. Construção dos modelos de calibração..... 36
4.4. Espécies interferentes..... 36
4.5. Figuras de mérito..... 37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 38
5.1. Influência dos principais parâmetros envolvidos..... 40
5.1.1. Natureza da solução-tampão..... 40
5.1.2. Concentração de 5-Br-PADAP..... 40
5.1.3. Temperatura de aquecimento da bobina reacional..... 41
5.1.4. Vazão..... 42
5.1.5. Comprimentos das alças de amostragem e das bobinas 42
5.2. Construção dos modelos de calibração..... 43
5.3. Modelo de calibração escolhido..... 43
5.4. Espécies interferentes..... 49
5.5. Figuras de mérito..... 50
6. CONCLUSÕES..... 51
REFERÊNCIAS..... 52

1. INTRODUÇÃO

Uma determinação analítica geralmente envolve diversas etapas tais como amostragem, mudanças físicas, reações químicas, separação do analito, mensuração, etc. Quando uma ou mais etapas impõem um caráter transiente à determinação, caracteriza-se um método cinético de análises.[1]

Os métodos explorando cinética diferencial, empregados em análises multicomponentes, constituem-se em uma das vertentes dos métodos cinéticos. Tais métodos, em geral envolvem a interação dos analitos com um reagente em comum, e as diferenças nas taxas reacionais são consideradas para distinguir e quantificar os componentes, sem a necessidade de qualquer separação física.[2]

Mesmo podendo se constituir em métodos mais simples, rápidos e precisos quando comparados aos métodos onde os equilíbrios químicos são atingidos, os métodos cinéticos apresentam algumas desvantagens, pois necessitam de um maior controle das condições experimentais, em função de serem mais susceptíveis às variações de pH, força iônica e temperatura do ambiente reacional, bem como da temporização.[3] Devido aos avanços recentes na automatização dos sistemas analíticos, à melhor compreensão da instrumentação analítica e das reações químicas, e ao aprimoramento dos métodos de tratamento de dados, os métodos cinéticos têm sido mais mais utilizados.[1-4]

A mecanização pode ser considerada como um dos aprimoramentos dos procedimentos de análises químicas, pois possibilita um controle eficiente dos principais parâmetros que condicionam uma determinação analítica. Obtem-se então, resultados mais confiáveis, de forma rápida e segura.[5] Dentre as diversas possibilidades de mecanização, destacam-se aquelas envolvendo sistemas de análises químicas em fluxo, onde a automatização e a miniaturização são facilmente obtidas, proporcionando baixos custos de instalação, operação e manutenção dos analisadores, além de reduzido consumo de amostras e reagentes, e curto tempo de análise.

Nos sistemas de análises em fluxo, uma alíquota da amostra é introduzida em um fluxo transportador, originando uma zona reprodutível de amostra que é transportada em direção ao detector. Durante seu transporte, a zona de amostra participa das operações inerentes ao procedimento analítico, tais como diluição, adição de reagentes, diálise, troca-iônica, extração líquido-líquido e/ou difusão gasosa, dentre outras. Em função da geometria fixa do módulo de análises e do rígido controle temporal, estas operações são conduzidas de

maneira eficiente e reprodutível, o que torna viável a utilização desses sistemas quando da implementação do conceito de medidas analíticas baseadas no registro de sinais transientes[5], pois permite um controle preciso da dispersão (de reagentes e de amostras) e da temporização. A amostra processada é monitorada durante sua passagem pelo detector e posteriormente descartada.

Durante a passagem da zona de amostra pelo detector, sucessivas mensurações podem ser realizadas, cada uma delas correspondendo a um diferente tempo médio de residência da zona de amostra no percurso analítico, a uma diferente concentração do analito e a uma diferente condição de tratamento da amostra;[6] consequentemente, as quantificações são análogas àquelas envolvendo diversos sensores. Desta forma, cada mensuração pode ser considerada como associada a um diferente "pseudo-sensor"[7], referente a um tratamento específico da zona de amostra, contrariamente a procedimentos envolvendo escaneamento (varredura de determinado parâmetro).

A evolução dos métodos analíticos e os avanços tecnológicos da instrumentação têm levado a um aumento da quantidade de informação obtida (resultados mais complexos e variados), bem como à necessidade de se empregar técnicas mais aprimoradas para tratamento e análise de dados. Neste sentido, a exploração de métodos quimiométricos[8,9] tem sido cada vez mais intensa.

Tais métodos se constituem em ferramentas utilizadas na análise de dados de natureza multivariada, e envolvem conceitos de matemática, estatística e computação. Em relação à calibração, a quimiometria busca um modelo baseado em um algoritmo matemático capaz de prever uma ou mais propriedades de interesse como, por exemplo, a concentração de um componente na amostra, a partir de resultados multivariados.

O objetivo deste trabalho foi a determinação espectrofotométrica e simultânea de cobre e de níquel em um sistema de análises por injeção em fluxo. O reagente 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (5-Br-PADAP)[10] foi utilizado, e as diferentes taxas de reação deste com Cu^{2+} e Ni^{2+} foram exploradas. Neste sistema, três aliquotas da amostra eram simultaneamente inseridas em um mesmo fluxo transportador contendo o reagente cromogênico. Após dispersão parcial, originava-se uma zona complexa de amostra apresentando três regiões de máxima, e duas de mínima coloração local. Esta zona era dirigida ao detector, e as mensurações referentes às cinco regiões especificadas eram quantificadas em um comprimento de onda único. Os dados eram então utilizados para calibração multivariada explorando regressão por ferramenta quimiométrica *Partial Least Squares-2* (PLS-2).[11]

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Métodos cinéticos

O primeiro estudo cinético foi realizado em 1850 e teve como objetivo o estabelecimento de uma relação empírica entre acidez e a taxa de hidrólise de açúcar de cana (sacarose), em glicose e frutose.[12]

Em 1881, foi proposto o primeiro método visual para a determinação da enzima amilase em amostras de extrato pancreático.[13] Este método baseava-se na variação da coloração azul do ambiente reacional, resultante da interação amido-iodo, em função do tempo. A taxa de descoloração notada era catalisada pela enzima.

Entre 1940 e 1950, a detecção visual foi substituida por sensores elétricos.[14] Um exemplo marcante dos detectores desta época foi o espectrofotômetro Beckman DU[15], que representou a evolução de uma série de espectrofotômetros deste fabricante, iniciada em 1940. Este instrumento apresentava melhor resolução e menor susceptibilidade à luz difusa comparativamente aos antecessores, sendo até classificado como o instrumento mais importante para o avanço da biociência.[15]

Um sistema *stopped-flow* com detecção espectrofotométrica foi projetado em 1940 para a determinação de constantes de reações relativamente rápidas.[16] Os volumes de reagente e de amostra eram inseridos de maneira súbita e simultânea, por meio de seringas motorizadas, em uma câmara de mistura posicionada dentro de um espectrofotômetro. A formação do produto reacional era monitorada imediatamente após estas inserções quantificando-se a variação da absorbância sob condições estáticas durante um período de tempo.

Nos anos 60, os métodos cinéticos tornaram-se ferramentas mais viáveis e confiáveis, devido ao desenvolvimento em instrumentação projetada especificamente para tal fim.[17] Dentre as inovações dessa época[14], podem ser citados: sensores eletroquímicos e fotométricos de alta qualidade apropriados ao monitoramento contínuo das reações envolvidas, técnicas de mistura rápida, celas reacionais com controle de temperatura, bem como procedimentos automatizados de processamento de dados, o que permitiu uma leitura direta mais eficiente

das respostas referentes a concentrações ou atividades cinéticas e diminuiu o trabalho tedioso até então associado aos métodos cinéticos.

Desde então, a exploração de métodos cinéticos de análises químicas tem apresentado diversas tendências[18]:

- crescente uso de "automação inteligente";
- crescente aplicação a análises multidimensionais;
- contínuo desenvolvimento de estratégias de processamento de dados;
- progressos em procedimentos de compensação de erros;
- inovações em métodos cinéticos multicomponentes;
- expansão das aplicações envolvendo determinações cinéticas.

Consequentemente, os métodos cinéticos de análises tem se tornado mais confiáveis e seletivos, além de menos dependentes das condições experimentais. Tais métodos podem ser classificados de diferentes maneiras.[19]

Em função das características reacionais, os métodos cinéticos podem explorar reações não-catalisadas ou catalisadas, estas últimas frequentemente envolvendo enzimas, como no mecanismo de Michaelis[12], representado pela Eq.1:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad \text{..... (1)}$$

onde: E = enzima que reage com o substrato (S) à taxa k_1; ES = espécie química intermediária que se decompõe à taxa k_2; P = produto. A regeneração de E caracteriza o ciclo catalítico.

Os métodos catalíticos são importantes representantes dos métodos cinéticos de análises e, na maioria dos casos, exploram reações de oxi-redução (reações indicadoras) sobre as quais o analito atua como catalisador, substrato ou modificador (ativador ou inibidor).[19]

Conforme a metodologia de manipulação dos dados, os métodos cinéticos podem envolver determinações únicas ou simultâneas. Para a determinação de uma única espécie envolvendo reação catalisada (indicadora), o analito pode ser quantificado a partir de métodos integrais ou métodos diferenciais de análise dos dados; para dois ou mais analitos, são utilizados procedimentos de análise cinética diferencial (do inglês *differential kinetic analysis*), onde as diferentes taxas reacionais dos analitos frente a um mesmo reagente são exploradas e os produtos reacionais, em geral similares, são simultaneamente monitorados.[19]

O objetivo geral dos métodos cinéticos multicomponentes explorando análise cinética diferencial é a deteminação de parâmetros cinéticos ou das concentrações analíticas de uma mistura de componentes[3], conforme Eq. 2:

$$E_i + R \xrightarrow{k_i} P_i \quad \text{.....} \quad (2)$$

onde: E_i = espécies químicas em concentrações C_i que interagem com um reagente em comum (R) a taxas reacionais distintas, representadas por k_i, formando produtos similares, mas não idênticos, P_i.

Devido às baixas concentrações C_i, a concentração R tende a ser constante. Consequentemente, cinéticas de pseudo-primeira ordem (Eq. 3) tem sido frequentemente relatadas:

$$E_i \xrightarrow{k'_i} P_i \quad \text{.....} \quad (3)$$

onde: $k'_i = k_i$ [R].

Para confirmar a pseudo-primeira ordem, a validade da Eq. 3 pode ser experimentalmente verificada, variando-se C_i.

Dependendo das diferenças entre as taxas reacionais (k_i), são utilizadas diferentes estratégias para a resolução das misturas multi-analitos.

Em análises cinéticas diferenciais envolvendo dois analitos, esta resolução torna-se mais simples, especialmente quando a diferença entre as taxas reacionais é suficientemente grande, pois cada espécie pode ser tratada separadamente. Assume-se que, a qualquer instante, apenas uma espécie está reagindo e a outra já reagiu completamente, ou está reagindo tão lentamente a ponto de não interferir na reação de interesse. Porém, quando a diferença entre as taxas é pequena, a estratégia citada acima não pode ser aplicada, pois o pressuposto de que uma das reações pode ser negligenciada não é válido.[3] Neste caso, podem ser aplicados outros procedimentos, tais como:

- mascaramento (do inglês *masking*): com a inserção de um agente mascarante, o equilíbrio de uma das espécies é deslocado, de forma a não reagir conjuntamente com a espécie de interesse;
- mudanças cinéticas no sistema: as características do reagente e/ou do ambiente reacional são alteradas de forma a se obter diferenças adequadas das taxas reacionais;

- extrapolação gráfica: os dados referentes a concentrações e seus respectivos instantes de aquisição são plotados de acordo com uma função compatível com a ordem da reação envolvida, e o gráfico resultante é levado em consideração para se obter as concentrações iniciais dos analitos;
- equações proporcionais: a Eq. 3 é simultaneamente resolvida para os analitos envolvidos; é necessário que a taxa de cada reação individual não seja alterada pela presença das outras espécies E, e que os sinais analíticos sejam aditivos.

A crescente utilização de computadores em laboratórios químicos colaborou muito com os métodos cinéticos multicomponentes, especialmente em relação ao último dos procedimentos acima mencionados. Se as reações químicas apresentam relações concentração / tempo não-lineares, estas podem ser prontamente modeladas com o auxílio computacional. Neste sentido, Pausch e Mergerum[20] descreveram um método utilizando de 30 a 60 equações proporcionais simultâneas. O emprego de computador tem sido altamente vantajoso também em métodos como linear simplificado por mínimos quadrados (do inglês *Simplified linear least squares*), regressão não-linear (do inglês *Non-linear regression*), filtro Kalman (do inglês *Kalman filter*) ou ainda a exploração de múltiplos comprimentos de onda (do inglês *Multi-wavelenght detection*).[3]

Calibração multivariada baseada em regressão clássica por mínimos quadrados (CLSR, do inglês *Classical Least Squares Regression*), regressão por componentes principais (PCR, *Principal Component Regression*), regressão parcial por mínimos quadrados (PLS, *Partial Least Squares Regression*) e redes neurais artificiais (ANNs, *Artificial Neural Networks*), também são muito adequadas para determinações explorando cinéticas reacionais devido à habilidade de processamento de grandes volumes de dados.[2] Alguns exemplos são mencionados a seguir.

