UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MILTON KATSUMI SASAKI

Comparação entre analisadores com fluxo constante ou pulsado: aplicação a amostras de relevância farmacêutica, agronômica e/ou ambiental

Piracicaba

2015

MILTON KATSUMI SASAKI

Comparação entre analisadores com fluxo constante ou pulsado: aplicação a amostras de relevância farmacêutica, agronômica e/ou ambiental

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Elias Ayres Guidetti Zagatto

Piracicaba

2015

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

Comparação entre analisadores com fluxo constante ou pulsado: aplicação a amostras de relevância farmacêutica, agronômica e/ou ambiental / Milton Katsumi Sasaki; orientador Elias Ayres Guidetti Zagatto. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

100 p.: il.

Tese (Doutorado – 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 por injeção em fluxo 2. Espectrofotometria 3. Química analítica 4. Química analítica quantitativa 5. Reagentes imobilizados 6. Separação líquido-líquido I. Título

CDU 543.068.3:543.422.3

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente à minha mãe Kazue, ao meu pai Noboru (saudosamente) e aos meus irmãos Marcos, Marcelo e Maurício, assim como à minha cunhada Milene e ao meu sobrinho Kenzo, que sempre auxiliaram na formação do meu caráter, além de serem um dos pilares que me sustentam.

À minha companheira (pessoal e profissionalmente) Tuanne Dias, com quem pude percorrer todo o caminho dessa fase da minha vida.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelos apoios financeiros, sob forma de bolsas e/ou auxílios.

Ao Prof. Elias Zagatto, com quem pude conviver e aprender muito desde a minha chegada ao CENA.

Aos funcionários do Laboratório Henrique Bergamin Filho: Prof. Boaventura Reis, Prof. Fábio Rocha, Prof. Francisco Krug, Prof^a Maria Fernanda Giné, Cláudia Corrêa, Fátima Patreze, Iolanda Rufini, Sheila Perdigão e Valdemir Barros, pela grata convivência proporcionada, sob forma de discussões, orientações de natureza diversa, apoios em laboratório e pessoal.

A todos os outros funcionários e amigos do CENA e do Laboratório de Química da ESALQ que, de forma direta ou indireta, também tiveram contribuições.

Aos amigos que tão bem me acolheram durante minha estadia em Portugal: Prof. João Santos, Prof. Costa Lima, Prof. João Prior, David Ribeiro e Sofia Rodrigues.

Aos amigos (que tenho como irmãos) de sempre: Gabriel Carvalho, Mário Feres, Renata Feres, Taciana Gomes, Dário Santos, Marcos Gomes, Marina Rodrigues e Rafael Leite.

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

"A felicidade consiste na ação, na satisfação do esforço ininterrupto, não na posse"

RESUMO

Sasaki, M. K. Comparação entre analisadores com fluxo constante ou pulsado: aplicação a amostras de relevância farmacêutica, agronômica e/ou ambiental. 2015. 100 f. Tese (Doutorado) — Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Sistemas de análises químicas em fluxo com multi-impulsão empregam bombas solenoide como unidade propulsora de fluidos, as quais proporcionam fluxos pulsados. Estes provêm um eficiente transporte radial de massas, o que garante boa homogeneização das soluções envolvidas, mesmo em situações de dispersão limitada. O objetivo principal deste trabalho foi então comparar o desempenho de metodologias envolvendo reagentes imobilizados em sistemas de análises em fluxo com fluxos constantes ou pulsados. Para isto, foram selecionadas as determinações espectrofotométricas de ácido ascórbico em produtos farmacêuticos, utilizando reator tubular de polietileno (50 cm) com MnO₂(s) imobilizado, e reação com formaldoxima (0,25 mol L⁻¹); e de carbaril em águas naturais, explorando extração líquido-líquido com xileno imobilizado em membrana de PVDF, e solução de NaOH a 0,1 mol L⁻¹ como fluxo aceptor. Adicionalmente, compararam-se os dois tipos de fluxo em uma nova titulação em fluxo, a titulação monitorada por traçador; a determinação de acidez total em vinagres foi selecionada e utilizaram-se as titulações por injeção em fluxo e programada em triângulo, ambas empregando solução de NaOH a 0,01 mol L-1 como titulante e fenolftaleína como indicador ácido-base, com monitoramento por traçador empregando azul brilhante FCF (ca. 6 mg L⁻¹). Na determinação de ácido ascórbico, o desempenho do sistema com fluxos pulsados foi superior àquele com fluxos constantes quanto ao limite de detecção: 0,33 contra 0,60 mg L⁻¹ (critério 3,3 σ), e à repetibilidade: d.p.r. estimado como 2,5 contra 5,6% (n = 20); quanto à exatidão, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o método proposto e o da Farmacopeia Britânica ao nível de confiança de 95%. Na determinação de carbaril, o uso de fluxos pulsados favoreceu a extração do analito, obtendose uma sensibilidade 9,3% maior relativamente ao emprego de fluxos constantes, além de uma melhor linearidade da curva analítica; entretanto, o método mostrou-se susceptível a interferência de outros metilcarbamatos, o que comprometeu sua aplicação à análise de águas naturais. Na determinação de acidez total, a exploração de fluxos pulsados proporcionou menores variações da razão dos valores de absorbância relativos ao monitoramento do traçador e do indicador; não foi encontrada diferença estatística entre as titulações em fluxo propostas e o método titulométrico de referência ao nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: Análises químicas em fluxo. Fluxos pulsados. Espectrofotometria UV-Vis. Extração líquido-líquido. Reagentes imobilizados. Titulações em fluxo.

ABSTRACT

Sasaki, M. K. Comparison of flow analyzers exploiting constant or pulsed flows: application to samples of pharmaceutical, agronomical and/or environmental relevance. 2015. 100 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Multi-pumping flow systems use solenoid pumps as fluid propelling devices, which deliver pulsed flows. These flows provide an efficient radial mass transport, thus good mixing conditions even in limited sample dispersion situations. The main objective of this work was then to compare the performance of methodologies involving immobilized reagents in flow systems with constant or pulsed flows. To this end, the spectrophotometric determinations of ascorbic acid in pharmaceutical products using a 50-cm polyethylene tubular reactor with immobilized MnO₂(s) with further colour-forming reaction with 0.25 mol L⁻¹ formaldoxime; and carbaryl in natural waters exploiting liquid-liquid extraction with xylene immobilized in a PVDF membrane and a 0.1 mol L⁻¹ NaOH solution as acceptor stream, were selected. Moreover, constant and pulsed flows were compared in relation to a novel strategy for flow titration, named tracer-monitored titration; the determination of total acidity in vinegars was selected and flow injection and triangle-programmed titrations were applied, both using a 0.01 mol L⁻¹ NaOH solution as titrant, phenolphtalein as acid-base indicator and ca. 6 mg L⁻¹ brilliant blue FCF as tracer. Regarding ascorbic acid determination, the pulsed flow system was superior in relation to the constant flow system for detection limit: 0.33 against 0.60 mg L^{-1} (3.3 σ criterion), and for repeatability: r.s.d. estimated as 2.5 against 5.6% (n = 20); in relation to accuracy, no significant differences between the proposed method and that of the British Pharmacopoeia were found at the 95% confidence level. Regarding carbaryl determination, use of pulsed flows favored the analyte extraction, leading to a 9.3% sensitivity improvement in relation to use of constant flows; besides the attainment of better linearity of the analytical curve. The method was however susceptible to interference of other methylcarbamates, thus the application to natural water analyses was impaired. Regarding total acidity determination, pulsed flows exploitation provided lower variations in the ratio of absorbance values related to the monitoring of tracer and indicator; no significant differences between the proposed titrations and the reference method were found at the 95% confidence level.

Keywords: Flow analysis. Pulsed flows. UV-Vis spectrophotometry. Liquid-liquid extraction. Immobilized reagents. Flow titrations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fluxos constantes e pulsados conforme suas variações em vazão	20
Figura 2.	Painel frontal do programa para acionamento de dispositivos escrito em LabVIEW	37
Figura 3.	Diagrama de blocos do programa para acionamento de dispositivos escrito	51
1 15414 5.	em LabVIEW	37
Figura 4.	MnO ₂ sólido incorporado à resina poliéster	39
Figura 5.	MnO ₂ sólido impregnado em tubo de polietileno	40
Figura 6.	Diagrama dos sistemas com FC e FP para determinação de ácido	
8	ascórbico	41
Figura 7.	Placa de PTFE com canal cunhado para passagem de fluidos	45
Figura 8.	Câmara para extração via SLME	45
Figura 9.	Diagrama de fluxos dos sistemas com FC e FP para verificação da	
C	eficiência de extração de carbaril via SLME	47
Figura 10.	Diagrama de fluxos do sistema para extração de carbaril via SLME e	
	derivatização com p-aminofenol	50
Figura 11.	Diagrama de fluxos dos sistemas por injeção em fluxo e programado em	
_	triângulo para titulações monitoradas por traçador	54
Figura 12.	Curvas analíticas obtidas com diferentes reatores com MnO ₂ sólido	57
Figura 13.	Influência do volume de amostra	58
Figura 14.	Influência dos volumes de solução-tampão e de formaldoxima	59
Figura 15.	Influência do comprimento da bobina reacional	60
Figura 16.	Influência do comprimento da bobina impregnada	61
Figura 17.	Influência da concentração de formaldoxima	61
Figura 18.	Influência da concentração hidrogeniônica da solução-tampão	62
Figura 19.	Influência da concentração da solução-tampão	63
Figura 20.	Influência da acidez da solução transportadora	63
Figura 21.	Influência dos volumes por pulso para sistema com FP	66
Figura 22.	Espectros de absorção de carbaril e da sua forma hidrolisada, α-naftol	68
Figura 23.	Influência da vazão da fase doadora	69
Figura 24.	Espectro de absorção do solvente orgânico xileno	70
Figura 25.	Influência do volume de amostra	71
Figura 26.	Influência da concentração da fase aceptora	72
Figura 27.	Extração de metilcarbamatos via SLME	75
Figura 28.	Influência da sequência de adição dos reagentes	76
Figura 29.	Influência do volume de reagente cromogênico	78
Figura 30.	Influência da concentração de reagente cromogênico	78
Figura 31.	Influência do comprimento do reator helicoidal	79
Figura 32.	Curvas analíticas para determinação de carbaril com derivatização com <i>p</i> -	
	aminofenol	80
Figura 33.	Influência do pH sobre os espectros de absorção dos corantes	81
Figura 34.	Espectros dos corantes	82
Figura 35.	Registros do sistema para titulação por injeção em fluxo	84
Figura 36.	Registros do sistema para titulação em fluxo programada em triângulo	85
Figura 37.	Registros das titulações com traçador com fluxos pulsados	86
Figura 38.	Registros típicos das titulações de vinagre	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Parâmetros investigados e valores selecionados	64
Tabela 2.	Resultados comparativos	67
Tabela 3.	Eficiência de extração e fator de enriquecimento da estratégia proposta	73
Tabela 4.	Dados de recuperação	74
Tabela 5.	Resultados de acidez total em vinagres	88

LISTA DE SIGLAS

AA Ácido Ascórbico

AOAC Association of Official Analytical Chemists

BB Brilliant Blue FCF
FC Fluxo Constante
FP Fluxo Pulsado

IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry

LEDLight Emitting DiodeLLELiquid-Liquid ExtractionMPFAMulti-Pumping Flow Analysis

OTR Open Tubular Reactor
PTFE Poly(tetrafluoroethylene)
PVDF Poly(vinylidene fluoride)

SLME Supported Liquid Membrane Extraction

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA.	23
2.1. Reagentes imobilizados em análises em fluxo	23
2.1.1. Reagentes sólidos imobilizados	23
2.1.2. Extrações líquido-líquido e solventes imobilizados	25
2.2. Titulações com traçadores	27
2.3. Os analitos	29
2.3.1. Ácido ascórbico	29
2.3.2. Carbaril	30
2.3.3. Acidez total em vinagres	32
3. EXPERIMENTAL 3	34
3.1. Material	34
3.2. Soluções	35
3.2.1. Determinação de ácido ascórbico	35
3.2.2. Determinação de carbaril	35
3.2.3. Titulação de acidez total	36
4. MÉTODOS	37
4.1. Determinação de ácido ascóbico	8
4.1.1. Reator imobilizado com MnO ₂ (s)	8
4.1.2. Os sistemas de análises em fluxo	10
4.1.3. Otimização dos principais parâmetros	11
4.1.4. Comparação entre sistemas com FC ou FP	12
4.1.5. Aplicação	13
4.2. Determinação de carbaril	13
4.2.1. Câmara para SLME	15
4.2.2. Sistemas de análises em fluxo para verificação da eficiência de extração	16
4.2.3. Otimização dos principais parâmetros para a extração	17
4.2.4. Eficiência e seletividade da extração de carbaril via SLME	18
4.2.5. Estratégias para derivatização e dimensionamento do sistema	19
4.3. Determinação de acidez total	50
4.3.1. Aspectos teóricos	51
4.3.2. Seleção do traçador	53
4.3.3. Concentração do titulante	54
4.3.4. Sistemas de análises em fluxo	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1. Determinação de ácido ascórbico	56
5.1.1. Reator com MnO ₂ sólido	56
5.1.2. Otimização dos principais parâmetros	58
5.1.3. Comparação entre sistemas com FC ou FP	54

5.1.4. Aplicação	66
5.2. Determinação de carbaril	67
5.2.1. Otimização dos principais parâmetros para a extração	67
5.2.2. Eficiência da extração.	73
5.2.3. Seletividade da extração e aplicação.	74
5.2.4. Estratégias para derivatização e dimensionamento do sistema	75
5.3. Determinação de acidez total	80
5.3.1. Seleção do traçador	80
5.3.2. Concentração do titulante	83
5.3.3. Dimensionamento do sistema	83
5.3.4. Aplicação	87
6. CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	91

1. INTRODUÇÃO

A mecanização dos procedimentos de análises químicas tem sido crescente, devido principalmente à maior disponibilidade de instrumentação e de dispositivos analíticos compactos e simples. O controle dos principais parâmetros que condicionam uma determinação analítica tem sido então aprimorado, visando à obtenção de resultados confiáveis, de forma rápida e segura. Dentre as diversas possibilidades de mecanização, destacam-se aquelas envolvendo sistemas de análises químicas em fluxo, que se caracterizam por um rígido controle espacial e temporal, o que permite que as diferentes etapas da análise sejam conduzidas de maneira eficiente e reprodutível. Outras características favoráveis destes sistemas podem ser mencionadas, tais como os baixos custos de instalação, operação e manutenção dos analisadores, a flexibilidade dos módulos de análises, a facilidade de operação e controle, os baixos consumos de amostras e de reagentes e o reduzido tempo de análise, dentre outras. A consumo de amostras e de reagentes e o reduzido tempo de análise, dentre outras.

A operação destes sistemas envolve a introdução de uma alíquota da amostra-teste em um fluxo transportador, a qual é direcionada ao detector. Durante o transporte, a zona de amostra estabelecida participa das operações inerentes ao método analítico, tais como diluição, adição de reagentes, diálise, troca-iônica, extração líquido-líquido e difusão gasosa. A seguir, a amostra processada passa pela unidade de detecção e o sinal analítico é registrado em forma de pico, idealmente proporcional à concentração do analito.

Os sistemas de análises em fluxo tornaram-se ferramenta importante e bem estabelecida na Química Analítica, inclusive no Brasil. Pesquisadores brasileiros tiveram importante participação desde os primeiros trabalhos publicados sobre o tema e, atualmente, dos trinta artigos científicos mais citados em Química Analítica, de pesquisadores nacionais, um terco se refere à análises em fluxo.

Dentre as contribuições com a participação de pesquisadores brasileiros pode-se citar os sistemas de análises em fluxo com multi-impulsão (MPFA, *Multi-Pumping Flow Analysis*), os quais empregam bombas solenoide como unidade propulsora de fluidos. Estas bombas podem ser atuadas de forma individual ou conjunta, o que confere alta versatilidade ao sistema, e desempenham papel importante no que se refere a bombeamento-injeção-homogeneização-comutação. Além disso, as bombas solenoide fornecem um fluxo pulsado (FP), o que contrasta com os fluxos pulsantes / constantes (FC) característicos dos sistemas que empregam bombas peristálticas ou de pistão; e esta diferença reside nas variações da vazão em função de tempo, como representado na Figura 1, onde situações com FC

(gráficos da parte superior) envolvendo uma solução (esquerda) ou duas soluções distintas (direita) são comparadas com situações análogas envolvendo FP (gráficos da parte inferior), e observa-se que a vazão tende à constância com FC, ao passo que variações acentuadas e repetitivas são inerentes aos FP. Na utilização pioneira⁷ de bombas solenoide em sistemas de análises em fluxo, a pulsação dos fluxos foi considerada como fator limitante; entretanto, trabalhos posteriores demonstraram que a utilização de FP é vantajosa em diferentes estratégias, devido às melhores condições de mistura que podem ser obtidas.

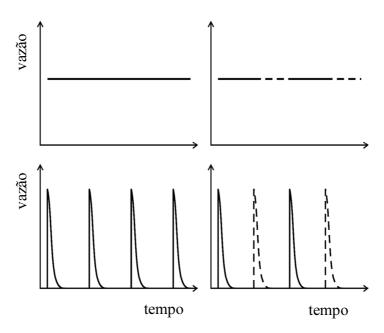


Figura 1 - Fluxos constantes e pulsados conforme suas variações em vazão. Representação da variação da vazão em função do tempo para sistemas com fluxos constantes (acima) e pulsados (abaixo), envolvendo uma (esquerda) ou duas (direita) soluções.

A boa homogeneização das soluções envolvidas inerente ao FP, mesmo em situações de dispersão limitada, deve-se à tendência de mistura turbulenta (*turbulent mixing*), ⁸ e consequente transporte radial de massas mais eficiente. Este aspecto foi evidenciado em diferentes situações:

• **Registro dos sinais analíticos.** A dispersão nos sistemas com FP é menor relativamente aos sistemas baseados em multicomutação que exploram FC, o que resulta em picos caracterizados por menor tempo de aparecimento, menor tempo de limpeza e maior altura, ⁹ refletindo em uma melhor frequência de amostragem;

- Sensibilidade analítica. O grau de desenvolvimento das reações químicas pode ser aumentado em função da melhor homogeneização das soluções envolvidas (aspecto mais pronunciado em reações relativamente lentas), o que pode resultar em melhoria em sensibilidade analítica;¹⁰
- Transferência de calor. A transferência de calor é mais eficiente nos sistemas com FP do que naqueles com FC, devido à maior movimentação dos elementos de fluido sob condições de fluxo pulsado. O aspecto é evidenciado em processos envolvendo reações químicas conduzidas em ambiente aquecido;¹¹
- Leitos fluidizados. Nesta estratégia, reagentes sólidos são utilizados sem o empacotamento destes em colunas. A pulsação inerente aos sistemas com FP possibilita um refluxo das partículas sólidas, o que resulta em uma melhor interação destas com a fase móvel. 12 Isto minimiza algumas desvantagens inerentes ao emprego de colunas empacotadas, tais como o estabelecimento de caminhos preferenciais, excessiva pressão hidrodinâmica, efeitos de contração / expansão (swelling) e menor acessibilidade a alguns sítios ativos;
- Extração líquido-líquido. A transferência do analito entre fases imiscíveis pode ser favorecida pela mistura turbulenta, permitindo uma melhor dispersão do extrator orgânico na fase aquosa contendo o analito; 13
- Difusão gasosa. A maior movimentação dos elementos de fluido, proporcionado pelas bombas solenoide, resulta em maior eficiência da difusão de espécies voláteis, através de membranas semi-permeáveis.¹⁴

Artigo revisional recente¹⁵ salientou a aplicabilidade dos sistemas de análises em fluxo com bombas solenoide, destacando a definição de FP como sendo "aqueles resultantes da acentuada e repetitiva variação em vazão, dos pequenos volumes propelidos por estas bombas"; as potencialidades e limitações deste tipo de sistema em fluxo; e a tendência de desenvolvimento e implementação de sistemas portáteis para análises *in situ*. Dentre estes últimos, tem-se o analisador de fosfato¹⁶ utilizado para a análise de águas de estações de tratamento de águas residuais. Este analisador foi projetado de modo a explorar as vantagens (versatilidade, portabilidade, baixo consumo de reagentes e de energia elétrica) alcançadas com o emprego de bombas solenoide.

O presente trabalho teve como objetivo principal a comparação entre metodologias baseadas no uso de reagentes imobilizados em sistemas de análises em fluxo envolvendo fluxos pulsantes (nesta tese tratados como constantes) ou pulsados. Para esta comparação, foram avaliadas as determinações espectrofotométricas de ácido ascórbico em produtos farmacêuticos, utilizando reator com MnO₂(s) imobilizado em sua parede interna; e de carbaril em águas naturais, utilizando extração líquido-líquido com solvente orgânico imobilizado em membrana hidrofóbica. Adicionalmente, compararam-se estes diferentes tipos de fluxo em sistemas de análises em fluxo para a determinação de acidez total em vinagres, utilizando titulação monitorada por traçador.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A seguir, são abordados os principais temas relacionados às determinações avaliadas neste trabalho.

2.1. Reagentes imobilizados em análises em fluxo

Os reagentes imobilizados têm sido utilizados em sistemas de análises em fluxo como uma unidade discreta antes da unidade de detecção ou ainda, integrada à mesma, como no caso dos biosensores.¹⁷ Esses reagentes podem estar na forma sólida ou líquida.

2.1.1. Reagentes sólidos imobilizados

Os reagentes sólidos têm sido frequentemente empregados em sistemas de análises em fluxo, o que facilita o uso de espécies químicas levemente solúveis, evita a necessidade de armazenamento de soluções instáveis e reduz o consumo do reagente de maneira pronunciada. Entre estes materiais comumente utilizados, têm-se ligas metálicas, óxidos, polímeros molecularmente impressos, enzimas e resinas de troca-iônica, que são sólidos por natureza.⁴

Enzimas ¹⁸ têm sido utilizadas visando, principalmente, a análise de amostras de interesse clínico, alimentar e ambiental. Entretanto, a maioria das enzimas são relativamente caras, mesmo quando são adicionados estabilizantes químicos em sua imobilização, visando aumento da sua vida útil. Consequentemente, esses bioreatores devem ser projetados e incorporados aos sistemas, de forma a permitir a máxima utilização dos sítios ativos disponíveis.

As resinas de troca-iônica¹⁹ também têm sido muito empregadas em análises em fluxo para etapas de concentração e/ou separação em linha. Estas resinas são utilizadas com o objetivo de melhorar a seletividade de métodos, já que estes materiais podem ser eficientes adsorventes de íons livres e de complexos metálicos. Ainda, quando são empregadas saturadas com uma espécie química específica, a disponibilidade desta espécie na coluna com resina pode ser muito mais elevada do que em solução, favorecendo o uso de reagentes com limitada solubilidade. Em sistemas de análises em fluxo, as resinas ainda podem ser versatilmente empregadas no módulo de análises de forma a possibilitar etapas de reação e de recondicionamento em linha da coluna.

