

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA



1150045898



IQ
T/UNICAMP F391d

**“DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTI-
COMPONENTE DE INJEÇÃO EM BATELADA COM
DETECÇÃO POTENCIOMÉTRICA, APLICADO À ANÁLISE
DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE BIOLÓGICO”**

Tese de Doutorado apresentada à Comissão de
Pós-graduação do Instituto de Química, como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Aluno: Julio Cesar Bastos Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Co-Orientador: Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto

CAMPINAS-SP

DEZEMBRO/2000



Prólogo



elaboração de um texto, seja um livro ou uma tese, exige sempre uma exata delimitação do seu conteúdo, a escolha correta a ser abordada pelo tema e a descrição da sua importância.

Com este objetivo, optou-se em alguns tópicos desta dissertação por uma descrição didática e detalhada, de modo que ela possa ser útil como consulta sobre o tema abordado. Em relação as referências, foi utilizada uma adaptação da norma ABNT, 1989 (NBR 6023) na sua descrição. Este tópico é um guia para futuras pesquisas, e em geral, sua importância é omitida, o que dificulta a consulta exata do tema desejado.

Objetivos

Técnicas para a automatização de análises são de grande importância devido à sua capacidade de realizar ensaios rapidamente e assim, diminuir o custo por análise. Análise por Injeção em Batelada, do inglês Batch Injection Analysis (BIA), é uma destas técnicas, que quando associada a sensores eletroquímicos, apresenta algumas vantagens em relação à outras técnicas dinâmicas de análise, tais como: sensibilidade, reprodutibilidade e alta velocidade de análise, sem a necessidade de bombas, válvulas e tubos associados. Devido a esta simplicidade, esta técnica é ideal para ser associada, quando possível, a sistemas de análise multi-componentes.

Espécies iônicas como cloreto e potássio, ou substâncias como ácido ascórbico, úrico e uréia, dentre outras, são de grande interesse no campo farmacêutico, alimentício e principalmente clínico. A importância da determinação de biomoléculas é demonstrada pela grande demanda de análises nos hospitais ou laboratórios de análises clínicas. No HC-UNICAMP, por exemplo, biomoléculas como o ácido úrico e a uréia, as quais servem como prognóstico e diagnóstico de processos renais e depuração plasmática, apresentam uma demanda da ordem de 50 a 500 amostras/dia, respectivamente. Já o ácido ascórbico, geralmente não é determinado, contudo ele pode provocar grande interferência em vários ensaios clínicos. Além disto, ele é uma das drogas mais consumidas no mundo, devido a sua ligação no combate à diversas enfermidades: a gripe, pois estimula o sistema imunológico; o câncer, pois combate os radicais livres; e mais tradicionalmente, o escorbuto. De modo geral, a nível fisiológico, a concentração de ácido ascórbico, úrico e uréia é elevada. O ácido ascórbico se encontra na faixa de 34-110 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no sangue, enquanto que a concentração de ácido úrico e uréia em soro sanguíneo, se encontra na faixa de 270-480 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1100-14000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente^[1]. Estas faixas de referência indicam que o uso de sensores eletroquímicos do tipo, eletrodos íon-seletivo (potenciométrico) são suficientes para serem utilizados na determinação destas substâncias.

Assim, este projeto de pesquisa visa possibilitar a determinação de forma rápida, simples e eficiente, de ácido ascórbico, ácido úrico e uréia em amostras de interesse biológico, usando a metodologia potenciométrica. Para isto, elaborou-se um sistema de análise multi-componente e de aquisição de dados, o qual pode ser associado à sistemas dinâmicos de análise, como o BIA. Além disto, procurou-se estudar os aspectos teóricos envolvidos na construção e utilização do sistema BIA, para associá-lo com os eletrodos íon-seletivo desenvolvidos.

Nos capítulos a seguir, procurar-se-á abordar em mais detalhes a importância, as dificuldades, os sucessos e insucessos obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

[1] TIETZ, N. W.; Textbook of Clinical Chemistry, W. B. Saunders Company: USA-Philadelphia, 1986.

Estrutura e Organização

A organização geral desta tese obedece à seguinte distribuição:

- Um primeiro conjunto que descreve resumidamente os resultados obtidos no trabalho.
- Quatro capítulos que descrevem detalhadamente uma visão histórica do tema abordado e os resultados da pesquisa com algumas conclusões obtidas.
- Um quinto capítulo com toda a parte experimental realizada;
- Um sexto capítulo que apresenta de forma abrangente os aspectos gerais da pesquisa realizada, os recentes avanços na área e as perspectivas futuras sobre o tema.

Agradecimentos

Quando a proposta é desenvolver uma pesquisa, somos direta e indiretamente dependentes da contribuição de instituições e de outras pessoas. Por isto, o autor agradece: ao orientador, Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota e ao co-orientador, Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto, pela oportunidade concedida, por ter acreditado na viabilidade desta pesquisa e pela orientação no desenvolvimento dos sensores e biossensores potenciométricos; ao Prof. Dr. Jarbas J. R. Rohwedder, pelo os ensinamentos e orientação na elaboração do sistema multi-componente de análise e aquisição de dados e de seu software de controle; ao Prof. Dr. Edvaldo Sabadini pelo empréstimo do tacômetro, a Profa. Dra. Nelci Roher pelas amostras de soro fornecidas do HC-UNICAMP e a Profa. Dra. Maria Izabel Bueno por ter gentilmente cedido um espaço físico em seu laboratório por ocasião da reforma do laboratório do Prof. Lauro.

O autor é grato à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido, sem o qual este trabalho não poderia ser concluído. Ao Instituto de Química-UNICAMP e seus funcionários pela manutenção da infra-estrutura de laboratórios e biblioteca. O autor agradece em especial ao Mário, pela confecção do sistema BIA; ao André e a Bel da CPG pelas informações das normas e oportunidades da pós-graduação; ao Everaldo e a Eliane pela confecção de vários desenhos e painéis oriundos dos trabalhos desta tese; a D. Paula e D. Iara pelos serviços prestados de cópias reprográficas.

O autor também é grato ao Laércio e a Luciane pelas sugestões e auxílio no desenvolvimento de vários trabalhos durante este projeto de pesquisa e aos colegas de laboratório. Aos amigos e amigas com os quais conviveu nestes anos de pesquisa: Aninha, Antônio Jr., Carlos, Helenice, Christian, Cláudio, Julia, Daniel, Décio, Diogo, Édson, Eduardo, Érico, Raquel, Fábio, Joana, Márcio André, Kátia, Mário, Marcelo, Paula e Valeska pelo apoio e amizade. Aos pais, Elder e Julia, e ao irmão Carlos, pela ajuda, esforço, paciência e dedicação neste período, mesmo separados pela distância.

Finalmente, pede desculpas aos amigos e amigas que não constam desta relação, não pelo descaso, mas sim única e exclusivamente pela falta de lembrança no momento, mas que estarão sempre guardados na memória.

"Quando em uma organização científica, as pessoas parecem estar mais motivadas em ocultar fatos e não resolver os mistérios, é porque se o fizerem, a razão de suas existências desaparece, pois estas pessoas estão mais interessadas no poder, que na ciência ..."
"Quando alguém pensa que pode perder seu posto de trabalho, não está nas melhores condições para agir com objetividade ..."

Jenny Randles

Resumo

“DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTI-COMPONENTE DE INJEÇÃO EM BATELADA COM DETECÇÃO POTENCIOMÉTRICA, APLICADO À ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE BIOLÓGICO”

Autor: *Julio Cesar Bastos Fernandes*

Orientador: *Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota*

Co-orientador: *Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto*

Neste trabalho de pesquisa foram desenvolvidos uma série de sensores potenciométricos para ácido ascórbico, ácido úrico e uréia. Várias estratégias foram utilizadas na elaboração destes sensores. Os ISE desenvolvidos apresentaram uma excelente seletividade. Em condições de estado estacionário, a faixa linear de resposta (FLR) e o limite de detecção (LD) para estes ISE foram: ácido ascórbico, FLR = $5,6 \times 10^{-6}$ - $3,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e LD = $3,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (pH 5); ácido úrico, FLR = $6,0 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e LD = $5,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (pH 12); uréia, FLR = $1,0 \times 10^{-3}$ - $1,0 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ e LD = $6,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (pH 7). O tempo de resposta nas condições de equilíbrio foi em torno de 2 min para os ISE sensíveis ao íon ascorbato e urato, e 10 s para o biossensor de uréia.

Ao mesmo tempo, foi elaborado um sistema multi-componente de análise e aquisição de dados. Este sistema permite medidas em estado estacionário e associado a técnicas dinâmicas de análise. Além disto, ele permite a determinação em tempo real, de até quatro compostos diferentes, usando sensores potenciométricos. Ele foi testado na determinação simultânea de potássio e cloreto em amostras de alimentos, com bons resultados.

Concomitantemente, foi desenvolvido um sistema de injeção em batelada (BIA) baseado nos cálculos de engenharia para os reatores de processos e tanques de agitação. Com este sistema foi possível compreender os aspectos envolvidos na formação do sinal no BIA com detecção potenciométrica.

Finalmente, os sensores potenciométricos, o sistema multi-componente de análise com aquisição de dados, e o BIA, foram testados, em separado ou associados, em determinações de substâncias de interesse biológico na área farmacêutica e clínica. Em condições de estado estacionário, os resultados obtidos com os sensores potenciométricos desenvolvidos foram razoáveis. Em BIA, foi observado uma melhora significativa na determinação de ácido ascórbico usando o ISE-Ascorbato proposto, principalmente considerando a precisão e a frequência analítica, quando as medidas foram comparadas com aquelas obtidas em estado estacionário.

Abstract

“DEVELOPMENT OF A MULTI-COMPONENT SYSTEM OF BATCH INJECTION WITH POTENTIOMETRIC DETECTION, APPLIED IN THE ANALYSIS OF BIOLOGICAL INTEREST SUBSTANCES”

Author: Julio Cesar Bastos Fernandes

Adviser: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Co-adviser: Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto

In this research work, a series of potentiometric sensors were developed for ascorbic acid, uric acid and urea. Some strategies were utilized in the design of these sensors. The developed ISE presented an excellent selectivity. Under steady-state conditions, the linear response range (RR) and detection limit (DL) for these ISE were: ascorbic acid, $RR = 5.6 \times 10^{-6} - 3.7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ and $DL = 3.8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5); uric acid, $RR = 6.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ and $DL = 5.2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12); uréia, $RR = 1.0 \times 10^{-3} - 1.0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ and $DL = 6.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7). The response time in steady-state situation was about 2 min for the ISE sensitive to ascorbate and urate ion, and 10 s for urea biosensor.