Estudos de alguns aspectos cinéticos associados ao cérebro necessitaram da determinação das taxas de oxidação de alguns compostos sintetizados como novos sistemas de transporte químico (CDS, do inglês *chemical delivery systems*). Para o monitoramento das concentrações destes compostos, foi utilizada a calibração CLSR para a resolução dos diferentes espectros de absorção, os quais eram obtidos a partir de método espectrofotométrico *in vitro*.[21]

Determinações simultâneas de Ga^{3+} e Al^{3+} envolvendo PCR foram efetuadas em amostras mistas a partir de sistema de análises químicas em fluxo com paragem da zona de amostra*[22] e detecção espectrofotométrica baseado nas suas diferentes taxas reacionais frente ao reagente 4-(2-piridilazo) resorcinol em meio alcalino.[23] Outro exemplo referente a PCR é a determinação espectrofotométrica de Cr^{6+} e de W^{6+} baseada em reação indicadora de oxidação de I^- por H_2O_2 em meio ácido.[24]

Aminoácidos utilizados em formulações farmacêuticas para tratamento do sistema nervoso central humano foram determinados espectrofotometricamente por método implementado em um sistema de análises químicas por injeção em fluxo e paragem da zona de amostra.[25] As diferentes taxas de oxidação dos analitos por periodato foram exploradas com o auxílio de PLS. A mesma ferramenta quimiométrica foi utilizada para a resolução de uma mistura ternária de íons metálicos: Fe^{2+}, Ni^{2+} e Zn^{2+}; as diferentes taxas de reação / retenção com 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol, imobilizado em fase sólida, foram exploradas.[26]

Uma mistura de aminoácidos, neste caso glicina e lisina em amostra sintética[27], foi analisada em método fundamentado nas reações com 1,2-naftoquinona-4-sulfonato onde ambos eram simultaneamente determinados utilizando-se ANNs. Antioxidantes utilizados em produtos alimentícios[28] foram simultaneamente determinados utilizando-se calibração multivariada, onde os analitos reduziam Fe^{3+} a diferentes taxas e as quantificações eram realizadas indiretamente a partir do monitoramento espectrofotométrico do produto formado na reação entre Fe^{2+} e o reagente cromogênico 2,2'-dipiridil; diferentes técnicas de calibração multivariada foram comparadas, e ANNs mostrou-se mais vantajosa.

Em virtude da importância adquirida ao longo do tempo, periódicos especializados[29,30], assim como volume especial[31] em periódico de grande circulação na área química, têm sido dedicados aos métodos explorando abordagens quimiométricas. Essas ferramentas seguem em geral algumas etapas[2,8,32] descritas sucintamente a seguir.

Os dados originais são organizados em duas matrizes: $\mathbf{X}_{(n \times m)}$, de variáveis independentes (matriz de dados experimentais); e $\mathbf{Y}_{(n \times p)}$, de variáveis dependentes (matriz de respostas experimentais, concentrações por exemplo). Cada linha (*n*) representa uma amostra (ressalte-se que ambas as matrizes devem possuir o mesmo número de amostras), cada coluna (*m*) da matriz **X** corresponde a um sensor e cada coluna (*p*) da matriz **Y,** ao(s) analito(s) em estudo.

---

* Neste texto, esta expressão se refere a *zone stoppng* (*stopped-flow)* e *zone trapping*.

Esses dados geralmente são pré-tratados, após a organização nas matrizes acima descritas, visando reduzir o efeito deletério de possíveis má distribuições, que poderiam dificultar a extração de informações úteis e a interpretação dos mesmos. Dentre os métodos de pré-tratamento utilizados, destacam-se a centragem na média e o auto-escalamento dos dados; no primeiro, calcula-se a média dos valores para cada coluna e subtrai-se cada valor do respectivo valor médio, e no segundo, os dados são centrados na média e divididos pelo respectivo desvio padrão, sendo um para cada coluna da matriz.

Após o pré-tratamento, as matrizes **X** e **Y** são decompostas em vetores: de escores (do inglês *scores*), que são as novas coordenadas das amostras, utilizando-se um novo conjunto de eixos; e de pesos (do inglês *loadings*), que representam os pesos das contribuições dos antigos eixos (quanto cada variável antiga contribui) e são os cossenos dos ângulos entre os eixos originais e o novo eixo gerado. Gera-se ainda uma matriz de ruídos estatísticos, que são resíduos de dados não modelados; e o produto destes vetores origina as variáveis latentes. Representação da decomposição das matrizes é dada na Figura 1.

Realiza-se então a etapa de modelagem (ou calibração), onde se estabelece uma relação matemática entre as matrizes. Nesta etapa, utilizam-se diversas amostras (padrões) de concentrações conhecidas dentro de um intervalo de concentração (faixa analítica) pré-estabelecido. Posteriormente, procede-se à etapa de validação, na qual é verificada a capacidade de previsão do modelo, utilizando preferencialmente amostras (padrões) não utilizadas na etapa anterior.

A qualidade do conjunto de amostras utilizado na etapa de calibração é avaliada por intermédio da análise de amostras anômalas (do inglês *outliers*), que pode ser feita a partir de análise gráfica das grandezas *leverage* e resíduos de *Student*; estes representam medidas da influência de cada amostra no conjunto. [2,8,32]

Após as etapas de calibração, otimização (remoção de amostras anômalas do conjunto inicialmente utilizado) e validação, o modelo pode ser aplicado a amostras com concentrações desconhecidas.

Métodos de calibração multivariada como CLSR podem utilizar um grande volume de dados (toda informação contida na matriz **X**) para construção de modelos; este necessita, entretanto, do conhecimento da concentração de todas as eventuais espécies interferentes. Esse problema pode ser solucionado com a utilização de PCR ou PLS: estes incluem somente as variáveis relevantes na construção dos modelos, o que resulta em calibrações mais eficientes e possibilita a construção de modelos mesmo com a presença de interferentes, além de serem mais eficientes para contornar problemas relativos a ruídos experimentais,

colinearidades e não linearidades; adicionalmente, o método PLS é menos susceptível, comparativamente a PCR, a erros decorrentes de flutuações significativas de variáveis[2,8,32]. E, comparativamente a ANNs, a calibração por PLS fornece, em muitos casos, resultados semelhantes utilizando um menor número de amostras para construção de modelos. [2]

Na calibração explorando PLS[8,11,32], a matriz dos dados originais é manipulada, executando-se rotações dos eixos de forma a representar variações presentes em muitas variáveis através de número menor de fatores, ortogonais entre si, conhecidos como variáveis latentes. Os dados representados por um conjunto de eixos passa a ser representado por um novo, contendo um menor número de eixos, reduzindo assim, a dimensionalidade do conjunto de dados. Estes novos eixos são traçados de forma a descrever a maior variação (variância) ou espalhamento entre os dados, utilizando o menor número possível de eixos.

Para a avaliação do desempenho dos modelos gerados, podem ser utilizados métodos de validação cruzada, como por exemplo, o *leave one out*[33], onde procede-se à remoção sucessiva de todas as amostras (uma de cada vez) do conjunto de treinamento, e constrói-se um modelo com as demais amostras. E a partir de estimativas dos erros de calibração, dadas pela raiz quadrada média dos erros de validação cruzada (RMSECV, do inglês *root mean square error of cross-validation*), e das porcentagens de variância capturadas estima-se o número ideal de variáveis latentes para cada modelo.

A raiz quadrada média dos erros de previsão (RMSEP, do inglês *root mean square error of prediction*, Eq. 4) é um parâmetro utilizado para a avaliação dos erros de previsão e é uma estimativa do desvio padrão relativo destas:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad \text{..... (4)}$$

onde, ŷ = valor previsto pelo modelo; y = valor da propriedade; n = número de amostras.

Em análises multicomponentes, a calibração por PLS pode ser feita com regressões separadas para cada analito, ou seja, apenas uma coluna na matriz Y (PLS-1); e também com uma única regressão para vários analitos ao mesmo tempo (PLS-2). Apesar de PLS-1 apresentar igual, ou melhor, acurácia nas previsões, PLS-2 apresenta algumas vantagens relativamente à primeira:[11]

- existência de um conjunto de fatores comuns a todos os analitos, o que simplifica a interpretação e possibilita uma inspeção gráfica simultânea;
- com uma alta correlação entre as concentrações dos analitos espera-se que o modelo PLS-2 seja mais robusto que os modelos separados PLS-1;
- para um grande número de analitos, a construção de um único modelo para estes é mais fácil e muito mais rápida.

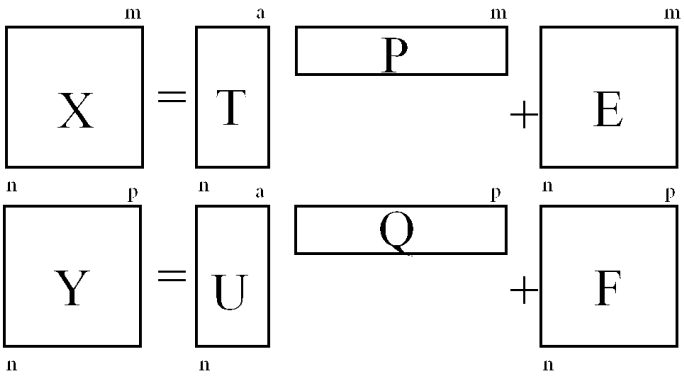

Figura 1 - Decomposição de matrizes

Cada quadro representa uma matriz, onde: X e Y = dados originais; T e U = escores; P e Q = pesos; E e F = ruídos estatísticos. Para mais detalhes, V. texto.

2.2. Cinética diferencial em sistemas de análises químicas por injeção em fluxo

O conceito de análises por injeção em fluxo (FIA, do inglês *flow injection analysis*) envolve medidas analíticas baseadas em sinais transientes, e pode ser eficazmente aplicado a métodos analíticos explorando cinética reacional. Um desenvolvimento crescente de sistemas FIA projetados para utilização em métodos multicomponentes baseados em cinética diferencial tem sido notado[5], e diferentes configurações do módulo de análises tem sido propostas. Estas configurações podem ser associadas a um único detector ou a diversas unidades de detecção (neste caso, mais de um detector mono-canal ou um detector multi-canais), conforme exibido na Figura 2, sendo especificadas a seguir:

a) Único detector:

- bifurcação / convergência de fluxo (do inglês *splitting / merging*)[34]: a zona de amostra é bifurcada e as alíquotas geradas, após passarem por diferentes percursos analíticos (condições reacionais), convergem antes de chegar ao detector (Figura 2a);

- inserção simultânea / convergência [35] : alíquotas da amostra são inseridas simultaneamente em percursos analíticos (condições reacionais) diferentes, convergindo antes do detector (Figura 2b);
- FIA reverso (do inglês *reversed FIA*)[5]: alíquotas de reagentes são sequencialmente inseridas em um fluxo da amostra (Figura 2c);
- interpenetração das zonas (do inglês *zone penetration*)[36]: zonas de amostra e reagente interagem durante a sobreposição gradual destas, à medida em que são propulsionadas até o detector (Figura 2d);
- cubetas de fluxo alinhadas[37]: cubetas de fluxo são posicionadas ao longo do feixe óptico de um único espetrofotômetro (Figura 2e);
- configuração fechado-aberto (do inglês *closed-open*)[37]: a zona de amostra é aprisionada em um circuito fechado contendo o detector, e uma segunda bomba peristáltica propulsiona a zona de amostra dentro do circuito (Figura 2f);
- substituição de reatores (do inglês *reactor replacement*)[38]: configuração onde cada comutação do injetor representa a inserção de diferentes alíquotas de amostra, em diferentes percursos analíticos, e consequentemente diferentes condições reacionais (Figura 2g);
- detecção multi-localizada (do inglês *multi-site detection*)[39]: a cubeta de fluxo é posicionada no módulo de análises de modo que cada comutação do injetor permita monitoramentos do produto formado em diferentes locais do percurso analítico (condições reacionais) (Figura 2h).

b) duas (ou mais) unidades de detecção:

- unidades de detecção em série[40]: diversos detectores são posicionados em série no módulo de análises (Figura 2i);
- bifurcação / detecção independente[41]: a zona de amostra é bifurcada e as alíquotas resultantes passam por percursos diferentes até os respectivos detectores (Figura 2j);
- inserção simultânea / detecção independente[5]: alíquotas de amostra são inseridas simultaneamente em percursos analíticos diferentes e os produtos formados são monitorados em detectores independentes (Figura 2k).

Alguns exemplos das diferentes configurações dos módulos de análise de sistemas FIA explorando cinética diferencial são dados a seguir.