Outra importante potencialidade do uso de reagentes sólidos é a espectrofotometria em fase sólida, 20,21 que se baseia na medida direta da absorção da radiação incidente na fase sólida quando a espécie de interesse (ou uma outra espécie formada a partir desta) é retida nesta fase. As resinas de troca iônica são os sólidos mais utilizados para essa finalidade, entretanto, espumas, filmes e membranas, que em geral não apresentam propriedades de troca-iônica, também tem sido utilizados na estratégia de detecção. De maneira semelhante, medidas quimiluminométricas podem ser realizadas em sistemas de análises em fluxo e, como exemplo, pode ser citado o trabalho utilizando luminol covalentemente ligado ou adsorvido a pequenas partículas-suporte, as quais eram empacotadas em mini-colunas.²²

Os reagentes sólidos são em geral empacotados em mini-colunas, as quais são inseridas no módulo de análises, porém algumas desvantagens tais como estabelecimento de caminhos preferenciais, pressão hidrodinâmica elevada, efeitos de contração / expansão (*swelling*) e inacessibilidade a sítios ativos¹² podem se manifestar.

Os reatores rotativos em disco (*rotating disc reactors*)¹⁸ podem minimizar significantemente algumas destas desvantagens, com a utilização mais eficiente dos sítios ativos de enzimas imobilizadas permitindo, assim, que quantidades muito pequenas do reagente sejam efetivamente empregadas. As enzimas são imobilizadas na superfície de partículas de vidro com tamanho de poro controlado (*controlled-pore glass*), as quais são fixadas sobre os reatores com a utilização de fita "dupla-face". Estes reatores rotativos são posicionados dentro de uma câmara em material polimérico, e se constituem em um disco em PTFE, com uma barra magnética embutida e uma agulha afixada no centro da parte inferior deste, a qual tem a finalidade de possibilitar que o disco seja acomodado numa reentrância cônica especialmente usinada na parte inferior da câmara, além de permitir a rotação do disco com o acionamento de um agitador magnético posicionado abaixo do reator.

Outra interessante estratégia nesse contexto são os reatores tubulares abertos, ²³ que empregam o reagente sólido impregnado nas paredes internas de tubos, o que permite a interação da zona de amostra com a fase sólida imobilizada. Estes reatores apresentam boa estabilidade e os resultados analíticos são reprodutíveis durante longos períodos de utilização, conforme demonstrado *e.g.* na determinação de reserpina em formulações farmacêuticas²⁴ utilizando MnO₂(s) imobilizado. Em função do fluxo constante envolvido, uma baixa interação da zona de amostra com a parede do reator foi verificada, resultando em menor sensibilidade analítica relativamente ao emprego do reagente em solução. Esta interação pôde ser melhorada empregando-se menor vazão, porém a velocidade analítica se deteriorava.

2.1.2. Extrações líquido-líquido e solventes imobilizados

As extrações líquido-líquido (LLE, *liquid-liquid extraction*) se baseiam na transferência de uma substância dissolvida em uma fase para outra, em geral uma orgânica e outra aquosa; almejando-se isolar ou concentrar o constituinte desejado ou separá-lo de espécies que podem interferir na análise.²⁵

LLE convencionais apresentam entretanto, várias desvantagens, destacando-se o grande consumo de solventes orgânicos, como pode ser observado em vários métodos oficiais de agências reguladoras, onde são utilizados vários mililitros de solvente por extração que, quando considerados para muitas análises, tornam este tipo de extração pouco favorável ao meio ambiente e ao analista. Ainda, o preço de alguns solventes específicos pode se constituir em fator limitante e, geralmente, essas estratégias são laboriosas e difíceis de serem automatizadas. Estas desvantagens tornam a pesquisa de estratégias alternativas de extração, um ramo importante da Química Analítica.²⁶

Em sistemas de análises em fluxo, a implementação de LLE apresenta inúmeras vantagens comparativamente aos procedimentos extrativos manuais.²⁷ Destaque-se a redução do consumo de solventes orgânicos, reagentes e amostras, o que torna os procedimentos mais amigáveis ao meio ambiente, e com menos riscos ao analista. Neste sentido, estratégias com extrações simples e múltiplas, extrações em filme de solvente, extrações com membrana, retro-extrações, sistemas fechados, além da utilização de amostragem de zonas, e cromatomebranas, têm sido relatadas em métodos explorando extração nesses sistemas.²⁷

Entretanto, a implementação de LLE em sistemas de análises em fluxo pode ser dificultada, especialmente considerando-se a volatilidade da maioria dos solventes orgânicos utilizados, assim como a agressividade relativamente aos materiais usados.

Neste contexto, a exploração de estratégias extrativas com membranas tem sido crescente, ²⁸ pois possibilita a extração seletiva e/ou a concentração de analitos de diferentes matrizes utilizando volumes reduzidos de solventes. Com a utilização de membranas líquidas, ^{26,29} as estratégias extrativas tendem a se tornar mais seletivas, apresentar altos fatores de enriquecimento e facilitar a automação, além dos aspectos econômicos e de segurança, que são favorecidos.

Em todos os tipos de extração por membrana, ^{26,29} a mesma separa a fase com amostra (também chamada de fase doadora) da fase aceptora ou removedora, e o analito passa através da membrana de uma fase a outra. Este processo, também conhecido como pertração (do inglês *pertraction: permeation-extraction*), pode ser dividido em extração por membrana em uma, duas ou três fases. Exemplos típicos de extração em uma fase são a filtração e a diálise, onde os processos são governados por propriedades físicas e, como as fases doadora e aceptora são similares, não há a formação de interface (partição) entre fases. Em sistemas em duas fases, uma delas é igual à da membrana, por exemplo, um solvente orgânico que pode estar presente tanto na membrana quanto na fase aceptora, enquanto se tem uma fase doadora aquosa ou gasosa, formando-se assim uma interface e, consequentemente, um equilíbrio de partição. Já nas extrações em três fases, a fase na membrana é diferente da doadora e da aceptora, formando um sistema com duas interfaces entre as fases, estabelecendo-se assim, duas etapas diferentes de extração, que podem ser definidas para diferentes tipos de reações químicas, de forma a se obter alta seletividade.

A extração com solvente suportado em membrana (SLME, *supported liquid membrane extraction*)³⁰ é o tipo mais utilizado de extração em três fases, onde um solvente orgânico é imobilizado em uma membrana hidrofóbica porosa (planar ou tubular), e a escolha de diferentes pares de fases doadora / aceptora é responsável pela obtenção de extrações (fase doadora / membrana e membrana / fase aceptora) mais eficientes. Apesar de muito explorada, principalmente para a obtenção de extratos com os analitos em maiores concentrações, SLME apresenta como maior desvantagem o efeito de memória entre amostras, tornando-se necessária a limpeza ou a troca da membrana entre extrações.

Como em outros processos envolvendo membranas, a transferência de massas através da membrana em SLME baseia-se na diferença de potenciais químicos do soluto nas soluções, ou seja, a intensidade do fluxo difusional do soluto é controlada pela diferença em concentração entre as fases doadora e aceptora, e pode ocorrer por dois mecanismos:²⁹

- a membrana líquida atua isoladamente como um solvente físico para a permeação;
- a membrana líquida contém um componente que facilita a permeação de massas da fase doadora para a membrana e desta para a fase aceptora.

A constante de distribuição²⁶ entre as fases aceptora e doadora é dada por:

$$D = \alpha_D K_D / \alpha_A K_A$$

onde D: constante de distribuição entre fases aceptora e doadora; α_A e α_D : frações extraíveis do analito na fase aceptora e doadora, K_A e K_D : coeficientes de partição entre as fases aceptora/membrana e doadora/membrana.

A aplicação pioneira de SLME em sistema de análises em fluxo objetivou o *clean up* de amostras e concentração em linha de aminas.³¹ Outros exemplos, tais como a determinação amperométrica de eugenol em temperos³² e a determinação espectrofotométrica de cafeína em amostras de café e de chá ³³ podem ser mencionados. Em ambas as propostas, as determinações foram realizadas sem nenhum tratamento prévio das amostras. Entretanto, a membrana precisava ser limpa e regenerada após cada extração e, na segunda aplicação, a faixa de trabalho se situava na ordem de grama de cafeína por litro.

A estratégia tem sido empregada em relação a fluxos constantes, e a porção da fase aquosa mais próxima à membrana é a que melhor interage com a mesma. O emprego de FP em SLME parece ainda não ter sido relatado e tende a contribuir para a melhoria da interação fase aquosa / fase orgânica, em função do melhor transporte radial massas, assim como relatado na extração de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em águas realizada com agitação magnética,³⁴ o que permitiu uma extração eficiente utilizando membrana polimérica.

2.2. Titulações com traçadores

Um traçador é uma substância monitorável introduzida em um sistema dinâmico para seguir o curso de um processo, e fornecer informações acerca do padrão de eventos e/ou da redistribuição de partes ou elementos envolvidos no mesmo. ³⁵ Estratégias com monitoramento envolvendo traçadores têm sido exploradas em diferentes campos como, por exemplo, estudos hidrológicos³⁶ e sobre nutrição de plantas. ³⁷ Exemplos típicos de traçadores são os corantes e os nuclídeos radioativos (ou estáveis). O traçador ideal deve apresentar as mesmas propriedades químicas da espécie de interesse, não interagir com outros componentes do meio reacional e ser facilmente detectável.

Em Química Analítica, estratégias com monitoramento por traçador têm sido frequentemente exploradas, especialmente para avaliação de recuperação³⁸ e padronização interna. ³⁹ Com relação à titulações, uma abordagem engenhosa foi proposta para a determinação espectrofotométrica da alcalinidade total em águas do mar. ⁴⁰ A adição de um

corante como traçador na solução titulante possibilitou a estimativa em tempo real tanto da fração volumétrica (amostra / titulante) como do pH da mistura, a cada adição de titulante. A curva de titulação inteira era então obtida sem a necessidade de medidas físicas de volume, massa, vazão ou cargas elétricas.

A inovação foi posteriormente investigada em relação a titulações ácido-base, óxido-redução e complexométrica. Al Na titulação de hidróxido de sódio com ácido clorídrico, o corante azul brilhante foi usado como traçador e as variações de pH eram potenciometricamente monitoradas. Na titulação de ácido ascórbico com iodo, íons cloreto eram condutimetricamente monitorados como traçador e amido era adicionado para derivatização. Na titulação de cálcio com EDTA, na presença de calmagita, as medidas espectrofotométricas eram simultaneamente efetuadas em dois comprimentos de onda, permitindo que as variações das frações volumétricas e o curso da titulação fossem avaliados. Recentemente, uma titulação monitorada por traçador foi proposta para a determinação de oxigênio dissolvido em águas de mar, explorando o método clássico de Winkler. A possibilidade de se usar traçadores fluorescentes ou radioativos foi também salientada.

Como as titulações em geral envolvem adições sucessivas de titulante até a obtenção do ponto final, os sistemas de análises em fluxo sempre demonstraram ser ferramentas muito versáteis e eficientes para este fim. A maioria das titulações em fluxo tem explorado fluxos não-segmentados, embora aplicações recentes demonstraram a viabilidade de se empregar fluxos monossegmentados.⁴

Desde as primeiras tentativas de automatização de métodos titulométricos, no início dos anos 1900, muitas propostas de titulações em fluxo foram apresentadas, tais como aquelas envolvendo fluxos convergentes, gradientes de concentração ou multicomutação.⁴ A seguir, são feitas breves discussões sobre as estratégias de titulação em fluxo exploradas no presente trabalho.

A titulação programada em triângulo (do inglês, *triangle-programmed titration*)^{43,44} explora variações em vazão, dos fluxos convergentes de amostra e titulante, e o fluxo resultante destes é dirigido para a detecção. A vazão da amostra é geralmente constante, ao passo que a do titulante é linearmente incrementada até a obtenção do ponto final da titulação. A vazão do titulante necessária para a obtenção deste ponto é considerada para o cálculo do resultado analítico.

A titulação por injeção em fluxo (do inglês, *flow injection titration*)^{45,46} explora os gradientes de concentração estabelecidos na zona de amostra. A amostra é inserida em um fluxo titulante, submetida à dispersão controlada e então, monitorada. O intervalo de tempo decorrido entre duas medidas referentes às frações volumétricas amostra / titulante no ponto final da titulação, é proporcional ao logaritmo da concentração do analito. Já que a estratégia requer uma curva analítica, não pode ser classificada como titulação verdadeira segundo definição IUPAC;⁴⁷ consequentemente, ela tem sido considerada como uma pseudo-titulação.⁴

2.3. Os analitos

São consideradas nesta seção, as espécies alvo das três propostas apresentadas, com destaque para suas importâncias, assim como para as diferentes metodologias existentes para as suas determinações analíticas.

2.3.1. Ácido ascórbico

A vitamina C, um nutriente essencial ao ser humano, é uma vitamina hidrossolúvel e atua como agente redutor eficaz, desempenhando papel de coenzima em processos do metabolismo de neurotransmissores, lipídios e colágeno. Foi inicialmente chamada de ácido hexurônico e sintetizada pioneiramente pelo grupo liderado pelo professor Haworth em 1933, motivo pelo qual o pesquisador recebeu o prêmio Nobel de Química em 1937; sua fórmula molecular é $C_6H_8O_6$ e a utilização do nome L-ácido ascórbico foi recomendada em 1965 pela IUPAC.

Uma busca bibliográfica revela vários artigos revisionais versando sobre a importância de ácido ascórbico (AA) em tecidos animais, ⁵⁰ amostras biológicas ⁵¹ e alimentos. ⁵² Diversos procedimentos para sua determinação utilizando técnicas fotométricas, ⁵³ espectrofotométricas e titulométricas, ⁵⁴, ⁵⁵ não-espectrofotométricas ⁵⁶ e cromatográficas, ⁵⁷ têm sido propostos, muitos deles implementados em sistemas de análises em fluxo. ⁵⁸

Nestes últimos, as etapas envolvidas na determinação do analito têm sido realizadas de maneira contínua e automatizada, e as reações de óxido-redução, comumente envolvidas tem se tornado menos susceptíveis a erros provenientes da oxidação aerial. As técnicas de detecção mais utilizadas em relação a sistemas de análises em fluxo têm sido a espectrofotometria (principalmente na região visível) e a eletroquímica, notando-se ainda algumas aplicações envolvendo detecção luminométrica. ⁵⁸ Em 2008, foi relatado que AA está

entre os 25 analitos mais determinados em sistemas de análises em fluxo, dentre um universo de mais de 17 mil trabalhos publicados.⁵⁹

Deve-se destacar a determinação indireta deste analito em produtos farmacêuticos e alimentos utilizando um sistema de análises em fluxo com uma mini-coluna de MnO₂ (sólido) suspenso em sílica-gel.⁶⁰ O método era baseado na redução do manganês contido na fase sólida quando a amostra passava pela mini-coluna. O Mn²⁺ liberado (proporcional ao analito contido na amostra) era quantificado por espectrometria de absorção atômica.

2.3.2. Carbaril

Os primeiros agrotóxicos utilizados nas lavouras apresentavam baixa solubilidade em água e, consequentemente, forte poder de aderência ao solo. Com a evolução tecnológica, passaram a ser mais solúveis, além de apresentar menor capacidade de aderência ao solo. Entretanto, esses novos agrotóxicos continham diferentes compostos químicos, resultando em produtos cada vez mais tóxicos e persistentes no ambiente, apesar de eficientes no combate a pragas. Em outras palavras, aumentou-se o potencial nocivo dos agrotóxicos à saúde humana e ao meio ambiente.⁶¹

Estudos revelam que os casos de envenenamento agudo por agrotóxicos, em diferentes regiões do mundo, resultam de diversos fatores. Em países em desenvolvimento, a incidência desses casos tende a ser maior devido a fatores como regulamentação insuficiente, falta de sistemas de vigilância, falta de formação e/ou acesso inadequado aos sistemas de informação, equipamentos de proteção individual mal conservados ou inexistentes, e maiores populações sustentadas pela agricultura. Ainda, o uso de pesticidas proibidos, em particular aqueles altamente tóxicos, estoques obsoletos e técnicas de armazenamento impróprios agravam ainda mais a situação nesses países. 62

Estima-se que o Brasil seja o maior produtor e consumidor de agrotóxicos do mundo, desde 2009. Esto leva à perda da biodiversidade e da qualidade dos recursos hídricos do país. Monitoramentos de resíduos de agrotóxicos sinalizam que estes resíduos estão presentes em alimentos, na atmosfera, nas chuvas e em águas superficiais e subterrâneas. E, dentre os agrotóxicos atualmente mais utilizados na agricultura, estão os carbamatos e organofosforados, os quais apresentam atividade inseticida muito eficiente.

Carbaril (1-naftil-*N*-metilcarbamato)⁶⁴ é um inseticida da família dos carbamatos, mundialmente usado em substituição a alguns inseticidas organoclorados. Devido à sua eficiente ação inseticida, é utilizado em mais de 120 cultivos diferentes, sendo disponível em diferentes formas, tais como pó, pastilha, grânulo, suspensão e solução. Similarmente à maioria dos carbamatos, o carbaril inibe a enzima acetilcolinesterase, responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina dos insetos. Entretanto, esse efeito inibitório também é danoso a mamíferos, podendo afetar até o sistema nervoso central destes.

Apesar de sua toxicidade, este inseticida geralmente não é encontrado em concentrações significativas em águas potáveis, não sendo, portanto considerada necessária pela Organização Mundial de Saúde⁶⁵ a proposição formal de um limite permissível da espécie nesse tipo de matriz. Esse mesmo órgão de saúde, entretanto, estima em 50 μg L⁻¹ como um limite aceitável da espécie, levando-se em consideração 20% da ingestão diária aceitável do inseticida em alimentos, para um adulto de 60 kg, consumindo 2 L de água por dia.

Em relação à determinação de carbaril, há muitos métodos encontrados na literatura, envolvendo diferentes técnicas, tais como espectrofotometria, ⁶⁶ quimiluminescência, ⁶⁷ fluorimetria, ⁶⁸ espectrometria de massas, ⁶⁹ eletroquímica ⁷⁰ e espectrofotometria no infravermelho. ⁷¹ Diferentes estratégias têm sido exploradas nestes métodos como o uso de enzimas, ⁷² cromatografia líquida, ⁷³ cromatografia a gás, ⁶⁹ uso de polímeros molecularmente impressos ⁷⁴ e análises em fluxo. ⁷⁵

Dentre os sistemas de análises em fluxo propostos para a determinação de carbaril, destacam-se aqueles com detecção por quimiluminescência, como aquele baseado na atenuação do sinal gerado pela reação entre luminol e peróxido de hidrogênio em meio alcalino, catalisada por íons Co(II), onde a atenuação do sinal é proporcional à concentração do analito na amostra inserida. ⁷⁶ Similarmente, a redução de sinal resultante da reação quimiluminométrica foi explorada em sistema com as enzimas acetilcolinesterase e colina oxidase, empacotadas em mini-colunas e acopladas ao módulo de análises. Carbaril apresentava ação inibitória na geração enzimática de peróxido, o qual reagia com luminol catalisado por hexacianoferrato(III). ⁷⁷ Outras propostas, exploraram o aumento de sinal, na presença do analito, em reações quimiluminescentes entre luminol e KMnO₄ em meio alcalino; ⁶⁷ Na₂SO₃ e KMnO₄ em meio ácido; ⁷⁸ e metilamina e Ru(bpy)₃ ³⁺ (ambos gerados em linha). ⁷⁹

Já dentre os sistemas de análises em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de carbaril, podem ser citados aqueles explorando reação com *p*-aminofenol, envolvendo etapas prévias de extração líquido-líquido com xileno, ⁸⁰ ou em ponto nuvem e degradação fotoquímica do efluente gerado. ⁸¹

2.3.3. Acidez total em vinagres

Vinagres⁸² são produzidos a partir da fermentação de etanol por bactérias (conhecidas como acetobactérias ou bactérias do ácido acético) de fontes adequadas como, por exemplo, cidra, vinho, malte, grãos e frutas; e o principal produto desta fermentação é o ácido acético.⁸³

A acidez total, que resulta do processo fermentativo, é um dos parâmetros avaliados pelo método oficial da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*)⁸⁴ para vinagres, e se baseia na titulação volumétrica ácido-base, utilizando fenolftaleína como indicador. Além da titulação baseada em medidas de volume, esse método titulométrico também pode ser realizado por medidas de massa, como salientado em artigo da área educacional, ⁸⁵ voltado para aulas práticas de Química Geral. Esse parâmetro pode ser também avaliado por métodos envolvendo voltametria, ⁸⁶ potenciometria e condutimetria, ⁸⁷ e espectrofotometria no infravermelho. ⁸⁸

Existem ainda diversas propostas de titulação de acidez total de vinagres em sistemas de análises em fluxo; dentre estas, podem ser destacadas aquelas explorando fluxos monossegmentados, onde a zona de amostra, contendo a amostra e o(s) devido(s) reagente(s), flui entre duas bolhas de ar em direção à detecção, e este aprisionamento entre as fases gasosas pode favorecer o tempo de limpeza, assim como o desenvolvimento da reação, aumentando-se o tempo de residência, sem aumentar a dispersão. A estratégia foi explorada na titulação espectrofotométrica de acidez total de vinagres com NaOH como titulante e fenolftaleína como indicador, a qual envolveu adições sequenciais de amostra e titulante, formando uma zona de amostra que fluía entre duas bolhas de ar; e o ponto final da titulação era encontrado variando-se a proporção volumétrica entre as duas soluções, que era determinada por algoritmo baseado no método Fibonaci de otimização unidimensional. ⁸⁹ Outras aplicações envolvendo fluxos monossegmentados para determinação de acidez total de vinagres contaram com detecção potenciométrica e estratégia de busca binária (do inglês, binary search) para se encontrar o ponto final; ⁹⁰ e também sistema de injeção sequencial com detecção espectrofotométrica. ⁹¹

Entre os sistemas com fluxos não segmentados para essa mesma determinação, podem ser citados aqueles com injeção sequencial ⁹² e aqueles com exploração de gradientes de concentração, ⁹³ utilizando uma única solução padrão e diferentes estratégias de calibração. Outro exemplo interessante no contexto é o analisador com fluxo descontínuo com detecção fotométrica, ⁹⁴ baseado em um pequena câmara de mistura equipada com um agitador de alta velocidade, a qual era conectada à cela de detecção, e LED como fonte de radiação.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Material

Os resultados apresentados nesta tese foram obtidos com a utilização dos seguintes materiais:

- sistema Ocean Optics (Dunedin, EUA): espectrofotômetro UV-Vis modelo USB 4000, fonte de radiação (lâmpada de tungstênio / halogênio modelo LS-1 ou lâmpada de xenônio modelo PX-2), fibras ópticas (400 μm d.i.) e cubeta de fluxo de Ultem em "Z" (50 μL volume interno e 10 mm caminho óptico) ou cubeta de fluxo Hellma modelo 178.010-QS (80 μL volume interno e 10 mm caminho óptico) com suporte para cubeta modelo CUV-UV; registros adquiridos via programa SpectraSuite;
- bombas solenoide com volume de pulso variável (5 50 μL) modelo MCP-50 e válvulas de três vias modelo MTV-3, de fabricação *Takasago Electric, Inc.* (Nagoya, Japão); bomba peristáltica modelo IPC-8 de fabricação *Ismatec* (Glattbrugg, Suíça), com tubos de bombeamento em Tygon[®] ou Viton[®]:
- injetor proporcional de três peças confeccionado em acrílico;
- interface de controle NI USB-6008 de fabricação National Instruments (Budapeste, Hungria), acionada via software desenvolvido em linguagem LabVIEW, para acionamento de bombas e válvulas solenoide; e interface de compatibilização de voltagem;
- tubos de polietileno ou de PTFE (0,8 mm d.i.), para confecção dos reatores helicoidais e linhas de transmissão;
- resina poliéster insaturada e pré-acelerada de fabricação *Maxi Rubber* (Diadema, Brasil), para confecção de reator com reagente sólido incorporado;
- câmara de extração confeccionada com placa de PTFE com canais cunhados para passagem de fluidos (volume interno de *ca.* 330 μL, para cada um dos canais);
- câmara de mistura confeccionada em acrílico de 600 μL de volume interno (reduzido à
 ca. 500 μL quando da inclusão de barra para agitação magnética);
- membrana hidrofóbica em PVDF *Millipore* modelo GVHP09050 (Carrigtwohill, Irlanda)
 com 125 μm espessura, 75% porosidade e 0,22 μm de tamanho de poros;

- conectores de PTFE e outros acessórios dos sistemas de análises em fluxo;
- materiais de uso corrente em laboratórios de Química Analítica (*e.g.* vidraria, capelas, balança analítica); padrões; reagentes.