Also, a multi-component system of analysis and data acquisition was elaborated. This system allows measurements in steady-state and associated with dynamic techniques of analysis. Moreover, it allows the determination in real time, up to four different compounds, using pontentiometric sensors. It was tested in simultaneous determination of potassium and chloride in food samples, with good results.

Concomitantly, a batch injection system based on engineer calculations for reactors of process and agitation tanks was developed. With this system, it was possible to understand the aspects involved in the signal formation in BIA with potentiometric detection.

Finally, the potentiometric sensors, the multi-elementary system of analysis with data acquisition and BIA, were tested, separately or associated, in the determination of substances with biological interest in the pharmaceutical and clinical areas. In the steady-state condition, the results obtained with the developed potentiometric sensors were reasonable. In BIA, a significant improvement in the ascorbic acid determination was obtained using the developed ISE-Ascorbate, mainly considering the precision and analytical frequency, when the measurements were compared with those obtained in steady-state.

Súmula Curricular

1. FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 1.1. Graduação: • Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Curso: Bacharelado em Química Tecnológica, 1990-1993
Curso: Licenciatura em Química, 2000-em conclusão
- 1.2. Pós-Graduação: • Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Curso: Doutorado em Química Analítica, 1996-2000
Curso: Mestrado em Química Analítica, 1994-1996
- 1.3. Ensino Técnico: • Escola Técnica Federal de Química do Rio de Janeiro - ETFQ-RJ
Curso: Técnico em Química Industrial, 1986-1988
- 1.4. Ensino Médio: • Colégio Federal Pedro II - Rio de Janeiro, 1983-1985

2. FORMAÇÃO PROFISSIONAL

- 2.1. Publicações: • "Eletrodos Íon-seletivo: Histórico, Mecanismo de Resposta, Seletividade e Revisão dos Conceitos", *Quim. Nova*, in press, 2001.
- "Simultaneous Determination of Chloride and Potassium in Carbohydrate Electrolyte Berages Using Array of Ion-Selective Electrodes Controlled by Microcomputer", *J. Braz. Chem Soc.* 11/4, 349-354, 2000.
- "Application of Two and Three-Way Chemometric Methods in the Study of Acetylsalicylic Acid and Ascorbic Acid Mixtures using Ultraviolet Spectrophotometry", *Anal. Chim. Acta* 409, 159-170, 2000.
- "Potentiometric Determination of L-ascorbic acid in Pharmaceutical Samples by FIA using a Modified Tubular Electrode", *J. Braz. Chem Soc.* 11/2, 182-186, 2000.
- "Development of a New FIA-potentiometric Sensor for Dopamine based on EVA-Copper(II) Ions", *J. Electroanal. Chem.* 481/1, 34-41, 2000.
- "Determination of Acetylsalicylic Acid by FIA-potentiometric System in Drugs after On-line Hydrolysis", *Talanta* 50, 661-667, 1999.
- "Potentiometric Sensor for L-ascorbic Acid based on EVA Membrane doped with Copper (II)", *Electroanalysis* 11, 475-480, 1999.
- "Potentiometric Biosensor for L-ascorbic acid based on Ascorbate Oxidase of Natural Source immobilized on Ethylene-vinyl-acetate Membrane", *Anal. Chim. Acta* 385, 3-12, 1999.
- "Determination of Acetylsalicylic Acid in Tablets with Salicylate Ion-selective Electrode in a Batch Injection Analysis System" *J. Braz. Chem Soc.* 9, 249-251, 1998.
- "Study of NADH Stability Using Ultraviolet-Visible Spectrophotometric Analysis and Factorial Design". *Anal. Biochem.* 260, 50-55, 1998.
- "Use of Column with Modified Silica for Interfering Retention in FIA Spectrophotometric Method for Direct Determination of L-Ascorbic Acid in Medicine", *Anal. Chim. Acta* 366, 11-22, 1998.
- "Paraformaldehyde as an End-point Indicator in Hydrolitic Thermometric Titration of Metal Ions and Iodine", *Analyst* 121, 559-561, 1996.
- "Formalin and Paraformaldehyde as End-point Indicators in Catalytic Thermometric Titrimetry", *Analyst* 118, 1453-1456, 1993.
- 2.2. Patentes: • "Sensor Potenciométrico para Determinação de Dopamina e Derivados Empregando Sistema de Análise por Injeção em Fluxo", PI 0001121, 31/03/2000.

2.3. Congressos:

- 52ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Brasília-DF
“Nova metodologia para a estimativa de coeficientes de seletividade potenciométricos usando o método de superfície de resposta”, 09-14/07/2000.
- 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas-MG
“BIA-potenciométrico para determinação de vitamina C”, 24-27/05/2000.
- VIII Encontro regional de Química SBQ-Rio, Rio de Janeiro-RJ
“Um simples sensor potenciométrico baseado em matriz de poli-etileno co-vinil acetato dopada com Fe^{3+} ”, 16-18/11/1999.
- X Encontro Nacional de Química Analítica, Santa Maria - RS
“Aplicação de Métodos Quimiométricos Multidimensionais no Estudo de Misturas de AAS e Vitamina C por Espectrofotometria no UV/Visível”.
“Aspectos Teóricos em Análise por Injeção em Batelada (BIA): Uma Abordagem Prática”.
“Determinação Simultânea de Cloreto e Potássio em Bebidas Energéticas usando um conjunto de Eletrodos Íon-seletivo controlado por Computador”, 31/08/-03/09/1999.
- XI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Maragogi - AL
“Determinação Potenciométrica de Dopamina em Fármacos empregando Sistema de Análise por Injeção em Fluxo”, 05-09/04/1999.
- 2nd Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto - SP
“Determination of L-ascorbic acid in pharmaceutical samples by FIA-potentiometric system based on Copper (II)/EVA electrode”, 27-31/03/1999.
- XXXVIII Congresso Brasileiro de Química, São Luís - MA
“Determinação dos Ácidos o-acetilsalicílico (AAS) e L-ascórbico (vitamina C) utilizando Espectrofotometria no Ultravioleta através de Calibração Multivariada”.
“Desenvolvimento de um Sensor Potenciométrico Seletivo para o Ácido L-ascórbico baseado nas Propriedades Redox de Íons Cúpricos Oclusos em EVA”, 21-24/09/1998.
- 7th European Conference on Electroanalysis, Coimbra - Portugal
“Potentiometric Biosensor for L-ascorbic Acid based on Ascorbate Oxidase of Natural Source immobilized on Ethylene-vinyl-acetate Membrane”, 24-28/05/1998.
- XXXVII Congresso Brasileiro de Química, Natal - RN
“Comparação entre dois Sistemas Dinâmicos: BIA e FIA na Análise de AAS em Fármacos”, 28/09/-03/10/1997.
- IX Encontro Nacional de Química Analítica, São Carlos - SP
“Um sensor potenciométrico simples para detecção de H^+ em fluxo baseado em ftalocianina de cobalto e resina uréia-formol”.
“Estudo da Estabilidade de NADPH e NADH em diferentes tampões utilizando espectrofotometria no UV-Visível e planejamento fatorial”, 31/08/-03/09/1997.
- VII International Conference on Flow Analysis, Piracicaba-SP
“Use of Column with modified Silica for Interfering Retention in a FIA Spectrophotometric Method for Direct Determination of Vitamin C in Medicine”, 25-28/08/1997.
- 20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas-MG
“Planejamento fatorial para o estudo de estabilidade das soluções aquosas de ácido L-ascórbico”, 24-27/05/1997.


Julio Cesar Bastos Fernandes

Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AMP	monofosfato de adenosina, do inglês <i>adenosine monophosphate</i>
ATP	trifosfato de adenosina, do inglês <i>adenosine triphosphate</i>
Aliquat-urato	urato de tricaprilil-trimetil-amônio
BIA	análise por injeção em batelada, do inglês <i>batch injection analysis</i>
CA	coeficiente angular
CBIA	análise por injeção em batelada em capilar, do inglês <i>capillary batch injection analysis</i>
CFI	injeção em fluxo contínuo, do inglês <i>continuous-flow injection</i>
DNA	ácido desoxiribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DL	detection limit
EDTA	ácido etileno diamino tetracético, do inglês <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
EDPR	estimativa do desvio padrão relativo da reta
EVA	poli-(etileno-co-acetato de vinila), do inglês <i>poly-(ethylene-co-vinyl acetate)</i>
FIA	análise por injeção em fluxo, do inglês <i>flow injection analysis</i>
FLR	faixa linear de resposta
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>
ISE	eletrodo(s) ion-seletivo, do inglês <i>ion-selective electrode(s)</i>
min	minuto
LD	limite de detecção
MM	massa molar
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
PA	para análise
P-E	potencial equivalente
PIPES	ácido piperazina-1,4-bis(2-etanosulfônico), do inglês <i>piperazine 1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>
PVC	cloreto de polivinila, do inglês <i>poly(vinyl chloride)</i>
RNA	ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
r	coeficiente de correlação
RR	linear response range
SFI	injeção em fluxo intermitente, do inglês <i>stopped-flow injection</i>
SIA	análise por injeção sequencial, do inglês <i>sequential injection analysis</i>
UV	ultravioleta
VIS	visível

*As siglas de tradição internacional foram mantidas em inglês.

Lista de Figuras

Capítulo 1: Substâncias de Interesse Biológico 1-18

- Fig. 1.1** Ciclo metabólico do ácido ascórbico.
- Fig. 1.2** Frações teóricas (α) de ácido ascórbico presentes em solução aquosa como função do pH.
- Fig. 1.3** Anel: A. Pirimidínico e B. Purínico.
- Fig. 1.4** Catabolismo de diferentes nucleotídeos purínicos.
- Fig. 1.5** Frações teóricas (α) de ácido úrico presentes em solução aquosa como função do pH.
- Fig. 1.6** Esquema das reações presentes no ciclo da uréia. 1. Transferência do grupo carbamóil do fosfato de carbamila para ornitina, através da ornitina transcarbamilase produzindo citrulina; 2a. O grupo uréico da citrulina é ativado pela reação com ATP dando o intermediário citrulina-AMP; 2b. O AMP é deslocado pelo aspartato, o qual é ligado ao carbono da citrulina via o grupo α -amino. As duas etapas da reação 2 é catalisada pela enzima arginina succinato sintetase, dando como produto final o succinato de arginina; 3. Arginina e fumarato são produzidos pela ação da enzima arginina succinase no succinato de arginina; 4. A hidrólise da arginina pela arginase produz ornitina e uréia, completando o ciclo. Adaptado da referência [1].