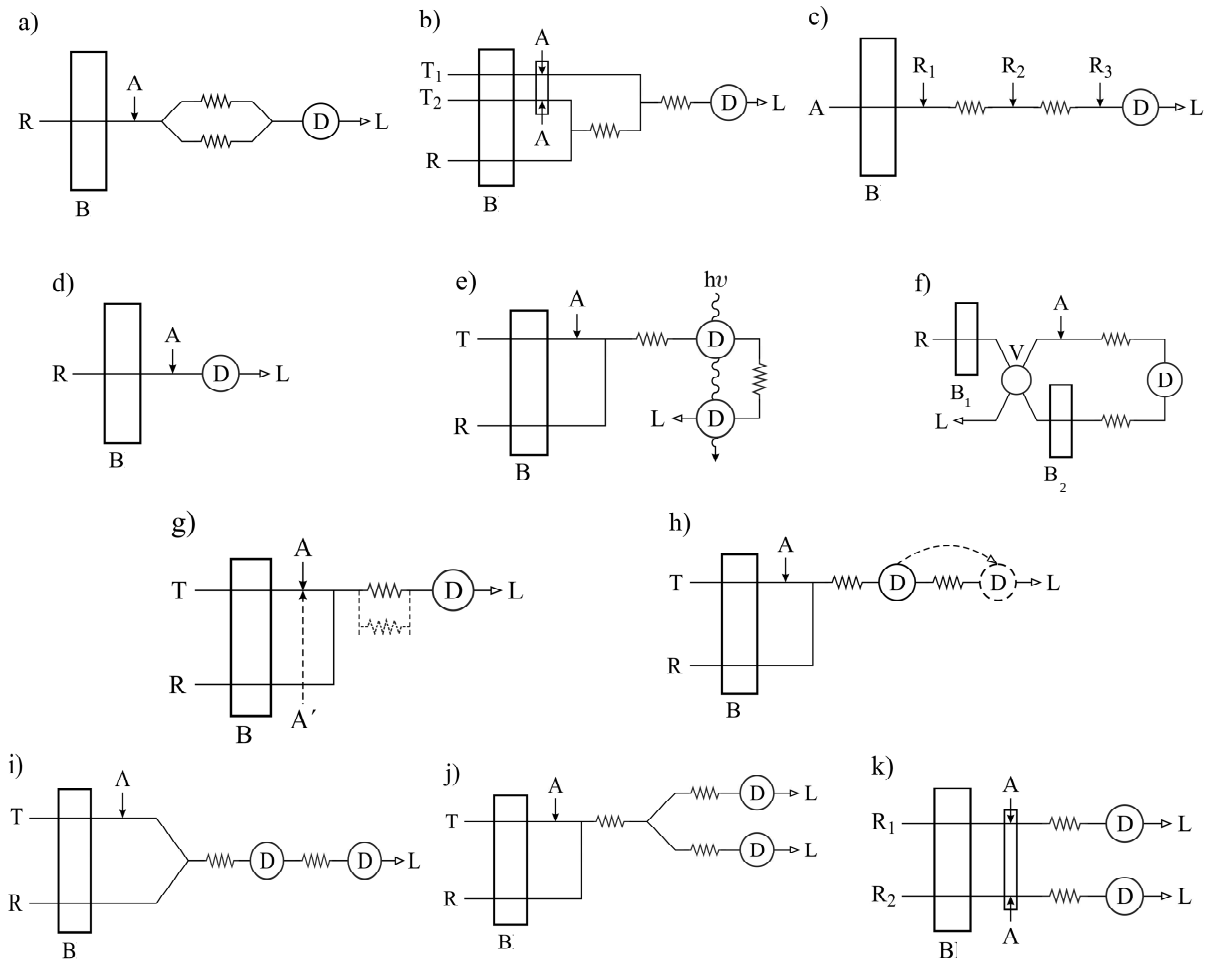

Figura 2 - Configurações comumente utilizadas em sistemas FIA para determinações multicomponetes explorando cinética reacional

B_i = bomba propulsora de fluidos; A / A' = amostra; T_i = solução transportadora; R_i = reagente; L = recipiente para descarte; hν = feixe de luz incidente; D = unidade de detecção. Linha tracejada = *status* alternativo do módulo de análises

O método pioneiro[40] explorando cinética diferencial em sistema FIA foi proposto em 1979 e apresentado como o primeiro de uma série de três artigos versando sobre o tema, do mesmo grupo de pesquisas. Determinações simultâneas de Mg^{2+} e Sr^{2+} foram realizadas a partir das diferentes taxas de dissociação ácida dos complexos formados entre os metais e o reagente *trans*-1,2-diaminociclohexanotetraacetato (CDTA), utilizando íon cúprico como sequestrador (do inglês *scavenger*). A configuração especificada na Figura 2i, envolvendo dois detectores em linha, foi utilizada e os sinais analíticos provenientes dos dois picos,

correspondentes às absorbâncias dos produtos formados (complexos Cu-CDTA), foram utilizados para resolução da mistura binária pelo método das equações proporcionais.

A estratégia acima não podia ser utilizada para resolução de misturas nas quais as diferenças de taxas reacionais de dissociação não fossem suficientemente grandes, como no caso envolvendo Mg^{2+} e Ca^{2+}. Esta limitação foi superada[42] utilizando-se um sistema semelhante ao primeiro, porém explorando as taxas de dissociação dos complexos metal-(2.2.1)criptatos e empregando íon sódio como sequestrador. Nestas condições, o primeiro pico registrado refletia predominantemente a concentração de Mg^{2+} e o segundo, a soma das contribuições de ambos os analitos, possibilitando assim a quantificação de Ca^{2+} e de Mg^{2+}.

O terceiro artigo[35] versou sobre a resolução de misturas entre Sr^{2+} e Mg^{2+} ou Ca^{2+}, onde o ligante utilizado foi o (2.2.2)criptato e o sequestrador foi o íon potássio. Nesse trabalho, porém, as detecções eram realizadas monitorando-se os produtos formados em reações paralelas entre o reagente cromogênico ftaleína complexona (do inglês *phthalein complexone*) e os íons metálicos liberados na dissociação dos metal-(2.2.2)criptatos. Duas configurações foram utilizadas, sendo uma semelhante às anteriores (utilizando dois detectores) e outra envolvendo a inserção dupla de alíquotas de amostra que, depois de passarem por percursos e condições reacionais diferentes, convergiam (Figura 2b) para uma câmara de mistura (do inglês *mixing chamber*) antes de serem direcionadas ao detector. As mensurações, semelhantemente ao segundo artigo da série, foram realizadas por combinações dos resultados dos dois picos, referentes às concentrações dos analitos, sendo a reação de Sr^{2+}, a reação mais lenta.

Alguns métodos cinéticos clássicos potencialmente seletivos, pouco utilizados em procedimentos manuais por serem muito dependentes da reprodutibilidade temporal, tanto do produto formado quanto dos reagentes utilizados, ganharam confiabilidade quando aplicados a sistemas FIA.[43] Neste sentido, outros métodos utilizando enzimas tem sido eficientemente conduzidos em sistemas FIA.[19] Outra vertente dos sistemas FIA, eficientemente explorada em métodos cinéticos de análises, é a paragem da zona de amostra[43,44] que permite se aumentar o tempo de residência e, consequentemente, a sensibilidade sem aumentar a dispersão, é utilizado com sucesso em medidas de taxas reacionais, servindo assim como base para as leituras analíticas.

Os pesticidas clorpirifós e carbaril foram simultaneamente determinados em formulações comerciais a partir das taxas de degradação dos compostos frente a H_2O_2 em meio alcalino. Foram utilizados sistemas FIA com paragem da zona de amostra (com

configuração semelhante à Figura 2d), explorando-se cinética diferencial em métodos envolvendo equações proporcionais[45] e regressões[46] PLS-1 e PLS-2.

O conceito de bifurcação da zona de amostra em sistemas FIA foi proposto[47] em 1976, visando o aumento da frequência analítica, assim como a expansão da faixa dinâmica de concentrações. Apesar de não ser um método cinético de análise, os autores já previam a possibilidade da utilização dessa estratégia em tais métodos.

A crescente utilização de bifurcação da zona de amostra em métodos multicomponentes levou a estudo criterioso[34] onde as caraterísticas geométricas e hidrodinâmicas desse tipo de configuração (Figura 2a) foram utilizadas em expressões que possibilitaram a previsão de taxas de divisão da alíquota de amostra inserida; testes utilizando solução de verde de bromocresol demonstraram concordância com previsões teóricas.

Determinções de Mn^{2+} e Fe^{3+} foram realizadas sequencial e simultaneamente por métodos catalítico-fluorimétricos em sistemas FIA. [48] No primeiro caso, dois fluxos transportadores diferentes eram inseridos sequencialmente, com a utilização de uma válvula-solenóide e, as diferentes interações com a mistura binária geravam sinais proporcionais às concentrações, os quais eram combinados para quantificar os analitos. No modo simultâneo, foram abordadas as diferenças das taxas reacionais de catálise em configuração que apresentava bifurcação da zona de amostra seguida de convergência das alíquotas (Figura 2a), após passagem destas por diferentes percursos analíticos.

Diferentes configurações utilizando uma ou duas cubetas de fluxo e um detector (*cf.* Figuras 2a, 2e, 2j) foram propostas para implementação de análises cinéticas diferenciais em sistemas FIA para determinações simultâneas de Ni^{2+} e Co^{2+}. [41] Com base nas diferentes taxas reacionais foram estabelecidas equações proporcionais para as quantificações.

O aprimoramento[49] dos métodos explorando bifurcação da zona de amostra foi obtido com a utilização de uma válvula-solenóide de três vias controladas por computador, em um sistema FIA envolvendo multicomutação (do inglês *multicommutation*), onde a zona de amostra era bifurcada com maior acurácia por meio do dispositivo; como aplicação foi utilizada determinação espectrofotométrica simultânea de Cu^{2+} e Zn^{2+} em digeridos de plantas.

Utilizando-se agentes mascarantes e controle de pH apropriados, foi proposto um sistema FIA com uma configuração simples (*cf.* Figura 2d), compreendida por inserção de uma alíquota de amostra, confluindo com dois reagentes / mascarantes antes de passar por um detector e, explorando cinéticas reacionais visando a especiação de compostos clorados (cloro, dióxido de cloro, íon clorito e íon clorato) em águas potáveis, alcançando-se limites de

detecção abaixo daqueles estabelecidos pela USEPA (do inglês *United States Environmental Protection Agency*).[50]

Baseando-se na formação de um complexo colorido com 1,2-dihidroxibenzeno-3,5-dissulfonato de sódio e explorando-se a aceleração da oxidação de Fe^{2+} com utilização de radiação UV, Fe^{2+} e Fe total foram determinados simultaneamente utilizando-se dois sistemas. [37] Em um destes, a zona de amostra passava por duas cubetas de fluxo posicionadas em série (Figura 2e), com uma fonte de luz UV entre estas; elas eram alinhadas de forma que fossem monitoradas simultaneamente por um único detector. Na outra configuração, a zona de amostra era aprisionada (Figura 2f), com o auxílio de uma válvula, em um circuito fechado compreendendo o detector, a fonte de radiação UV e uma segunda bomba peristáltica, que propulsionava a zona de amostra dentro do circuito, propiciando assim, repetidas mensurações de uma mesma alíquota de amostra, até que esta fosse completamente dispersa na solução transportadora / reagente.

A exploração de diferenças nas taxas reacionais frente a um mesmo reagente, em análises em fluxo, pode ser realizada a partir de diferentes estratégias como: injeções múltiplas, bifurcação da zona de amostra, substituição de reatores, detecção multi-localizada, paragem da zona de amostra, etc. Entretanto, visando a concepção de um sistema cuja arquitetura fosse mais simples e sem a necessidade de um controle de tempo externo ao sistema, foi proposto um sistema para determinação de ferro e vanádio em ligas metálicas, baseado na influência catalítica desses sobre a taxa de oxidação de iodeto por dicromato sob condições ácidas. Medidas sucessivas ao longo dos gradientes de concentração gerados na zona de amostra (referentes a diferentes elementos de fluido e a diferentes tempos de reação), passando pelo detector, foram exploradas num sistema constituido por mini bombas-solenóide e a análise dos dados foi realizada a partir da ferramenta quimiométrica PLS-2.[51]

Um método semelhante[52] foi proposto para os mesmos analitos e mesma matriz anteriores. Nesse caso, porém, foram exploradas inserções sucessivas de alíquotas de amostra e os pontos, ou sensores, escolhidos foram os máximos e os mínimos (correspondentes às sobreposições das sucessivas zonas de amostra) de absorbância gerados; a justificativa da escolha de tais sensores baseou-se na maior acurácia representada por tais pontos.[53]

2.3. O reagente 5-Br-PADAP

Os azo reagentes[10], ou azo corantes, compreendem um grupo de reagentes orgânicos largamente empregados em análises espectrofotométricas. 5-Br-PADAP (Figura 3) é um exemplo desses reagentes: derivado do 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR), é um excelente reagente para diversos metais e foi sintetizado[54] buscando-se melhores seletividade e sensibilidade desse tipo de compostos heterocíclicos. Apresenta valores de absorptividade molar dos complexos formados com cobre e níquel de 1,0 e 1,28 x 10^5 L mol^{-1} cm^{-1}, respectivamente, valores superiores aos dos complexos envolvendo PAR.

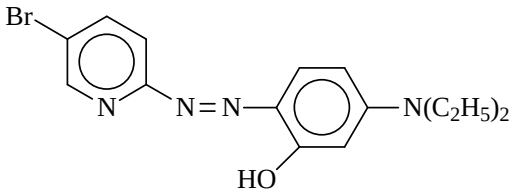

Figura 3 - Estrutura do 5-Br-PADAP

Os métodos empregando 5-Br-PADAP como reagente são muito utilizados, como pode ser constatado em função de inúmeros trabalhos relatando seu uso para determinações de íons metálicos.[10] Entretanto, as estruturas dos complexos com ele formados ainda é alvo de estudos.

Apesar de não haver um consenso, os produtos formados na reação com Cu^{2+} parecem seguir o descrito por Shibata[54], que descreve a formação de complexos com a razão molar Cu^{2+} : 5-Br-PADAP, de 1 : 2 para valores de pH mais altos do que 6, e de 1 : 1 para valores mais baixos. Essa constatação é corroborada por métodos baseados em técnicas como espectrofotometria[55-57], voltametria[58] e espectrometria de massas[59,60].

Já os complexos formados com Ni^{2+} apresentam razões molares metal : ligante de 1: 2, para ambientes reacionais ácidos ou alcalinos, conforme confirmado por técnicas espetrofotométricas[55,57, 61] e espectrometria de massas[59]. Entretanto, razão discordante foi atribuída ao mesmo complexo em trabalho publicado por Watarai[62], onde foi utilizada uma técnica espectrofotométrica baseada no mecanismo de reação interfacial, encontrando-se uma razão molar de 1 : 1, para $4 < pH < 7$.

Apesar de 5-Br-PADAP ser muito utilizado em métodos espectrofotométricos para determinações de íons metálicos, são raros os trabalhos versando sobre a utilização deste reagente em métodos multicomponentes explorando cinética diferencial.