3.2. Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada (resistividade $> 18,2 \text{ M}\Omega$ cm) e reagentes de grau analítico. São descritos a seguir, os preparos das soluções para construção das curvas analíticas, reagentes e amostras, utilizadas nos trabalhos.

3.2.1. Determinação de ácido ascórbico

Soluções de 20,0 a 100,0 mg L^{-1} ácido ascórbico (AA) foram preparadas por diluições de uma solução 500,0 mg L^{-1} AA a qual era diariamente preparada por dissolução de 50,0 mg de $C_6H_8O_6$ (Fisher Scientific, Waltham, EUA) em 100,0 mL de água.

A solução de formaldoxima (0,25 mol L⁻¹) foi preparada dissolvendo-se 1,69 g do reagente sólido (formaldoxime trimer hydrochloride; C₃H₉N₃O₃ • xHCl; CAS: 62479-72-5; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) em 50,0 mL de água. A solução-tampão 1,0 mol L⁻¹ carbonato / hidrogenocarbonato foi preparada dissolvendo-se 4,2 g de NaHCO₃ em cerca de 30 mL de água, ajustando-se o pH a 10,5 com solução de hidróxido de sódio, e completando-se o volume para 50,0 mL com água. Os produtos farmacêuticos foram adquiridos em farmácia local e preparados para análise de diferentes formas. Comprimidos efervecentes (1000 - 2000 mg AA por tablete) e cápsulas (45 - 500 mg AA por cápsula) foram preparados pesando-se e pulverizando-se um número representativo (>10) dos produtos sólidos, e quantidades destes pulverizados suficientes para perfazer *ca.* 50 mg AA foram pesadas e dissolvidas em água, sendo o volume completado a 1000 mL com água. Para análise de formulações líquidas (*ca.* 200 mg mL⁻¹ AA), alíquotas de 250 μL foram amostradas e diluídas para 1000 mL com água.

3.2.2. Determinação de carbaril

Soluções-padrão (100,0 - 1000,0 $\mu g \ L^{-1}$ carbaril) foram preparadas por diluições de uma solução de carbaril 10,0 mg L^{-1} , a qual era preparada por dissolução (assistida por

ultrassom) de 2,50 mg de 1-naftil-*N*-metilcarbamato (C₁₂H₁₁NO₂; CAS: 63-25-2; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) em 250,0 mL de água.

O solvente orgânico xileno (C₆H₄(CH₃)₂; CAS: 1330-20-7; Merck, Hohenbrunn, Alemanha) foi imobilizado na membrana hidrofóbica.

A solução aceptora era preparada por dissolução de 2,0 g de NaOH em 500,0 mL de água, de modo a perfazer solução 0,1 mol L⁻¹. A solução de *p*-aminofenol (50 mg L⁻¹) era preparada por dissolução de 2,5 mg do reagente sólido (C₆H₇NO; CAS: 123-30-8; Merck, Hohenbrunn, Alemanha) em 50,0 mL de água.

As amostras de águas naturais foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Ecologia Isotópica do CENA / USP, e compreenderam amostras coletadas nos rios do Estado de São Paulo: Camanducaia, Jaguari e Ribeirão das Posses; assim como águas provenientes de escoamento superficial de uma área predominantemente recoberta por cana de açúcar em uma microbacia inserida na bacia hidrográfica do rio Corumbataí. Essas amostras foram preparadas por filtragem em membrana de acetato de celulose de 0,45 μm, preservação sob refrigeração (*ca.* -4°C) e estabilização térmica imediatamente antes das análises.

3.2.3. Titulação de acidez total

Azul brilhante FCF ($C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$; CAS: 3844-45-9) e fenolftaleína, aqui designados como BB e phen, foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

O titulante era uma solução $0.01 \text{ mol } L^{-1} \text{ NaOH}$, padronizada com hidrogenoftalato de potássio $(C_8H_5KO_4)^{.25}$ Imediatamente antes do uso, algumas gotas de uma solução 0.5% (m/v) phen em 50% (v/v) etanol, e uma massa diminuta de BB em pó, suficiente para perfazer $ca.6 \text{ mg } L^{-1} \text{ na solução titulante}$, foram adicionados.

As amostras de vinagre foram adquiridas em mercado local. Antes das análises, eram diluídas (1:20 v/v) com água.

4. MÉTODOS

Os três procedimentos aqui apresentados exploraram espectrofotometria UV-Vis e foram implementados em sistemas com FC ou FP. Para acionamento e temporização dos dispositivos como bombas e válvulas solenoide, foram utilizados programas (como o representado nas Figuras 2 e 3) escritos em linguagem *LabVIEW*.

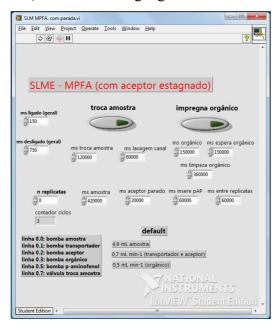


Figura 2 - Painel frontal do programa para acionamento de dispositivos escrito em *LabVIEW*. Determinação de carbaril via SLME com o sistema com bombas solenoide.

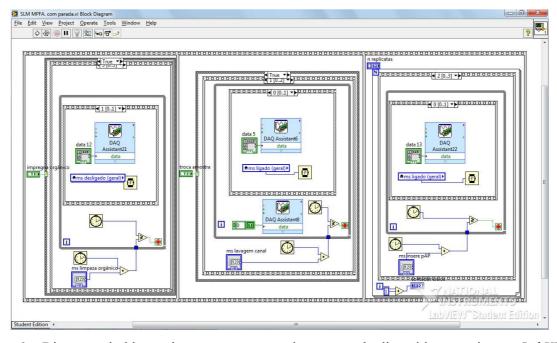


Figura 3 - Diagrama de blocos do programa para acionamento de dispositivos escrito em *LabVIEW*. Determinação de carbaril via SLME com o sistema com bombas solenoide.

4.1. Determinação de ácido ascórbico

O método proposto para a determinação de AA envolve sua oxidação por Mn(IV) (reator com MnO_2) com liberação da forma reduzida Mn^{2+} para a fase aquosa e posterior monitoramento do íon liberado, cuja quantidade é proporcional à concentração do analito, conforme equação 1.

$$MnO_2 + C_6H_8O_6 + 2H^+ \longrightarrow Mn^{2+} + C_6H_6O_6 + 2H_2O$$
 (1)

Para a quantificação de Mn²⁺, foi inicialmente avaliada a possibilidade de se explorar a reação catalítica envolvendo a oxidação de verde de malaquita por periodato em condições levemente ácidas, cuja velocidade é afetada pela presença de Mn²⁺. ⁹⁶ Esta reação mostrou-se, porém inadequada, pois também envolvia óxido-redução, e o efluente da coluna com reagente imobilizado (contendo AA remanescente) tinha grande influência sobre ela. Este inconveniente foi contornado utilizando-se a reação de complexação com formaldoxima (H₂C=NOH). ⁹⁷ O reagente dissocia-se em meio alcalino, produzindo o ânion H₂C=NO⁻, que rapidamente forma complexos estáveis e coloridos com cátios de metais multivalentes, tais como o Mn²⁺.

Um método similar envolvendo espectrometria de absorção atômica com chama foi implementado em um sistema de análises em fluxo, 60 e utilizava MnO₂(s) ligado à sílica gel e empacotado em mini-coluna. Figuras de mérito favoráveis foram obtidas mas, como uma mini-coluna era utilizada, algumas limitações, como citado anteriormente, poderiam persistir, tais como estabelecimento de caminhos preferenciais, efeitos com aumento de pressão no sistema e limitada acessibilidade a sítios ativos.

4.1.1. Reator imobilizado com MnO₂(s)

Previa-se a princípio, a construção de um reator com partículas sólidas de MnO₂ incorporadas à parede interna de tubo polimérico. Este reator seria construído segundo o procedimento descrito por Gosnell e colaboradores, ²³ que incoporaram esferas de vidro (com porosidade controlada) às paredes internas de tubos de PTFE ou de Tygon, para servirem como suporte para a imobilização de enzimas. Este procedimento, porém, utilizava altas temperaturas (até 350 °C), além de possivelmente resultar em incorporações heterogêneas das partículas à parede do tubo.

Foram então avaliadas diferentes estratégias para a utilização do reagente sólido, sem a necessidade de empacotá-lo em mini-coluna.

Na estratégia para a imobilização de MnO₂ em resina poliéster, ⁹⁸ sem etapa de moagem da resina com o reagente incorporado, o reagente sólido foi adicionado à resina líquida em diferentes proporções (1,0:1,0; 0,5:1,0; 0,1:1,0 m:m, MnO₂:resina), juntamente com algumas gotas de catalisador, e moldado em tubo Falcon de 15 mL, onde foi seco à temperatura ambiente por 2 dias. A seguir, a coluna era furada com broca de 2,7 mm de diâmetro; seções de 5,0 cm das colunas foram avaliadas no módulo de análises, empregandose pedaços de tubo Tygon como luvas para conexão com os tubos de polietileno das linhas de transmissão (Figura 4).



Figura 4 - MnO₂ sólido incorporado à resina poliéster. Vista aérea da coluna (foto à esquerda) e corte transversal (foto à direita) das diferentes proporções avaliadas. Da esquerda para a direita, proporções 1,0:1,0; 0,5:1,0; 0,1:1,0 (m:m, MnO₂:resina).

Alternativamente, foi avaliada a impregnação do mesmo reagente em um tubo de polietileno. O revestimento de MnO₂ em poliolefinas (*e.g.* polietileno) pode ser obtido via redução de permanganato: ⁹⁹ sob condições ácidas, depósitos massivos do sólido são formados após longos períodos de reação, e esse aspecto é atribuído ao caráter auto-catalítico da decomposição de MnO₄; por outro lado, a massa do revestimento não aumenta após a primeira hora de tratamento sob condições alcalinas, e para valores de pH acima de 10, depósitos não uniformes do sólido são obtidos. Portanto, no presente trabalho, foram utilizadas condições ácidas para a impregnação do filme de MnO₂(s) em tubo de polietileno. Ressalte-se que esta estratégia de revestimento foi originalmente proposta ⁹⁹ objetivando-se a modificação da superfície do polímero, de forma que este apresentasse resistência à abrasão suave, baixo ângulo de contato e baixa resistência elétrica de superfície. Aplicação analítica envolvendo esta estratégia de imobilização parece não ter sido proposta anteriormente.

Uma solução $0.2~\text{mol}~\text{L}^{-1}~\text{KMnO}_4 + 0.2~\text{mol}~\text{L}^{-1}~\text{HNO}_3$ era inserida no tubo de polietileno, e o tubo preenchido com a solução era colocado em banho de areia a 80°C e mantido neste por cerca de 3 h, formando-se assim, uma película homogênea de MnO_2 no interior do tubo (Figura 5).



Figura 5 - MnO₂ sólido impregnado em tubo de polietileno. Tubo impregnado típico recém obtido (esquerda) e após cerca de 100 determinações (direita).

4.1.2. Os sistemas de análises em fluxo

O desempenho de analisadores com FC ou FP foi criticamente comparado com o intuito de se verificar se a interação analito / reagente sólido imobilizado, assim como figuras de mérito, poderiam ser melhoradas pela exploração da mistura turbulenta inerente a FP.

No sistema com FC (Figura 6a), as soluções envolvidas eram continuamente propelidas pela bomba peristáltica, sendo ou direcionadas ao módulo de análises ou direcionadas aos frascos de origem (ou para descarte, no caso da amostra). Seus volumes e sequências de adição eram definidos de acordo com intervalos de tempo pré-definidos. A amostra era inserida pela ativação simultânea das válvulas V1 e V2, ou seja, direcionando-se um volume de amostra ao invés do fluxo transportador (C) para o canal analítico; após a inserção da amostra, as válvulas V₁ e V₂ eram desligadas, retornando à condição indicada na Figura 6a, e C transportava a zona estabelecida de amostra através do reator revestido com MnO₂ onde o analito reduzia o manganês sólido, liberando Mn²⁺. Após um intervalo de tempo pré-selecionado, quando a zona de amostra alcançava o ponto de confluência y, as válvulas V₃ e V₄ eram acionadas para a inserção de reagentes; o consumo destes era minimizado desligando-se estas válvulas imediatamente após a passagem da amostra através do ponto y. Posteriormente, a amostra fluía no reator R_C em direção à cubeta de fluxo. Passagem da zona de amostra através desta resultava em uma variação transiente da absorbância monitorada, a qual era registrada como um pico idealmente proporcional à concentração de AA na amostra, a altura de pico sendo considerada como base de medida. A substituição das amostras era realizada com o acionamento de V₅, em conjunto com V₁ e V₂, possibilitando assim, que a nova amostra limpasse o percurso até o ponto x e fosse desviada diretamente para o recipiente de descarte.

O sistema com FP (Figura 6b) foi projetado com arquitetura similar à do sistema com FC, sendo então operado de forma análoga, mas tendo como principal diferença a unidade propulsora.

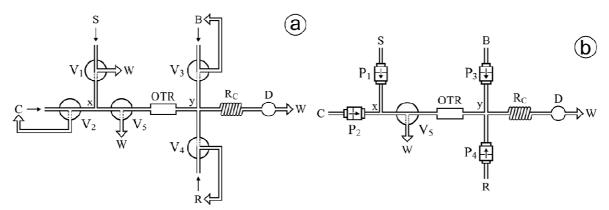


Figura 6 - Diagramas dos sistemas com FC (a) e FP (b) para determinação de ácido ascórbico. S = amostra (2,0 mL min⁻¹); C = solução transportadora (0,01 mol L⁻¹ HNO₃; 2,0 mL min⁻¹); R = formaldoxima (0,25 mol L⁻¹; 1,0 mL min⁻¹); B = solução tampão (1,0 mol L⁻¹ HCO₃-/CO₃²⁻; 1,0 mL min⁻¹); W = recipiente de descarte; OTR = reator tubular aberto com MnO₂(s) (50 cm); x, y = pontos de confluência; R_C = reator helicoidal (100 cm); V_i = válvulas de três vias (linha tracejada = caminho alternativo); P_i = bombas solenoide (1 e 2 = 10 μ L, 3 e 4 = 5 μ L por pulso); D = detector (455 nm); setas preenchidas = atuação das bombas; setas vazias = reciclagem ou descarte.

4.1.3. Otimização dos principais parâmetros

Utilizando-se soluções 10,0; 50,0 e 100,0 mg L⁻¹ AA, preparadas diariamente, foram avaliados os diferentes reatores com MnO₂ (seção 4.1.1): incoporado em resina ou impregnado em tubo de polietileno. Como a reação (Eq. 1) ocorre em meio ácido, utilizou-se uma solução transportadora ácida (HNO₃) de modo a simplificar o módulo de análises, pois a inserção do ácido por confluência, apesar de poder minimizar possíveis gradientes de pH (considerando a amostra em água), tornaria necessária a inclusão de mais um canal antes da coluna com reagente sólido. Além disso, a formação deste gradiente de pH não foi um fator limitante à oxidação do analito como verificado no dimensionamento do sistema.

As vazões das soluções envolvidas foram de 2,0 mL min $^{-1}$ para a solução transportadora e para a amostra, e de 1,0 mL min $^{-1}$ para as soluções do reagente cromogênico e do tampão; diferentes vazões não foram avaliadas, pois diferentes tempos para promover as reações envolvidas já eram obtidos variando-se os comprimentos do reator com MnO_2 e da bobina reacional. Para o estudo da influência do volume de amostra, variou-se o tempo de acionamento de V_1 e V_2 entre 3 e 11 s, o que correspondia de 100 a 365 μ L de amostra.

O reagente complexométrico formaldoxima e a solução-tampão hidrogenocarbonato / carbonato eram inseridos simultaneamente, e suas vazões foram mantidas como 1,0 mL min $^{-1}$, visando menor consumo e uma melhor distribuição destas na zona de amostra gerada, já que utilizando-se esta vazão, as válvulas correspondentes puderam ser acionadas por tempos maiores sem acarretar um consumo excessivo de reagentes. Os tempos de acionamento das válvulas V_3 e V_4 foram variados de 1 a 11 s, o que correspondia de 15 a 185 μ L de cada uma das soluções.

O reator tubular aberto e o reator helicoidal (OTR e R_C , respectivamente, Figura 6) foram confeccionados em tubo de polietileno, e o aumento do comprimento destes promovia a liberação de Mn^{2+} e o desenvolvimento da reação entre este e formaldoxima. Os comprimentos foram variados de 10 a 300 cm para o reator tubular aberto e de 25 a 200 cm para o reator helicoidal.

A concentração do reagente formaldoxima foi avaliada de 0,05 a 0,75 mol L⁻¹; o pH da solução-tampão entre 9,5 e 11,0 e a concentração desta entre 0,25 e 2,0 mol L⁻¹ HCO₃⁻/CO₃²⁻; e a concentração da solução transportadora entre 0,00 e 0,05 mol L⁻¹ HNO₃.

4.1.4. Comparação entre sistemas com FC ou FP

Após a otimização dos principais parâmetros envolvidos no sistema com FC para a determinação de AA, os valores selecionados foram mantidos para sistema análogo com FP, para a comparação de desempenho entre estes sistemas. Para esta comparação, as válvulas V_1 - V_4 (Figura 6a) foram substituídas pelas bombas solenoide P_1 - P_4 (Figura 6b).

Comparadas as principais figuras de mérito dos sistemas acima mencionados, avaliouse ainda, a influência dos volumes dispensados por pulso das bombas no sistema com FP. Foram avaliados três pares de bombas solenoide: 20 e 40 μ L, 10 e 20 μ L, e 5 e 10 μ L por pulso, que eram acionadas a diferentes frequências (uma para cada par), de modo que as vazões utilizadas fossem sempre mantidas.

4.1.5. Aplicação

O sistema com FP proposto foi então aplicado à análise de produtos farmacêuticos comerciais, na forma de comprimidos efervescentes, cápsulas ou soluções, os quais foram preparados conforme descrito na seção 3.2.1.

Para a avaliação de exatidão, as amostras foram também analisadas de acordo com método da Farmacopeia Britânica. ¹⁰⁰ Para este fim, AA foi titulado com sulfato cérico amoniacal em meio ácido, ferroína sendo utilizada como indicador. A concentração do analito foi avaliada levando-se em consideração que cada mL de solução padronizada 0,106 mol L⁻¹ Ce(IV) era equivalente a 9,334 mg AA.

4.2. Determinação de carbaril

Na proposta inicial desta tese, tinha-se como um dos objetivos a determinação de cafeína em bebidas utilizando SLME. A extração era realizada com clorofórmio impregnado na membrana hidrofóbica e o analito era monitorado diretamente na região UV do espectro eletromagnético, assim como em um dos trabalhos pioneiros 101 sobre extração líquido-líquido em sistemas de análises em fluxo. Entretanto, a estratégia de extração não se mostrou seletiva por si só, requerendo, portanto o uso de solventes mais seletivos na membrana, ou uma etapa de derivatização do analito, para a qual não foram encontrados relatos na literatura. Como estudos de outras etapas de preparo de amostra (como a clarificação das amostras de chá, por exemplo) estavam fora do escopo do trabalho, além de provavelmente tornar o sistema final inviável devido à complexidade, a determinação de cafeína via SLME em linha foi postergada. Ressalte-se que a possibilidade de concentração do analito, estagnando-se a fase aceptora, visando a determinação de cafeína a baixas concentrações em águas naturais também foi avaliada. De fato, o conhecimento desta concentração é importante em estudos ambientais como marcador de atividade antropogênica. 102 Essa estratégia, no entanto, também não se mostrou aplicavél, provavelmente devido à falta de condições para que a espécie extraída para a fase aceptora fosse aprisionada nesta, de modo a impedir que o analito retornasse à membrana com a fase orgânica, na qual a espécie apresenta maior solubilidade.

Tendo em vista essas dificuldades, optou-se então por outra determinação em que fossem plausíveis as etapas de extração de uma fase aquosa para uma orgânica, e uma reextração para uma segunda fase aquosa, e que o analito pudesse ficar preferencialmente na fase aceptora aquosa. Selecionou-se então, a determinação de carbaril⁸⁰ em águas naturais,

já que a espécie pode ser extraída para um solvente orgânico, como o xileno, e ser eficientemente re-extraída para uma solução aquosa alcalina, onde permanece na forma hidrolisada, α -naftol; este último pode ser derivatizado com diferentes reagentes, dentre eles, a forma oxidada do p-aminofenol.

Destaque-se que, nas determinações de carbaril já propostas, geralmente são necessárias etapas de extração (para *clean-up* da amostra e/ou concentração do analito) previamente à introdução de amostras nos sistemas analíticos, para quantificação. No presente trabalho, as extrações / concentrações e quantificações foram efetudas em linha, em um único sistema de análises em fluxo, que utilizava uma câmara em material inerte, a qual separava duas fases aquosas (doadora e aceptora) com uma membrana hidrofóbica, que era impregnada com xileno. Um volume pré-selecionado de amostra era inserido no canal da fase doadora e o analito era extraído para a membrana líquida, ao passo que na segunda extração, a fase aceptora (NaOH) permanecia parada e possibilitava que o carbaril fosse concentrado na forma de α-naftol, conforme a hidrólise do analito representada na equação 2.

$$O-C-NHCH_3 OH OH$$

$$Carbaril OH-C-NHCH_3$$

$$\alpha-naftol$$

$$\alpha$$
(2)

Esta etapa do trabalho foi então, sub-dividida em: a) verificação da eficiência de extração e concentração do analito via SLME, com monitoramento em 246 nm; e seleção do tipo de fluxo (FC ou FP) mais eficiente para a estratégia; e b) verificação da seletividade das extrações, em relação a outros metilcarbamatos, e derivatização com *p*-aminofenol⁶⁶ (equação 3), onde a forma oxidada do reagente pode se ligar à α-naftol e o produto final, azul de indofenol, ser monitorado em 590 nm.