Capítulo 2: A Potenciometria e os ISE Desenvolvidos 19-92

- Fig. 2.1** Cronologia do desenvolvimento da potenciometria e dos eletrodos ion-seletivo.
- Fig. 2.2** A. Modelo de Bockis *et al.* para representar a dupla camada, com a distribuição dos íons e moléculas do solvente (o símbolo $\odot$ representa a molécula de água); B. Variação do potencial eletrostático em função da distância ao eletrodo. Adaptado da referência [32].
- Fig. 2.3** Circuito de um típico analisador de íons. I_{un} é a corrente enviada pelo amplificador operacional. Quando $R_p \gg R_i$, $I_{un} = 10^{-12}$ A, e pela Lei de Ohm o $V_{out} = 10^{-12}$ A $\times 10^3 \Omega = 10^{-9}$ V = 0,1 mV.
- Fig. 2.4** A. Interface eletrificada eletrodo-solução. B. Circuito eletrônico equivalente. Quando $R \rightarrow \infty$ a interface é polarizável e para $R \rightarrow 0$, a interface é não-polarizável. Adaptado da referência [35].
- Fig. 2.5** A. Esquema de um capacitor de placas paralelas comumente usado em aparelhos eletrônicos, que é capaz de armazenar cargas quando um potencial é aplicado com uma bateria ou fonte de energia; B. Modelo de um eletrodo de membrana; C. Representação de um eletrodo de vidro ou outro qualquer de membrana, o qual apresenta uma estrutura superficial zwitteriônica. Adaptado da referência [25].
- Fig. 2.6** Método gráfico para obtenção do limite nernstiano (LN) e do limite de detecção (LD) nos ISE.
- Fig. 2.7** Método gráfico para a determinação do K^{pot} .
- Fig. 2.8** Diagrama esquemático de um biossensor.
- Fig. 2.9** Gráfico da atividade enzimática como função do tempo de extração de ascorbato oxidase da casca de pepino. Relação entre a quantidade de casca de pepino e o volume de tampão (fosfato 0,1 mol L⁻¹ - pH 5,6) utilizado na extração: 1:1.
- Fig. 2.10** Efeito da relação entre a quantidade de casca de pepino e o volume de solução tampão (fosfato 0,1 mol L⁻¹ - pH 5,6) utilizados na extração da enzima ascorbato oxidase. Tempo de extração: 60 min.
- Fig. 2.11** Estabilidade do extrato bruto de ascorbato oxidase como função do tempo de armazenagem. Condição de estocagem: congelado em freezer a -15°C.
- Fig. 2.12** Curvas de cinética enzimática para o extrato bruto de ascorbato oxidase de pepino, obtidas por espectrofotometria na região do UV ($\lambda=265$ nm). Volume de extrato enzimático diluído: 5 μ L (a. até g.), h. 0. Concentração inicial de solução de ácido ascórbico em mmol L⁻¹: a. 0,020; b. 0,033; c. 0,066; d. 0,133; e. 0,166; f., g. e h. 0,200. A curva g. foi obtida depois do extrato enzimático ser aquecido à 90 °C por 15 min e a h. em solução tampão fosfato.
- Fig. 2.13** Curva de calibração (espectrofotometria no UV - $\lambda=265$ nm) para ácido ascórbico em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,6. Volume final: 3,00 mL. Temperatura: 25 °C.

- Fig. 2.14** Gráfico de Michaelis-Menten para o substrato ácido ascórbico referente a cinética enzimática do extrato bruto de casca de pepino.
- Fig. 2.15** Gráfico de Lineweaver-Burk para a cinética enzimática de ácido ascórbico com o extrato bruto de casca de pepino.
- Fig. 2.16** Diagrama de Reilley mostrando a faixa operacional de pH para o biossensor. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Força iônica: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de ácido ascórbico, mol L^{-1} : A. 1×10^{-4} e B. 1×10^{-5} .
- Fig. 2.17** Efeito da temperatura no tempo de resposta do biossensor para ascorbato baseado no extrato bruto de casca de pepino contendo ascorbato oxidase. pH 5,0. Força iônica: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.
- Fig. 2.18** Faixa de linearidade e limite de detecção para o biossensor construído à base de ascorbato oxidase extraída da casca de pepino e imobilizada por oclusão em EVA. Força iônica: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. pH: 5,0.
- Fig. 2.19** Esquema do mecanismo proposto para a resposta do sensor baseado em membrana de EVA/ Cu^{2+} sensível ao ion ascorbato.
- Fig. 2.20** Efeito da concentração de ions Cu^{2+} na membrana de EVA, no tempo de resposta do eletrodo sensível para o ion ascorbato. A. 5%; B. 10%; C. 15%. pH 5,0. Força iônica: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.
- Fig. 2.21** Diagrama de Reilley mostrando a faixa operacional de pH do sensor baseado em EVA/ Cu^{2+} para ácido ascórbico. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Força iônica: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de ácido ascórbico, mol L^{-1} : A. 1×10^{-4} ; B. 1×10^{-5} .
- Fig. 2.22** Dependência do potencial do eletrodo como função da concentração de ácido ascórbico. Força iônica: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH: 5,0. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Eletrodo baseado em membrana de EVA: A. com e B. sem ions Cu^{2+} (5%) na membrana.
- Fig. 2.23** Efeito do pH na resposta do sensor EVA/ Cu^{2+} para dopamina. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Força iônica: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de dopamina, mol L^{-1} : A. 1×10^{-4} ; B. 1×10^{-5} .
- Fig. 2.24** Esquema do mecanismo de resposta do sensor para urato baseado em membrana de EVA/ Fe^{3+} .
- Fig. 2.25** Diagrama de Reilley para o sensor EVA/ Fe^{3+} . Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Força iônica: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de ácido úrico, mol L^{-1} : A. 1×10^{-4} ; B. 1×10^{-5} .
- Fig. 2.26** Efeito da força iônica na resposta do sensor EVA/ Fe^{3+} para ácido úrico. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Concentração de fosfato, mol L^{-1} : A. 0,10; B. 0,25; C. 0,50; D. 0,75; E. 1,00.
- Fig. 2.27** Medida do tempo de resposta do sensor EVA/ Fe^{3+} para o ion urato. Concentração de ions Fe^{3+} na membrana: 5%; pH 12,0; Força iônica: $0,25 \text{ mol L}^{-1}$; Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.
- Fig. 2.28** Efeito de algumas biomoléculas na resposta do sensor EVA/ Fe^{3+} . Força iônica: $0,25 \text{ mol L}^{-1}$; pH 12,0; Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Concentração de ácido úrico: $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Quantidade de interferente adicionado: $100 \mu\text{L}$ de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A. Ácido ascórbico; B. Catecol; C. Hidroquinona; D. Dopamina; E. L-dopa; F. Cisteína.
- Fig. 2.29** Esquema do mecanismo de ação catalítica da urease na hidrólise da uréia. $\text{R} = \text{NH}_2$. Adaptado da referência [129].
- Fig. 2.30** Curvas analíticas para uréia mostrando o efeito tamponante do meio na resposta do biossensor. pH 6,0. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Concentração do tampão TRIS- SO_4 , mol L^{-1} : A. 1×10^{-1} ; B. 1×10^{-2} ; C. 1×10^{-3} ; D. 1×10^{-4} ; E. 1×10^{-5} .
- Fig. 2.31** Resposta para pH do eletrodo de Pt utilizado como transdutor para o biossensor de uréia. Na presença (A) e na ausência (B) de NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.
- Fig. 2.32** Diagrama de Reilley para o biossensor EVA/urease/Pt. Concentração do tampão TRIS- SO_4 : $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Concentração de uréia, mol L^{-1} : A. 2×10^{-2} ; B. 2×10^{-3} .
- Fig. 2.33** Efeito da força iônica na resposta do biossensor EVA/Urease/Pt para uréia. pH: 5,5. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Tampão: TRIS- SO_4 , $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de sal, mol L^{-1} : A. KCl 1×10^{-1} ; B. KCl 1×10^{-2} ; C. Nula; D. KCl 5×10^{-2} ; E. LiNO_3 , 1×10^{-2} .
- Fig. 2.34** Efeito da temperatura no tempo de resposta do biossensor EVA/Urease/Pt para uréia. Tampão: TRIS- SO_4 , $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. pH 5,5.
- Fig. 2.35** Curva analítica típica para uréia com o biossensor EVA/Urease/Pt. Tampão: TRIS- SO_4 , $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,5; Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.
- Fig. 2.36** Esquema de imobilização de uma enzima por ligação covalente usando carbodimida e PVC-COOH.

- Fig. 2.37** Efeito do pH na resposta do ISE-NH₄⁺. Temperatura: (25,0±0,1) °C. Tampão: TRIS-SO₄, 0,1 mol L⁻¹. Concentração de íons NH₄⁺, mol L⁻¹: A. 1×10⁻³; B. 1×10⁻².
- Fig. 2.38** Diagrama de Reilley mostrando a faixa operacional de pH do biossensor para uréia baseado em urease imobilizada por ligação covalente em PVC-COOH Temperatura: (25,0±0,1) °C. Tampão: TRIS-SO₄, 0,1 mol L⁻¹. Concentração de uréia, mol L⁻¹: A. 1×10⁻²; B. 1×10⁻¹.
- Fig. 2.39** Medida do tempo de resposta para o biossensor baseado em urease imobilizada em PVC-COOH. pH: 7,0. Tampão: TRIS-SO₄, 0,1 mol L⁻¹. Temperatura (±0,1°C): A. 25,0; B. 30,0; C. 35,0; D. 40,0.
- Fig. 2.40** Curva analítica típica para uréia com o biossensor baseado em urease imobilizada em PVC-COOH. pH 7,0; Tampão: TRIS-SO₄, 0,1 mol L⁻¹; Temperatura: (25,0±0,1) °C.