Determinações simultâneas de Zn^{2+} e Cd^{2+} em amostras aquosas foram realizadas baseando-se em suas diferentes taxas reacionais frente ao reagente. Este foi imobilizado em uma fase sólida do polímero XAD-4 e carregado (do inglês *loaded*) na região central de uma cubeta de fluxo, onde os sinais relativos às mudanças em reflectância decorrentes das formações dos complexos M-[5-Br-PADAP]$_n$ (M = Zn^{2+} ou Cd^{2+}) eram monitorados em comprimento de onda único por sensor químico de fibra óptica (do inglês *optical fiber chemical sensor*). A quantificação dos analitos foi realizada via regressão por mínimos quadrados.[63]

Diferenças em taxas reacionais também foram exploradas para determinações simultâneas de Cu^{2+} e Ni^{2+} em sistema FIA explorando detecção multi-localizada. Os analitos, reagindo a diferentes taxas, eram monitorados espectrofotometricamente e determinados por método de equações proporcionais.[39]

3. EXPERIMENTAL

3.1. Material

O módulo de análises era constituído por:

- bomba peristáltica Ismatec® IPC-4 V 2.00, provida de tubos de bombeamento de Tygon com diferentes diâmetros internos;
- injetor-comutador[64] fabricado no CENA-USP, para inserção das alíquotas de amostras no percurso analítico;
- sistema de aquecimento em linha Watlow® com controlador 1/32 DIN série SD;
- sistema de detecção Ocean Optics, Inc. composto por uma cubeta de fluxo tipo Z de 18 µL de volume interno e 10 mm de caminho óptico, uma fonte de luz com lâmpada de tungstênio e um espectrofotômetro modelo USB 4000; estas unidades eram conectadas entre si através de fibras ópticas, e o espectrofotômetro, diretamente a um computador por cabo USB, para transferência de dados;
- linhas de transmissão, alças de amostragem e reatores tubulares helicoidais, fabricados com tubos de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm;
- demais acessórios e vidraria de uso rotineiro em laboratórios de química.

O monitoramento dos produtos formados foi feito a 562 nm, utilizando-se o *software* SpectraSuite, do mesmo fabricante do sistema de detecção. A espectrofotometria a duplo comprimento de onda[65] foi utilizada para compensação de eventuais distorções dos sinais analíticos devidas ao efeito Schlieren, que são resultado de mesclas mal sucedidas e/ou gradientes de concentração entre soluções[66].

Foram utlizados 50 ms como tempo de integração dos sinais e médias de 50 leituras, além de alisamento (do inglês *smoothing*) dos sinais obtidos baseado na média móvel de 30 pontos.

As medidas das absorbâncias máximas e mínimas locais[52] consideradas foram dispostas em matrizes de variáveis independentes $\mathbf{X}_{(n\ x\ m)}$ onde cada linha (n) representou uma amostra e cada coluna (m) representou um "pseudo-sensor", ou seja, cada máximo ou mínimo local considerado. Nas matrizes de variáveis dependentes $\mathbf{Y}_{(n\ x\ p)}$, cada coluna (p)

correspondeu à concentração de um analito. As etapas de cálculos, calibração e validação dos modelos foram efetuadas com o PLS *toolbox* versão 4.0.2 (Eigenvector Research, Inc.), a partir do *software* Matlab, versão 7.0 (The MathWorks, Inc.).

3.2. Soluções

Todas as soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas com água destilada-desionizada e com reagentes de grau analítico.

As soluções-padrão estoque de cobre e de níquel (200,0 mg L^{-1} Cu ou Ni) foram preparadas a partir de 0,0786 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ e 0,0896 g $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ dissolvidos em aproximadamente 80 mL de HNO_3 0,1% (v/v), sendo o volume posteriomente completado até 100,0 mL com a mesma solução ácida. As soluções-padrão mistas de trabalho (Tabela 1), contendo de 0,00 a 1,60 mg L^{-1} de cada um dos cátions, eram preparadas a partir de diluições apropriadas das soluções-padrão estoque em HNO_3 0,1% (v/v).

A solução estoque do reagente cromogênico (250 mg L^{-1}) foi preparada a partir de 0,125 g 5-Br-PADAP, que era dissolvido em 20,0 mL de etanol, adicionado a 200,0 mL de uma solução 8,0 % (v/v) do tensoativo Triton X-100, sendo então o volume completado a 500,0 mL com água.

A solução transportadora / reagente era preparada diariamente. Para o modelo de calibração escolhido, era obtida misturando-se 150,0 mL da solução estoque de 5-Br-PADAP com 100,0 mL de solução 0,20 mol L^{-1} pirofosfato de sódio ($Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$) e 0,5 mol L^{-1} solução-tampão ácido acético / acetato de sódio (CH_3COOH / CH_3COONa; pH 4,7), e completando-se o volume a 500,0 mL com água.

O reagente foi solubilizado em meio etanólico, com aquecimento (aproximadamente 50 ^oC), devido à insolubilidade deste em meio aquoso. As concentrações de Triton X-100, utilizado para aumentar a solubilidade dos complexos formados, e de pirofosfato de sódio, agente mascarante para intereferências de íons metálicos como Fe^{3+}, assim como o pH da solução-tampão foram mantidos conforme trabalho anterior[39] explorando a mesma reação.

Tabela 1 - Concentrações de Cu^{2+} e de Ni^{2+} nas soluções empregadas nas etapas de calibração e de validação dos modelos. Concentrações expressas em mg L^{-1}. Soluções * empregadas na etapa de validação

solução	cobre	níquel	solução	cobre	níquel
1	0,00	0,40	16	1,20	0,40
2	0,00	0,80	17	1,20	0,80
3	0,00	1,20	18	1,20	1,20
4	0,00	1,60	19	1,20	1,60
5	0,40	0,00	20	1,60	0,00
6	0,40	0,40	21	1,60	0,40
7	0,40	0,80	22	1,60	0,80
8	0,40	1,20	23	1,60	1,20
9	0,40	1,60	24	1,60	1,60
10	0,80	0,00	*25	0,70	0,50
11	0,80	0,40	*26	1,50	0,50
12	0,80	0,80	*27	0,50	1,40
13	0,80	1,20	*28	1,50	1,40
14	0,80	1,60	*29	0,70	1,00
15	1,20	0,00			

3.3. Amostras

O preparo das amostras fundamentou-se em informações retiradas de livro específico[67], bem como na orientação do próprio editor deste. Aproximadamente 0,1 g de limalhas de ligas metálicas eram pesadas e colocadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, aos quais eram adicionados 10,0 mL de *aqua regia* (solução 3:1 $HCl:HNO_3$ v/v). Algumas amostras necessitaram ainda da adição de 2,0 mL de HF devido à presença de silício (na forma de silicatos) e tungstênio; para as amostras que necessitaram HF, foram utilizados frascos Erlenmeyer e de armazenamento feitos de PTFE, enquanto que as outras puderam ser solubilizadas em vidraria de uso rotineiro e estocadas em frascos de vidro ou de polietileno.

As amostras com as misturas ácidas eram aquecidas em banho de areia (aproximadamente 100 ^{o}C) até completa dissolução, seguido de gradual aumento da temperatura de aquecimento para reduzir-se o volume dos ácidos e, após resfriamento à

temperatura ambiente, os volumes eram completados a 50,0 mL. As soluções resultantes foram estocadas em recipientes apropriados. Os solubilizados de amostras eram então diluídos em HNO_3 0,1% (v/v) a proporções (2 a 200 vezes) em que se adequassem às faixas de concentração acima mencionadas. As concentrações típicas dos constituintes das amostras utilizadas (informação pessoal)[†] são apresentadas na Tabela 2; saliente-se que a maioria das amostras era constituída por aços, que apresentam ferro como contituinte majoritário.

Tabela 2 - Faixas de concentrações dos constituintes das amostras de ligas metálicas. Dados expressos em % (m/m)

constituinte	concentração
Cu	0,012-3,50
Ni	0,079-11,12
Mn	0,280-1,53
P	0,009-0,035
S	0,0076-0,036
Si	0,030-9,21
C	0,048-0,916
Cr	0,060-17,37
Mo	0,010-5,54
V	0,080-2,00
N	0,0039-0,009
Al	0,009-majoritário
Fe	0,85-majoritário

[†]Informação pessoal fornecida por MATIAS, T. B., CCDM / UFSCar, em 2011.

4. MÉTODO

O método empregado neste trabalho para as determinações simultâneas de cobre e de níquel baseou-se nas formações, a diferentes taxas, de complexos entre o reagente cromogênico 5-Br-PADAP e os íons metálicos. Os espectros de absorção dos complexos formados apresentam-se na Figura 4, onde alíquotas das soluções 2, 10 e 12 (Tabela 1) foram inseridas no fluxo transportador / reagente e quando eram atingidas as absobâncias máximas, a propulsão da bomba peristática era interrompida e os espectros eram registrados. Salienta-se que as absorbâncias negativas observadas para comprimentos de onda menores do que 520 nm se devem ao fato de que o fluxo transportador era uma solução colorida. Selecionou-se para monitoramento o comprimento de onda de 562 nm e, para compensação de efeitos Schilieren, o comprimento de onda de 800 nm, em que não há absorbância significativa relativa aos produtos das reações de interesse.

A partir das diferenças em taxas reacionais procedeu-se a quantificações simultâneas dos analitos através de calibração multivariada fundamentada na ferramenta quimiométrica PLS-2.

4.1. Diagrama de fluxos

O módulo de análises (Figura 5) permitia a inserção simultânea de três alíquotas de amostra / solução-padrão no fluxo transportador / reagente, o que conferiu ao sistema uma configuração em linha única. As zonas de amostra geradas eram dirigidas até a cubeta de fluxo para serem monitoradas após passarem por diferentes condições (percursos analíticos e tempos para desenvolvimento) de reação e de dispersão, resultando em variadas distribuições, relativamente às absorbâncias, dos pontos máximos e mínimos locais explorados. Essas distribuições nortearam a calibração multivariada para discriminar e quantificar os analitos.

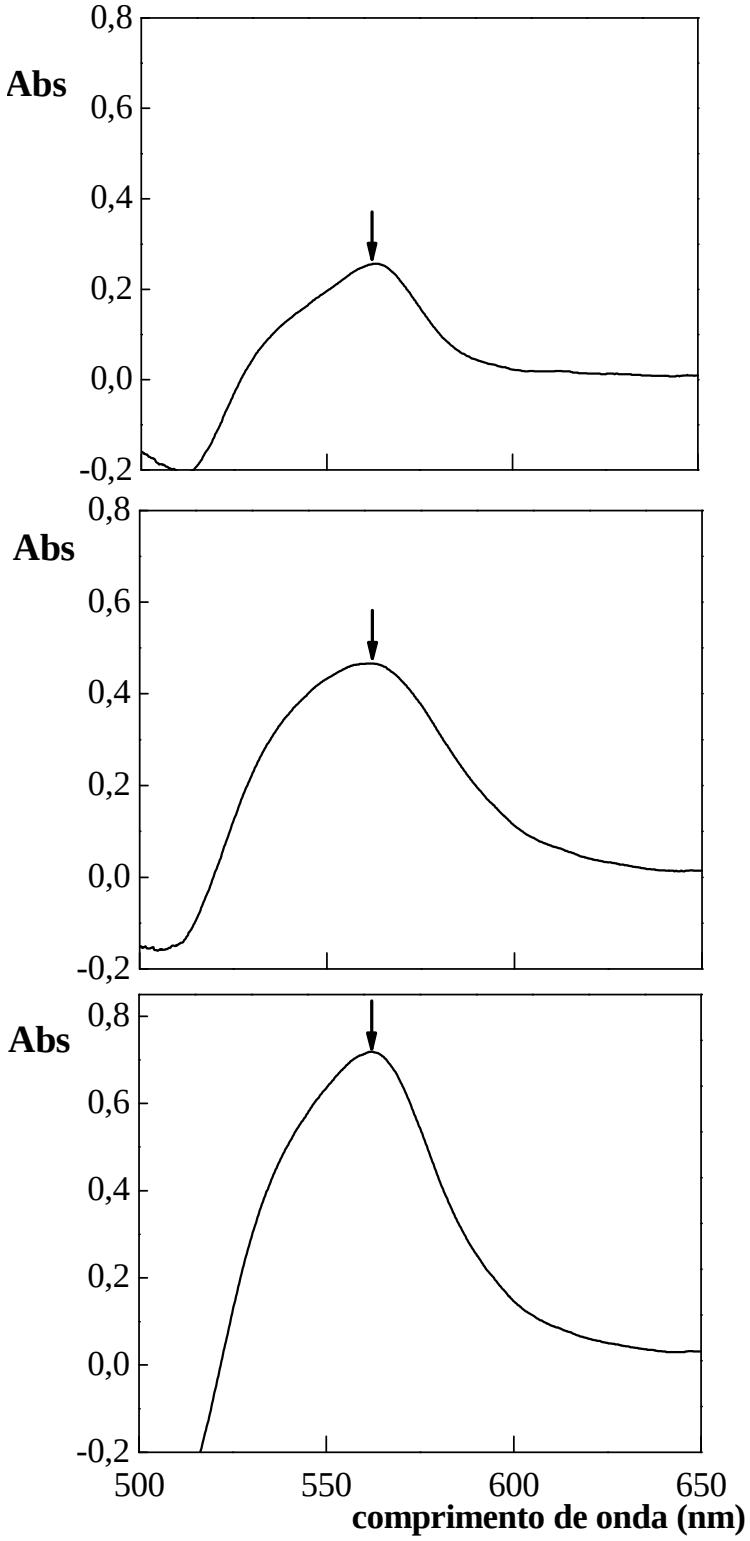

Figura 4 - Espectros de absorção

Acima: 0,8 mg L^{-1} Ni^{2+}; meio: 0,8 mg L^{-1} Cu^{2+}; abaixo: 0,8 mg L^{-1} Ni^{2+} + 0,8 mg L^{-1} Cu^{2+}. Setas = comprimento de onda utilizado para o monitoramento (562 nm)

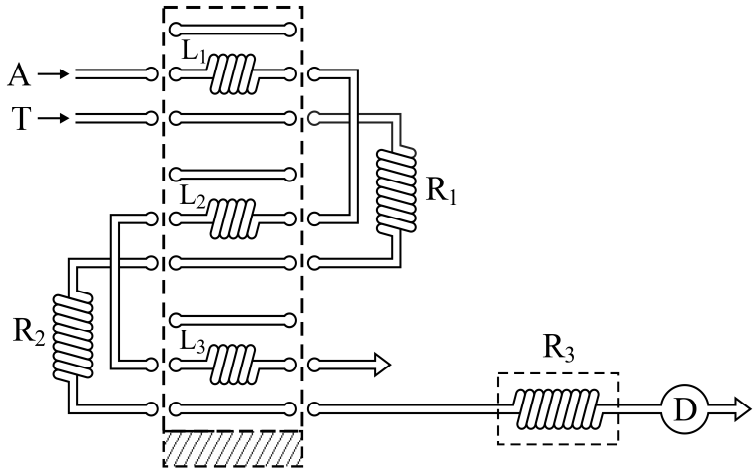

Figura 5 - Diagrama de fluxos do sistema proposto

A = amostra; T = solução transportadora / reagente; L_i = alças de amostragem; R_i = bobinas separadoras ou reacional; tracejado em R_3 = aquecimento; D = detector; área hachureada: posição alternativa do injetor-comutador. Para mais detalhes, V. texto

4.2. Influência dos principais parâmetros envolvidos

Objetivando-se uma melhor discriminação cinética, ou seja, um modelo de calibração que mantivesse o compromisso de aliar as maiores porcentagens de variâncias capturadas e os menores valores de RMSEP utilizando o menor número possível de variáveis latentes, foram avaliados univariadamente, no sistema da Figura 5, os parâmetros: concentrações da solução tampão e de 5-Br-PADAP, temperatura de aquecimento da bobina reacional (R_3), vazão da solução transportadora / reagente, comprimentos das alças de amostragem (L_i), das bobinas entre amostras (R_1 e R_2) e da bobina reacional (R_3).