4.2.1. Câmara para SLME

A câmara para extração foi confeccionada em placas de PTFE, onde foram cunhados os canais para passagem dos fluidos (Figura 7), cujos volumes internos foram de *ca.* 330 μL; as extremidades foram furadas, para permitir a entrada e a saída de fluxos.

Para a montagem da câmara, duas placas preparadas como mencionado acima foram sobrepostas, de modo que os percursos ficassem separados somente pela membrana hidrofóbica alocada entre elas. As placas foram então, furadas e parafusadas nas laterais, para permitir a vedação dos canais, evitando-se que a solução fluindo de um lado passasse ao outro (Figura 8).

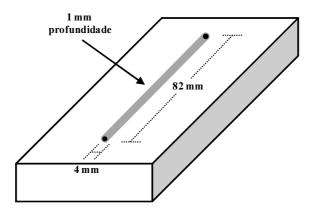


Figura 7 - Placa de PTFE com canal cunhado para passagem de fluidos. Em detalhe: dimensões do canal cunhado para passagem de fluxo.

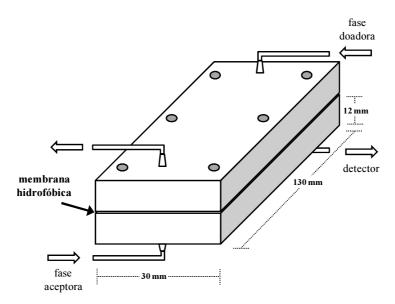


Figura 8 - Câmara para extração via SLME. Em detalhe: dimensões da câmara montada; setas vazias = direções dos fluxos; seta preenchida = posicionamento da membrana líquida.

Montada a câmara para extração, um dos percursos desta foi utilizado para a fase doadora, por onde passava a amostra, sendo o analito extraído para a fase orgânica imobilizada na membrana. O excedente da alíquota inserida era direcionado para o descarte. E no outro percurso, a fase aceptora permanecia estagnada de modo a obter uma segunda extração / concentração do analito, da fase orgânica (membrana) para outra aquosa (aceptor), direcionando então o analito extraído para detecção.

Vale ressaltar que a membrana hidrofóbica PVDF, *poly(vinylidene fluoride)* foi selecionada em função de suas características favoráveis de resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência química e hidrofobicidade, em comparação com outros materiais poliméricos comerciais. ¹⁰³

4.2.2. Sistemas de análises em fluxo para avaliação da eficiência de extração

Assim como na determinação de ácido ascórbico, um sistema com FC (Figura 9a) foi projetado para a avaliação da eficiência de extração de carbaril via SLME. As soluções envolvidas eram continuamente propelidas pela bomba peristáltica, através do módulo de análises ou re-direcionadas aos frascos de origem (ou para descarte, no caso da amostra). Os volumes e sequências de adição eram definidos de acordo com intervalos de tempo prédefinidos. A amostra (S) era inserida pela atuação simultânea das válvulas V1 e V2, ou seja, direcionando-se um volume de amostra ao invés do fluxo transportador (C) para a câmara de extração; após a inserção de S, estas válvulas eram desligadas, retornando à condição especificada na Figura 9a. Durante a inserção de S, a fase aceptora era estagnada ativando-se V₃ e, após esta inserção, essa válvula era mantida ativada por um intervalo de tempo prédeterminado, de modo a permitir que quantidades remanescentes do analito na membrana pudessem ser extraídas para a fase aceptora, desta forma melhorando-se a sensibilidade analítica e reduzindo-se o efeito carry-over. Após esse intervalo de tempo, V3 era desligada e o analito, na forma hidrolisada, era transportado em direção à cubeta de fluxo, e a passagem desta zona de fase aceptora com analito concentrado através dela resultava em uma variação transiente da absorbância monitorada (246 nm), a qual era registrada como um pico proporcional à concentração de carbaril na alíquota de amostra inserida. A altura de pico era considerada como base de medida. A substituição das amostras era realizada com o acionamento de V5, em conjunto com V1 e V2, possibilitando assim, que a amostra seguinte "limpasse" o percurso até o ponto x e fosse desviada diretamente para o recipiente de descarte.

Em relação à imobilização do solvente orgânico (xileno) na membrana de PVDF, foram avaliados procedimentos *in-line* e *off-line*. A segunda opção se mostrou inviável devido à volatilidade e a maior periculosidade do solvente quando utilizado desta forma, além da necessidade de se abrir a câmara a cada imobilização.

Decidiu-se então, efetuar a etapa de imobilização do xileno em linha com o auxílio da válvula V_4 , a qual era acionada em conjunto com V_2 , para que o solvente orgânico entrasse pelo ponto y e fosse direcionado à câmara ao invés do fluxo transportador. Verificou-se que a imobilização era mais eficiente inserindo-se ca. 700 μ L (considerando também o volume necessário para preencher o percurso até a câmara) e mantendo-se esta alíquota em repouso por 2 min, antes da limpeza do excesso de solvente.

O sistema com FP (Figura 9b) foi projetado com arquitetura similar à do sistema com FC, sendo então operado de forma análoga, mas tendo como principal diferença a unidade propulsora.

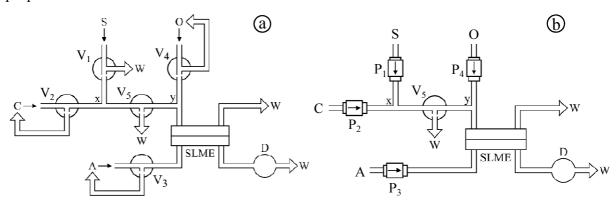


Figura 9 - Diagramas de fluxos dos sistemas com FC (a) e FP (b) para verificação da eficiência de extração de carbaril via SLME. S = amostra (0,7 mL min⁻¹); C = solução transportadora (água; 0,7 mL min⁻¹); A = solução aceptora (0,1 mol L⁻¹ NaOH; 0,7 mL min⁻¹); O = xileno (0,35 mL min⁻¹); W = recipiente para descarte; SLME = câmara para extração; V_i = válvulas de três vias (linha tracejada = caminho alternativo); P_i = bombas solenoide (10 μ L por pulso); D = detector (246 nm); seta preenchida = atuação da bomba; seta vazia = reciclagem ou descarte.

4.2.3. Otimização dos principais parâmetros para a extração

Para o estudo dos principais parâmetros envolvidos na extração, utilizou-se uma solução $500~\mu g~L^{-1}$ carbaril como amostra, água como fluxo transportador e solução NaOH como fluxo aceptor.

Dentre os parâmetros avaliados, pode ser citada a vazão da fase doadora (transportador e amostra), a qual desempenhava influência sobre o tempo de contato do analito na alíquota de amostra inserida com a membrana líquida, ou seja, verificou-se a cinética da extração

fase aquosa / fase orgânica. Este parâmetro foi avaliado entre 0,5 e 1,1 mL min⁻¹. Ressalte-se que a fase aceptora era mantida parada durante a amostragem e o percurso entre a câmara de extração e o detector era o mais curto possível (*ca.* 15 cm), minimizando possíveis efeitos difusionais e de dispersão. A vazão desta foi então, sempre mantida como sendo a mesma daquela da fase doadora, o que facilitou o dimensionamento do sistema, além de poder minimizar qualquer perturbação na membrana em função de diferenças em vazão, quando as duas fases estivessem fluindo.

O volume de amostra, definido pelo tempo de abertura da válvula correspondente (Figura 9a) ou pelo número de pulsos da bomba solenoide correspondente (Figura 9b), foi variado entre 1,4 e 5,6 mL. Já a concentração da solução aceptora foi investigada entre 0,005 e 1,0 mol L⁻¹ NaOH; esta concentração influencia a hidrólise de carbaril a α-naftol e, portanto, a eficiência da retenção do analito no fluxo aceptor.

Os desempenhos dos analisadores com FC ou FP foram então comparados, com o intuito de verificar se a interação analito / solvente orgânico imobilizado, assim como figuras de mérito, poderiam ser melhoradas explorando-se mistura turbulenta. Para essa comparação, utilizaram-se as condições selecionadas nos estudos acima mencionados em sistemas análogos com bombas peristáltica ou solenoide (Figura 9). Construíram-se curvas analíticas com soluções padrão 100,0 - 1000,0 µg L⁻¹ carbaril.

4.2.4. Eficiência e seletividade da extração de carbaril via SLME

Para estimar a eficiência de extração da estratégia proposta, utilizaram-se os parâmetros otimizados para a extração e comparou-se a concentração da amostra inserida com a da fase aceptora, levando-se em consideração também os volumes inseridos de amostra e o da câmara de extração. Como o volume da câmara era pequeno, inseriram-se duas alíquotas de amostra, e os volumes correspondentes da fase aceptora com o analito concentrado foram coletados em balão volumétrico de 5,0 mL cujo volume foi posteriormente completado com a solução utilizada como aceptora. Determinou-se a concentração desta solução coletada por calibração externa, manualmente realizada com padrões 50 - 500 μg L⁻¹ carbaril em cubeta aberta de quartzo, e corrigiram-se estas concentrações obtidas para o volume da câmara (330 μL). De posse dessas concentrações, inicial e após extração, calculou-se o fator de enriquecimento pelas expressões:²⁶

$$E_F = (C_A / C_S) \times (V_A / V_S)$$
 (4)

e

$$E = E_F \times (V_S / V_A) \tag{5}$$

onde: E_F = eficiência de extração; C_A = concentração na fase aceptora; C_S = concentração inicial na amostra; V_A = volume de amostra; V_S = volume do aceptor; E = fator de enriquecimento.

A seletividade da extração de carbaril, com monitoramento na região UV, foi avaliada em relação a outros metilcarbamatos (aminocarb, bendiocarb, carbofuran, pirimicarb e propoxur), com os quais foram preparadas soluções individuais (1000,0 µg L⁻¹), as quais foram inseridas no lugar da amostra. Os sinais registrados a 246 nm foram comparados com aqueles obtidos pela inserção de solução de carbaril à mesma concentração.

4.2.5. Estratégias para derivatização e dimensionamento do sistema

Verificada a necessidade de derivatização, em função da falta de seletividade da extração por membrana, selecionou-se a reação com *p*-aminofenol, que reage, em sua forma oxidada, com α-naftol, formando o azul de indofenol (seção 4.2). A oxidação de *p*-aminofenol pode ocorrer somente com o oxigênio molecular presente na solução aquosa do reagente, portanto sem a necessidade da inserção de um agente oxidante. Testes preliminares revelaram que a presença de um agente oxidante, como KIO₄, não favorecia a reação e, tendo em vista o estado já parcialmente oxidado (escurecido) do reagente disponível, ainda na forma sólida, optou-se pela reação direta de uma alíquota da solução do reagente com o analito concentrado na fase aceptora.

A solução do reagente cromogênico poderia ser admitida de diferentes formas no sistema, quais sejam: em conjunto com a solução aceptora antes da câmara de extração, como uma solução a mais ou como uma única solução mista, ou ainda, inserida entre a câmara e o detector. A fim de testar estas possibilidades de admissão do reagente, foi efetuado, manualmente, um teste de sequência de inserção das soluções: 0,1 mol L⁻¹ NaOH (1,0 mL), 50 mg L⁻¹ *p*-aminofenol (1,0 mL) e 10 mg L⁻¹ carbaril (ou água, para simular o branco; 0,1 mL). Estas soluções foram misturadas em diferentes sequências de adição em uma cubeta aberta, e subsequentemente monitoradas em 590 nm, comprimento de onda de máxima absortividade molar do azul de indofenol.

Após verificação da melhor forma de inserção de *p*-aminofenol, construiu-se o sistema da Figura 10, que foi projetado com uma bomba solenoide e um reator helicoidal adicionais, em relação ao sistema utilizado para otimização da extração por membrana. Este novo sistema foi operado com os parâmetros selecionados na otimização da extração. Ainda, estudaram-se outros parâmetros: volume (58 - 408 μL) e concentração (10 - 75 mg L⁻¹) de *p*-aminofenol, e comprimento (25 - 100 cm) do reator helicoidal para a mistura entre o analito da fase aceptora e o reagente.

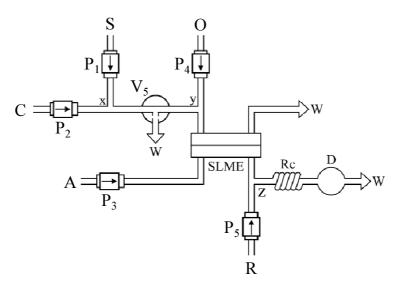


Figura 10 - Diagrama de fluxos do sistema para extração de carbaril via SLME e derivatização com p-aminofenol. $S = amostra (0,7 \text{ mL min}^{-1}); C = solução transportadora (água; 0,7 mL min}^{-1}); A = solução aceptora (0,1 mol L<math>^{-1}$ NaOH; 0,7 mL min $^{-1}$); $O = xileno (0,35 \text{ mL min}^{-1}); R = reagente cromogênico (50 mg L<math>^{-1}$ p-aminofenol; 0,35 mL min $^{-1}$); $W = recipiente para descarte; SLME = câmara para extração; <math>R_C = reator$ helicoidal (75 cm); $V_5 = v$ álvula de três vias (linha tracejada = caminho alternativo); $P_i = b$ ombas solenoide ($P_1 - P_4 = 10 \mu L, P_5 = 5 \mu L$ por pulso); D = detector (590 nm); seta preenchida = atuação da bomba; seta vazia = reciclagem ou descarte.

4.3. Determinação de acidez total

À primeira vista, as titulações monitoradas por traçador podem ser implementadas em qualquer analisador em fluxo, desde que as frações volumétricas de traçador e titulante sejam conhecidas. Considerando-se o grande número e a diversidade de estratégias de titulações em fluxo, duas abordagens clássicas foram selecionadas para demonstrar a viabilidade da proposta: a titulação programada em triângulo, mantendo-se a vazão do titulante constante e variando-se a vazão da amostra, com bombas peristáltica ou solenoides; e a titulação por injeção em fluxo, com inserção de amostra por injetor proporcional ou por bomba solenoide.

4.3.1. Aspectos teóricos

Em sistemas de análises químicas em fluxo, todo elemento de fluido da zona de amostra resulta da combinação das soluções envolvidas (amostra, reagentes, diluentes), e as frações volumétricas associadas a esse elemento 104 se constituem em característica intrínseca dos sistemas. A fração volumétrica da amostra ($X_{\rm S}$) do elemento de fluido correspondente a um sinal analítico fornece informações acerca do grau de dispersão da amostra, destacando-se o potencial de ganho em sensibilidade pela minimização da dispersão. Os valores transientes $X_{\rm S}$ ao longo de uma zona em movimento também são relevantes, especialmente em procedimentos analíticos com exploração de gradientes de concentração, tais como aqueles desenvolvidos para a implementação de método das adições de padrão, 105 de análise por cinética diferencial 106 ou de titulação. 45

Em sistemas de análises em fluxo com detecção espectrofotométrica, os valores $X_{\rm S}$ podem ser estimados através do uso de corantes, 107 o que requer experimentos adicionais para a obtenção dessas estimativas. Com o advento dos espectrofotômetros multicanais, a implementação da estratégia foi muito favorecida, como no caso das titulações monitoradas por traçador, as quais são apresentadas no presente trabalho. Para isto, um corante traçador é adicionado ao meio reacional da titulação, possibilitando assim, que as variações nas frações volumétricas amostra / titulante sejam eficientemente monitoradas durante o curso da titulação. Com isto, informações sobre as proporções volumétricas entre as soluções a cada estágio da titulação são obtidas facilmente. Ressalte-se que o titulante e a espécie química que atua como traçador devem sofrer dispersões iguais, isto é, o traçador e o titulante (ou analito) devem apresentar coeficientes difusionais semelhantes, ou ainda, as diferenças devidas a efeitos difusionais devem ser minimizadas.

A equação 6, derivada da ref. 41 e adaptada às condições de análises em fluxo, descreve o balanço de massas de uma titulação.

$$C_A - Q C_T = C_{0A} X_S - Q C_{0T} X_T$$
 (6)

onde: A = analito; T = titulante; C_A e C_T = concentrações no elemento de fluido considerado; C_{0A} e C_{0T} = concentrações originais; X_S e X_T = frações volumétricas de amostra e titulante; Q = fator estequiométrico.

Como a equação 6 é válida para qualquer ponto do curso da titulação, a curva da titulação inteira pode ser obtida por sucessivas aplicações desta. Em geral, a solução titulante é adicionada até se atingir o ponto final de titulação, o qual é indicado, por exemplo, por uma súbita variação da cor de um indicador. Valores negativos de concentração, após o ponto final, são evitados trocando-se os sinais positivo e negativo da equação 6. No ponto final de titulação, esta equação se iguala a zero:

$$C_{0A} X_S - Q C_{0T} X_T = 0$$

ou:

$$C_{0A} = Q C_{0T} X_T (X_S)^{-1}$$
(7)

Como $X_T + X_S = 1$, a equação 7 é modificada para:

$$C_{0A} = Q C_{0T} X_T (1 - X_T)^{-1}$$
(8)

O resultado analítico é mais facilmente obtido através da equação 9, uma simplificação da equação 8. Para isto, deve ser assumido que:

- X_S e X_T = C_A $(C_{0A})^{-1}$ e C_T $(C_{0T})^{-1}$ [C e C_0 = concentrações instantâneas e originais];
- $X_{\rm T}$ é idealmente igual para o traçador e para o titulante;
- a resposta do detector é linear no intervalo de medida.

$$C_{0A} = Q C_{0T} [M_{0T} (M_T)^{-1} - 1]^{-1}$$
(9)

onde: M_{0T} e M_T = medidas relativas ao traçador na solução não dispersa de titulante e no elemento de fluido associado ao ponto final, respectivamente.

Análise da equação 9 revela que a determinação do analito não depende da concentração original do traçador e este é um aspecto importante da estratégia. Ainda, nenhuma medida de volume, massa ou carga elétrica é necessária e limitações associadas a variações de volume, como em titulações convencionais, são inexistentes.

4.3.2. Seleção do traçador

Nas titulações monitoradas por traçador, uma espécie química inerte é usada para estimar em tempo real as frações volumétricas envolvidas. Para a seleção dessa espécie, os seguintes critérios devem ser considerados:

- Resposta linear. A aplicação da equação 9 pressupõe que a resposta do detector deve ser proporcional à concentração do corante em qualquer elemento de fluido. Este critério foi avaliado, nesta etapa do trabalho, através de sucessivas diluições dos corantes e análise das funções absorbância vs concentração dos mesmos.
- Não aderência às paredes da tubulação. O corante não deve interagir com os tubos do sistema, e este aspecto pode ser confirmado inserindo-se diferentes volumes e concentrações da solução de corante, e checando-se os registros (principalmente linha base).
- Características químicas. O corante traçador deve ser quimicamente inerte, não interagindo com qualquer constituinte do meio reacional, ou seja, a absorbância deve ser idealmente independente da concentração hidrogeniônica, e essa característica pôde ser verificada variando-se o pH do titulante entre 3,0 e 9,0; para assegurar este critério, o traçador deve apresentar valor de pK distante do pH associado ao ponto final.
- Características espectrais. O comprimento de onda de máxima absortividade molar
 do corante traçador deve estar localizado em uma região espectral onde a absorbância
 relativa ao indicador da titulação seja nula. Caso contrário, um fator de correção deve
 ser aplicado,⁴² o que pode prejudicar a precisão das medidas devido a efeitos de
 propagação de erros.
- Características difusionais. As espécies traçador e titulante devem, idealmente, sofrer a mesma dispersão, portanto apresentar o mesmo coeficiente de difusão. Uma comparação experimental direta entre as dispersões do corante traçador e hidróxido de sódio não é facilmente exequível, e os coeficientes de difusão dos corantes não foram encontrados em busca na literatura. Então, o critério foi avaliado, nesta tese, analisando-se os formatos dos picos registrados em dois comprimentos de onda, correspondentes às máximas absortividades molares de phen e dos diferentes corantes traçadores.

4.3.3. Concentração do titulante

Fenolftaleína é frequentemente usada em titulações ácido / base, e foi escolhida como o indicador da presente titulação, considerando-se seu uso mundialmente difundido para avaliações de acidez, inclusive em métodos oficiais de análise. ⁸⁴ Sua concentração não é um aspecto crítico, já que as variações em absorbância próximo ao ponto final da titulação são pronunciadas e súbitas. Para o estudo desse parâmetro, soluções de titulante com diferentes concentrações de hidróxido de sódio (0,005 - 0,05 mol L⁻¹ OH⁻) foram estudadas.

4.3.4. Sistemas de análises em fluxo

As titulações programada em triângulo e por injeção em fluxo foram implementadas nos sistemas de análises em fluxo representados na Figura 11. Em contraste com os procedimentos tradicionais de titulação, o indicador (phen) era adicionado ao titulante e não à amostra, e o monitoramento dos sinais era realizado simultaneamente em 552 nm (relativo à phen) e 630 nm (relativo ao traçador).

Como a precisão analítica se mostrou dependente das diferenças na difusão do traçador e do titulante, as condições de mistura desempenharam papel chave no estratégia. Em ambos os sistemas, reatores dos tipos tubular aberto enrolado ou empacotado com partículas de vidro 108 foram avaliados a fim de melhorar as condições de mistura. Além disso, uma câmara de mistura também foi testada, alocada antes da cubeta de detecção para minimizar os gradientes radiais de concentração, uma potencial fonte de inexatidão em titulações em fluxo. A linha de transmissão entre a câmara e a cubeta de fluxo era tão curta quanto possível (ca. 10 cm).

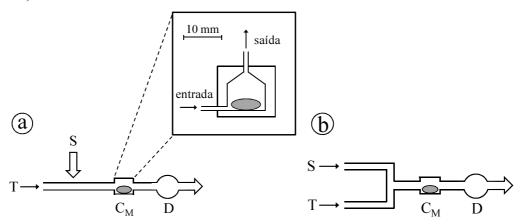


Figura 11 - Diagrama de fluxos dos sistemas por injeção em fluxo (a) e programado em triângulo (b) para titulações monitoradas por traçador. S = amostra; T = solução titulante; $C_M = câmara$ de mistura (detalhes no destaque); D = detector (552 e 630 nm); setas preenchidas = atuação da bomba; setas vazias = inserção de amostra e direcionamento dos fluxos.

Efeitos decorrentes da variação em volume de amostra, vazão, comprimento do percurso analítico e concentração do titulante foram investigados para ambos os sistemas. Após o dimensionamento, a influência do tipo de fluxo foi estudada. Para isto, fluxos constantes ou pulsados, propelidos por bombas peristáltica ou solenoide, foram explorados.

Os analisadores com fluxos pulsados foram então utilizados para as análises de vinagres, e as principais figuras de mérito foram avaliadas. A exatidão foi avaliada comparando-se os resultados obtidos com a estratégia aqui proposta com aqueles obtidos por método de referência de titulação convencional.⁸⁴

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados e discutidos os resultados obtidos nas três determinações propostas, assim como as principais características observadas em relação a suas vantagens e limitações.