Capítulo 3: Técnicas Dinâmicas de Análise 93-133

- Fig. 3.1** Diagrama esquemático de um simples sistema FIA monocal. (B) é uma bomba peristáltica para a propulsão do reagente da linha carregadora (C). (A) é um injetor, onde um volume definido de solução amostra é inserido em (C). A amostra é conduzida até a cela de detecção (D), passando por uma bobina de reação (BR), para que a mesma reaja com o componente de (C) formando uma espécie sensível ao detector. A passagem da amostra por (D) produz um pico típico, o qual é mostrado abaixo do sistema FIA. (IA) é o ponto de partida da injeção da amostra; (T) é o tempo de residência da amostra até a sua detecção; (S) e (H) são respectivamente a área e a altura do pico, a qual relaciona a concentração do analito com a medida instrumental; e (t_L) é o tempo de lavagem da cela de detecção ou de retorno do sinal à linha base. Após a detecção, a amostra é conduzida até um recipiente de acúmulo de resíduo (L). Adaptado da referência [20].
- Fig. 3.2** Esquema de um sistema SIA com o seu perfil de resposta. Os símbolos representam: (SL) solução de lavagem; (A) solução do analito; (Rg) solução reagente; (SP) solução do padrão; (R) região de reação; (D) cela de detecção; (RR) reservatório de retenção; (IA) momento de injeção da amostra. A válvula de seleção (V) providencia a injeção sequencial das soluções para dentro do canal, através de etapas pré-programáveis e sincronizadas com o movimento do pistão. Adaptado da referência [2].
- Fig. 3.3** Diagrama esquemático de um sistema BIA típico. (A) detector; (B) ponteira de uma micropipeta; (C) orifício; (D) dreno e (E) barra de agitação. Adaptado da referência [3].
- Fig. 3.4** Possíveis modos de operação nas micropipetas eletrônicas motorizadas: (A) Normal; (B) Titular; (C) Diluir; (D) Misturar; (E) Injeção sequencial de volumes. Retirado da referência [85].
- Fig. 3.5** Tipos de escoamentos em agitadores: A. Axial para o tipo hélice; B. Radial para o tipo turbina. Retirado da referência [91].
- Fig. 3.6** Tipos de agitadores: A. Turbina de lâminas planas; B. Turbina de lâminas planas inclinadas; C. Turbina de lâminas curvas; D. Turbina, com disco de lâminas planas; E. Turbina, com disco de lâminas curvas; F. Turbina, ventoinha; G. Hélice; H. Palheta, plana; I. Agitador de âncora. Retirado da referência [91].
- Fig. 3.7** Tipos de fluxo obtidos em um tanque: A. Agitado (formação de vórtice); B. Agitado com chincanas para eliminação de vórtice; C. Agitado com um impulsor em posição inclinada; D. Agitado com um impulsor em posição não centrada. Retirado da referência [91].
- Fig. 3.8** Dimensões características de um tanque com agitador tipo turbina. B é a largura de cada chincana; C é a distância do fundo do tanque à linha central do agitador; T é o diâmetro interno do tanque; D é o diâmetro do impulsor; Z é a profundidade do fluido no tanque; W e L é a largura e o comprimento das lâminas do agitador tipo turbina, respectivamente. Retirado da referência [89].
- Fig. 3.9** Desenho esquemático do sistema BIA.
- Fig. 3.10** Fotografia do reator BIA associado com o sistema de aquisição de dados e análise multi-componente.
- Fig. 3.11** Diagrama esquemático do impacto do jato de um fluido sobre uma superfície inclinada. Adaptado da referência [91].
- Fig. 3.12** A. Desenvolvimento da camada-limite; B. Tipos de regimes de fluxo de um fluido em movimento. Adaptado da referência [95].
- Fig. 3.13** Transferência de massa em um eletrodo wall-jet. A. Região de fluxo estabelecida; B. Região de estagnação; C. Região wall-jet. Retirado da referência [96].

- Fig. 3.14** Efeito do diâmetro do bocal da ponteira de injeção na resposta do sistema BIA-Potenciométrico. Velocidade de agitação: 400 rpm. Distância da ponteira da micropipeta ao detector: 2 mm; Volume de Injeção: 20 μL . pH: A. 4,00; B. 10,01.
- Fig. 3.15** Efeito do diâmetro do bocal da ponteira do injetor (A) e da velocidade do fluido injetado (B), na estimativa teórica da espessura da camada-limite: a. Hidrodinâmica; b. Difusão.
- Fig. 3.16** A. Gráfico da variação máxima de potencial no BIA como efeito do volume injetado. B. Resposta obtida devido a injeção de a. 5 μL ; b. 10 μL ; c. 20 μL ; d. 40 μL ; e. 60 μL ; f. 80 μL de solução tampão pH 4,00. Velocidade de agitação: 400 rpm. Distância da ponteira da micropipeta ao detector: 2 mm. Vazão volumétrica: 0,95 mL s^{-1} . Diâmetro do bocal da ponteira: 0,035 cm.
- Fig. 3.17** A. Efeito da vazão volumétrica na resposta do sistema BIA-potenciométrico. a. 0,60 mL s^{-1} ; b. 0,86 mL s^{-1} ; c. 0,95 mL s^{-1} . Velocidade de agitação: 400 rpm; Distância da ponteira da micropipeta ao detector: 2 mm; Volume de Injeção: 20 μL . pH 4,00. Diâmetro do bocal da ponteira: 0,035 cm. B. Gráfico da vazão volumétrica da micropipeta Eppendorf (modelo 4850) como função da variação máxima do potencial.
- Fig. 3.18** Estimativa teórica da espessura da camada-limite, calculada a partir da vazão volumétrica do líquido injetado. a. Hidrodinâmica e b. Difusão.
- Fig. 3.19** A. Perfil do sinal no sistema BIA-potenciométrico para diferentes velocidades de agitação da solução do tanque. B. Gráfico obtido a partir da velocidade de agitação: a. Variação máxima de potencial; b. Tempo de lavagem; c. Tempo de resposta. Vazão volumétrica: 0,95 mL s^{-1} . Distância da ponteira da micropipeta ao detector: 2 mm. Volume de Injeção: 20 μL . pH: 4,00. Diâmetro do bocal da ponteira: 0,035 cm.
- Fig. 3.20** A. Perfil do sinal no sistema BIA-potenciométrico para diferentes distâncias do bocal de injeção à superfície do detector. B. Gráfico da distância do injetor ao detector em função da variação máxima de potencial. Vazão volumétrica: 0,95 mL s^{-1} . Velocidade de agitação: 400 rpm. Volume de injeção: 20 μL . pH: 4,00. Diâmetro do bocal da ponteira: 0,035 cm.
- Fig. 3.21** Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio no sinal e no tempo de regeneração do eletrodo no FIA. Volume de injeção: 50 μL de 0,1 mol L^{-1} de ácido ascórbico. Vazão: 2,2 mL min^{-1} . A. Sinal obtido para diferentes concentrações de H_2O_2 , mol L^{-1} : a. Sem; b. 0,05; c. 0,1; d. 0,5; e. 1,0. B. Representação gráfica.
- Fig. 3.22** Influência do volume de injeção e da vazão no sinal do sistema FIA-potenciométrico para ácido ascórbico usando eletrodo tubular baseado em membrana de EVA/ Cu^{2+} . Concentração de ácido ascórbico: $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Efeito: A. Vazão da bomba peristáltica (volume injetado: 50 μL); B. Volume de amostra injetado (vazão: 2,2 mL min^{-1}).
- Fig. 3.23** Diagrama mostrando o sinal típico obtido com o sistema FIA-potenciométrico proposto para determinação de ácido ascórbico usando eletrodo tubular baseado em membrana de EVA/ Cu^{2+} .
- Fig. 3.24** Curva de calibração para ácido ascórbico com o sistema FIA-potenciométrico usando eletrodo tubular baseado em membrana de EVA/ Cu^{2+} .
- Fig. 3.25** Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio no tempo de regeneração (A) e no sinal (B) do ISE-Ascorbato com o sistema BIA. Volume de injeção: 50 μL de 0,1 mol L^{-1} de ácido ascórbico. Velocidade de agitação: 400 rpm. Distância ponteira-detector: 2 mm; Vazão volumétrica da micropipeta: 0,95 mL s^{-1} ; Diâmetro do bocal da ponteira: 0,035 cm.
- Fig. 3.26** Influência do volume de injeção no sinal do sistema BIA-potenciométrico usando ISE baseado em membrana de EVA/ Cu^{2+} . Concentração de ácido ascórbico: $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de agitação: 400 rpm; Distância ponteira-detector: 2 mm; Vazão volumétrica da micropipeta: 0,95 mL s^{-1} ; Diâmetro do bocal da ponteira: 0,035 cm.
- Fig. 3.27** Influência da velocidade de agitação do sistema BIA-potenciométrico no sinal (A) e no tempo de regeneração (B) do ISE-Ascorbato baseado em membrana de EVA/ Cu^{2+} . Concentração de ácido ascórbico: $3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Volume de injeção: 50 μL ; Distância ponteira-detector: 2 mm; Vazão volumétrica da micropipeta: 0,95 mL s^{-1} ; Diâmetro do bocal da ponteira: 0,035 cm.
- Fig. 3.28** Diagrama obtido com a injeção de ácido ascórbico no sistema BIA-potenciométrico, usando o sensor baseado em membrana de EVA/ Cu^{2+} . Volume de injeção: 50 μL ; Velocidade de agitação: 400 rpm; Distância ponteira-detector: 2 mm; Vazão volumétrica da micropipeta: 0,95 mL s^{-1} ; Diâmetro do bocal da ponteira: 0,035 cm.
- Fig. 3.29** Curva de calibração para ácido ascórbico com o sistema BIA-potenciométrico usando o sensor baseado em membrana de EVA/ Cu^{2+} .

Capítulo 4: Parte Experimental 135-155

- Fig. 4.1** Fluxograma do esquema de extração da enzima ascorbato oxidase da casca de pepino e construção do biossensor potenciométrico para o íon ascorbato.
- Fig. 4.2** Diagrama do circuito eletrônico elaborado para comutação de eletrodos, controle da velocidade de agitação e aquisição de dados.
- Fig. 4.3** Diagrama de bloco da estrutura lógica do software implementado para controle computacional da placa ACL-8111.
- Fig. 4.4** Esquema (a) do eletrodo tubular e (b) do sistema FIA. B. Linha carregadora; S. Linha da amostra; PP. Bomba peristáltica; ISE. Eletrodo indicador; RE. Eletrodo de referência; W. Descarte; P. pH/Analisador de íons; C. Sistema de Aquisição.
- Fig. 4.5** Diagrama esquemático do sistema FIA-espectrofotométrico. A solução carregadora foi tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 5,6.

Apêndice 1: Estabilidade do Ácido Ascórbico 165-168

- Fig. A1.1** Diagrama representativo mostrando o grau de decomposição de soluções aquosas de ácido ascórbico 2,0×10⁻⁴ mol L⁻¹ como função do pH, O₂ e temperatura. Monitorado a 265 nm.
- Fig. A1.2** Efeito da radiação eletromagnética na decomposição das soluções aquosas fortemente ácidas de ácido ascórbico 2,0×10⁻⁴ mol L⁻¹. Temperatura, 25 °C. A. Exposição à radiação ambiente; B. Exposição à radiação UV. Monitorado a 243 nm.
- Fig. A1.3** Estabilidade das soluções aquosas de ácido ascórbico quando armazenadas congeladas. Concentração: 1,0×10⁻¹ mol L⁻¹, pH < 2.