4.2.1. Natureza da solução-tampão e concentração de 5-Br-PADAP

O efeito da concentração da solução tampão, ou seja, da capacidade tamponante desta, foi avaliada num intervalo de 0,5 a 1,5 mol L^{-1}, mantendo-se o pH 4,7; assim como a concentração do reagente na solução transportadora / reagente, que foi variada de 25 a 100 mg L^{-1} 5-Br-PADAP.

4.2.2. Temperatura de aquecimento da bobina reacional

A variação da temperatura do cartucho em forma cilíndrica do sistema de aquecimento em linha, ao qual era enrolada a bobina R_3, foi verificada no intervalo de 25 (temperatura ambiente) a 60 ºC; temperaturas mais altas não foram utilizadas devido ao consequente surgimento de bolhas de ar no percurso analítico.

4.2.3. Vazão

A vazão do fluxo transportador / reagente foi variada de 1,5 a 3,9 mL min^{-1}; valores mais baixos não foram utilizados, pois prejudicariam sobremaneira a frequência analítica, ao passo que vazões mais altas prejudicariam a formação dos produtos das reações envolvidas bem como poderia resultar em excessiva pressão hidrodinâmica do sistema.

4.2.4. Comprimentos das alças de amostragem e das bobinas

Diferentes combinações de volumes de amostra inseridos (L_i) foram estudadas empregando-se três comprimentos de alças de amostragem: 25, 50 e 75 cm (*ca* 125, 250 e 375 µL, respectivamente). As distâncias entre as três zonas de amostra geradas (R_1 e R_2) também foram avaliadas utilizando-se diferentes combinações de bobinas medindo 75, 150 e 225 cm (*ca* 375, 750 e 1120 µL, respectivamente). Como estas distâncias entre as zonas de amostra estão diretamente relacionadas à sobreposição destas, necessitou-se que tivessem volumes que não ocasionassem a separação completa das zonas e, ao mesmo tempo, que não aproximassem demasiadamente os pontos mínimos dos máximos locais utilizados no tratamento de dados. Adicionalmente, a bobina reacional (R_3) foi avaliada entre 100 e 250 cm (500 e 1250 µL); volumes maiores prejudicavam sobremaneira a frequência analítica.

4.3. Construção dos modelos de calibração

Previamente à construção de modelos utilizando PLS-2 procedeu-se ao pré-tratamento das matrizes **X** e **Y**, utilizando-se método de centragem na média. A qualidade do conjunto de dados utilizado na etapa de calibração foi avaliada por análise de amostras anômalas, e cada modelo gerado foi submetido à validação cruzada, por meio do método *leave one out*. Definiu-se então o número ideal de variáveis latentes para cada um dos modelos levando-se em consideração as porcentagens de variância capturadas e os erros de validação cruzada atrelados a ele.

Os modelos foram construídos utilizando-se duas ou três variáveis latentes e as melhores condições, que resultaram no melhor modelo de calibração, foram escolhidas de forma a se obter melhor precisão das previsões. A capacidade de previsão para amostras reais foi avaliada utilizando-se os resultados obtidos por ICP OES [68] em amostras de ligas metálicas.

4.4. Espécies interferentes

Espécies potencialmente intereferentes (Cd^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Pb^{2+}, Fe^{3+}, Al^{3+}, Zr^{4+}, Ag^{+}, Hg^{2+}, Co^{2+})[10] para a reação com o 5-Br-PADAP foram avaliados em razões de massas Ni:Cu:I (I = espécie possivelmente interferente) de 1 : 1 : 1; 1 : 1 : 10 e 1 : 1 : 100. Adicionavam-se os possíveis interferentes, nestas proporções, em soluções-padrão contendo 1,00 mg L^{-1} Ni^{2+} + 1,00 mg L^{-1} Cu^{2+}, e as soluções resultantes eram analisadas. Utilizando-se os valores de RMSEP do modelo construído, estimaram-se os intervalos de confiança (1,00 mg L^{-1} ± RMSEP) nos quais os desvios das previsões obtidas fossem considerados como erros aleatórios.

4.5. Figuras de mérito

A partir do modelo correspondente à melhor discriminação cinética, foram avaliadas as principais características analíticas:

a) as estabilidades do módulo de análises e da linha base foram verificadas mantendo-se o sistema em operação por cerca de quatro horas;
b) a estabilidade de calibração foi avaliada a partir das previsões obtidas nas etapas de validação em dez diferentes calibrações efetuadas utilizando-se o modelo de calibração escolhido;
c) a frequência analítica foi calculada através de uma modificação da equação (Eq. 5)[22] utilizada em sistema baseado em paragem da zona de amostra:

$$F = 3600 \times (t_P + t_L)^{-1} \quad (5)$$

onde: F = frequência analítica (h^{-1}); t_P = tempo de paragem da zona de amostra (s); t_L = tempo de limpeza do sinal analítico, definido como intervalo de tempo entre instantes correspondentes ao máximo de absorbância e ao restabelecimento da linha base (s). A modificação da equação acima consistiu na substituição de t_P pelo intervalo de tempo entre o primeiro e o último máximos locais considerados nas mensurações;
d) o consumo de reagentes foi estimado através da frequência analítica, considerando-se a vazão e as concentrações utilizadas;
e) a repetibilidade dos sinais obtidos foi calculada independentemente para cada "pseudo-sensor", onde uma mesma solução (27, Tabela 1) escolhida aleatoriamente, foi inserida dez vezes consecutivas, estimando-se os desvios-padrão das leituras;
f) a precisão foi estimada através dos erros RMSECV e RMSEP;
g) a exatidão foi avaliada em função da comparação entre as concentrações dos analitos em amostras de ligas metálicas, previstas pelo modelo escolhido e por ICP OES[68].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tempo de integração dos sinais foi selecionado como 50 ms como um compromisso entre a intensidade da fonte de luz, a possibilidade de saturação dos sinais e a faixa operacional do detector. Visando uma razão sinal / ruído adequada, utilizaram-se médias de 50 leituras (sinais integrados) em conjunto com “alisamento” dos sinais, baseado em médias móveis de 30 pontos. Valores maiores que os acima especificados não foram utilizados buscando-se manter um maior nível de fidelidade às informações que chegavam ao detector.

A solução transportadora contendo o reagente 5-Br-PADAP apresentava coloração alaranjada com máximo de absorbância a 462 nm, portanto também absorvendo no comprimento de onda utilizado para monitorar os produtos das reações de interesse (562 nm), mas este aspecto não se afigurou como um fator limitante para as mensurações.

Os sinais correspondentes aos brancos analíticos, soluções-padrão isentas de analitos, não foram considerados em nenhum dos modelos construídos, pois sempre eram apontados como amostras anômalas quando adicionados ao conjunto de calibração. Provocavam diluições da solução transportadora / reagente, gerando picos negativos.

As diferentes taxas de formação dos produtos reacionais foram evidenciadas com o monitoramento das absorbâncias relativas a eles em função do tempo, como apresentado na Figura 6. Para esta avaliação, alíquotas de soluções-padrão mono-analito (1,00 mg L^{-1} Ni^{2+} ou Cu^{2+}) foram inseridas no fluxo transportador idêntico ao utilizado para as mensurações simultâneas e, quando era atingida a primeira absorbância local máxima, as zonas de amostra eram paradas por 2 min, via interrupção da propulsão da bomba peristáltica. O desenvolvimento reacional dos produtos durante esse intervalo de tempo pôde ser avaliado em função do aumento contínuo da absorbância monitorada. Observou-se que a reação com o íon Cu^{2+} procede de uma forma mais rápida comparativamente à reação com Ni^{2+}. Essa diferença em taxa reacional foi norteadora para as discriminações e quantificações efetuadas pelos diversos modelos matemáticos construídos e avaliados.

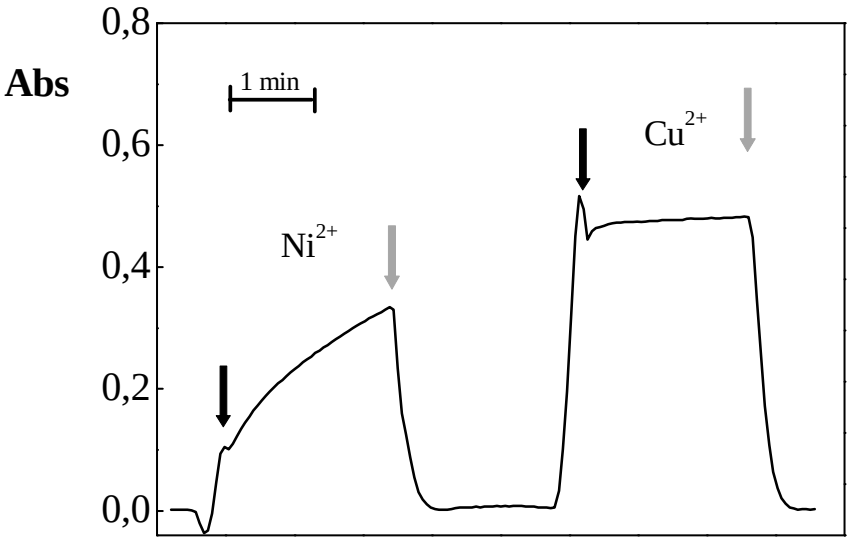

Figura 6 - Registro do desenvolvimento das reações mono-analito com paragem de fluxo
As setas indicam interrupção (pretas) e religamento (cinzas) da bomba peristátilca

Uma representação de registro absorbância *vs* tempo tipicamente obtido por inserção das alíquotas de amostra, com a configuração utilizada na Figura 5, é dada na Figura 7, onde são retratados também os "pseudo-sensores" referentes à construção das matrizes **X**.

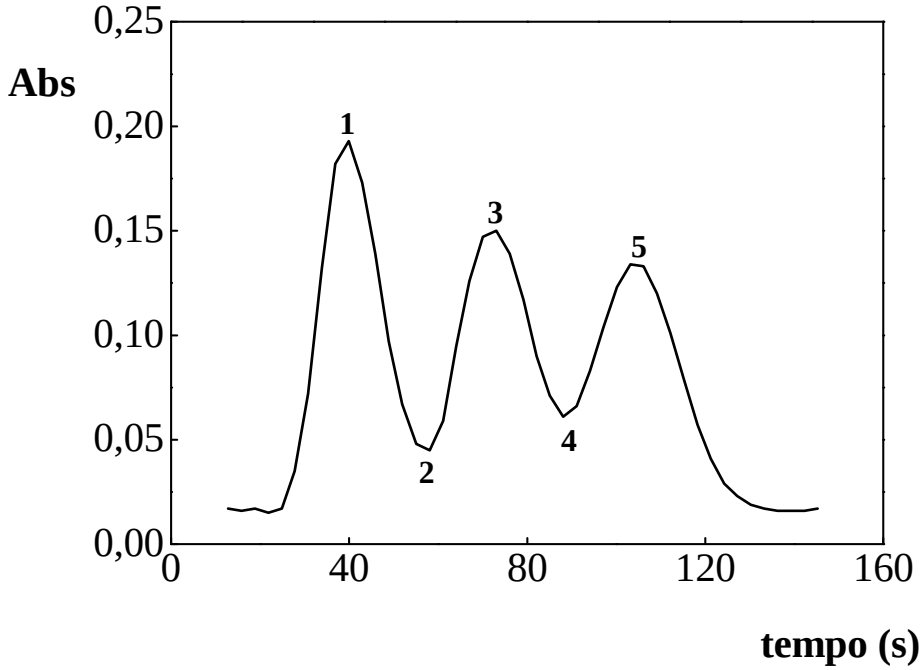

Figura 7 - Registro típico da zona complexa gerada por inserção das alíquotas de amostra
Os números **1 – 5** se referem aos "pseudo-sensores" explorados

De um modo geral, os modelos de calibração construídos apresentaram bons resultados quanto às porcentagens de variância capturadas e aos valores RMSEP correspondentes a eles, utilizando apenas duas ou três variáveis latentes. Estes resultados são apresentados e discutidos conjuntamente em seção destinada à construção dos modelos. A seguir, é discutida a otimização dos parâmetros, onde cada variação de um destes representou um modelo diferente.