5.1. Determinação de ácido ascórbico

O método empregado para a determinação de AA baseou-se na formação de complexo entre o reagente cromogênico formaldoxima e os íons Mn²⁺ liberados do reator com reagente sólido, cuja quantidade é proporcional à concentração do analito. Selecionou-se para monitoramento o comprimento de onda de 455 nm e, para compensação de efeito *Schlieren*, ¹⁰⁹ o comprimento de onda de 800 nm, em que não há absorção significativa relativa ao produto da reação de interesse. Este efeito era causado pela mistura da solução transportadora ácida, necessária para a redução de Mn(IV), com a solução-tampão alcalina, necessária para a reação de complexação entre o metal liberado e a formaldoxima.

A partir de testes preliminares referentes à otimização dos principais parâmetros do sistema, verificou-se que o intervalo de tempo necessário para a passagem do volume de amostra inserido pelo reator MnO₂ e obtenção de uma boa sobreposição entre este e as alíquotas de formaldoxima e de solução-tampão era de 7 s, permitindo que mesmo amplas faixas de volumes destas soluções pudessem se combinar em uma mesma zona de amostra, fato que foi confirmado nos estudos subsequentes.

5.1.1. Reator com MnO₂ sólido

Como descrito na seção 4.1.1, foram avaliadas diferentes formas de utilização do reagente MnO₂ sólido, sem a necessidade de empacotá-lo em mini-coluna. Nesta avaliação, foram utilizados 5 s para inserção de amostra (*ca.* 160 μL), 3 s para inserção de formaldoxima e de solução-tampão (*ca.* 50 μL cada) e 100 cm de bobina reacional; quanto às concentrações, utilizaram-se 0,01 mol L⁻¹ HNO₃ como solução transportadora, 0,25 mol L⁻¹ de formaldoxima, 0,5 mol L⁻¹ solução-tampão (pH 10,5), além de soluções-padrão 5,0; 10,0; 50,0 e 100,0 mg L⁻¹ AA.

Nos segmentos de 5,0 cm das colunas com o reagente incorporado à resina poliéster (volume interno *ca.* 280 μL), nas proporções de 1,0:1,0; 0,5:1,0; 0,1:1,0 (m:m; MnO₂:resina), pode-se observar (Figura 4, foto à direita) a heterogeneidade entre os constituintes, sobremaneira para maiores teores do reagente. Além da heterogeneidade, obteve-se uma liberação irreprodutivel de Mn²⁺ e/ou respostas não proporcionais à concentração do analito nos volumes de amostras inseridos (Figura 12). Utilizando-se reator de 50 cm com reagente impregnado (volume interno *ca.* 250 μL), obteve-se um ganho substancial em termos de proporcionalidade das respostas com as concentrações do analito; sendo este o reator selecionado para a consecução da determinação de AA. Vale ressaltar que, mesmo após cerca de 200 determinações, as respostas obtidas com um mesmo reator tubular impregnado não sofriam modificações significativas.

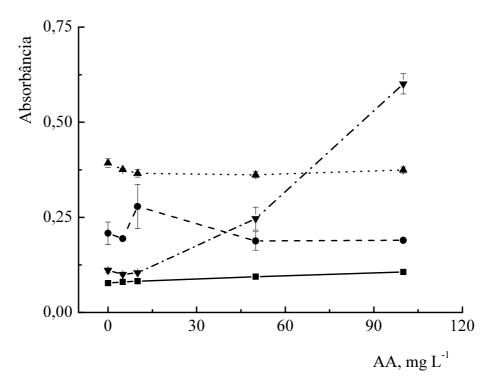


Figura 12 - Curvas analíticas obtidas com diferentes reatores com MnO₂ sólido. Médias das respostas obtidas em triplicata, com colunas de 0,1:1,0 (linha contínua); 0,5:1,0 (linha tracejada); 1,0:1,0 (linha pontilhada) de MnO₂:resina, e reator impregnado com o reagente (linha pontilhada/tracejada).

5.1.2. Otimização dos principais parâmetros

Os resultados advindos do dimensionamento do sistema para a determinação de AA são apresentados nesta seção.

5.1.2.1. Influência do volume de amostra

Foi observada uma sensibilidade crescente em função do aumento do volume de amostra inserido (Figura 13), devido à maior liberação de íons Mn²⁺. Este fato, não extensivo à solução de 10,0 mg L⁻¹ AA, foi comprovado pelas larguras dos sinais registrados (dispersões das zonas de amostra), que se mostraram muito semelhantes, mesmo com diferentes volumes de amostra.

Selecionou-se 7 s (ca. 235 μ L de amostra), como tempo de abertura de V_2 , como compromisso entre sensibilidade e frequência de amostragem, e garantia de que os sinais referentes a 100,0 mg L⁻¹ AA estivessem abaixo de 1,0 absorbância (acima de 10 % de transmitância), o que poderia comprometer a repetibilidade dos sinais analíticos.

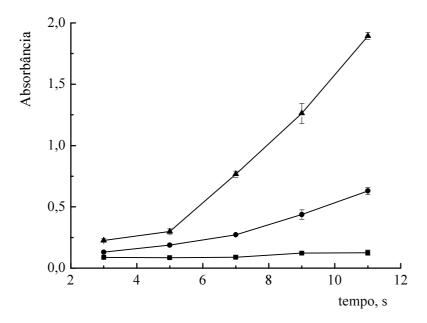


Figura 13 - Influência do volume de amostra. $\blacksquare = 10,0$; $\bullet = 50,0$; $\blacktriangle = 100,0$ mg L⁻¹ AA. Médias das respostas obtidas em triplicata para tempos de amostragem (3 - 11 s), correspondentes a *ca.* 100 - 365 μ L de amostra.

5.1.2.2. Influência dos volumes de solução-tampão e de reagente

Os volumes da solução-tampão hidrogenocarbonato/carbonato e de formaldoxima eram inseridos simultaneamente no ponto y (Figura 6), e a avaliação da influência da variação destes volumes também foi feita a partir da variação do tempo de abertura das válvulas correspondentes (V₃ e V₄). Foram avaliados tempos entre 1 e 11 s (Figura 14), que correspondiam *ca.* 15 - 185 µL de cada uma das soluções.

Neste estudo, não foram notadas diferenças significativas em sensibilidade para tempos de inserção acima de 3 s; selecionou-se então, como um fator de segurança, 5 s (*ca.* 85 μL) como o tempo de abertura das válvulas V₃ e V₄. Ressalte-se que os resultados referentes a 7 s, por algum motivo não detectado, não foram concordantes com aqueles dos outros tempos avaliados sendo então considerados como anômalos e, portanto, desconsiderados para este estudo.

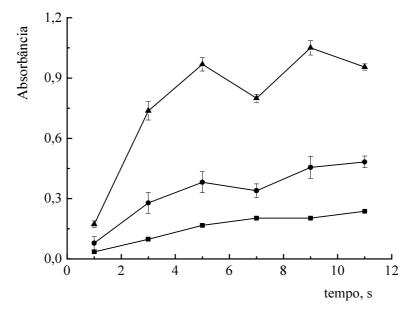


Figura 14 - Influência dos volumes de solução-tampão e de formaldoxima. ■ = 10,0; ● = 50,0; ▲ = 100,0 mg L⁻¹ AA. Médias das respostas obtidas em triplicata para 1 - 11 s (*ca.* 15 - 185 μL de cada uma das soluções).

5.1.2.3. Influência do comprimento da bobina reacional

O comprimento da bobina reacional (R_C , Figura 6), um dos parâmetros responsáveis por promover a mistura e o tempo de reação entre Mn^{2+} , formaldoxima e a solução-tampão, foi variado de 25 a 200 cm (Figura 15). Com o aumento deste parâmetro até cerca de 100 cm,

houve melhoria em sensibilidade; acima deste valor, ocorriam dispersões excessivas da zona de amostra sem melhoria significativa em sensibilidade ou no comportamento dos sinais (efeito *Schlieren*), além disso, os tempos de limpeza eram aumentados pronunciadamente, causando diminuição da frequência de amostragem. Selecionou-se então, 100 cm como o comprimento para a bobina reacional.

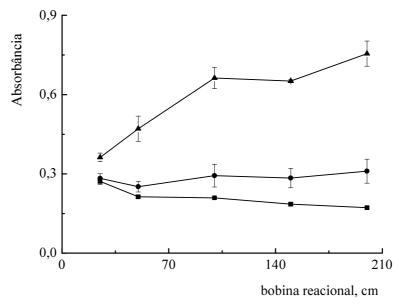


Figura 15 - Influência do comprimento da bobina reacional. ■ = 10,0; • = 50,0; ▲ = 100,0 mg L⁻¹ AA. Médias das respostas obtidas em triplicata.

5.1.2.4. Influência do comprimento da bobina impregnada

A bobina com reagente impregnado (OTR, Figura 6) atuava como fonte de Mn(IV), o qual era liberado em solução quando reduzido a Mn²⁺ por reação com AA. Esperava-se então que, quanto maior o comprimento deste reator (variado de 10 a 300 cm), maior seria a quantidade de Mn²⁺ liberado. Entretanto, os sinais referentes ao complexo formado entre o metal liberado e a formaldoxima tiveram acréscimos somente até 50 cm de comprimento (Figura 16), decrescendo drasticamente com comprimentos maiores do reator.

Este fato pode ser explicado pelas características fisico-químicas do MnO₂, as quais possibilitam que o composto seja utilizado como adsorvente de metais pesados, inclusive Mn²⁺. ¹¹⁰ Acredita-se então, que com a utilização de até 50 cm do reator impregnado, a quantidade de íons liberados era crescente e o caráter adsorvente do sólido não era fator limitante à estratégia proposta; portanto, este comprimento foi o selecionado.

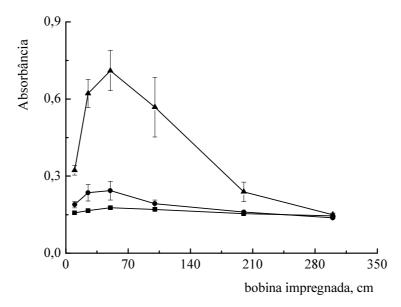


Figura 16 - Influência do comprimento da bobina impregnada. ■ = 10,0; • = 50,0; ▲ = 100,0 mg L⁻¹ AA. Médias das respostas obtidas em triplicata.

5.1.2.5. Influência da concentração do reagente cromogênico

Ao se modificar a concentração de formaldoxima na faixa entre 0,05 e 0,75 mol L⁻¹, notou-se melhoria em sensibilidade com o aumento da concentração do reagente até 0,25 mol L⁻¹ (Figura 17). Este valor foi selecionado, pois para valores mais altos, eram obtidos maiores sinais analíticos para o branco, sem melhoria em sensibilidade.

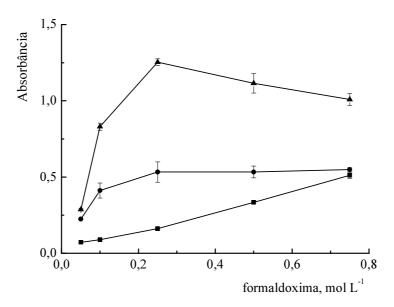


Figura 17 - Influência da concentração de formaldoxima. ■ = 10,0; • = 50,0; ▲ = 100,0 mg L⁻¹ AA. Dados se referem a 3 replicatas.

5.1.2.6. Influência do pH e da concentração da solução-tampão

Variando-se o pH da solução-tampão entre 9,5 e 11,0 (Figura 18), verificou-se que melhor sensibilidade analítica era obtida a pH 10,5, sendo este o valor selecionado, levando-se também em consideração o favorecimento da capacidade tamponante pela proximidade com o valor de pKa do sistema HCO₃-/CO₃²⁻, que é 10,33. A sua concentração foi avaliada entre 0,25 e 2,0 mol L⁻¹ HCO₃-/CO₃²⁻ (Figura 19); notou-se sensibilidade crescente com o aumento da capacidade-tampão até 1,0 mol L⁻¹, sendo o valor selecionado, já que concentrações mais elevadas não trouxeram melhoria em sensibilidade.

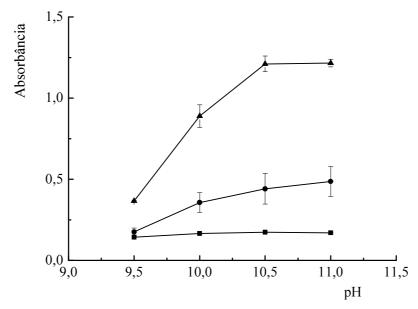


Figura 18 - Influência da concentração hidrogeniônica da solução-tampão. $\blacksquare = 10,0; \bullet = 50,0; \blacktriangle = 100,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ AA. Dados se referem a 3 replicatas}$

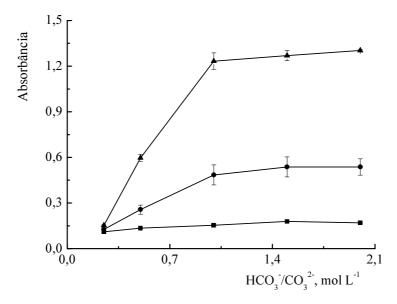


Figura 19 - Influência da concentração da solução-tampão. ■ = 10,0; • = 50,0; ▲ = 100,0 mg L⁻¹ AA. Dados se referem a 3 replicatas.

5.1.2.7. Influência da acidez da solução transportadora

Como a reação envolvendo AA e Mn(IV) no reator impregnado ocorre em meio ácido, utilizou-se HNO₃ como solução transportadora da amostra. A concentração desta foi variada de 0,00 a 0,05 mol L⁻¹ (Figura 20), e observou-se sensibilidade crescente com o aumento da acidez até 0,01 mol L⁻¹ HNO₃. Esta concentração foi selecionada, já que valores acima deste não levaram a melhorias em sensibilidade.

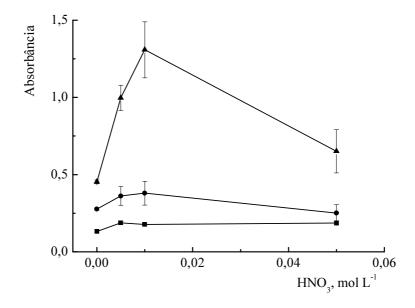


Figura 20 - Influência da acidez da solução transportadora. ■ = 10,0; • = 50,0; ▲ = 100,0 mg L⁻¹ AA. Dados se referem a 3 replicatas.

5.1.3. Comparação entre sistemas com FC ou FP

Na otimização dos principais parâmetros envolvidos na determinação de AA obtiveram-se os valores apresentados na Tabela 1.

Estes valores foram obtidos em sistema com FC e, para estudar a influência do tipo de fluxo envolvido, construiu-se um sistema análogo com FP (Figura 6b) e verificaram-se as diferenças advindas da utilização dos FP (bombas solenoide) ao invés dos FC (bomba peristáltica). No lugar das válvulas V_1 e V_2 foram utilizadas bombas solenoide com volume de pulso igual a 20 μ L e como V_3 e V_4 , volume de 10 μ L (Figura 6a); a frequência de acionamento foi selecionada como 1,66 s⁻¹ para que as bombas dispensassem vazões equivalentes às do sistema com FC.

Tabela 1 - Parâmetros investigados e valores selecionados

parâmetro	valores investigados	valor selecionado
volume de amostra (μL)	100 - 365	235
volume de formaldoxima e de solução-tampão (μL)	15 - 185	85
comprimento da bobina reacional (cm)	25 - 200	100
comprimento do reator com MnO ₂ (cm)	10 - 300	50
pH da solução-tampão	9,5 - 11	10,5
[solução-tampão] (mol L ⁻¹)	0,25 - 2,0	1,0
[formaldoxima] (mol L ⁻¹)	0,05 - 0,75	0,25
[HNO ₃] (fluxo transportador, mol L ⁻¹)	0,00 - 0,05	0,01

Para ambos os sistemas, obtiveram-se curvas analíticas na faixa de 20,0 a 100,0 mg L⁻¹ AA, tipicamente descritas como:

FP:
$$A = -0.1958 + 0.0117 \text{ C} \quad (n = 5; r = 0.9985)$$

FC:
$$A = -0.1661 + 0.0114 \text{ C} \quad (n = 5; r = 0.9989)$$

onde, A = altura de pico em absorbância; C = concentração em mg L^{-1} AA.

Tanto a sensibilidade quanto o coeficiente de correlação linear foram semelhantes para ambos os sistemas. Porém, o sistema com FP foi superior àquele com FC quanto ao limite de detecção: 0,33 contra 0,60 mg L⁻¹ (critério 3,3 σ); bem como em relação à repetibilidade (desvio padrão relativo estimado como 2,5 contra 5,6% - 20 leituras). As melhorias em limite de detecção e repetibilidade obtidas com emprego de fluxos pulsados resultam das melhores condições de mistura alcançadas com este tipo de fluxo. Entretanto, este favorecimento das condições de mistura não teve efeito apreciável sobre a interação do analito com o reagente sólido imobilizado. Acredita-se que isso é resultado de limitações físicas e/ou cinéticas, já que na redução de Mn(IV) a Mn²⁺, há passagem do metal do estado sólido para o líquido.

Outras figuras de mérito dos sistemas propostos foram: consumo de *ca.* 2,8 mg de formaldoxima por determinação e frequência de amostragem de 60 h⁻¹.

Ressalte-se que as figuras de mérito, como o limite de detecção e a frequência de amostragem, obtidas no presente trabalho são semelhantes àquelas relatadas (0,2 mg L⁻¹ e 95 h⁻¹, respectivamente) em procedimento que também empregou um reator com MnO₂(s) para a determinação de AA⁶⁰ utilizando espectrometria de absorção atômica com chama para monitorar o Mn²⁺ liberado da coluna. Neste caso entretanto, devido à utilização de uma coluna empacotada, o módulo de análises necessitava de materiais mais resistentes (como tubo de aço inox para a construção da coluna, por exemplo) além de uma bomba de cromatógrafo, para a propulsão da amostra pela coluna.⁶⁰

Adicionalmente, três conjuntos de bombas solenoide, com diferentes volumes por pulso, foram avaliados para o sistema com FP para se verificar diferenças de desempenho devido aos volumes das alíquotas com os quais as soluções eram inseridas. Para manter as mesmas vazões, as bombas eram atuadas a diferentes frequências: os conjuntos de bombas com 20 e 40 μ L; 10 e 20 μ L; 5 e 10 μ L foram atuadas a frequências de 0,95; 1,66; e 3,33 s⁻¹ respectivamente. Os volumes das soluções envolvidas foram definidos pelos números de pulsos.

Para 20.0 - 100.0 mg L⁻¹ AA, a sensibilidade foi aumentada utilizando-se menores volumes por pulso (Figura 21). Esta tendência pode ser atribuída à mistura mais efetiva obtida com menores volumes de pulsos. O sistema com bombas de 5 e $10~\mu L$ foi então selecionado para a análise das amostras.

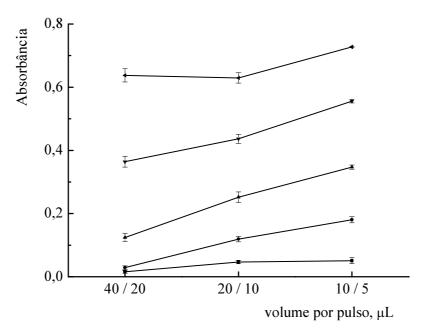


Figura 21 - Influência dos volumes por pulso para sistema com FP. Linhas = isoconcentrações (20, 40, 60, 80 e 100 mg L⁻¹ AA, de baixo para cima). Dados se referem a 3 replicatas.

5.1.4. Aplicação

A exatidão do método proposto foi verificada analisando-se formulações farmacêuticas previamente analisadas por procedimento recomendado pela Farmacopeia Britânica. Os resultados obtidos (Tabela 2) foram comparados e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre métodos ao nível de confiança de 95%, aplicando-se o teste pareado t - Student (valores t estimado e tabelado = 0,143 e 2,306; t = 9). t =

Com relação à seletividade, efeitos provenientes de outras espécies presentes nas amostras não foram avaliados. Um aspecto que favorece a seletividade do método proposto é a pronunciada diluição que as amostras sofrem, ou seja, o efeito de potenciais interferentes ao método é minimizado.

Tabela 2 - Resultados comparativos. Quantidades de AA em formulações farmacêuticas, determinados pelo procedimento proposto (MPFA) e pelo método recomendado pela Farmacopéia Britânica (referência). Dados se referem a 3 replicatas. Valores declarados pelos fabricantes são também apresentados (rotulado)

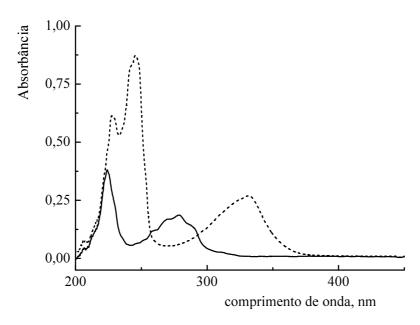
amostra	mg AA			
	rotulado	referência ¹⁰⁰	MPFA	
1	2000	2279 ± 11	2419 ± 41	
2	2000	2334 ± 54	2399 ± 13	
3	2000	2287 ± 22	2242 ± 25	
4	1000	1159 ± 11	1169 ± 48	
5	500	561 ± 1	560 ± 14	
6	500	550 ± 9	512 ± 3	
7	45	39 ± 1	41 ± 1	
8	200	255 ± 1	186 ± 1	
9	200	218 ± 3	180 ± 1	

5.2. Determinação de carbaril

Como descrito na seção 4.2, a determinação espectrofotométrica de carbaril em águas naturais foi realizada em sistema de análises em fluxo e envolveu SLME com xileno como fase orgânica, o qual era impregnado em membrana hidrofóbica. Esta era mantida dentro de uma câmara que possilitava a passagem dos fluxos doador e aceptor, ambos aquosos, separados pela membrana líquida.

5.2.1. Otimização dos principais parâmetros para a extração

Os estudos relativos à extração do analito via SLME foram efetuados no sistema da Figura 9 e se basearam no monitoramento da quantidade de carbaril extraída para a fase aceptora. Nesta fase, o analito se encontrava na forma hidrolisada, α-naftol, que apresentava espectro de absorção na região UV, com máximos em 246 e 332 nm, diferente daquele da forma não hidrolisada (Figura 22).



Figua 22 - Espectros de absorção de carbaril e da sua forma hidrolisada, α -naftol. A figura se refere a 5,0 mg L⁻¹ de carbaril em água (linhas contínua) e de α -naftol em 0,1 mol L⁻¹ NaOH (linha tracejada).

Estes máximos de absorção de α-naftol foram, então, selecionados para o monitoramento; para compensação de efeito *Schlieren*, ¹⁰⁹ foi selecionado o comprimento de onda de 450 nm, onde não há absorção significativa relativa à espécie. Este efeito era causado pela presença de mínimas quantidades do solvente xileno, que ocasionava o estabelecimento de interfaces transientes das fases aquosa e orgânica, as quais causavam distorções no monitoramento.

Testes preliminares revelaram que eram necessários *ca.* 20 s após a inserção de amostra, para que o analito extraído na membrana líquida fosse hidrolisado e coletado na fase aceptora. Durante esse intervalo de tempo, após a amostragem, a fase aceptora continuava então estagnada, objetivando uma maior concentração nesta fase.