Apêndice 3: Software de Controle em Visual BASIC 173-188

- Fig. A3.1** Interface gráfica do software elaborado em VISUAL BASIC para controle do sistema multi-componente, bem como os sinais potenciométricos obtidos para as medidas de padrões e amostras de cloreto (A) e potássio (B) com eletrodos íon-seletivo. Concentração dos padrões (mol L⁻¹) e amostras (diluídas 10 vezes) da esquerda para direita: 1,0×10⁻⁴; 1,0×10⁻³; 1,0×10⁻²; 1,0×10⁻¹; #1; #2. Velocidade de agitação: 300 rpm.

Lista de Tabelas

Capítulo 1: Substâncias de Interesse Biológico 1-18

Tabela 1.1 Teor de ácido ascórbico encontrado em alguns alimentos^[2,23].

Capítulo 2: A Potenciometria e os ISE Desenvolvidos 19-92

Tabela 2.1 Grau de interferência obtido para o biossensor em relação a diversas substâncias moleculares. Concentração de ácido ascórbico e interferente: 1×10^{-4} mol L⁻¹ (proporção: 1:1).

Tabela 2.2 Coeficientes de seletividade potenciométrico para o biossensor. Concentração de interferente: 1×10^{-4} mol L⁻¹.

Tabela 2.3 Resultados obtidos na análise de amostras farmacêuticas de vitamina C usando o biossensor EVA/ascorbato oxidase.

Tabela 2.4 Grau de interferência obtido para o sensor EVA/Cu²⁺. Concentração de interferente: 1×10^{-4} mol L⁻¹.

Tabela 2.5 Coeficientes de seletividade potenciométricos para o sensor EVA/Cu²⁺.

Tabela 2.6 Coeficientes de seletividade potenciométricos para o sensor EVA/Cu²⁺, estimado pelo método P-E. Todas as medidas foram realizadas em pH 7,0.

Tabela 2.7 Estabilidade do sensor proposto para ácido ascórbico baseado em membrana de EVA dopada com íons Cu²⁺.

Tabela 2.8 Resultados obtidos na análise de amostras farmacêuticas de vitamina C com o sensor EVA/Cu²⁺.

Tabela 2.9 Grau de interferência obtido para o sensor EVA/Fe³⁺, em relação a diversas substâncias moleculares. Concentração de interferente: 1×10^{-3} mol L⁻¹ (proporção: 100:1).

Tabela 2.10 Coeficientes de seletividade potenciométrico obtido pelo método do potencial-equivalente para o sensor EVA/Fe³⁺ construído para ácido úrico. Concentração de interferente: 1×10^{-3} mol L⁻¹.

Tabela 2.11 Coeficientes de seletividade potenciométrico para o sensor EVA/Fe³⁺ estimado pelo método do potencial-equivalente. Todas as medidas foram realizadas em pH 12,0.

Tabela 2.12 Resultados obtidos na determinação de ácido úrico em amostras de soro sanguíneo com o sensor EVA/Fe³⁺.

Tabela 2.13 Grau de interferência obtido para o biossensor EVA/Urease/Pt, em relação a algumas substâncias moleculares. Concentração de interferente: 1×10^{-3} mol L⁻¹.

- Tabela 2.14** Coeficientes de seletividade potenciométrico obtido pelo método do potencial-equivalente para o biossensor EVA/Urease/Pt para uréia. Concentração de interferente: 1×10^{-4} mol L⁻¹.
- Tabela 2.15** Grau de interferência obtido para o biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina, em relação à alguns derivados de uréia. Concentração de interferente: 1×10^{-2} mol L⁻¹ (proporção: 10:1).
- Tabela 2.16** Coeficientes de seletividade potenciométrico obtido pelo método do potencial-equivalente para o biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina para uréia.
- Tabela 2.17** Resultados obtidos na determinação de uréia em amostras de soro sanguíneo com o biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina.

Capítulo 3: Técnicas Dinâmicas de Análise 93-133

- Tabela 3.1** Alguns exemplos de aplicações das técnicas FIA, SIA e BIA.
- Tabela 3.2** Resultados obtidos para a estimativa da vazão volumétrica da micropipeta Eppendorf modelo 4850, nos seus três modos de operação.
- Tabela 3.3** Características do regime de fluxo para um jato expelido com a micropipeta Eppendorf modelo 4850. Consideração: o volume escoado é o mesmo de um cilindro ($\pi r^2 l$).
- Tabela 3.4** Características do regime de fluxo para um fluido agitado no sistema BIA elaborado.
- Tabela 3.5** Resposta obtida no sistema BIA nos estudos por planejamento fatorial.
- Tabela 3.6** Análise dos efeitos principais e de interação entre os parâmetros estudados no sistema BIA para a solução tampão pH 4,00.
- Tabela 3.7** Características de desempenho entre FIA e BIA na determinação de ácido ascórbico usando o ISE-Ascorbato baseado em EVA dopado com íons Cu²⁺.
- Tabela 3.8** Resultados obtidos na determinação de ácido ascórbico em amostras farmacêuticas.

Capítulo 4: Parte Experimental 135-155

- Tabela 4.1** Relação dos reagentes utilizados na pesquisa.
- Tabela 4.2** Dados obtidos na calibração da micropipeta eletrônica.
- Tabela 4.3** Matriz fatorial para o estudo de estabilidade das soluções aquosas de ácido ascórbico, contendo o planejamento e os dados obtidos.

Apêndice 1: Estabilidade do Ácido Ascórbico 165-168

- Tabela A1.1** Resultados obtidos na análise do planejamento fatorial 2⁴ para o estudo da estabilidade das soluções aquosas de ácido ascórbico (2×10^{-4} mol L⁻¹).

Apêndice 3: Software de Controle em Visual BASIC 173-188

Tabela A3.1 Resultados obtidos na determinação simultânea de cloreto e potássio em bebidas isotônicas usando um conjunto de eletrodos íon-seletivo com o sistema multi-componente proposto.

Índice Geral

Capítulo 1: Substâncias de Interesse Biológico	1-18
1.1 O Ácido L-Ascórbico	2
1.1.1 Métodos de Determinação do Ácido L-Ascórbico	5
1.1.2 Estabilidade do Ácido L-Ascórbico	5
1.1.2.1 Dissociação do Ácido L-Ascórbico	6
1.2 O Ácido Úrico	7
1.2.1 Métodos de Determinação do Ácido Úrico	9
1.2.2 Estabilidade do Ácido Úrico	9
1.2.2.1 Dissociação do Ácido Úrico	10
1.3 A Uréia	11
1.3.1 Métodos de Determinação da Uréia	11
Referências	13
 Capítulo 2: A Potenciometria e os ISE Desenvolvidos	 19-92
2.1 A Interface Eletrodo-Solução	21
2.2 A Medida de Potencial	25
2.2.1 Os Eletrodos de Referência	27
2.2.2 Os Eletrodos Indicadores	27
2.2.2.1 A Equação de Nernst: Princípios Cinéticos	28
2.2.2.2 A Equação de Nernst: Princípios Termodinâmicos	33
2.2.2.3 O Transporte de Massa na Solução	34
2.2.2.4 O Mecanismo de Resposta dos ISE	36
2.2.2.5 Características Operacionais dos ISE	40
2.3 As Técnicas Potenciométricas	42
2.4 Os Sensores Potenciométricos Desenvolvidos	43
2.4.1 O ISE-Ascorbato	43
2.4.1.1 O Biossensor à Base de EVA/Ascorbato Oxidase	44
I. A Enzima Ascorbato Oxidase	45
II. Extração da Enzima Ascorbato Oxidase	46
III. Estabilidade do Extrato Enzimático de Ascorbato Oxidase	46
IV. Estudo Cinético do Extrato Enzimático de Ascorbato Oxidase	47
V. Características da Membrana do Biossensor EVA/Ascorbato Oxidase	51
VI. Efeito de pH, Força Iônica e Temperatura no Biossensor EVA/Ascorbato Oxidase	52
VII. Avaliação e Desempenho do Biossensor EVA/Ascorbato Oxidase	53

2.4.1.2 O Sensor à Base de EVA/Cu ²⁺	57
I. Características da Membrana e Teoria de Resposta do Sensor EVA/Cu ²⁺	57
II. Efeito da Quantidade de Ions Cobre (II) na Membrana de EVA	58
III. Efeito do pH e da Força Iônica no Sensor EVA/Cu ²⁺	59
IV. Avaliação e Desempenho do Sensor EVA/Cu ²⁺	61
2.4.2 O ISE-Urato	66
2.4.2.1 O Sensor à Base de EVA/Fe ³⁺	66
I. Características da Membrana e Teoria de Resposta do Sensor EVA/Fe ³⁺	66
II. Efeito do pH e da Força Iônica sobre o Sensor EVA/Fe ³⁺	67
III. Avaliação e Desempenho do Sensor EVA/Fe ³⁺	67
2.4.3 O ISE-Uréia	72
I. A Enzima Urease	73
2.4.3.1 O Biossensor à Base de EVA/Urease/Pt	75
I. Efeito da Concentração do Tampão no Biossensor EVA/Urease/Pt	75
II. Efeito de pH, Força Iônica e Temperatura no Biossensor EVA/Urease/Pt	76
III. Avaliação e Desempenho do Biossensor EVA/Urease/Pt	78
2.4.3.2 O Biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina	80
I. Efeito do pH e da Temperatura no Biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina	81
II. Avaliação e Desempenho do Biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina	82
Referências	85
Capítulo 3: Técnicas Dinâmicas de Análise	93-133
3.1 A Análise por Injeção em Batelada	98
3.1.1 Elaboração e Planejamento do Sistema BIA	99
3.1.2 A Teoria "Wall-jet"	104
3.1.3 Os Regimes de Fluxo no Sistema BIA	109
3.1.4 Efeito do Diâmetro do Bocal do Injetor-Ponteira no Sistema BIA	112
3.1.5 Efeito do Volume de Injeção no Sistema BIA	113
3.1.6 Efeito da Vazão Volumétrica da Micropipeta no Sistema BIA	114
3.1.7 Efeito da Velocidade de Agitação do Líquido no Sistema BIA	116
3.1.8 Efeito da Distância Injetor-Detector no Sistema BIA	117
3.1.9 Estudo dos Parâmetros do Sistema BIA por Planejamento Fatorial	118
3.2 Comparação entre FLA e BIA	120
3.2.1 Otimização e Avaliação dos Sistemas FLA e BIA	121
Referências	127