5.1. Influência dos principais parâmetros envolvidos

5.1.1. Natureza da solução-tampão

As formações dos complexos entre 5-Br-PADAP e os íons metálicos em estudo ocorrem numa ampla faixa de pH[54]: 4,5-10 para Ni^{2+} e 2-10 para Cu^{2+}. Esse fato foi confirmado em trabalho envolvendo a determinação simultânea destes analitos explorando detecção multi-localizada[39], onde foi estabelecido que a faixa $4 < pH < 5$ proporciona a melhor discriminação cinética; optou-se então pela utilização de idêntica solução-tampão deste trabalho, cujo ácido constituinte (CH_3COOH) possibilita a condição de pH = pKa = 4,7 que é o valor de pH que confere a maior capacidade tamponante da mesma.

Avaliou-se outro parâmetro que condiciona a capacidade tamponante, a concentração da solução-tampão, utilizando-se concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mol L^{-1} CH_3COOH / CH_3COONa. Verificou-se que este parâmetro não teve muita influência na capacidade preditiva dos modelos (Tabela 4); selecionou-se a menor concentração visando economia de reagentes. Ressalte-se com o dito, a possibilidade de utilização de solução mais concentrada, dentro desta faixa, em casos onde a natureza de uma amostra assim o requeresse.

5.1.2. Concentração de 5-Br-PADAP

O aumento da concentração do reagente cromogênico representou melhoria da capacidade preditiva; porém, isto ocorreu até certo ponto, pois com a concentração de

100 mg L^{-1}, aumentou-se também o número de variáveis latentes utilizadas e os erros de previsão tornaram-se imensamente maiores (Tabela. 4). Optou-se então por se utilizar 75 mg L^{-1}.

Uma explicação plausível para este comportamento, a partir da variação da concentração do reagente é que, à medida que se aumenta a concentração, favorece-se o desenvolvimento das reações envolvidas; porém, ao se atingir certa concentração, sucedem-se desvios da linearidade provocadas por mudanças em absortividade molar do reagente (além de aumento da magnitude da linha base), uma vez que as moléculas do soluto começam a ter influência umas sobre as outras, quando em concentrações maiores.

5.1.3. Temperatura de aquecimento da bobina reacional

A influência deste parâmetro é maior relativamente à reação com Ni^{2+}, por se tratar de reação mais lenta que a do Cu^{2+}, seu aumento leva à diminuição da diferença entre as taxas reacionais dos analitos, pois a primeira reação torna-se mais rápida, ao passo que a outra é menos afetada.

A variação da temperatura de aquecimento não possibilitou a detecção de tendências quanto a melhorias em capacidade preditiva, pois as temperaturas estudadas (25, 40, 50 e 60 ºC) resultaram em distribuições irregulares em erros de previsão. A temperatura de 50 ºC foi escolhida devido à utilização de menor número de variáveis latentes e por apresentar um erro na validação cruzada semelhante ou menor comparativamente às outras temperaturas (Tabela 4).

A diminuição da diferença em taxas reacionais (fator que afeta a diferenciação e quantificação dos analitos na regressão) poderia causar, a princípio, maiores incertezas nas discriminações cinéticas. Adicionalmente, maior efeito catalítico referente à reação mais lenta se justifica em função das possíveis incertezas quando esta reação não é catalisada, particularmente em menores concentrações. Este aspecto foi observado até mesmo quando se utilizou o aquecimento de 50 ºC, e é discutido na seção 5.3.

5.1.4. Vazão

Por se tratar de um sistema em linha única, a vazão da solução transportadora / reagente corresponde à vazão total. Menores erros de previsão e de validação cruzada, e menor número de variáveis latentes foram obtidos a partir de vazões mais baixas (Tabela 4), as quais favoreciam o desenvolvimento das reações, sobremaneira a do Ni^{2+}, assim como mencionado no parâmetro anterior. Selecionou-se a vazão 2,3 mL min^{-1}, com o compromisso de aliar um modelo mais preciso mantendo-se uma melhor frequência analítica.

5.1.5. Comprimentos das alças de amostragem e das bobinas

No estudo dos comprimentos das alças de amostragem, verificou-se que a utilização de 25 cm (menor dos comprimentos testados) na segunda ou terceira bobina (a contar da mais próxima ao detector), em conjunto com outras mais longas, deterioravam a qualidade dos modelos, pois nessas condições esta menor zona de amostra sofria proporcionalmente maior dispersão, fazendo com que as absorbâncias máximas e mínimas exploradas se aproximassem muito, dificultando a distinção destes pontos e gerando maiores imprecisões nas previsões.

Outras configurações utilizando diferentes comprimentos de alças de amostagem na inserção mostraram-se piores comparativamente à utilização de três volumes iguais e, dos três modelos referentes ao emprego de iguais volumes, a utilização de alças de amostragem de 75 cm (375 µL) afigurou-se como a melhor escolha (Tabela 4).

Da mesma forma, a variação das duas distâncias entre as alíquotas de amostra foram avaliadas e, as associações de 75 e 225 cm (menor e maior dos comprimentos testados, respectivamente) mostraram-se inviáveis, pois aumentava-se muito a disparidade entre os pontos mínimos obtidos (sobreposições das zonas de amostra), chegando-se ao ponto de tornar impraticável a distinção entre pontos de máximos e mínimo locais, quando da utilização da menor distância no segundo intervalo entre alíquotas de amostra (a contar do mais próximo ao detector). Este aspecto se coaduna com o fato de a utilização de alças de amostragem de volumes iguais proporcionarem os melhores modelos, onde dois comprimentos de 150 cm (750 µL) geraram menores erros (Tabela 4).

Quanto ao comprimento da bobina reacional, as alíquotas de amostra sofriam maiores dispersões, ao percorrerem as maiores distâncias, mas devido às melhores condições para o desenvolvimento das reações, modelos com melhor discriminação cinética eram obtidos (Tabela 4). O comprimento de 200 cm foi selecionado visando-se uma melhor frequência analítica, utilizando-se duas variáveis latentes. Deve-se salientar que quando empregado o comprimento de 250 cm, foram necessárias três variáveis latentes.

5.2. Construção dos modelos de calibração

Como descrito anteriormente, a cada variação de um dos parâmetros em estudo, construiu-se um modelo de calibração; na Tabela 3 são especificadas as condições experimentais referentes a cada um destes modelos.

A Tabela 4 apresenta os números de variáveis latentes utilizadas para a construção dos modelos de calibração, assim como os valores RMSECV e RMSEP, e as porcentagens de variância capturadas atrelados a eles. Os valores RMSEP também são expostos em forma de gráfico de barras (Figura 8), facilitando a visualização da magnitude do parâmetro para os modelos construídos.

Mantendo-se o compromisso de aliar uma maior robustez com uma maior capacidade preditiva, as condições experimentais exploradas no modelo 14 foram selecionadas, pois com apenas duas variáveis latentes obtiveram-se os menores valores de RMSEP, além da captura de mais de 98% das variâncias.

5.3. Modelo de calibração escolhido

O gráfico representando a influência do número de variáveis latentes no erro de calibração é exibido na Figura 9. Verifica-se que com a utilização de duas variáveis latentes obtêm-se os menores valores RMSECV, justificando-se a escolha deste número para o modelo escolhido (Tabela 4); variáveis latentes adicionais não proporcionaram informações que beneficiem a qualidade do modelo, além de gerarem ligeiro aumento dos erros.

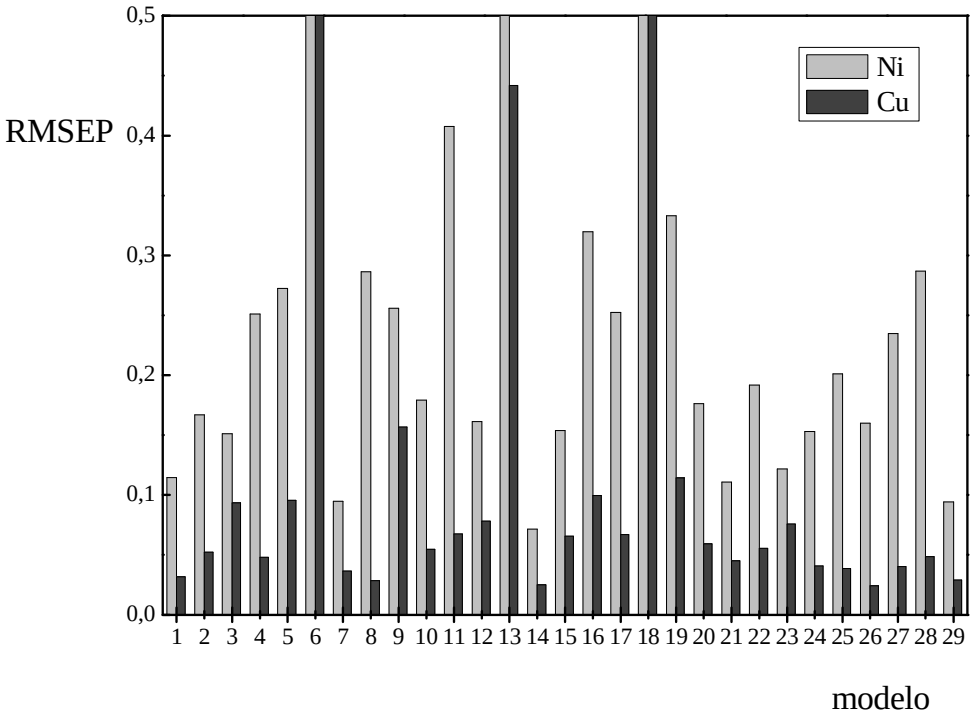

Figura 8 - RMSEP para os modelos de calibração. Em alguns casos (modelos 6, 13 e 18) os erros obtidos são maiores e consequentemente os valores RMSEP extrapolam a escala utilizada

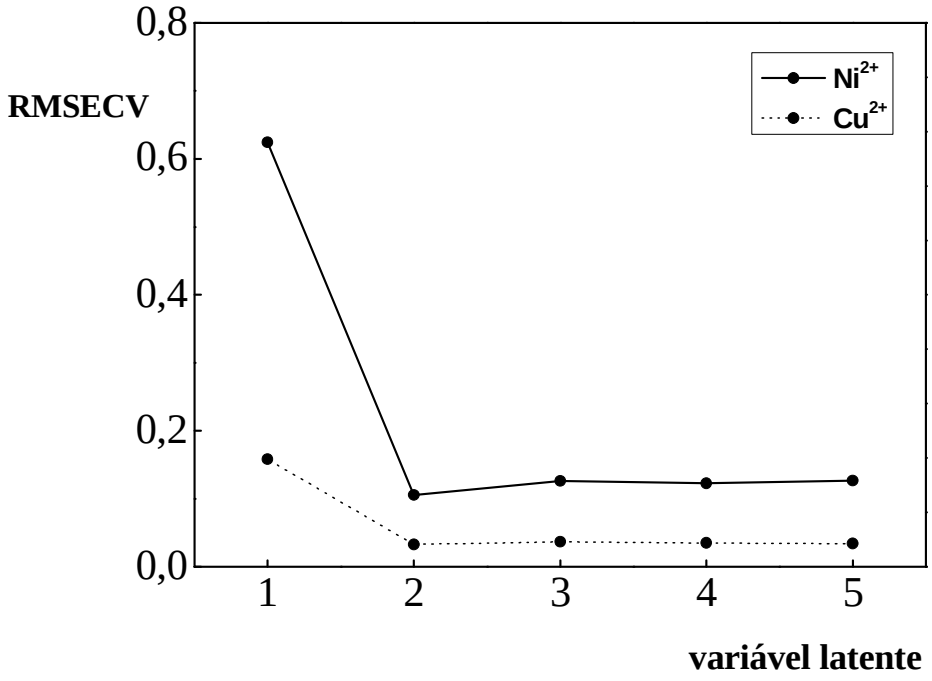

Figura 9 - RMSECV por variável latente para o modelo escolhido

Tabela 3 - Condições experimentais para os modelos de calibração. Alças de amostragem e distâncias entre estas (bobinas separadoras), ordenadas a partir das mais próximas ao detector

modelo	solução-tampão	reagente	temp.	vazão	alças de amostragem	bobinas separadoras	bobina reacional
	mol L^{-1}	mg L^{-1}	^{o}C	mL min^{-1}	cm	cm	cm
1	0,5	50	50	2,3	50/50/50	150/150	200
2	1,0	50	50	2,3	50/50/50	150/150	200
3	1,5	50	50	2,3	50/50/50	150/150	200
4	0,5	25	50	2,3	50/50/50	150/150	200
5	0,5	75	50	2,3	50/50/50	150/150	200
6	0,5	100	50	2,3	50/50/50	150/150	200
7	0,5	75	25	2,3	50/50/50	150/150	200
8	0,5	75	40	2,3	50/50/50	150/150	200
9	0,5	75	60	2,3	50/50/50	150/150	200
10	0,5	75	50	3,0	50/50/50	150/150	200
11	0,5	75	50	3,9	50/50/50	150/150	200
12	0,5	75	50	1,5	50/50/50	150/150	200
13	0,5	75	50	2,3	25/25/25	150/150	200
14	0,5	75,0	50	2,3	75/75/75	150/150	200
15	0,5	75,0	50	2,3	25/50/75	150/150	200
16	0,5	75,0	50	2,3	75/50/25	150/150	200
17	0,5	75,0	50	2,3	50/25/75	150/150	200
18	0,5	75,0	50	2,3	75/25/50	150/150	200
19	0,5	75,0	50	2,3	25/75/50	150/150	200
20	0,5	75,0	50	2,3	75/75/75	75/75	200
21	0,5	75,0	50	2,3	75/75/75	75/150	200
22	0,5	75,0	50	2,3	75/75/75	150/75	200
23	0,5	75,0	50	2,3	75/75/75	225/225	200
24	0,5	75,0	50	2,3	75/75/75	225/150	200
25	0,5	75,0	50	2,3	75/75/75	150/225	200
26	0,5	75,0	50	2,3	75/75/75	75/225	200
27	0,5	75,0	50	2,3	75/75/75	150/150	150
28	0,5	75,0	50	2,3	75/75/75	150/150	100
29	0,5	75,0	50	2,3	75/75/75	150/150	250