Para o estudo relativo à vazão da fase doadora, ou seja, da amostra e do fluxo transportador (água), foram inseridas alíquotas de 3,5 mL de uma solução-padrão 500 μg L⁻¹ de carbaril ou do branco. Os resultados do monitoramento em 246 nm (Figura 23) apontaram que a extração do analito da amostra para a fase orgânica é lenta, já que para as vazões mais baixas (até 0,7 mL min⁻¹) é que foram obtidas as maiores extrações do analito, as quais eram desfavorecidas para vazões mais altas. Esta vazão (0,7 mL min⁻¹) foi então selecionada, visando não prejudicar a frequência de amostragem, com vazões ainda mais baixas.

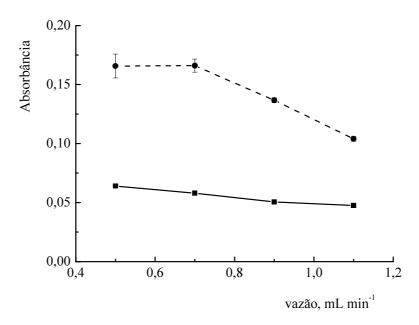


Figura 23 - Influência da vazão da fase doadora. Linha contínua = branco, linha tracejada = $500.0 \,\mu g \, L^{-1}$ de carbaril. Dados se referem a 3 replicatas.

Ressalte-se que os sinais relativos ao branco representam, como dito anteriormente, a de diminutas porções do solvente orgânico, que é minimamente solubilizado/arrastado pela fase aceptora. Este fato é corroborado analisando-se o espectro de absorção do solvente (Figura 24), que apresenta uma alta absorção em sua forma pura, na região em que o analito é monitorado. Deve ser ainda destacado que os registros obtidos (neste estudo e nos demais) para o monitoramento em 332 nm apresentaram o mesmo comportamento do monitoramento em 246 nm, porém com sinais menos intensos, a ponto de não serem muito bem distinguidos dos sinais referentes ao branco. Os registros em 332 nm não são então apresentados neste trabalho.

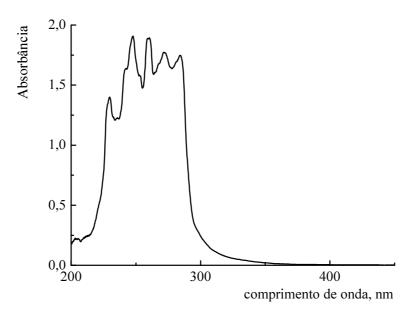


Figura 24 - Espectro de absorção do solvente orgânico xileno.

O volume inserido de amostra demonstrou ser um parâmetro muito influente, como já esperado, sobre a quantidade do analito extraído para o fluxo aceptor (Figura 25). Do primeiro para o segundo volume avaliado (1,4 e 2,1 mL), observou-se um acréscimo de 33% do sinal referente à inserção de amostra; com os quatro incrementos posteriores, obteve-se cerca de 10% de aumento de sinal entre cada um destes; somente entre o penúltimo e último volumes (4,9 e 5,6 mL) é que se observou um menor acréscimo em sinal (6,5%). Pode-se então inferir que, com uma câmara de 330 µL, o emprego de volumes maiores de amostra não deveriam promover aumentos expressivos na eficiência de extração. Portanto, como compromisso entre eficiência da extração e frequência de amostragem, selecionou-se o volume de amostra de 4,9 mL, o que correspondia a 7,0 min da etapa de amostragem. É importante ressaltar que os sinais referentes ao branco praticamente não variaram com o volume de amostra e, consequentemente, com o tempo de amostragem; esse aspecto é muito importante em relação ao solvente orgânico imobilizado, pois mesmo com essas variações, não se observou uma maior perda de xileno.

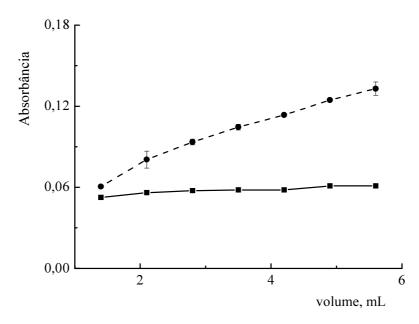


Figura 25 - Influência do volume de amostra. Linha contínua = branco, linha tracejada = $500,0 \mu g L^{-1}$ carbaril. Dados se referem a 3 replicatas.

A concentração de NaOH na fase aceptora influenciou a hidrólise do analito e, por consequência, a quantidade extraída da membrana para a segunda fase aquosa (Figura 26). O aumento desta concentração até 0,05 mol L⁻¹ (terceira menor concentração, na Figura 26) revelou que esta seria a concentração mínima para se ter uma hidrólise eficiente do analito, pois não houveram incrementos em sinal com concentrações mais altas. Para as concentrações mais altas, observaram-se sinais mais imprecisos e aumento do sinal de branco, sugerindo que soluções mais alcalinas interferem no equilíbrio (e talvez na solubilidade) entre as fases aquosa e orgânica. Considerando-se estes aspectos e assumindo-se uma medida de segurança, selecionou-se a concentração de 0,1 mol L⁻¹ NaOH.

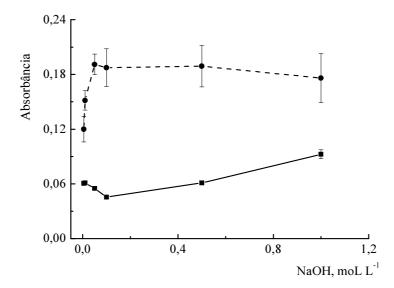


Figura 26 - Influência da concentração da fase aceptora, NaOH. Linha contínua = branco, linha tracejada = $500,0 \, \mu g \, L^{-1}$ carbaril. Dados se referem a 3 replicatas.

Após otimização dos principais parâmetros envolvidos na extração de carbaril via SLME utilizando sistema com FC, construiu-se sistema análogo com FP (Figura 9b) e verificaram-se as diferenças advindas da utilização desses fluxos. Foram utilizadas bombas solenoide com volume de pulso de $10~\mu L$ como V_1 , V_2 e V_3 , e de $5~\mu L$ como V_4 (Figura 9a); a frequência de acionamento foi selecionada como $1,11~s^{-1}$ para que as bombas dispensassem vazões equivalentes às do sistema com FC.

Para ambos os sistemas, obtiveram-se curvas analíticas entre 100,0 e 1000,0 μg L⁻¹ carbaril, as quais eram tipicamente descritas como:

FP:
$$A = -1,30 \times 10^{-4} + 1,165 \times 10^{-4} \text{ C}$$
 $(n = 4; r = 0,998)$
FC: $A = -9,59 \times 10^{-3} + 1,066 \times 10^{-4} \text{ C}$ $(n = 4; r = 0,965)$

onde, A = altura de pico em absorbância; C = concentração em $\mu g \ L^{-1}$ carbaril.

Comparando-se esses resultados, comprovou-se que o uso de FP favoreceu a extração do analito, já que o sistema explorando esse tipo de fluxo apresentou uma sensibilidade 9,3% maior, comparando-se os coeficientes angulares, além de uma melhor linearidade da curva analítica. O sistema com FP foi então, selecionado para o prosseguimento dos estudos e para a análise das amostras.

5.2.2. Eficiência da extração

A eficiência da extração foi estimada em função das concentrações de solução-padrão inserida e daquela coletada na fase aceptora, assim como dos volumes de amostra inserida e da câmara de extração. Considerando-se que foram coletados volumes referentes a duas inserções de amostra, o volume total inserido de cada solução-padrão testada (9,8 mL) e o volume de duas vezes o da câmara (660 μL) foram utilizados para se quantificar a eficiência de extração e o fator de enriquecimento.

A curva analítica utilizada nesta quantificação foi construída para determinar a concentração dos volumes coletados em balões de 5,0 mL. Esta curva obedeceu a equação: $A = 0,0055 + 1,310 \times 10^{-4} \text{ C}$ (r = 0,992; n = 4), para a faixa de concentração $50,0 - 500,0 \, \mu \text{g L}^{-1}$ carbaril. Para averiguação da eficiência de extração e do fator de enriquecimento, utilizaram-se as equações apresentadas na seção 4.2.4, para inserções de soluções-padrão $500,0 \, \text{e} \, 1000,0 \, \mu \text{g L}^{-1}$ carbaril (Tabela 3).

Tabela 3 - Eficiência de extração e fator de enriquecimento da estratégia proposta. Valores calculados pelas equações da seção 4.2.4, a partir dos valores de concentração das soluções-padrão e das respectivas alíquotas coletadas na saída da câmara de extração

solução de carbaril (μg L ⁻¹)	eficiência de extração (%)	fator de enriquecimento
500,0	20,6	3,06
1000,0	18,9	2,80

Apesar destes baixos valores de eficiências de extração (*ca.* 20%) e fatores de enriquecimento (*ca.* 3), deve-se destacar que a estratégia proposta apresenta como grandes vantagens o preparo da amostra realizado em linha, e o menor tempo (7,0 min) de amostragem/concentração. De fato, na única aplicação de SLME para a determinação de carbaril¹¹² encontrada na literatura, utilizou-se uma etapa de extração/concentração de 30 min para soluções contendo 1,0 mg L⁻¹ carbaril (concentração muito acima da esperada para amostras reais) previamente à inserção da solução extraída em cromatógrafo a líquido de alta eficiência, obtendo-se apenas 58,28% de eficiência de extração para carbaril.

5.2.3. Seletividade da extração e aplicação

Para a verificação da aplicabilidade da estratégia proposta, as amostras de águas naturais foram analisadas com o sistema dimensionado. Acredita-se que os sinais registrados sejam decorrentes da absorção da radiação (246 nm) por matéria orgânica, já que a região UV do espectro eletromagnético é reconhecidamente susceptível a este tipo de interferência, e não havia nenhum indício de que as amostras teriam esse nível de contaminação com o analito. Entretanto, no estudo de adição e recuperação efetuado para estas amostras, observou-se, apesar da falta de seletividade, bons valores de recuperação, como descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados de recuperação. Concentrações estimadas antes e depois da adição de carbaril a amostras de águas naturais. Dados se referem a 3 replicatas

amostra	concentração estimada (μg L ⁻¹)	adição (μg L ⁻¹)	concentração estimada após adição (μg L ⁻¹)	recuperação (%)
1	273 ± 24	150,0	437 ± 8	110
2	$97 \pm 32*$	150,0	229 ± 35	88
3	108 ± 16	150,0	233 ± 32	83
4	114 ± 24	150,0	263 ± 40	100
5	168 ± 36	300,0	493 ± 44	108
6	168 ± 80	300,0	426 ± 7	86
7	$86 \pm 21*$	300,0	387 ± 33	100
8	282 ± 7	300,0	599 ± 113	106

^{*}valores obtidos por extrapolação da curva analítica (100,0 - 1000,0 µg L⁻¹ carbaril)

Relativamente aos outros metilcarbamatos, foram preparadas soluções individuais que foram inseridas no lugar da amostra e os sinais obtidos foram comparados com aqueles obtidos pela inserção de solução de carbaril à mesma concentração (Figura 27).

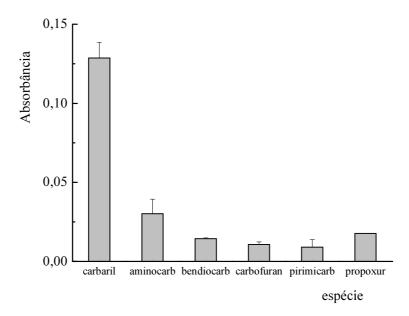


Figura 27 - Extração de metilcarbamatos via SLME. Soluções individuais contendo $1000,0~\mu g~L^{-1}$ de cada espécie. Dados se referem a 3 replicatas.

Os metilcarbamatos avaliados demonstraram também ser potenciais interferentes pois, apesar de apresentarem absorção abaixo de 25% do sinal relativo ao analito, todos foram extraídos por SLME e se mostraram monitoráveis em 246 nm. Desta forma, fez-se necessária a adição de uma etapa de derivatização para contornar o efeito das espécies interferentes.

Ressalte-se que foram realizadas mais de 30 extrações / determinações com a imobilização de apenas uma pequena alíquota (700 μ L) de xileno, e não foram observados efeitos de memória.

5.2.4. Estratégias para derivatização e dimensionamento do sistema

Para a implementação da etapa de derivatização foi utilizado o reagente cromogênico *p*-aminofenol, o qual se liga diretamente ao analito concentrado na forma de α-naftol, formando o produto azul de indofenol. Como este reagente poderia ser inserido em diferentes posições do sistema em fluxo, foram realizados experimentos para definir a sequência de inserção na fase aceptora e para isso foram utilizadas soluções contendo 0,1 mol L⁻¹ NaOH, 50 mg L⁻¹ *p*-aminofenol e 10 mg L⁻¹ carbaril (ou água, para simular o branco); respectivamente nos volumes: 1,0; 1,0 e 0,1 mL. Estas soluções foram misturadas em diferentes sequências em uma cubeta aberta (caminho óptico de 1,0 cm), e subsequentemente monitoradas em 590 nm.

As possibilidades avaliadas foram (Figura 28):

- a) a inserção do reagente cromogênico em confluência com a solução aceptora e, hidrólise do analito e reação indicadora, concomitantemente; para isso, as três soluções foram misturadas rapidamente e monitoradas logo em seguida;
- b) o uso de uma única solução mista na fase aceptora, já contendo o reagente cromogênico em NaOH; para isso, essas duas soluções foram previamente misturadas, mantidas em repouso (*ca.* 1,5 h) para simular as condições do uso dessa solução por sucessivas extrações e, posteriormente, adicionou-se a amostra e efetuou-se a leitura;
- c) a inserção do reagente logo após a saída da fase aceptora pela câmara de extração, para simular uma reação indicadora após a hidrólise do analito; para isso, as soluções de NaOH e de amostra foram combinadas e mantidas em repouso por *ca.* 5 min; posteriormente, adicionou-se o reagente e efetuou-se a leitura.

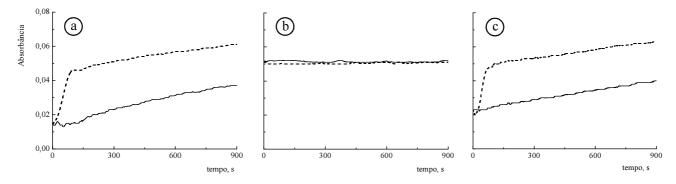


Figura 28 - Influência da sequência de adição dos reagentes. Linha contínua = branco, linha tracejada = 10.0 mg L^{-1} carbaril. Sequências = (a): NaOH + p-aminofenol + amostra \rightarrow leitura; (b): NaOH + p-aminofenol (ca. 1,5 h) \rightarrow + amostra \rightarrow leitura; (c) NaOH + amostra (ca. 5 min) \rightarrow + p-aminofenol \rightarrow leitura.

Analisando-se os registros obtidos, descartou-se a possibilidade de mistura prévia de *p*-aminofenol e NaOH (Figura 28b), pois pode-se inferir que as espécies reagiram completamente entre si, impossibilitando qualquer reação com o analito adicionado posteriormente. A mesma reação (entre *p*-aminofenol e NaOH) pôde ser observada nos registros do branco das duas outras situações (Figura 28 a, c), as quais resultaram em registros semelhantes. Portanto, optou-se por inserir o reagente cromogênico após a câmara de extração como forma de favorecer a reação entre o analito e *p*-aminofenol em detrimento do desfavorecimento da reação.

Construiu-se então, um novo sistema (Figura 10) visando a extração de carbaril via SLME e derivatização com *p*-aminofenol, ambas no mesmo módulo de análises. Adicionou-se ao sistema anterior para extração, mais uma bomba solenoide (5 μL de volume por pulso) para a inserção do reagente, a qual era acionada à mesma frequência das demais e provia a metade da vazão destas, ou seja, 0,35 mL min⁻¹. Ressalte-se que a vazão do reagente foi selecionada como sendo menor que a da solução aceptora visando uma menor diluição da zona de amostra. Neste sistema, foram utilizados os parâmetros selecionados para a etapa de extração, e avaliaram-se os principais parâmetros envolvidos na derivatização. Estes estudos também se basearam na avaliação de registros referentes a inserções de branco ou solução-padrão 500,0 μg L⁻¹ carbaril.

Contrariamente à extração com monitoramento em UV, onde os sinais do branco eram menos pronunciados, com a adição da etapa de derivatização, este aspecto se tornou relevante, já que o reagente cromogênico apresentava absorção considerável no comprimento de onda de monitoramento. Com o aumento do volume inserido de reagente, que foi avaliado em função do tempo de atuação da bomba solenoide correspondente, observou-se aumento nos sinais referentes ao branco e à solução-padrão (Figura 29); porém, em termos de sinais líquidos, ou seja, descontando-se os sinais dos brancos daqueles referentes à solução-padrão, observou-se incrementos até 50 s (290 µL de reagente); este volume foi então selecionado, pois era suficiente para reagir com o volume de analito extraído para a fase aceptora da câmara de extração.

Em relação à concentração do reagente, não foram observados efeitos pronunciados em termos de sinais líquidos, para a faixa de estudo (Figura 30); selecionou-se, portanto, a concentração de 50 mg L^{-1} p-aminofenol, com a qual obtinha-se um sinal líquido um pouco mais intenso, sem aumentar-se demasiadamente o sinal do branco correspondente.

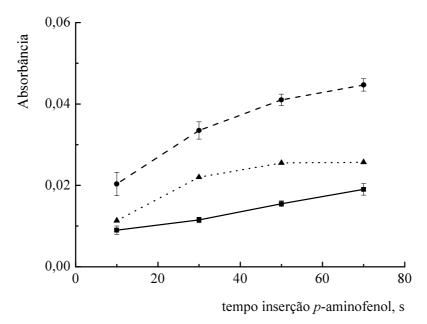


Figura 29 - Influência do volume de reagente cromogênico. Volume em função do tempo de inserção do reagente. Linha contínua = branco, linha tracejada = $500,0~\mu g~L^{-1}$ carbaril, linha pontilhada = diferença (padrão - branco). Dados se referem a 3 replicatas.

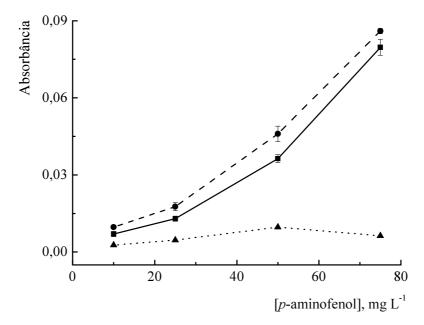


Figura 30 - Influência da concentração de reagente cromogênico. Linha contínua = branco, linha tracejada = $500,0~\mu g~L^{-1}$ carbaril, linha pontilhada = diferença (padrão - branco). Dados se referem a 3 replicatas.

Já com o aumento do comprimento do reator helicoidal, observou-se um aumento em sinal líquido até 75 cm (Figura 31), selecionado como suficiente para se obter boas condições de mistura e de tempo de reação, entre o analito extraído e o reagente.

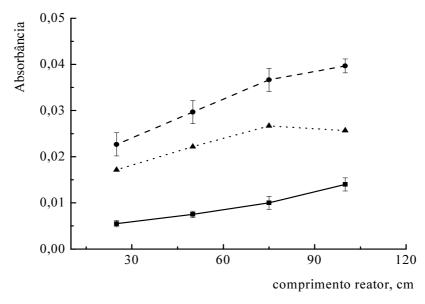


Figura 31 - Influência do comprimento do reator helicoidal. Linha contínua = branco, linha tracejada = 500,0 µg L⁻¹ carbaril, linha pontilhada = diferença (padrão - branco). Dados se referem a 3 replicatas.

Após o dimensionamento do sistema para extração e derivatização do analito, verificou-se a linearidade de curvas analíticas compreendendo as faixas de concentrações 50,0 - 1000,0 μg L⁻¹ e 0,50 - 5,00 mg L⁻¹ carbaril (Figura 32). Para a faixa de concentrações mais baixas, foi notada uma diferença muito pequena entre o sinais do branco e dos demais: a diferença entre o sinal referente à solução-padrão mais concentrada e o branco, por exemplo, foi de apenas *ca.* 0,03 absorbância; qualquer faixa de trabalho neste nível de concentração do analito apresentaria, portanto, limitada sensibilidade. Já com a faixa de concentrações mais elevadas, foram observadas sensibilidade e linearidade muito superiores em relação à outra faixa.

Entretanto, quando consideradas as re-inserções de branco (Figura 32, em destaque), realizadas após a inserção de todas as soluções-padrão, para ambas as curvas analíticas, observa-se a instabilidade do reagente cromogênico utilizado que, mesmo sem adição prévia de NaOH, como nos experimentos relativos à sequência de inserção, revelou-se inadequado para a presente aplicação.

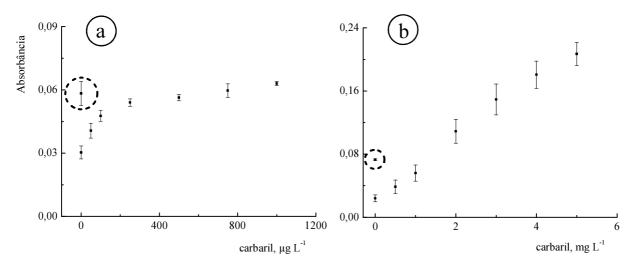


Figura 32 - Curvas analíticas para determinação de carbaril com derivatização com *p*-aminofenol. (a): 50,0 - 1000,0 μg L⁻¹ carbaril; (b): 0,50 - 5,0 mg L⁻¹ carbaril. Em destaque: re-inserção do branco. Dados se referem a 3 replicatas.

Portanto, apesar das características favoráveis observadas em relação à extração de carbaril via SLME com FP, sobretudo a simplicidade e os bons resultados de recuperação, estudos referentes à seletividade para a análise de águas naturais não puderam ser concluídos, devido ao estado inadequado do reagente cromogênico disponível, o qual não pôde ser substituído em tempo hábil.

5.3. Determinação de acidez total

Os sistemas de análises em fluxo na Figura 11 são robustos e não foram observadas derivas significativas de linha base mesmo por longos períodos (6 h) de operação. Os resultados foram precisos (d.p.r. < 6%) e facilmente obtidos, já que a equação 9 é diretamente aplicável.

5.3.1. Seleção do traçador

Os corantes azul de poirrier, azul de toluidina, azul de cresil brilhante e BB demonstraram ser traçadores em potencial na presente aplicação, devido à linearidade de absorção em relação à concentração, à não aderência à tubulação do sistema e às características espectrais favoráveis.

Os valores de absorbância relativos aos primeiros dois corantes eram, entretanto, afetados por variações de pH, próximos ao ponto final (Figura 33). Já o corante azul de cresil

brilhante tendeu a obedecer ao critério de independência em relação a pH, mas não foi selecionado, pois experimentos paralelos confirmaram que sua coloração desvanece em ambientes oxidantes, ¹¹³ fator que poderia ser limitante em relação à exatidão. BB foi então, o corante selecionado como traçador.