Capítulo 4: Parte Experimental	135-155
4.1 Reagentes	135
4.2 Aparelhagem	141
4.3 Procedimento	141
4.3.1 Preparo das Soluções	141
4.3.2 Calibração da Vazão Volumétrica da Micropipeta Eletrônica	142
4.3.3 Estudo de Estabilidade das Soluções Aquosas de Ácido Ascórbico	143
4.3.3.1 Efeito do pH $\times$ O ₂ $\times$ Temperatura $\times$ Tempo	143
4.3.3.2 Efeito da Radiação Eletromagnética	143
4.3.4 Elaboração dos Sensores Potenciométricos	143
4.3.4.1 Construção do Sensor Base	143
I. Eletrodo de Grafite/Epóxi	143
II. Eletrodo de pH (Pt)	144
III. Eletrodo de NH ₄ ⁺ (PVC-COOH/Nonactina/Adipato)	144
IV. Eletrodo de K ⁺ (PVC/Valinomicina/Adipato)	145
4.3.4.2 Construção do ISE-Ascorbato	145
I. Extração da Enzima Ascorbato Oxidase de Casca de Pepino e Elaboração do Biossensor	145
I.1 Ensaio para Determinação da Atividade Enzimática do Extrato de Ascorbato Oxidase	145
II. Elaboração do Sensor EVA/Cu ²⁺	147
4.3.4.3 Construção do ISE-Urato	147
I. Elaboração do Sensor EVA/Fe ³⁺	147
4.3.4.4 Construção do ISE-Uréia	147
I. Elaboração do Biossensor EVA/Urease/Pt	147
II. Elaboração do Biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina	148
4.3.5 Elaboração e Princípios de Funcionamento do Sistema de Medição Multi-Componente	148
4.3.5.1 Implementação do Software de Controle	149
4.3.5.2 Avaliação e Desempenho do Sistema Multi-Componente	151
4.3.6 Medidas Potenciométricas com os ISE	151
4.3.6.1 Estado-Estacionário	151
4.3.6.2 Estado-Dinâmico	153
4.3.7 Métodos de Referência	154
4.3.7.1 Determinação de Ácido Ascórbico	154
I. Espectrofotométrico	154
II. Titulação Iodométrica	154
4.3.7.2 Determinação de Potássio e Cloreto	154
Referências	155

Capítulo 5: Aspectos Gerais, Recentes Avanços e Perspectivas Futuras	157-163
5.1 A Contribuição	158
5.2 O Futuro	160
Referências	162
Apêndice 1: Estabilidade do Ácido Ascórbico	165-168
A1.1 Efeito do $\text{pH} \times \text{O}_2 \times \text{Temperatura} \times \text{Tempo}$	165
A1.2 Efeito da Radiação Eletromagnética	167
A1.3 Efeito do Congelamento das Soluções	167
Apêndice 2: Especificações Técnicas dos CI	169-172
A2.1 Placa de Aquisição ACL-8111	169
A2.2 Oscilador 301-864	171
A2.3 Chave Analógica ADG201	172
Referências	172
Apêndice 3: Software de Controle em Visual BASIC	173-188
A3.1 Código do Arquivo *.frm (Form1)	173
A3.2 Código do Arquivo *.bas (Module 1)	185
A3.3 Avaliação e Desempenho do Sistema Multi-Componente	187
Apêndice 4: Funções Estatísticas	189-191
A4.1 Estimativa do Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo	189
A4.2 Método dos Mínimos Quadrados	189
A4.2.1 Estimativa do Desvio Padrão da Reta	189
A4.2.2 Coeficiente de Correlação da Reta	189
A4.2.3 Coeficiente Angular da Reta e a Estimativa do seu Desvio Padrão	190
A4.2.4 Coeficiente Linear e a Estimativa do seu Desvio Padrão	190
A4.3 Propagação de Erros em Cálculos Aritméticos	190
A4.3.1 Adição ou Subtração	190
A4.3.2 Multiplicação ou Divisão	190
A4.3.3 Exponenciação	190
A4.3.4 Logaritmo	190
A4.4 Planejamento Fatorial	190
A4.4.1 Cálculo do Efeito Principal (A ou B ou C)	190
A4.4.2 Cálculo do Efeito de Interação ($A \times B$ ou $B \times C$ ou $A \times B \times C$)	191
A4.4.3 Estimativa da Variância do Experimento	191

<i>A4.4.4 Estimativa da Variância do Efeito</i>	<i>191</i>
<i>A4.4.5 Cálculo do Erro Padrão do Efeito</i>	<i>191</i>
<i>Referências</i>	<i>191</i>

Substâncias de Interesse Biológico

O ser vivo é composto de uma série de substâncias que são responsáveis pelo seu adequado funcionamento. Estas substâncias, denominadas de biomoléculas, são responsáveis pelo surgimento da vida, participando da formação da estrutura do organismo e atuando nos seus diversos processos energéticos e metabólicos.

Na formação do ser vivo, as biomoléculas são organizadas em sistemas complexos formados por células e estruturas biológicas sub-celulares chamadas de organelas, as quais são reuniões de uma grande quantidade de moléculas poliméricas ou macromoléculas. As macromoléculas apresentam uma complexa arquitetura tridimensional como consequência de interações entre as unidades monoméricas, em geral, blocos simples de moléculas, tais como os açúcares e aminoácidos^[1].

Nas transformações energéticas, as biomoléculas atuam na manutenção da estrutura organizada e na atividade dos sistemas vivos. Contudo, isto depende da capacidade do mesmo em extrair energia do ambiente, seja através dos processos de fotossíntese ou do metabolismo, os quais, respectivamente, capturam energia do sol ou dos outros seres vivos no processo de alimentação através de biomoléculas especiais, onde o ATP e o NADH são dois exemplos proeminentes^[1].

Finalmente, as estruturas biológicas servem para propostas funcionais nos membros e órgãos, onde os agentes químicos do metabolismo, tais como as enzimas e os intermediários metabólicos são bons exemplos^[1].

Assim, o ser vivo na sua essência é formado por inúmeras substâncias químicas organizadas em diferentes sistemas. O excesso ou a escassez de uma dada biomolécula pode causar um mal funcionamento do organismo vivo, provocando doenças e até a morte. Por isto, são determinados uma série de compostos como por exemplo, os triglicerídios, o colesterol, a glicose, íons como Na^+ , K^+ e Cl^- , a uréia, o ácido úrico, o ácido ascórbico, dentre outros. Além disto, algumas destas substâncias são muito empregadas como fármacos onde são igualmente importante serem determinadas.

Neste trabalho, um dos principais objetivos foi desenvolver sensores potenciométricos para determinação de biomoléculas como o ácido ascórbico, o ácido úrico e a uréia. A importância da determinação destas substâncias são descritas a seguir.

1.1 O Ácido L-Ascórbico

O ácido ascórbico é uma substância muito importante para o metabolismo dos seres vivos. Sua deficiência pode causar uma doença denominada escorbuto, a qual afetou muitas pessoas no antigo Egito, Grécia e Roma, sendo na Idade Média, endêmica no norte da Europa^[1].

Gregory (1724-1773), forneceu a primeira descrição clínica completa dos sintomas do escorbuto. Em 1757, Lind, fez o primeiro estudo terapêutico desta enfermidade, que atacava as tripulações nas viagens marítimas e campanhas militares. Budd foi quem atribuiu de um modo explícito, a atividade antiescorbútica de alguns alimentos, a presença de um determinado constituinte deles, descobrindo sua fisiologia experimental, em 1841^[2].

Smith^[3] foi o primeiro a descrever um estado hemorrágico em cobaias alimentadas com rações contendo apenas cereais. Contudo, somente depois dos trabalhos de Holst e Frölich^[4] foi confirmado que uma ração constituída por cevada e pão branco provocava nas cobaias sintomas análogos ao escorbuto humano. Eles descobriram que o regime alimentício que provocava o escorbuto no homem, causava-o também nas cobaias, e que os alimentos que o curavam no homem exerciam um efeito benéfico nestes animais. Porém, a origem do escorbuto em cobaias só foi definitivamente admitida com os trabalhos de Chick e Hume^[5], na Inglaterra, e de Cohen e Mendel^[6], nos Estados Unidos. A existência de uma relação definida entre a atividade anti-escorbútica do suco de limão e o seu estado de oxi-redução no corpo que lhe conferia aquela atividade, era tanto maior quanto mais reduzido estava o agente e foi comprovada por Zilva, em 1928^[7].

A primeira descrição sobre o isolamento do ácido ascórbico foi feita por Albert Szent-Györgyi^[8], que o obteve da glândula supra renal de ratos, do suco de frutos cítricos e da páprica, chamando-a de ácido hexurônico. Posteriormente, Tillmans e Hirsch^[9], estabeleceram uma correlação evidente entre o poder redutor de vários alimentos e sua atividade anti-escorbútica. A identidade do fator redutor de Zilva na cura do escorbuto, e o ácido hexurônico de Szent-Györgyi foi definitivamente estabelecida por Svirbel, Szent-Györgyi, Waugh e King, em 1932^[10,11].

Haworth e Szent-Györgyi^[12] foram quem propuseram denominar de ácido ascórbico a vitamina que apresentava atividade anti-escorbútica. Sua estrutura foi determinada por Hirst e Haworth em 1933^[13], e sua síntese foi descrita simultaneamente por Reichstein^[14] e por Haworth^[15].

No reino animal, somente alguns vertebrados não conseguem sintetizar o ácido ascórbico, os seres humanos, o porquinho da Índia (preá), certos pássaros e alguns peixes, como o salmão, por exemplo. Em todos estes casos, a incapacidade de produzi-lo está associada à falta de uma enzima no fígado desses animais, a L-gulono- γ -lactona oxidase. Assim, é necessário que o ácido ascórbico faça parte da dieta alimentar^[1].

O ácido ascórbico possui diversas funções no metabolismo dos seres vivos (Fig. 1.1). No cérebro, ele está associado com o metabolismo da L-tirosina, onde *p*-hidroxifenilpiruvato dioxigenase atua na

conversão da tirosina em ácido homogentísico e requer ascorbato para oxidação e descarboxilação do intermediário, o ácido *p*-hidroxifenilpirúvico. A tirosina também é convertida em catecolaminas num processo dependente de ascorbato. Assim como a conversão de dopamina em noradrenalina na catálise por dopamina- β -hidroxilase^[1].