Tabela 4 - Número de variáveis latentes, porcentagens de variância capturadas, RMSECV e RMSEP

modelo	variáveis latentes	variância (%)		RMSECV (mg L^{-1})		RMSEP (mg L^{-1})	
		X	**Y**	Ni^{2+}	Cu^{2+}	Ni^{2+}	Cu^{2+}
1	2	99,98	99,05	0,083	0,032	0,115	0,032
2	2	99,99	99,23	0,074	0,029	0,167	0,052
3	2	99,97	98,13	0,113	0,052	0,151	0,093
4	2	98,93	92,61	0,244	0,062	0,251	0,048
5	2	99,85	91,21	0,274	0,093	0,273	0,095
6	3	99,99	96,86	0,168	0,045	0,581	0,555
7	3	100,00	94,33	0,216	0,019	0,095	0,037
8	3	99,98	93,93	0,238	0,040	0,286	0,028
9	3	99,98	91,22	0,264	0,129	0,256	0,157
10	2	99,94	82,13	0,439	0,096	0,179	0,055
11	3	99,90	79,32	0,495	0,070	0,408	0,067
12	2	99,98	95,05	0,192	0,068	0,161	0,078
13	2	99,95	97,46	0,127	0,034	1,474	0,442
14	2	99,99	98,43	0,106	0,033	0,071	0,025
15	2	99,96	89,25	0,282	0,077	0,154	0,066
16	3	99,99	88,03	0,316	0,104	0,320	0,099
17	2	99,95	88,14	0,333	0,109	0,252	0,067
18	3	100,00	98,75	0,098	0,035	5,743	1,503
19	2	99,96	93,28	0,223	0,076	0,333	0,114
20	2	99,97	95,90	0,188	0,058	0,176	0,059
21	2	99,95	97,56	0,151	0,064	0,111	0,045
22	2	99,97	91,63	0,254	0,086	0,192	0,055
23	3	100,00	97,09	0,157	0,050	0,122	0,076
24	2	99,98	94,69	0,210	0,050	0,153	0,041
25	2	99,98	92,58	0,239	0,054	0,201	0,038
26	2	99,98	96,55	0,159	0,037	0,160	0,024
27	2	99,99	97,32	0,145	0,047	0,235	0,040
28	2	99,96	93,29	0,246	0,050	0,287	0,049
29	3	99,92	97,83	0,356	0,086	0,094	0,029

Após a etapa de calibração, a otimização do modelo foi realizada a partir da detecção de amostras anômalas (Figura 10), onde o *software* indicou com um nível de confiança de 95%, que as soluções 1 e 2 (Tabela 1) causavam um desajuste ao modelo construído. Este aspecto prejudicial foi resultado das maiores incertezas atreladas aos menores valores de absorbância referentes a estas soluções, que continham as menores concentrações do analito que reagia mais lentamente e eram isentas da outra espécie química. Verificou-se posteriormente que estas amostras, apesar de detectadas como anômalas, tinham pequena influência sobre o poder de previsão do modelo, pois quando retiradas geraram ligeira

redução dos valores de RMSEP: de 0,073 para 0,071 mg L^{-1} no caso de Ni^{2+} e, de 0,030 para 0,025 mg L^{-1} no caso de Cu^{2+}.

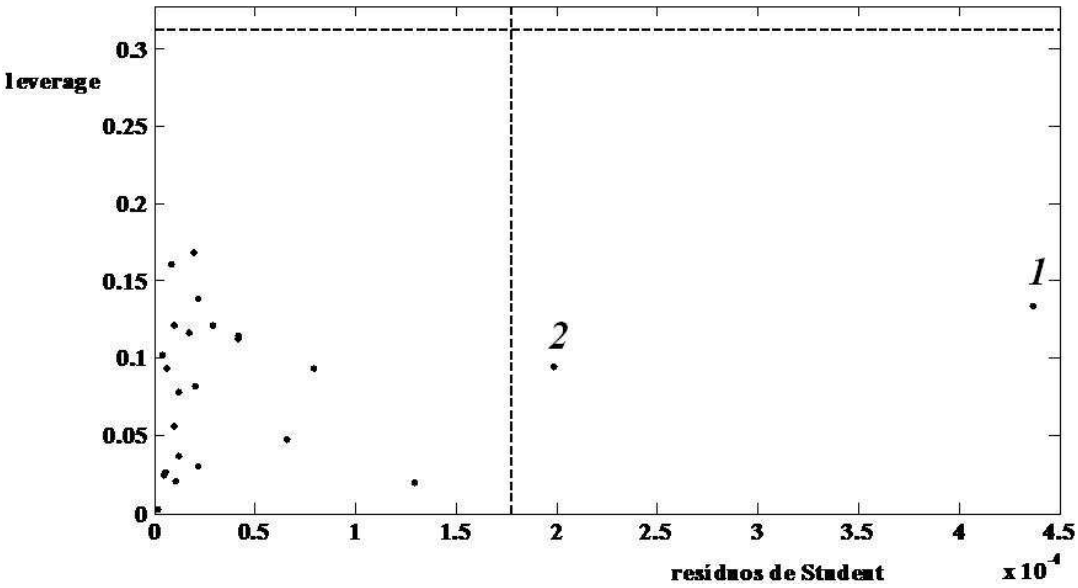

Figura 10 - Detecção de amostras anômalas

A linha tracejada assinala o limite (95% de confiança) para indicação e os números em itálico, as soluções detectadas como anômalas.

Os valores RMSEP, para o modelo escolhido: 0,071 mg L^{-1} Ni^{2+} e 0,025 mg L^{-1} Cu^{2+}, resultaram dos erros provenientes da etapa de validação, onde as cinco soluções utilizadas (26-30, Tabela 1) foram avaliadas com replicata, objetivando-se o aumento do número de amostras nesta etapa, além de uma observação da precisão das medidas ao longo da análise dos modelos construídos. As concentrações previstas, os valores reais e os erros decorrentes da comparação entre estes são apresentados na Tabela 5; assim como curvas de correlação entre as concentrações, previstas *vs* reais, na etapa de validação do modelo escolhido (Figura 11).

Após as etapas de construção, otimização e validação do modelo escolhido, este foi utilizado na previsão das concetrações dos analitos em amostras reais de ligas metálicas, e os valores previstos foram comparados com valores obtidos por ICP OES (Tabela 6).

Tabela 5 - Valores previstos, reais e de erros obtidos na etapa de validação. Concentrações de cobre e de níquel expressas em mg L^{-1} e erros em %

Cu			Ni		
previstas	**real**	**erro**	**previstas**	**real**	**erro**
0,73	0,70	3,71	0,47	0,50	-6,30
0,72	0,70	2,18	0,52	0,50	4,48
1,54	1,50	2,84	0,46	0,50	-7,31
1,48	1,50	-1,46	0,62	0,50	24,22
0,53	0,50	6,31	1,39	1,40	-0,63
0,50	0,50	-0,50	1,51	1,40	7,89
1,50	1,50	0,10	1,39	1,40	-0,94
1,48	1,50	-1,06	1,52	1,40	8,66
0,74	0,70	5,57	0,94	1,00	-6,04
0,71	0,70	2,12	1,05	1,00	5,07

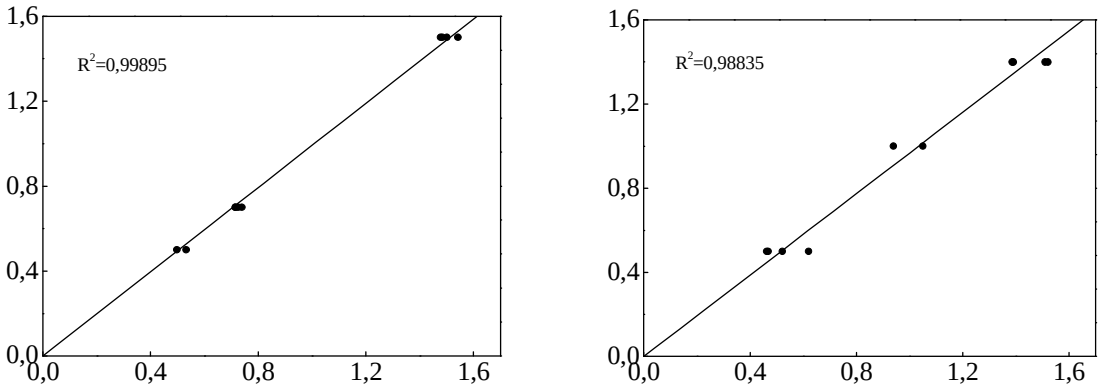

Figura 11 - Correlações entre concentrações esperadas e previstas na etapa de validação
Esquerda e direita se referem a Cu^{2+} e Ni^{2+}; concentrações expressas em mg L^{-1}; eixos x = valores previstos pelo modelo escolhido; eixos y = valores reais das concentrações das soluções testadas

Apesar de o modelo apresentar boa precisão, verificada através de pequenos erros de calibração (RMSECV) e de validação (RMSEP), utilizando duas variáveis latentes; ele mostrou-se inexato, quando as amostras reais foram testadas, conforme os resultados da comparação com o método de referência (Tabela 6).

O teste *t-Student* acusou discordância entre os métodos, ao nível de 95% de confiança. Desta forma, constatou-se a presença de erros sistemáticos (além de possíveis erros aleatórios) e assume-se que o modelo proposto não atende integralmente ao previsto inicialmente, necessitando, portanto de reformulações em etapas experimentais.

Tabela 6 - Resultados comparativos. Concentrações de cobre e de níquel em ligas metálicas, expressas em % (m/m), determinadas pelo sistema proposto e por ICP OES[68]. As incertezas para o sistema proposto são dadas na mesma unidade da concentração e são baseadas em três replicações, e as referentes a ICP OES são tipicamente 3%

amostra	Cu		Ni	
	Proposto	ICP OES	proposto	ICP OES
1	0,79 ± 0,14	0,51	0,56 ± 0,28	0,84
2	3,44 ± 0,57	3,52	2,82 ± 0,97	2,87
3	6,08 ± 0,28	5,27	9,25 ± 0,94	8,76
4	0,29 ± 0,04	0,26	0,35 ± 0,14	0,21

5.4. Espécies interferentes

A partir das previsões obtidas pelas soluções contendo as diferentes proporções relativamente às possíveis espécies químicas potentialmente inteferentes, contruiu-se uma carta de seletividade para o método proposto (Tabela 7). Os desvios em concentrações cujas magnitudes extrapolaram os valores de RMSEP (para cada analito) foram considerados como interferência.

Tabela 7 - Carta de seletividade para o modelo proposto. Concentrações dos possíveis interferentes adicionados a soluções 1,00 mg L^{-1} Ni^{2+} + 1,00 mg L^{-1} Cu^{2+}; as marcações (X) representam interferência em pelo menos um dos analitos, segundo os valores de RMSEP para cada um destes

espécie	concentração		
	1 mg L^{-1}	10 mg L^{-1}	100 mg L^{-1}
Cd^{2+}			X
Zn^{2+}		X	X
Mn^{2+}		X	X
Pb^{2+}			X
Fe^{3+}		X	X
Al^{3+}			X
Zr^{4+}		X	X
Ag^{+}		X	X
Hg^{2+}	X	X	X
Co^{2+}	X	X	X

5.5. Figuras de mérito

Conforme descrito na seção 4.5, as principais figuras de mérito foram avaliadas obtendo-se como resultados:

a) o sistema proposto mostrou-se fisicamente robusto, pois quando mantido em operação por cerca de quatro horas, não foram observadas derivas na linha base ou mal-funcionamentos em nenhum dos componentes;
b) nas dez diferentes construções do modelo de calibração escolhido obtiveram-se como coeficientes de variação: 8,7% e 19,8% nas etapas de validação, para Cu^{2+} e Ni^{2+} respectivamente;
c) através dos tempos médios de limpeza (44 s) e entre os máximos considerados (65 s), estimou-se uma frequência de 33 amostras por hora, correspondendo a 165 dados (leituras consideradas) e 66 determinações realizadas;
d) foram consumidos 314 µg 5-Br-PADAP por amostra analisada, ressaltando-se que o baixo consumo de reagentes também foi obsevado para CH_3COOH e CH_3COONa: 24 µL e 34 mg, respectivamente;
e) o sistema proposto mostrou boa repetibilidade das leituras, pois as absorbâncias dos "pseudo-sensores" explorados apresentaram erros tipicamente menores que 5%;
f) a boa precisão do modelo foi verificada com os valores 0,106 e 0,071 mg L^{-1} Ni^{2+}, e 0,033 e 0,025 mg L^{-1} Cu^{2+}, de RMSECV e RMSEP, respectivamente utilizados como parâmetros para esta estimativa;
g) os valores de concentrações previstas pelo modelo foram discordantes daqueles encontrados por ICP OES, não se alcançando portanto, a exatidão desejada às previsões; inexatidão atribuída à possível incompatibilidade das matrizes das amostras com a das soluções-padrão, mesmo com as diluições efetuadas ou ainda, mais provavelmente, devido ao efeito de interferentes, pois nas ligas metálicas utilizadas, os analitos em análise são constituintes minoritários e o reagente cromogênico não demonstrou uma grande seletividade, conforme Tabela 7.

6. CONCLUSÕES

O sistema proposto para as determinações simultâneas de Cu^{2+} e de Ni^{2+} explorando cinética diferencial e utilizando a ferramenta quimiométrica PLS-2, mostrou-se viável devido à robustez, precisão das previsões e baixo consumo de reagentes (inerente aos sistemas FIA).