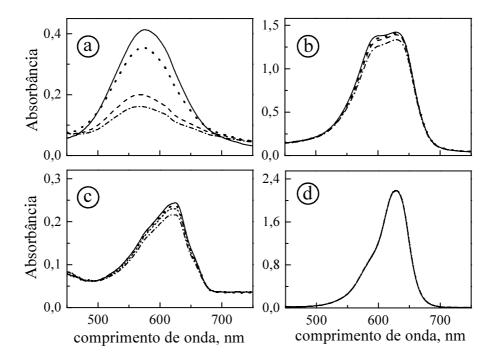


Figura 33 - Influência do pH sobre os espectros de absorção dos corantes. Figura refere-se à 20,0 mg L⁻¹ de: azul de poirrier (a), azul de toluidina (b), azul de cresil brilhante (c) e azul brilhante FCF, BB (d). Linhas contínua, pontilhada, tracejada e pontilhada/tracejada: valores de pH iguais a 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0; respectivamente.

Com o corante BB, uma linha base estável (sem derivas mensuráveis) foi registrada, confirmando que este traçador não adere à tubulação do sistema. A espécie não sofre modificações mensuráveis em sua estrutura química próximo ao ponto final da titulação, e as características espectrais são independentes em relação ao valor de pH (Figura 33). Ainda, o corante não é afetado pela presença de etanol no meio reacional. Uma resposta linear, descrita na equação 10, foi obtida para curva até 10 mg L⁻¹ BB, sendo expressa como:

$$M = 0.00367 + 0.135 \text{ C} \quad (r = 0.99995; n = 8)$$
 (10)

onde, M = altura de pico em absorbância; C = concentração do corante em $mg L^{-1}$.

O comprimento de onda de máxima absortividade molar para BB (630 nm) refere-se a uma região espectral onde nenhuma absorção mensurável por phen é notada. Por outro lado, a absorção relativa à phen foi monitorada a 552 nm, onde BB absorve levemente (Figura 34). Esse aspecto não foi relevante já que, como mencionado anteriormente, as variações em absorção relativas a phen, próximas ao ponto final, são pronunciadas e súbitas.

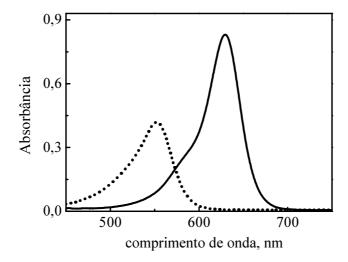


Figura 34 - Espectros dos corantes. Figura se refere a espectros em pH 9, do traçador (6,0 mg L^{-1} BB; linha contínua) e do indicador ácido-base (1,6 μ g L^{-1} phen; linha pontilhada).

Como salientado na seção 4.3.2, o traçador e o titulante devem idealmente apresentar o mesmo coeficiente de difusão e isto implica em dispersões idênticas destas espécies. A dispersão de espécies é muito importante em procedimentos em fluxo, e a sua quantificação pode prover informações acerca das concentrações da amostra, da solução transportadora e do(s) reagente(s) ao longo da zona de amostra.⁴ A primeira proposta de quantificação da dispersão em sistemas de análises em fluxo não-segmentado foi o fator de dispersão, ¹¹⁵ o qual considerava a razão de concentrações antes e depois do processo dispersivo para dado elemento de fluido. Posteriormente, diferentes propostas de quantificação de dispersão foram apresentadas, entretanto, todas essas consideravam apenas a extensão de dispersão de uma determinada espécie química, geralmente o analito, em determinado elemento fluido, sem salientar a composição volumétrica.⁴

A fração volumétrica $(X)^{104}$ foi então proposta como sendo um parâmetro quantitativo que englobava, e ainda contornava as limitações, das propostas precedentes relativas à dispersão em sistemas de análises em fluxo. X expressa a contribuição relativa de uma solução em dado elemento fluido, localizado em qualquer posição do módulo de análises, a qualquer momento. Porém, mesmo X não é considerada como uma resposta definitiva quanto à

caracterização do grau de dispersão em análises do fluxo: em situações onde as espécies químicas apresentam coeficientes de difusão muito distintos, por exemplo, a aplicação do conceito se torna complexa.⁴

Desta forma, após análise dos formatos dos picos registrados nos dois comprimentos de onda, correspondentes às absortividades molares máximas de phen e de BB, pôde-se concluir que o critério de igualdade em coeficientes de difusão não era perfeitamente obedecido. De fato, esses formatos eram um pouco diferentes, especialmente nas porções frontal e traseira dos picos registrados. Para dispersões idênticas, a razão entre absorbância phen/BB deveria ser constante. Deve ser enfatizado que as diferenças em coeficientes de difusão de BB e OH⁻, provavelmente, são maiores que aquelas entre BB e phen. Decidiu-se então, projetar os sistemas em fluxo da Figura 11 com as menores dispersões axiais possíveis, visando minimizar a influência de diferenças nos coeficientes de difusão envolvidos.

5.3.2. Concentração do titulante

Os experimentos envolvendo variações da concentração do titulante revelaram que o aumento deste parâmetro era limitado, já que a coloração de phen desvanecia rapidamente em concentrações superiores a 0,01 mol L⁻¹ OH⁻; este valor foi então selecionado.

Objetivando minimizar a influência das diferenças difusionais entre traçador e titulante, a dispersão da amostra foi mantida tão baixa quanto possível. Uma diluição manual prévia (20 vezes) das amostras com água, foi então realizada antes de suas inserções nos sistemas em fluxo.

5.3.3. Dimensionamento do sistema

Quando um reator tubular aberto de 100 cm foi colocado no percurso analítico, a razão de absorções phen/BB sofreu variações pronunciadas (Figura 35), e esta característica se manifestou mesmo para reatores maiores. A tendência se manteve também com um reator empacotado com partículas de vidro. A variação na razão de absorções teve ligeiro aumento para maiores volumes de amostra, e este aspecto é consequência do esvaziamento da alça de amostragem: como um fluxo constante era utilizado, a influência da difusão durante o esvaziamento da mesma se tornava mais pronuncianda. A vazão se mostrou menos influente no contexto, como pode ser concluído comparando-se as porções da esquerda e central da Figura 35. Este parâmetro, portanto, foi selecionado tão alto quanto possível para melhorar a

frequência de amostragem. Entretanto, distorções nos picos registrados levavam a razões de absorções menos estáveis para vazões maiores do que 3,0 mL min⁻¹. Este parâmetro foi então selecionado como 2,0 mL min⁻¹.

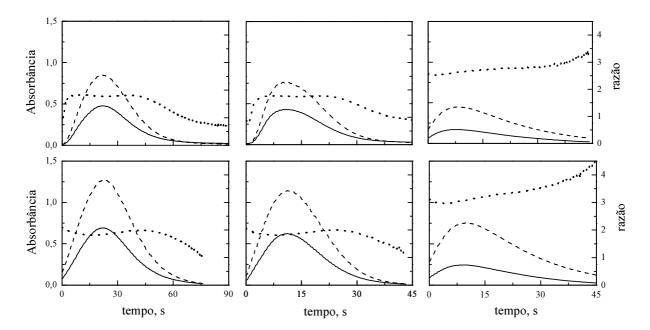


Figura 35 - Registros do sistema para titulação por injeção em fluxo. Figura refere-se a solução *ca.* 6 mg L⁻¹ BB + gotas de phen (em tampão borato; 0,01 mol L⁻¹; pH 9,0), inserida em solução-tampão idêntica (sem os corantes), no sistema da Figura 11a com bomba peristáltica. Porções superior e inferior: 120 e 250 μL de volume inserido; porções à esquerda e central: 1,0 e 2,0 mL min⁻¹ de vazão, e 100 cm de reator tubular; porções à direita: 2,0 mL min⁻¹ de vazão e uma câmara de mistura no lugar do reator tubular. Linhas contínua e tracejada: registros de phen (552 nm) e BB (630 nm); linha pontilhada: razão dos valores de absorbância nesses comprimentos de onda. Para mais detalhes, vide texto.

Contrariamente, variações menores da razão de absorções foram notadas utilizando-se uma câmara de mistura (Figura 35, direita). A influência do volume de amostra inserido não foi significativa, já que este era muito menor relativamente ao volume interno da câmara. Para o dimensionamento do sistema, portanto, uma câmara de mistura foi utilizada, e prioridade foi dada às situações que resultassem em menores variações na razão de valores de absorbância.

Com relação ao sistema de titulação por injeção em fluxo da Figura 11a, as medidas obtidas nas porções frontais da zona de amostra foram sempre menos precisas. 116 Para amostras típicas com ca. 76 mmol L^{-1} ácido acético, os desvios-padrão relativos dos resultados associados às porções frontal e traseira das amostras foram estimados em 5-70 e 1-4%, respectivamente. Este resultado enfatiza que o caráter laminar do fluxo utilizado foi uma desvantagem, já que ele proporciona um pronunciado gradiente axial de

concentração, especialmente na parte frontal da zona de amostra. As condições de mistura se tornaram críticas e as diferenças em coeficientes de difusão foram, então, mais restritivas. Consequentemente, apenas as medidas realizadas na porção traseira da zona de amostra foram consideradas na presente aplicação.

Em relação ao sistema de titulação programada em triângulo (Figura 11b), a vazão do titulante foi mantida, ao passo que a vazão da amostra era aumentada em incrementos de 0,1 mL min⁻¹. Um longo período de tempo (30 s) entre incrementos foi utilizado para se evitarem efeitos de memória nas sucessivas condições estabelecidas. Ao contrário do sistema de análises por injeção em fluxo, a irregularidade em razão de absorções associadas aos primeiros instantes da titulação eram as mais pronunciadas, provavelmente devido às piores condições de mistura, já que o titulante era propelido a uma vazão significativamente maior em relação à da amostra. Duas vazões de titulante (2,0 e 4,0 mL min⁻¹) foram testadas, e menores variações em razão de absorções foram notadas para os primeiros incrementos da titulação utilizando-se a vazão de 4,0 mL min⁻¹ de titulante (Figura 36). A possibilidade de parada da amostra (ou titulante) dentro da câmara de mistura e implementação de uma variação gradual da vazão de titulante (ou amostra), portanto de frações volumétricas, também foi investigada, mas variações similares da razão de absorções phen/BB foram observadas.

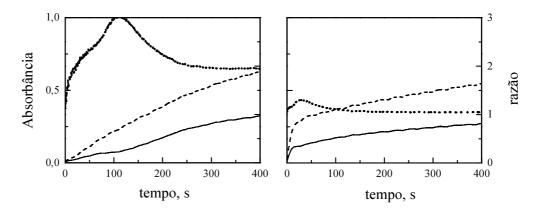


Figura 36 - Registros do sistema para titulação em fluxo programada em triângulo. A figura se refere à solução *ca.* 6 mg L⁻¹ BB + gotas de phen (em tampão borato; 0,01 mol L⁻¹; pH 9,0) em vazão crescente (incrementos de 0,1 mL min⁻¹), em confluência com solução-tampão idêntica (sem os corantes e à vazão constante), no sistema da Figura 11b com bomba peristáltica. Porções esquerda e direita: vazão do titulante em 2,0 e 4,0 mL min⁻¹. Linhas contínua, tracejada e pontilhada, como na Figura 35. Para mais detalhes, vide texto.

A influência do tipo de fluxo sobre a razão de absorbância foi investigada posteriormente, com o objetivo de se obter dispersões de traçador e titulante mais similares entre si. Um fluxo laminar, apresentando um perfil flutuante em torno de uma média da vazão

em função do tempo (devido ao movimento dos roletes), é obtido com uma bomba peristáltica, o que leva a um pronunciado alargamento das zonas, ¹¹⁷ enquanto que as bombas solenoide proporcionam fluxos pulsados, e a inerente mistura turbulenta aprimora o transporte radial de massas, reduzindo então, o alargamento das zonas. ¹⁵ Experimentos adicionais foram então conduzidos para verificar a possibilidade do uso de fluxos pulsados para minimizar as restrições advindas de variações em coeficientes de difusão.

Com fluxos pulsados, a razão de valores de absorbância phen/BB sofreu menores variações em relação a fluxos constantes (Figura 37). Este aspecto destaca a habilidade da mistura turbulenta em conferir dispersões similares de espécies diferentes devido às melhores condições de mistura. Bombas solenoide com menores volumes internos foram preferidas para se destacar essa melhoria em mistura. Entretanto, a diminuição desses volumes era limitada pela perda em precisão, pois experimentos paralelos demonstraram que para volumes muito pequenos, seriam necessárias altas frequências de acionamento das bombas solenoide, e a precisão era afetada negativamente. Desta forma, duas bombas solenoide de 20 µL foram usadas no sistema de análises por injeção em fluxo (inserção de 260 µL de amostra), ao passo que uma bomba de 10 µL e outra de 20 µL foram usadas para amostra e titulante, respectivamente, no sistema de titulação programada em triângulo.

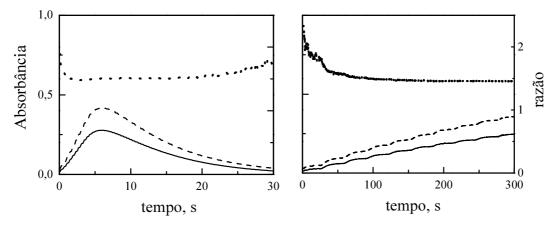


Figura 37 - Registros das titulações com traçador com fluxos pulsados. Figura se refere à solução ca. 6 mg L⁻¹ BB + gotas de phen (em tampão borato; 0,01 mol L⁻¹; pH 9,0) no lugar da amostra nos sistemas da Figura 11a (esquerda) e 11b (direita), com uma vazão total (esquerda) ou vazão do titulante (direita) de 3,0 mL min⁻¹. Símbolos e outras condições, como na Figura 35. Para mais detalhes, vide texto.

Com as condições experimentais da Figura 37, e considerando-se a concentração esperada nas amostras, após a diluição destas, as frequências de amostragem foram estimadas em 100 e 10 h⁻¹, para os sistemas por injeção em fluxo e programado em triângulo, respectivamente.

5.3.4. Aplicação

Após dimensionamento, os sistemas de análises em fluxo da Figura 11, com fluxos pulsados, foram aplicados às análises de amostras comerciais de vinagre. Os registros obtidos com os dois sistemas apresentaram tipicamente os perfis da Figura 38, onde foi utilizada a derivada do monitoramento de phen para se encontrar os pontos de inflexão e assim obter os pontos finais das titulações. No sistema de análises por injeção em fluxo, apenas os resultados provenientes da porção traseira da zona de amostra foram considerados. A exatidão foi avaliada tomando-se um método manual de titulação⁸⁴ como referência. Após aplicação do teste pareado de t de Student aos dados da Tabela 5, obtiveram-se os valores t estimados: 1,74 (sistema de injeção em fluxo) e 1,15 (sistema programado em triângulo); contra o valor tabelado de t (2,45) para n = 7. Nenhuma diferença estatística entre os métodos foi, portanto, encontrada a um nível de confiança de 95%. t

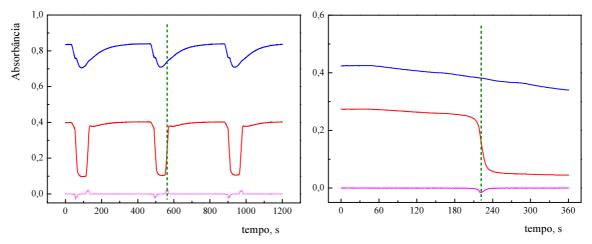


Figura 38 - Registros típicos das titulações de vinagre. Figura refere-se a inserções de uma amostra em sistema por injeção em fluxo (à esquerda, em triplicata) e programado em triângulo (à direita). Em azul: monitoramento do traçador BB; em vermelho: monitoramento do indicador ácido-base phen; em rosa: derivada do monitoramento de phen; em verde tracejado: representação de ponto final da titulação.

Tabela 5 - Resultados de acidez total em vinagres. Valores obtidos por procedimento titulométrico manual (referência), e pelas titulações monitoradas por traçador propostas (sistemas de análises por injeção em fluxo e programado em triângulo). Concentrações e erros relativos expressos em mmol L^{-1} e %, respectivamente.

amostra	referência	injeção em fluxo ^a	erro relativo	programado em triângulo	erro relativo
1	753 ± 2	791 ± 11	+5,0	754 ± 6	+0,1
2	798 ± 4	790 ± 6	-1,0	804 ± 11	+0,8
3	758 ± 2	813 ± 19	+7,2	824 ± 3	+8,6
4	761 ± 2	759 ± 15	-0,3	769 ± 6	+1,1
5	759 ± 1	738 ± 38	-2,8	750 ± 3	-1,2
6	752 ± 4	779 ± 3	+3,6	750 ± 9	-0,3
7	779 ± 2	824 ± 10	+5,8	786 ± 45	+0,9

a = dados referentes à porção traseira da zona de amostra.

6. CONCLUSÕES

A comparação de desempenho de sistemas de análises químicas em fluxo envolvendo FC ou FP para a implementação de metodologias empregando reagentes imobilizados demonstrou que a utilização de FP, apesar de proporcionar melhor transporte radial de massas, não evidenciou ganhos expressivos em relação ao uso de reagentes sólidos imobilizados, na forma de reator tubular aberto, assim como de solventes orgânicos imobilizados em membrana hidrofóbica, para extração líquido-líquido. Entretanto, a utilização deste tipo de fluxo mostrou-se favorável em relação à obtenção de dispersões similares de espécies diferentes, devido às melhores condições de mistura, para a implementação de titulações monitoradas por traçador.

O reator tubular aberto com MnO₂(s) imobilizado demonstrou ser um dispositivo útil e vantajoso para a determinação de AA em produtos farmacêuticos, devido à facilidade de confecção, minimização das limitações associadas à utilização de reagentes sólidos empacotados em mini-colunas, e vida útil adequada (mais de 200 determinações sem perdas consideráveis em repetibilidade). A sensibilidade e o coeficiente de correlação linear foram semelhantes para os sistemas com os diferentes tipos de fluxo; acredita-se que as condições de mistura não tiveram efeito apreciável sobre a interação do analito com o reagente sólido imobilizado devido a limitações físicas e/ou cinéticas já que, na redução de Mn(IV) a Mn²⁺, há passagem do metal da fase sólida para a líquida. O sistema com FP apresentou melhor desempenho em relação a limite de detecção e repetibilidade devido às melhores condições de mistura inerentes a este tipo de fluxo. Em relação à exatidão, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o método proposto e o da Farmacopeia Britânica ao nível de confiança de 95%.

A estratégia de extração líquido-líquido via SLME, proposta para a determinação de carbaril, apresentou como grandes vantagens a simplicidade, a minimização do volume de solvente orgânico requerido (*ca.* 20 μL por extração), o preparo da amostra realizado em linha, e o curto tempo de amostragem/concentração (7,0 min). Ainda, o uso de FP favoreceu a extração por membrana, obtendo-se uma sensibilidade 9,3% maior com o sistema com este tipo de fluxo; entretanto, o método mostrou-se susceptível a efeitos de interferentes, como outros metilcarbamatos, e estudos referentes à seletividade para a análise de águas naturais não puderam ser concluídos.

A titulação monitorada por traçador foi eficientemente implementada em sistemas de análises em fluxo para a determinação de acidez total em vinagres. Como uma curva analítica não é requerida, a inovação é considerada como uma titulação verdadeira, segundo definição da IUPAC. A exatidão pode, entretanto, ser prejudicada por diferenças em coeficientes de difusão do titulante e do traçador; essa desvantagem foi contornada reduzindo-se a dispersão axial. Ainda, a utilização de FP mostrou-se favorável quanto às variações da razão dos valores de absorbância relativos ao monitoramento do traçador e do indicador ácido-base, destacando a habilidade da mistura turbulenta em obter dispersões similares de espécies diferentes devido às melhores condições de mistura; nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os resultados obtidos com os sistemas propostos (por injeção em fluxo e programado em triângulo) e com o método manual de referência, ao nível de confiança de 95%.

REFERÊNCIAS

¹ CERDA, V.; FERRER, L.; AVIVAR, J.; CERDA, A. **Flow analysis.** A practical guide. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2014.

² SKEGGS JUNIOR, L. T. Persistence... and prayer: From the artificial kidney to the AutoAnalyzer. **Clinical Chemistry**, Washington, DC, v. 46, p. 1425-1436, 2000.

³ SNYDER, L. R. Continuous-flow analysis: present and future. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 114, p. 3-18, 1980.

⁴ ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; TOWNSHEND, A.; WORSFOLD, P. J. Flow analysis with spectrophotometric and luminometric detection. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2012.

⁵ BATISTA, A. D.; SASAKI, M. K.; ROCHA, F. R. P.; ZAGATTO, E. A. G. Flow analysis in Brazil: contributions over the last four decades. **Analyst**, Cambridge, v. 139, p. 3666-3682, 2014.

⁶ LAPA, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, B. F.; SANTOS, J. L. M.; ZAGATTO, E. A. G. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 466, p. 125-132, 2002.

⁷ WEEKS, D. A.; JOHNSON, K. S. Solenoid pumps for flow injection analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 68, p. 2717-2719, 1996.

⁸ FORTES, P. R.; FERES, M. A.; SASAKI, M. K.; ALVES, E. R.; ZAGATTO, E. A. G.; PRIOR, J. A. V.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C. Evidences of turbulent mixing in multi-pumping flow systems. **Talanta**, Amsterdam, v. 79, p. 978-983, 2009.

⁹ LIMA, J. L. F. C.; SANTOS, J. L. M.; DIAS, A. C. B.; RIBEIRO, M. F. T.; ZAGATTO, E. A. G. Multi-pumping flow systems: an automation tool. **Talanta**, Amsterdam, v. 64, p. 1091-1098, 2004.

¹⁰ DIAS, A. C. B.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C.; QUINTELLA, C. M.; LIMA, A. M. V.; ZAGATTO, E. A. G. A critical comparison of analytical flow systems exploiting streamlined and pulsed flows. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin, v. 388, p. 1303-1310, 2007.

¹¹ ALVES, E. R.; FERES, M. A.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C. Exploiting pulsed flows for heating improvement: application to determination of total reducing sugars in molasses and sugar-cane juices. **Current Analytical Chemistry**, Sharjah, v. 5, p. 65-69, 2009.

¹² RIBEIRO, M. F. T.; DIAS, A. C. B.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C.; ZAGATTO, E. A. G. Fluidized beds in flow analysis: use with ion-exchange separation for spectrophotometric determination of zinc in plant digests. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin, v. 384, p. 1019-1024, 2006.