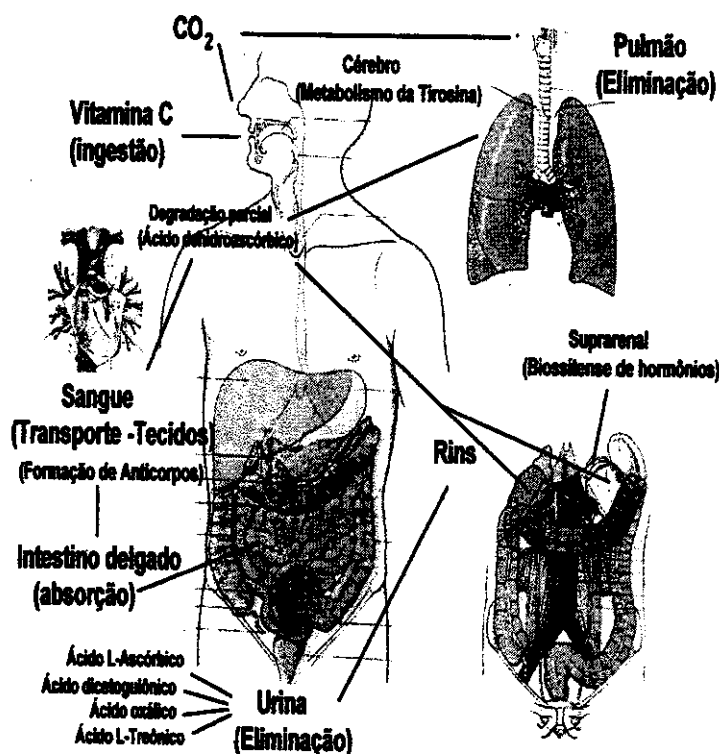


Fig. 1.1 Ciclo metabólico do ácido ascórbico.

O ácido ascórbico é também importante na prevenção e tratamento de infecções, pois estimula o sistema imunológico participando da formação dos anticorpos no sangue, onde os leucócitos apresentam altas concentrações dele. O ascorbato inibe a destruição oxidativa das células brancas do sangue e aumenta sua mobilidade prevenindo a anemia. Outra importante função do ácido ascórbico está envolvida com o metabolismo da histamina na resposta à alergia. Na presença de íons cobre (II), o ascorbato previne a acumulação da histamina e auxilia na sua degradação e eliminação. Também há evidências de que o ácido ascórbico participa na síntese da prostaglandina^[1].

O escorbuto, doença causada pela deficiência de ácido ascórbico, está associada com a incapacidade do organismo de formar as fibras de colágeno apropriadamente. Isto é resultante da perda de atividade da prolil-hidroxilase, que forma a hidroxiprolina, sendo o processo dependente desta vitamina. Como consequência, esta doença deixa lesões na pele, provocando fadiga, debilidade dos vasos sanguíneos, dentes e ossos, sendo que nos estágios mais avançados, ela pode provocar uma grotesca desfiguração com eventual morte do indivíduo^[1,2,16-21].

Por isto tudo, o ácido ascórbico é amplamente utilizado como fármaco, sendo também adicionado em alimentos manufaturados para atuar como antioxidante e assim, prolongar o tempo de vida do produto comercial^[22]. O ácido ascórbico é encontrado em diversos alimentos, contudo ele é rapidamente destruído pelas oxidases contidas em alguns destes. A Tabela 1.1 mostra a quantidade de ácido ascórbico encontrado em diversos alimentos^[23].

A monitoração do ácido ascórbico é muito importante tanto em fármacos como em análises clínicas. Esta última deve-se principalmente ao elevado grau de interferência que esta substância causa em outros ensaios clínicos, como por exemplo, na análise de glicose e ácido úrico. A nível fisiológico a concentração de ácido ascórbico no sangue se encontra na faixa de $3,4 \times 10^{-5}$ a $1,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹^[24]. Além disto, o excesso de ácido ascórbico pode causar irritação gástrica e diarreia, sendo um dos produtos da sua metabolização, o ácido oxálico, o qual pode causar problemas aos rins^[2,25].

Tabela 1.1 Teor de ácido ascórbico encontrado em alguns alimentos^[2,23].

Alimento	mg de ácido ascórbico/100 g ou 100 mL de alimento
Acerola	1000-3000
Nabo	100-150
Morango	70
Laranja (suco)	40-70
Limão (suco)	40-60
Fruta de Conde	34
Ervilha-Verde (cozida)	20
Espinafre (cozido)	28
Tomate	20-30
Brócolis (cozido)	90-115
Brócolis	115
Maçã	3-10
Cebola	18
Abacate	14
Banana	11
Uva	4
Couve (cozida)	76-93
Couve-flor	76
Melão	29
Repolho	40-70

$$\begin{array}{c}
 \text{HO} \quad \text{OH} \\
 \diagup \quad \diagdown \\
 \text{H} \quad \text{C} \quad \text{C} \quad \text{O} \\
 \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \\
 \text{HOCH}_2 - \text{C} \quad \text{O} \quad \text{C} = \text{O} \\
 \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \\
 \text{HO} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H}
 \end{array}
 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \longrightarrow
 \begin{array}{c}
 \text{O} \quad \text{O} \\
 \diagdown \quad \diagup \\
 \text{H} \quad \text{C} \quad \text{C} \quad \text{O} \\
 \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \\
 \text{HOCH}_2 - \text{C} \quad \text{O} \quad \text{C} = \text{O} \\
 \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \\
 \text{HO} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H}
 \end{array}
 + \text{H}_2\text{O} \quad (1.1)$$

Ácido ascórbico Ácido dehidroascórbico

Alguns fatores influenciam esta reação, tais como a temperatura, a luz, o solvente, o pH e íons metálicos (Cu^{2+} , Ag^{1+} e Fe^{3+})^[2,51-54]. A maior estabilidade do ácido ascórbico em solução aquosa, ocorre em pH abaixo de dois, devido a dificuldade de hidrólise do anel lactona^[2].

1.1.2.1 Dissociação do Ácido L-Ascórbico

O ácido ascórbico tem sua acidez devida a ionização do grupo enol do átomo de C^3 (Eq. 1.1), onde o primeiro pK_a vale 4,17 e o segundo 11,57 (C^2)^[2,55]. A dissociação do ácido ascórbico influencia na estabilidade das soluções aquosas. Os equilíbrios de dissociação em função do pH estão apresentados na Fig. 1.2.

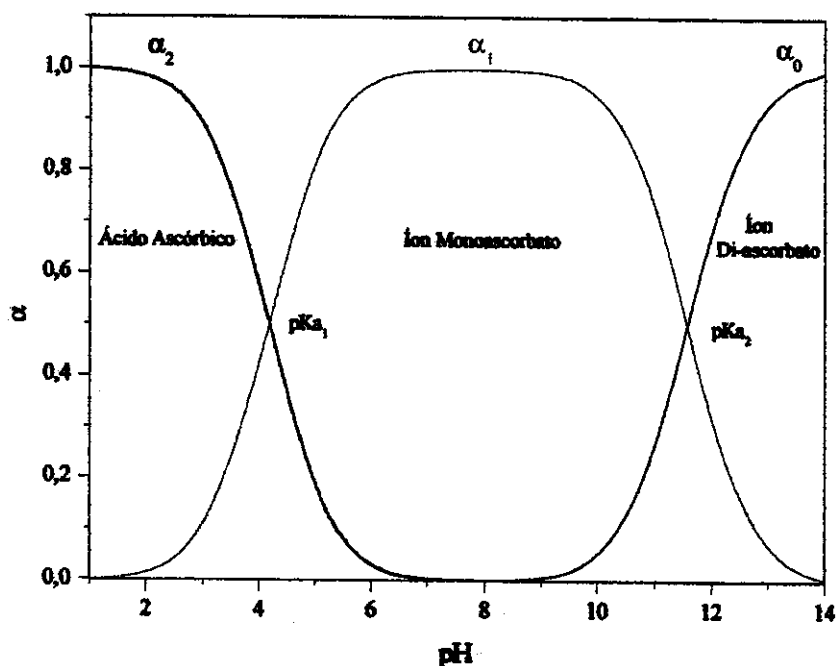


Fig. 1.2 Frações teóricas (α) de ácido ascórbico presentes em solução aquosa como função do pH.

No manuseio das soluções aquosas de ácido ascórbico, é recomendável que estas sejam preparadas em água deionizada e em pH menor que dois (2). Um estudo da influência da dissociação do ácido ascórbico na sua estabilidade e de fatores como a temperatura e a radiação UV, está apresentado no Apêndice 1.

1.2 O Ácido Úrico

O organismo do ser vivo é constituído de nucleotídeos e ácidos nucleicos que são biomoléculas que possuem bases nitrogenadas heterocíclicas como principal componente de suas estruturas^[1]. Os nucleotídeos são intermediários essenciais em quase todos os processos do metabolismo celular, enquanto que os ácidos nucleicos são os elementos da hereditariedade e as substâncias responsáveis pela transferência da informação genética. Analogamente às proteínas, que são polímeros de aminoácidos, os ácidos nucleicos são cadeias poliméricas de nucleotídeos, sendo o DNA e o RNA, duas espécies básicas. A completa hidrólise dos ácidos nucleicos liberam bases nitrogenadas, as quais são denominadas de pirimidínicas e purínicas (Fig. 1.3).

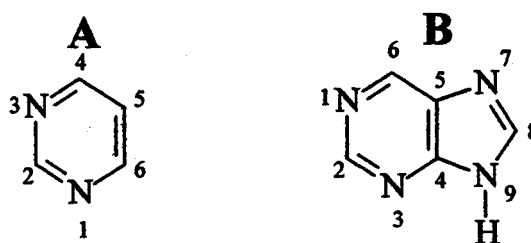


Fig. 1.3 Anel: A. Pirimidínico e B. Purínico.

Alguns exemplos de bases pirimidínicas são a citosina, o uracil e a timina, enquanto que a adenina, a xantina e o ácido úrico são bons exemplos de bases purínicas.

O ácido úrico não se forma diretamente pela síntese de moléculas menores. Ele é produzido durante o catabolismo (degradação) das bases purínicas (Fig 1.4), como resultado da oxidação da hipoxantina e da xantina pela enzima xantina oxidase. Diferente do que ocorre nos primatas, a maior parte dos mamíferos converte de 80% a 98% do ácido úrico produzido no organismo em alantoína, o qual se forma no fígado pela ação da enzima uricase. O grau de oxidação do ácido úrico no organismo animal é expresso pelo índice uricolítico, e equivale a razão entre o nitrogênio proveniente da alantoína e o da soma deste último com o nitrogênio do ácido úrico^[2].