Entretanto, a inexatidão das previsões comparativamente aos resultados obtidos por ICP OES afigurou-se como fator limitante à implementação desse sistema, sob essas condições, nessa matriz em larga escala, por exemplo. Este fato reclama maiores estudos referentes a esse tipo de matriz e aos possíveis interferentes, que tendem a se constituir como as próximas etapas dessa pesquisa. Estudos utilizando o mesmo modelo de calibração a outras matrizes, como lodo de esgoto, extratos de solo e materiais vegetais, foram também conduzidos. Porém, a alta complexidade matricial do lodo de esgoto exige estudos mais aprofundados acerca da etapa de preparo de amostra. Relativamente aos extratos de solos, torna-se necessário o uso de soluções extratoras que não interfiram quimicamente no método analítico, fator este que se apresentou como limitante. De fato, as soluções convencionais e.g. Fehling 1, Fehling 3, DTPA não se mostraram apropriadas. Desta forma, a colaboração com um profissional em Fertilidade de Solos se torna essencial. Salienta-se que a utilização do modelo a amostras de tecido vegetal afigurou-se como inviável devido ao tipicamente baixo teor de Ni^{2+} nesse tipo de matriz, abaixo da faixa de concentração em estudo.

Ainda, vislumbra-se a possibilidade da implementação de determinações simultâneas, com o mesmo reagente, abrangendo um maior número de analitos (possivelmente algum(ns) daqueles listados como possíveis interferentes); ou ainda, a utilização do sistema proposto para outras matrizes, o que pode ser apoiada pela carta de seletividade (Tabela 7) construída para o sistema.

REFERÊNCIAS

1. PARDUE, H. L. Unified view of kinetic-based analytical methods with emphasis on ruggedness. A review. **The Analyst**, London, v. 121, p. 385-390, 1996.

2. CULLEN, T. F.; CROUCH, S. R. Multicomponent kinetic determinations using multivariate calibration techniques. **Mikrochimica Acta**, Vienna, v. 126, p. 1-9, 1997.

3. QUENCER, B. M.; CROUCH, S. R. Multicomponent kinetic methods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Boca Raton, v. 24, p. 243-262, 1993.

4. PEREZ-BENDITO, D. Approaches to differential reaction-rate methods. **The Analyst**, London, v. 115, n. 6, p. 689-698, 1990.

5. TROJANOWICZ, M. **Flow injection analysis**: instrumentation and applications. 1. ed. Singapore: World Scientific, 2000.

6. RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. **Flow injection analysis**. 2. ed. New York: Wiley Interscience, 1988.

7. FORTES, P. R. **Calibração multivariada e cinética diferencial em sistemas de análises em fluxo com detecção espectrofotométrica**. 2006. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

8. FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, p. 724-731, 1999.

9. BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **The Analyst**, London, v. 125, p. 2125-2154, 2000.

10. MARCZENKO, Z. **Separation and spectrophotometric determination of elements**. 2. ed. Chichester: Ellis Horwood, 1986.

11. MASSART, D. L. et al. **Chemometrics:** a textbook. Amsterdam: Elsevier, 1988.

12. DENISOV, E. T.; SARKISOV, O. M.; LIKHTENSHTEIN, G. I. **Chemical kinetics**: fundamentals and new developments. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2003.

13. ROBERTS, W. On the estimation of the amylolytic and proteolytic activity of pancreatic extracts. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 32, p. 145-161, 1881.

14. PARDUE, H. L. A comprehensive classificationof kinetic method of analysis used in clinical chemistry. **Clinical Chemistry**, Washington, DC, v. 23, n. 12, p. 2189-2201, 1977.

15. SIMONI, R. D. et al. A Classic Instrument: The Beckman DU spectrophotometer and its inventor, Arnold O. Beckman. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 49, p. 79-81, 2003.

16. CHANCE, B. The accelerated flow method for rapid reactions. Part II: design, construction, and tests. **Journal of the Franklin Institute**, Philadelphia, v. 229, p. 737-766, 1940.

17. YATSIMIRSKY, K. B. **Kinetic methods of analysis**. 1. ed. Oxford: Pergamon Press, 1966.

18. CROUCH, S. R. Trends in kinetic methods of analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 283, p. 453-470, 1993.

19. LUQUE DE CASTRO, M. D.; VALCARCEL, M. Kinetic-based determinations in continuous-flow analysis. **Journal of Automatic Chemistry**, Bethesda, v. 8, n. 4, p. 186-192, 1986.

20. PAUSCH, J. B.; MARGERUM, D. W. Differential kinetic analysis of alkaline-earth ions using stopped-flow spectrophotometry. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 41, n. 2, p. 226-232, 1969.

21. MAHMOUD, S. et al. 1,2-dihydrolsoquinoline-N-acetic acid derivatives as new carriers for specific brain delivery I: synthesis and estimation of oxidation kinetics using multivariate calibration method. **Archiv der Pharmazie**, Berlin, v. 336, p. 573-584, 2003.

22. VIDA, A. C. F. et al. Zone trapping / merging zones in flow analysis: a novel approach for rapid assays involving relatively slow chemical reactions. **Talanta,** Amsterdam, 2011. No prelo. doi:10.1016/j.talanta.2011.03.065.

23. BLANCO, M. et al. Kinetic spectrophotometric determination of Ga(III)-Al(III) mixtures by stopped-flow injection analysis using principal component regression. **Talanta**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 261-267, 1993.

24. GU, Z.-C.; WANG, X.-D. The application of principal component regression on simultaneous multicomponent determinations through a single catalytic kinetic run. **Talanta**, Amsterdam, v. 42, n. 2, p. 205-210, 1995.

25. PISTONESI, M. et al. Simultaneous determination of levodopa and benserazide by stopped-flow injection analysis and three-way multivariate calibration of kinetic-spectrophotometric data. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 36, p. 541-547, 2004.

26. TEIXEIRA, L. S. G. et al. Flow-injection solid phase partial least-squares spectrophotometric simultaneous determination of iron, nickel and zinc. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 54-59, 2002.

27. HASANI, M.; YAGHOUBI, L.; ABDOLLAHI, H. A kinetic spectrophotometric method for simultaneous determination of glycine and lysine by artificial neural networks. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 365, p. 74-81, 2007.

28 . NI, Y.-N.; LIU, C. Artificial neural networks and multivariate calibration for spectrophotometric differential kinetic determinations of food antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 396, p. 221-230, 1999.

29 . CHEMOMETRICS AND INTELLIGENT LABORATORY SYSTEMS. Amsterdam: Elsevier, 1986- . ISSN 0169-7439.

30. JOURNAL OF CHEMOMETRICS. Chichester: John Wiley & Sons, 1987- . ISSN 1099-128X.

31. TALANTA. Amsterdam: Elsevier, 2011. v. 83, n. 4, n. esp. ISSN 0039-9140.

32. GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 185, p. 1-17, 1986.

33. HAALAND, D. M.; THOMAS, E. V. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 60, n. 11, p. 1193-1202, 1988.

34. FERNANDEZ, A. et al. A flow-injection manifold based on splitting the sample zone and a confluence point before a single detector unit. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 165, p. 217-226, 1984.

35. KAGENOW, H.; JENSEN, A. Differential kinetic analysis and flow injection analysis. Part III: the (2.2.2)cryptates of magnesium, calcium and strontium. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 114, p. 227-234, 1980.

36. ESPINOSA-MANSILLA, A.; SALINAS, F.; ZAMORO, A. Simultaneous determination of chlorpyrifos and carbaryl by differential degradation using diode-array spectrophotometry optimized by partial least squares. **The Analyst**, London, v. 119, p. 1183-1188, 1994.

37. KURODA, R.; NARA, T.; OGUMA, K. Simultaneous determination of iron(III) and total iron by flow injection analysis using kinetic spectrophotometry with tiron. **The Analyst**, London, v. 113, p. 1557-1560, 1988.

38. ARRUDA, M. A. Z.; ZAGATTO, E. A. G.; MANIASSO, N. Kinetic determination of cobalt and nickel by flow-injection spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 283, p. 476-480, 1993.

39 . VENDRAMINI, D.; GRASSI, V.; ZAGATTO, E. A. G. Spectrophotometric flow injection determination of copper and nickel in plant digests exploiting differential kinetic analysis and multi site detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 570, p. 124-128, 2006.

40 . DAHL, J. H.; ESPERSEN, D.; JENSEN, A. Differential kinetic analysis and flow injection analysis. Part I: the trans-1,2-diaminocyclohexanetetraacetate complexes of magnesium and strontium. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 105, p. 327-333, 1979.

41. FERNANDEZ, A.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; VALCARCEL, M. Comparison of flow injection analysis configurations for differential kinetic determination of cobalt and nickel. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 56, p. 1146-1151, 1984.

42. ESPERSEN, D.; JENSEN, A. Differential kinetic analysis and flow injection analysis. Part II: the (2.2.1)cryptates of magnesium and calcium. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 108, p. 241-247, 1979.

43. HANSEN, E. H. Exploiting kinetic-based flow injection methods for quantitative chemical assays. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 261, p. 125-136, 1992.

44. CHRISTIAN, G. D.; RUZICKA, J. Exploiting stopped-flow injection methods for quantitative chemical-assays. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 261, p. 11-21, 1992.

45. ESPINOSA-MANSILLA, A.; SALINAS, F.; ZAMORO, A. Simultaneous kinetic determination of chlorpyrifos and carbaryl based on differential degradation process in alkaline oxidative medium. **Mikrochimica Acta**, Vienna, v. 113, p. 9-17, 1994.

46. ESPINOSA-MANSILLA, A.; SALINAS, F.; ZAMORO, A. Simultaneous determination of chlorpyrifos and carbaryl by differential degradation using diode-array spectrophotometry optimized by partial least-squares. **The Analyst,** London, v. 119, n. 6, p. 1183-1188, 1994.

47. RUZICKA, J.; STEWART, J. W. B.; ZAGATTO, E. A. Flow injection analysis. Part IV: stream sample splitting and its application to continuous spectrophotometric determination of chloride in brackish waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 81, p. 387-396, 1976.

48. LAZARO, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; VALCARCEL, M. Sequential and differential catalytic-fluorimetric determination of manganese and iron by flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 169, p. 141-148, 1985.

49. OLIVEIRA, C. C. et al. Multicommutation in flow analysis. Part 4. computer-assisted splitting for spectrophotometric determination of copper and zinc in plants. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 332, p. 173-178, 1996.

50. GORDON, G. et al. Utilization of kinetic-based flow injection methods for the determination of chlorine and oxychlorine species. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 224, n. 2, p. 383-391, 1989.

51. FORTES, P. R.; MENESES, S. R. P.; ZAGATTO, E. A. G. A novel flow-based strategy for implementing differential kinetic analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 572, p. 316-320, 2006.

52. FORTES, P. R. et al. Sequential injections as an alternative to gradient exploitation for implementing differential kinetic analysis in a flow injection system. **Talanta**, Amsterdam, v. 81, n. 4-5, p. 1409-1412, 2010.

53. GISIN, M.; THOMMEN, C.; MANSFIELD, K. F. Hydrodynamically limited precision of gradient techniques in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 179, p. 149-167, 1986.

54. SHIBATA, S.; FURUKAWA, M.; TOEI, K. Syntheses and spectrophotometric studies of azo dyes containing meta-dimethylaminophenol as analytical reagents. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 66, p. 397-409, 1973.

55. TOPÇU, S.; MENEK, N.; EREN, E. Thermodynamic studies of 2-(5-bromo-2-pyridylazo)5-diethylamino)phenol Cu(II), Co(II), Ni(II) and Zn(II) complexes. **Dyes and Pigments**, Barking, v. 50, p. 29-33, 2001.

56. NONOVA, D.; STOYANOV, K. Extraction-spectrophotometric determination of traces of copper(II), zinc(II), cadmium(II) and mercury(II) with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol. **Mikrochimica Acta**, Vienna, v. 82, n. 1-2, p. 143-152, 1984.

57. JOHNSON, D. A.; FLORENCE, T. M. A study of some pyridylazo dyestuffs as chromogenic reagents and the elucidation of nature of their metal complex spectra. **Talanta**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 253-265, 1975.

58. MENEK, N.; TOPÇU, S.; UÇAR, M. Voltammetric and spectrophotometric studies of 2-(5-bromo-2-pyridylazo)5-diethylamino)phenol copper(II) complex. **Analytical Letters**, New York, v. 34, n. 10, p. 1733-1740, 2001.

59. MATSUMOTO, A. et al. Electrospray ionization mass spectrometry of metal complexes. Gas phase formation of a binuclear copper(II)-5-Br-PADAP complex. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 390, p. 193-199, 1999.

60. OSZWALDOWSKI, S.; WITOWSKA, J.; JAROSZ, M. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric and visible spectrophotometric studies of copper(I) and copper(II) complexes with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 36, n. 11, p. 1230-1236, 2001.

61. FERREIRA, S. L. C.; COSTA, A. C. S.; DE JESUS, D. S. Derivative spectrophotometric determination of nickel using Br-PADAP. **Talanta**, Amsterdam, v. 43, n. 10, p. 1649-1656, 1996.

62. WATARAI, H.; GOTOH, M.; GOTOH, N. Interfacial mechanism in the extraction kinetics of Ni(II) with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol and molecular dynamics simulation of interfacial reactivity of the ligand. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, Tokyo, v. 70, n. 5, p. 957-964, 1997.

63. KUSWANDI, B.; VAUGHAN, A. A.; NARAYANASWAMY, R. Simple regression model using an optode for the simultaneous determination of zinc and cadmium mixtures in aqueous samples. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 17, n. 1, p. 181-186, 2001.

64. KRUG, F. J.; BERGAMIN FILHO, H; ZAGATTO, E. A. G. Commutation in flow-injection analysis **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 179, p. 103-118, 1986.

65. ZAGATTO, E. A. G. et al. Compensation of the Schlieren effect in flow-injection analysis by using dual-wavelength spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 234, n. 1, p. 153-160, 1990.

66. DIAS, A. C. B. et. al. A critical examination of the components of the Schlieren effect in flow analysis. **Talanta**, Amsterdam, v. 68, n. 4, p. 1076-1082, 2006.

67. KRUG, F. J. (Ed.). **Métodos de preparo de amostras**: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1. ed. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz, 2008.

68. JACINTHO, A. O. et al. **Análise química de rochas por ICP AES**. Campinas: Ed. Unicamp, 1985.