- ¹³ NASCIMENTO, C. F.; BRASIL, M. A. S.; COSTA, S. P. F.; PINTO, P. C. A. G.; SARAIVA, M. L. M. F. S.; ROCHA, F. R. P. Exploitation of pulsed flows for on-line dispersive liquid-liquid microextraction: Spectrophotometric determination of formaldehyde in milk. **Talanta**, Amsterdam, v. 144, p. 1189-1194, 2015.
- ¹⁴ FRIZZARIN, R. M.; ROCHA, F. R. P. A multi-pumping flow-based procedure with improved sensitivity for the spectrophotometric determination of acid-dissociable cyanide in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 758, p. 108-113, 2013.
- ¹⁵ GONZÁLEZ, P.; KNOCHEN, M.; SASAKI, M. K.; ZAGATTO, E. A. G. Pulsed flows in flow analysis: potentialities, limitations and applications. **Talanta**, Amsterdam, v. 143, p. 419-430, 2015.
- ¹⁶ SLATER, C.; CLEARY, J.; LAU, K.-T.; SNAKENBORG, D.; CORCORAN, B.; KUTTER, J. P.; DIAMOND, D. Validation of a fully autonomous phosphate analyser based on a microfluidic lab-on-a-chip. **Water Science and Technology**, London, v. 61, p. 1811-1818, 2010.
- ¹⁷ HALL, E. A. H. Flow injection analysis with immobilized reagents. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 2, p. 9-16, 1991.
- ¹⁸ RICHTER, P.; LÓPEZ-RUIZ, B.; SÁNCHEZ-CABEZUDO, M.; MOTTOLA, H. A. Immobilized enzyme reactors. Diffusion/convection, kinetics, and a comparison of packed-column and rotating bioreactors for use in continuous-flow systems. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 68, p. 1701-1705, 1996.
- ¹⁹ MARTELLI, P. B.; REIS, B. F.; KORN, M.; RUFINI, I. A. The use of ion exchange resin for reagent immobilization and concentration in flow systems. Determination of nickel in steel alloys and iron speciation in waters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 8, p. 479-485, 1997.
- ²⁰ BRYKINA, G. D.; MARCHENKO, D. Y.; SHPIGUN, O. A. Solid-phase spectrophotometry. **Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 50, p. 440-446, 1995.
- ²¹ ROCHA, F. R. P.; RAIMUNDO, I. M.; TEIXEIRA, L. S. G. Direct solid-phase optical measurements in flow systems: a review. **Analytical Letters**, Philadelphia, v. 44, p. 528-559, 2011.
- NIEMAN, T. A. Immobilized and solid-state reagent systems for luminol chemiluminescence in flow systems. **Mikrochimica Acta**, Vienna, v. 3, p. 239-247, 1988.
- ²³ GOSNELL, M. C.; SNELLING, R. E.; MOTTOLA, H. A. Construction and performance of plastic-embedded controlled-pore glass open tubular reactors for use in continuous-flow systems. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 58, p. 1585-1587, 1986.
- ²⁴ VARMA, S. R.; CALATAYUD, J. M.; MOTTOLA, H. A. Continuous-flow determination of reserpine by oxidation with periodate ion and catalysis by manganese(II) in solution or by an MnO₂(s) reactor. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 233, p. 235-241, 1990.

- ²⁵ HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.
- ²⁶ JONSSON, J. A. Membrane extraction in preconcentration, sampling and trace analysis, In: PABBY, A. K.; RIZVI, S. S. H.; SASTRE, A. M. (Ed.). **Handbook of membrane separations.** Boca Raton: CRC Press, 2009. chap. 12.
- ²⁷ SILVESTRE, C. I. C.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C.; ZAGATTO, E. A. G. Liquid-liquid extraction in flow analysis: a critical review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 652, p. 54-65, 2009.
- ²⁸ DRIOLI, E.; STANKIEWICZ, A. I.; MACEDONIO, F. Membrane engineering in process intensification an overview. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 380, p. 1-8, 2011.
- ²⁹ BOYADZHLEV, L.; LAZAROVA, Z. Liquid membranes (liquid pertraction). In: NOBLE, R. D.; STERN, S.A. **Membrane separations technology** Principles and Applications. Amsterdam: Elsevier, 1995. chap. 7.
- ³⁰ JONSSON, J. A.; MATHIASSON, L. Liquid membrane extraction in analytical sample preparation I. Principles. **Trends in Analytical Chemistry**, London, v. 18, p. 318-325, 1999.
- ³¹ AUDUNSSON, G. Aqueous / aqueous extraction by means of a liquid membrane for sample cleanup and preconcentration of amines in a flow system. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 58, p. 2714-2723, 1986.
- ³² LUQUE, M.; RIOS, A.; VALCARCEL, M. Use of supported liquid membranes incorporated in a flow system for the direct determination of eugenol in spice samples. **Analyst**, Cambridge, v. 125, p. 1805-1809, 2000.
- ³³ LUQUE-PEREZ, E.; RIOS, A.; VALCARCEL, M.; DANIELSSON, L. -G.; INGMAN, F. Spectrophotometric flow injection determination of caffeine in solid and slurry coffee and tea samples using supported liquid membranes. **Laboratory Automation & Information Management**, Amsterdam, v. 34, p. 131-142, 1999.
- ³⁴ ALCUDIA-LEON, M. C.; LUCENA, R.; CARDENAS, S.; VALCARCEL, M. Stir membrane extraction: a useful approach for liquid sample pretreatment. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 81, p. 8957-8961, 2009.
- ³⁵ THE AMERICAN HERITAGE DICTIONARY. **The American heritage dictionary of the english language**. 4. ed. Boston: Houghton Mifflin Co., 2009.
- ³⁶ DAVIS, S. N.; THOMPSON, G. M.; BENTLEY, H. W.; STILES, G. Groundwater tracers a short review. **Ground Water**, Westerville, v. 18, p. 14-23, 1980.
- ³⁷ VOSE, P. B. Introduction to nuclear techniques in agronomy and plant biology. Oxford: Pergamon Press, 1980.

- ³⁸ BURNS, D. T.; DANZER, K.; TOWNSHEND, A. Use of the terms "recovery" and "apparent recovery" in analytical procedures (IUPAC recommendations 2002). **Pure and Applied Chemistry**, Research Triangle Park, v. 74, p. 2201-2205, 2002.
- ³⁹ SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5. ed. New York: Saunders College Publishing, 1998.
- ⁴⁰ MARTZ, T. R.; DICKSON, A. G.; DEGRANDPRE, M. D. Tracer monitored titrations: measurement of total alkalinity. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 78, p. 1817-1826, 2006.
- ⁴¹ DEGRANDPRE, M. D.; MARTZ, T. R.; HART, R. D.; ELISON, D. M.; ZHANG, A.; BAHNSON, A. G. Universal tracer monitored titrations. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 83, p. 9217-9220, 2011.
- ⁴² MARTZ, T. R.; TAKESHITA, Y.; ROLPH, R.; BRESNAHAN, P. Tracer monitored titrations: measurement of dissolved oxygen. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 84, p. 290-296, 2012.
- ⁴³ BLAEDEL, W. J.; LAESSIG, R. H. Continuous automated, buretless titrator with direct readout. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 36, p. 1617-1623, 1964.
- ⁴⁴ NAGY, G.; FEHER, Z. S.; TOTH, K.; PUNGOR, E. A novel titration technique for the analysis of streamed samples The triangle-programmed titration technique. Part I. General considerations. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 91, p. 87-96, 1977.
- ⁴⁵ RUZICKA, J.; HANSEN, E. H.; MOSBAEK, H. Flow injection analysis. Part IX. A new approach to continuous flow titrations. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 92, p. 235-249, 1977.
- ⁴⁶ RAMSING, A. U.; RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. The principles and theory of high-speed titrations by flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 129, p. 1-17, 1981.
- ⁴⁷ INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Compendium of Analytical Nomenclature, Definitive Rules 1997**. 3. ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1998.
- ⁴⁸ KOJO, S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 11, p. 1041-1064, 2004.
- ⁴⁹ CHAUHAN, A. S.; RAMTEKE, R. S.; EIPESON, W. E. Properties of ascorbic acid and its applications in food processing: A critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, Heidelberg, v. 35, p. 381-392, 1998.
- ⁵⁰ CARR, R. S.; BALLY, M. B.; THOMAS, P.; NEFF, J. M. Comparison of methods for determination of ascorbic-acid in animal-tissues. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 55, p. 1229-1232, 1983.

⁵¹ WASHKO, P. W.; WELCH, R. W.; DHARIWAL, K. R.; WANG, Y.-H.; LEVINE, M. Ascorbic-acid and dehydroascorbic acid analyses in biological samples. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 204, p. 1-14, 1992.

- ⁵² HASSELMANN, C.; DIOP, P. A. Determination of L-ascorbic-acid in foods a review (1976-1981). **Sciences des Aliments**, Paris, v. 3, p. 161-180, 1983.
- ⁵³ ARYA, S. P.; MAHAJAN, M.; JAIN, P. Photometric methods for determination of vitamin C. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 14, p. 889-895, 1998.
- ⁵⁴ PANDEY, N. K. Spectrophotometric and titrimetric determinations of ascorbic acid. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 54, p. 793-796, 1982.
- ⁵⁵ ZAPOROZHETS, O. A.; KRUSHINSKAYA, E. A. Determination of ascorbic acid by molecular spectroscopic techniques, **Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 57, p. 286-297, 2002.
- ⁵⁶ ARYA, S. P.; MAHAJAN, M.; JAIN, P. Non-spectrophotometric methods for the determination of vitamin C. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 417, p. 1-14, 2000.
- ⁵⁷ NOVAKOVA, L.; SOLICH, P.; SOLICHOVA, D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. **Trends in Analytical Chemistry**, London, v. 27, p. 942-958, 2008.
- ⁵⁸ YEBRA-BIURRUN, M. C. Flow injection determination methods of ascorbic acid. **Talanta**, London, v. 52, p. 367-383, 2000.
- ⁵⁹ CHALK, S. Bibliometrics In: KOLEV, S. D.; MCKELVIE, I. D. (Ed.). **Advances in flow injection analysis and related techniques**. Amsterdam: Elsevier, 2008. v. 54, chap. 5. (Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry).
- ⁶⁰ NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; AKHAVAN, K. Atomic absorption spectrometry for the automatic indirect determination of ascorbic acid based on the reduction of manganese dioxide. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 21, p. 655-659, 2005.
- ⁶¹ VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; FARIA, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 2391-2399, 2006.
- ⁶² THUNDIYIL, J. G.; STOBER, J.; BESBELLI, N.; PRONCZUK, J. Acute pesticide poisoning: a proposed classification tool. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 86, p. 205-209, 2008.
- ⁶³ DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, p. 1296-1301, 2014.

⁶⁴ GUNASEKARA, A. S.; RUBIN, A. L.; GOH, K. S.; SPURLOCK, F. C.; TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of carbaryl. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 196, p. 95-121, 2008.

- ⁶⁵ WHO. **Carbaryl in drinking-water**: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva, 2008. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/carbaryl_2add_feb2008.pdf. Acesso em: 30 Jun. 2015.
- ⁶⁶ SASTRY, C. S. P.; VIJAYA, D.; MANGALA, D. S. Spectrophotometric determination of carbaryl and propoxur using aminophenols and phenylenediamine. **Analyst**, Cambridge, v. 112, p. 75-78, 1987.
- ⁶⁷ HUERTAS-PEREZ, J. F.; GARCIA-CAMPANA, A.; GAMIZ-GRACIA, L.; GONZALEZ-CASADO, A.; OLMO IRUELA, M. Sensitive determination of carbaryl in vegetal food and natural waters by flow-injection analysis based on the luminol chemiluminescence reaction. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 524, p. 161-166, 2004.
- ⁶⁸ PACIONI, N. L.; VEGLIA, A. V. Determination of carbaryl and carbofuran in fruits and tap water by β-cyclodextrin enhanced fluorimetric method. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 488, p. 193-202, 2003.
- ⁶⁹ PETROPOULOU, S. S. E.; TSARBOPOULOS, A.; SISKOS, P. A. Determination of carbofuran, carbaryl and their main metabolites in plasma samples of agricultural populations using gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 385, p. 1444-1456, 2006.
- ⁷⁰ MORAES, F. C.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S.; BRETT, C. M. A. Direct electrochemical determination of carbaryl using a multi-walled carbon nanotube/cobalt phthalocyanine modified electrode. **Talanta**, Amsterdam, v. 79, p. 1406-1411, 2009.
- ⁷¹ DAGHBOUCHE, Y.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Solid-phase preconcentration-Fourier transform infrared spectrometric determination of carbaryl and 1-naphthol. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 314, p. 203-212, 1995.
- ⁷² ABAD, A.; MONTOYA, A. Application of a monoclonal antibody-based ELISA to the determination of carbaryl in apple and grape juices. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 311, p. 365-370, 1995.
- ⁷³ HAO, L.; LIU, X. -L.; WANG, J. -T.; WANG, C.; WU, Q. -H.; WANG, Z. Use of ZIF-8-derived nanoporous carbon as the adsorbent for the solid phase extraction of carbamate pesticides prior to high-performance liquid chromatographic analysis. **Talanta**, Amsterdam, v. 142, p. 104-109, 2015.
- ⁷⁴ ZHAO, L.-J.; ZHAO, F.-Q.; ZENG, B.-Z. Electrochemical determination of carbaryl by using a molecularly imprinted polymer/graphene-ionic liquid-nano Au/chitosan-AuPt alloy nanoparticles composite film modified electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, Belgrade, v. 9, p. 1366-1377, 2014.

- ⁷⁵ LLORENT-MARTINEZ, E. J.; ORTEGA-BARRALES, P.; FERNANDEZ-DECORDOVA, M. L.; RUIZ-MEDINA, A. Trends in flow-based analytical methods applied to pesticide detection: A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 684, p. 30-39, 2014.
- ⁷⁶ WASEEM, A.; YAQOOB, M.; NABI, A.; SIDDIQUI, M. A. Determination of carbaryl by flow injection with luminol chemiluminescence inhibition detection. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Abingdon, v. 87, p. 825-832, 2007.
- ⁷⁷ PIRES, C. K.; MORALES-RUBIO, A.; DE LA GUARDIA, M.; LIMA, J. L. F. C.; ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F. A chemiluminescence flow-based procedure for determination of carbaryl in natural waters exploiting multicommutation and enzymatic reaction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, p. 519-525, 2007.
- ⁷⁸ WASEEM, A.; YAQOOB, M.; NABI, A. Flow-injection determination of carbaryl and carbofuran based on KMnO₄-Na₂SO₃ chemiluminescence detection. **Luminescence**, Chichester, v. 22, p. 349–354, 2007.
- ⁷⁹ PÉREZ-RUIZ, T.; MARTÍNEZ-LOZANO, C.; TOMÁS, V.; MARTÍN, J. Flow injection chemiluminescence determination of carbaryl using photolytic decomposition and photogenerated tris (2,2'-bipyridyl)ruthenium(III). **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 476, p. 141-148, 2003.
- ⁸⁰ KHALAF, K. D.; MORALES-RUBIO, A.; DE LA GUARDIA, M. Simple and rapid flow-injection spectrophotometric determination of carbaryl after liquid-liquid extraction. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 280, p. 231-238, 1993.
- ⁸¹ MELCHERT, W. R.; ROCHA, F. R. P. A greener and highly sensitive flow-based procedure for carbaryl determination exploiting long pathlength spectrophotometry and photochemical waste degradation. **Talanta**, Amsterdam, v. 81, p. 327-333, 2010.
- ⁸² FAO/WHO. **Codex Alimentarius**: International Food Standards. Geneva, 1995. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/docs/CXS_192e.pdf>. Acesso em: 19 May 2015.
- ⁸³ NAKAYAMA, T. Studies on acetic acid-bacteria. 1. Biochemical studies on ethanol oxidation. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 46, p. 1217-1225, 1959.
- ⁸⁴ CUNNIFF, P. (Ed.). **AOAC official methods of analysis**. 16. ed. Arlington: AOAC, 1995.
- ⁸⁵ McMILLS, L.; NYASULU, F.; BARLAG, R. Comparing mass and volumetric titrations in the general chemistry laboratory. **Journal of Chemical Education**, Washington, DC, v. 89, p. 958-959, 2012.
- ⁸⁶ KOTANI, A.; MIYAGUCHI, Y.; HARADA, D.; KUSU, F. A disposable voltammetric cell for determining the titratable acidity in vinegar. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 19, p. 1473-1476, 2003.

- ⁸⁷ MARTINS, J. V.; SOUZA, A. P. R.; SALLES, M. O.; SERRANO, S. H. P. Determinação de ácido acético em amostra de vinagre adulterada com ácido clorídrico um experimento integrado de titulação potenciométrica e condutométrica. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, p. 755-758, 2010.
- ⁸⁸ MOROS, J.; INON, F. A.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Determination of vinegar acidity by attenuated total reflectance infrared measurements through the use of second-order absorbance-pH matrices and parallel factor analysis. **Talanta**, Amsterdam, v. 74, p. 632-641, 2008.
- ⁸⁹ HONORATO, R. S.; ARAUJO, M. C. U.; VERAS, G.; ZAGATTO, E. A. G.; LAPA, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C. A monosegmented flow titration for the spectrophotometric determination of total acidity in vinegar. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 15, p. 665-668, 1999.
- ⁹⁰ MARTELLI, P. B.; REIS, B. F.; KORN, M.; LIMA, J. L. F. C. Automatic potentiometric titration in monosegmented flow system exploiting binary search. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 387, p. 165-173, 1999.
- ⁹¹ KOZAK, J.; WOJTOWICZ, M.; GAWENDA, N.; KOSCIELNIAK, P. An automatic system for acidity determination based on sequential injection titration and the monosegmented flow approach. **Talanta**, Amsterdam, v. 84, p. 1379-1383, 2011.
- ⁹² LENGHOR, N.; JAKMUNEE, J.; VILEN, M.; SARA, R.; CHRISTIAN, G. D.; GRUDPAN, K. Sequential injection redox or acid-base titration for determination of ascorbic acid or acetic acid. **Talanta**, Amsterdam, v. 58, p. 1139-1144, 2002.
- ⁹³ WOJTOWICZ, M.; KOZAK, J.; KOSCIELNIAK, P. Novel approaches to analysis by flow injection gradient titration. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 600, p. 78-83, 2007.
- ⁹⁴ CARDWELL, T. J.; CATTRALL, R. W.; CROSS, G. J.; O'CONNELL, G. R.; PETTY, J. D.; SCOLLARY, G. R. Determination of titratable acidity of wines and total acidity of vinegars by discontinuous flow-analysis using photometric end-point detection. **Analyst**, Cambridge, v. 116, p. 1051-1054, 1991.
- ⁹⁵ MELCHERT, W. R. **Desenvolvimento de procedimentos analíticos limpos e com alta sensibilidade para a determinação de espécies de interesse ambiental**. 1999. 182 f. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- ⁹⁶ KAWAKUBO, S.; FUKASAWA, T.; IWATSUKI, M.; FUKASAWA, T. Flow injection determination of manganese using Malachite Green periodate catalytic reaction. **Journal of Flow Injection Analysis**, Toyota, v. 5, p. 14-22, 1988.
- ⁹⁷ GINE, M. F.; ZAGATTO, E. A. G.; BERGAMIN-FILHO, H. Semi-automatic determination of manganese in natural waters and plant digests by flow injection analysis. **Analyst**, Cambridge, v. 104, p. 371-375, 1979.
- ⁹⁸ ZAMORA, L. L.; MATEO, J. V. G.; CALATAYUD, J. M. Entrapment of reagents in polymeric materials. Indirect atomic absorption spectrometric determination of isoniazid by

- oxidation with manganese dioxide incorporated in polyester resin beads in a flow-injection system. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 265, p. 81-86, 1992.
- ⁹⁹ RUBIRA, A. F.; COSTA, A. C.; GALEMBECK, F.; ESCOBAR, N. F. L.; SILVA, E. C.; VARGAS, H. Polyethylene and polypropylene surface modification by impregnation with manganese(IV) oxide. **Colloids and Surfaces**, Amsterdam, v. 15, p. 63-73, 1985.
- ¹⁰⁰ THE BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION. **British Pharmacopoeia**. 5. ed. London: The Stationery Office, 2005. v. 3.
- ¹⁰¹ KARLBERG, B.; THELANDER, S. Extraction based on flow-injection principle. Part 1. Description of extraction system. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 98, p. 1-7, 1978.
- ¹⁰² MONTAGNER, C. C.; UMBUZEIRO, G. A.; PASQUINI, C.; JARDIM, W. F. Caffeine as an indicator of estrogenic activity in source water. **Environmental Science Processes & Impacts**, Cambridge, v. 16, p. 1866-1869, 2014.
- ¹⁰³ LIU, F.; HASHIM, N. A.; LIU, Y.–T.; ABED, M. R. M.; LI, K. Progress in the production and modification of PVDF membranes. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 375, p. 1-27, 2011.
- ¹⁰⁴ ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F.; BERGAMIN-FILHO, H. The concept of volumetric fraction in flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 226, p. 129-136, 1989.
- ¹⁰⁵ TYSON, J. F.; IDRIS, A. B. Determination of chromium in steel by flame atomic absorption spectrometry using a flow injection standard additions method. **Analyst**, Cambridge, v. 109, p. 23-26, 1984.
- ¹⁰⁶ FORTES, P. R.; FERES, M. A.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C. Sequential injections as an alternative to gradient exploitation for implementing differential kinetic analysis in a flow injection system. **Talanta**, Amsterdam, v. 81, p. 1409-1412, 2010.
- ¹⁰⁷ RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analysis. Part X. Theory, techniques and trends. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 99, p. 37-76, 1978.
- ¹⁰⁸ REIJN, J. M.; VAN DER LINDEN, W. E.; POPPE, H. Dispersion in open tubes and tubes packed with large glass beads. The single bead string reactor. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 123, p. 229-237, 1981.
- ¹⁰⁹ ZAGATTO, E. A. G.; ARRUDA, M. A. Z.; JACINTHO, A. O.; MATTOS, I. L. Compensation of the Schlieren effect in flow-injection analysis by using dual-wavelength spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 234, p. 153-160, 1990.
- ¹¹⁰ MICHEL, M. M.; KIEDRYNSKA, L. Modelling equilibrium data for manganese(II) sorption onto manganese dioxide modified chalcedonite using the non-linear regression method. **Annals of Warsaw University of Life Sciences**, Warsaw, v. 43, p. 155-163, 2011.

- ¹¹¹ SASAKI M. K.; FERES, M. A.; ZAGATTO, E. A. G. Flow systems with MnO₂-coated open tubular reactors for spectrophotometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical products. **Analytical Letters**, Philadelphia, 2015. doi:10.1080/00032719.2014.979353.
- ¹¹² MSAGATI, T. A. M.; MAMBA, B. B. Monitoring of N-methyl carbamate pesticide residues in water using hollow fibre supported liquid membrane and solid phase extraction. **Physics and Chemistry of the Earth**, Oxford, v. 50-52, p. 149-156, 2012.
- ¹¹³ ENSAFI, A. A.; KAZEMZADEH, A. Flow injection spectrophotometric determination of ultra trace amounts of oxalic acid. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 367, p. 590-592, 2000.
- ¹¹⁴ CAPITAN-VALLVEY, L. F.; IGLESIAS, N. N.; PAYA, I. O.; CASTANEDA, R. A. Simultaneous determination of quinoline yellow and brilliant blue FCF in cosmetics by solid-phase spectrophotometry, **Talanta**, Amsterdam, v. 43, p. 1457-1463, 1996.
- ¹¹⁵ RUZICKA, J.; HANSEN, E. H.; ZAGATTO, E. A. G. Flow injection analysis. Part VII. Use of ion selective electrodes for rapid analysis of soil extracts and blood serum. Determination of potassium, sodium and nitrate. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 88, p. 1-16, 1977.
- ¹¹⁶ 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.
- ¹¹⁷ BETTERIDGE, D. Flow injection analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 50, p. 832A-846A, 1978.
- ¹¹⁸ SASAKI, M. K.; ROCHA, D. L.; ROCHA, F. R. P.; ZAGATTO, E. A. G. Tracermonitored flow titrations. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 902, p. 123-128, 2016.