Os estudos fisiológicos da uricolísis mostram que, dependendo das condições do meio, um mesmo órgão pode converter e recuperar o ácido úrico previamente degradado. Alguns pesquisadores têm demonstrado que um extrato de fígado pode decompor o ácido úrico *in vitro* e recompô-lo na ausência de oxigênio. A maior parte dos mamíferos, depois da ingestão oral ou injeção intravenosa de ácido nucleico ou bases purínicas, elimina a quase totalidade destes compostos na forma de alantoína na urina. O homem, ao contrário, somente contém nas mesmas condições uma pequena fração das purinas ingeridas na urina, sendo estas na forma de ácido úrico. Isto demonstra, que fisiologicamente o organismo humano é incapaz de destruir por oxidação o ácido úrico. Alguns

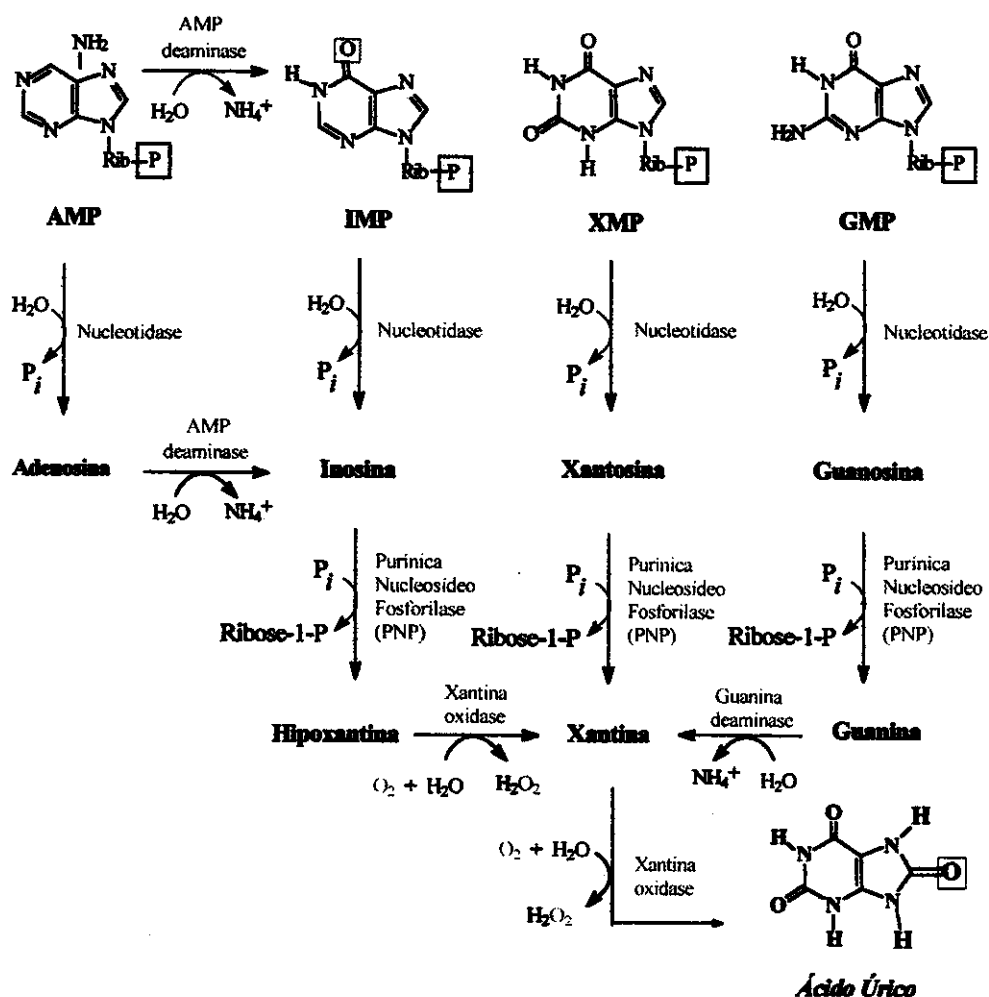


Fig. 1.4 Catabolismo de diferentes nucleotídeos purínicos.

investigadores consideram que no homem, a diferença entre a quantidade de purinas ingeridas e a fração eliminada pela urina deve-se a uma etapa onde o ácido úrico é convertido em uréia^[2].

O ácido úrico é responsável por algumas desordens clínicas quando os níveis no soro sanguíneo (hiperuricemia) e na urina são elevados. A nível fisiológico, a concentração de ácido úrico em soro sanguíneo se encontra na faixa de $2,7 \times 10^{-4}$ a $4,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e na urina entre $1,5 \times 10^{-3}$ a $4,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹^[24]. Quando acima do nível fisiológico no soro, os cristais de urato de sódio, que são pouco solúveis em água, depositam nas extremidades das articulações caracterizando uma enfermidade conhecida como gota. A gota provoca uma dolorosa inflamação, que ocorre mais frequentemente no dedo polegar do pé (grande). O ácido úrico também pode causar danos aos rins e obstrução dos canais urinários (ureteres) devido a formação de cálculos ou pedras. A hiperuricemia crônica ocorre em 3% da população, como consequência de anormalidades metabólicas devido principalmente a super-produção de nucleotídeos purínicos^[1,56].

1.2.1 Métodos de Determinação do Ácido Úrico

A maioria dos métodos desenvolvidos para determinação de ácido úrico utilizam a cromatografia líquida e gasosa, seja de alta eficiência ou não^[57-68]. Alguns pesquisadores descrevem o uso da cromatografia líquida usando fase estacionária de polimetacrilato e HPLC com diluição isotópica^[64] ou fase reversa^[67]. Outros métodos desenvolvidos para a determinação de ácido úrico baseiam-se no uso de biossensores amperométricos^[69-71], voltamétricos^[72-74] e termométricos^[75]. No caso dos métodos amperométricos e voltamétricos é comum a elaboração de biossensores, onde a enzima uricase é imobilizada sobre a superfície de eletrodos de Clark (sensível ao oxigênio), pasta de carbono ou grafite/epóxi. Assim, o ácido úrico é determinado indiretamente pelo consumo de oxigênio ou pelo peróxido de hidrogênio produzido na reação enzimática. No termométrico é detectada a variação de temperatura devido a reação enzimática, a qual libera cerca de 50 kJ mol⁻¹ de calor^[75]. Alguns métodos espectrofotométricos também têm sido sugeridos usando UV ou complexos coloridos de ácido úrico com Fe³⁺ e diclorobenzoquinona^[76]. Contudo, a maioria destes métodos utiliza aparelhagens complexas de alto custo, envolvendo a manipulação em muitas etapas com grande consumo de tempo, além do uso de reagentes tóxicos.

Em relação aos ISE^[77,78], algumas propostas sugerem o uso de urato de tricaprilil-trimetil-amônio (aliquat-urato) associado ou não com complexos de metal-fenantrolina, onde o metal pode ser Fe²⁺, Ru³⁺, Ni²⁺ ou Cu¹⁺^[78]. A principal dificuldade nestes sensores potenciométricos ocorre na preparação do material sensível.

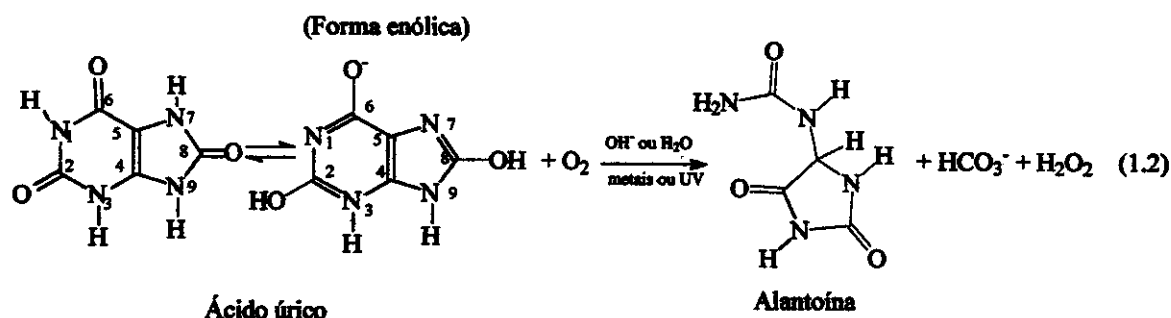
Em análises clínicas os métodos mais utilizados são o espectrofotométrico^[79] e o enzimático^[80]. No método espectrofotométrico, o principal reagente é o fosfotungstato que, ao ser reduzido pelo ácido úrico, produz um composto de coloração azul.

Já o método enzimático foi proposto por Bulger e John em 1941^[80], como um aperfeiçoamento para o método espectrofotométrico. Neste, a enzima uricase era usada em sua forma solúvel para degradar o ácido úrico aumentando a seletividade. No entanto, vale lembrar que o uso de enzimas na forma solúvel torna o método mais dispendioso.

1.2.2 Estabilidade do Ácido Úrico

O ácido úrico é decomposto em solução por sais inorgânicos de metais pesados como ferro, manganês, cromo ou cobre. Estes compostos podem catalisar a decomposição do ácido úrico pelo oxigênio, sendo esta favorecida em pH alcalino^[81-83]. Durante a oxidação do ácido úrico catalisada por íons Cu²⁺, este se decompõe cerca de 80% em 30 min a 38 °C ([Ácido Úrico] = 2×10⁻⁴ mol L⁻¹ e [Cu²⁺] = 1×10⁻⁴ mol L⁻¹)^[81]. As soluções de ácido úrico também podem sofrer fotodegradação por radiação UV, onde neste processo ele se degrada cerca de 84% em duas horas a 30 °C^[83].

No processo de decomposição do ácido úrico pelo oxigênio em meio alcalino e aquoso, o qual é catalisado por íons metálicos ocorre a formação de alantoína e bicarbonato (Eq. 1.2). No entanto, quando no meio existe a presença do ânion borato, pode haver a formação de uréia e do íon aloxanato^[83].



1.2.2.1 Dissociação do Ácido Úrico

O ácido úrico apresenta duas constantes de acidez, onde o primeiro pK_a vale 5,4 e o segundo 11,3^[84]. Os equilíbrios de dissociação em função do pH estão apresentados na Fig. 1.5.

Da mesma forma que ocorre com o íon ascorbato, o íon urato sofre autoxidação em meio aquoso alcalino. Contudo, este processo é lento, não sendo observada nenhuma degradação num período de 30 min a 38 °C^[81].

Assim, no manuseio das soluções aquosas de ácido úrico, é recomendável que estas sejam armazenadas à temperatura ambiente e preparadas com água desionizada em pH maior que onze (11), uma vez que abaixo de pH oito (8), o ácido úrico é muito pouco solúvel.

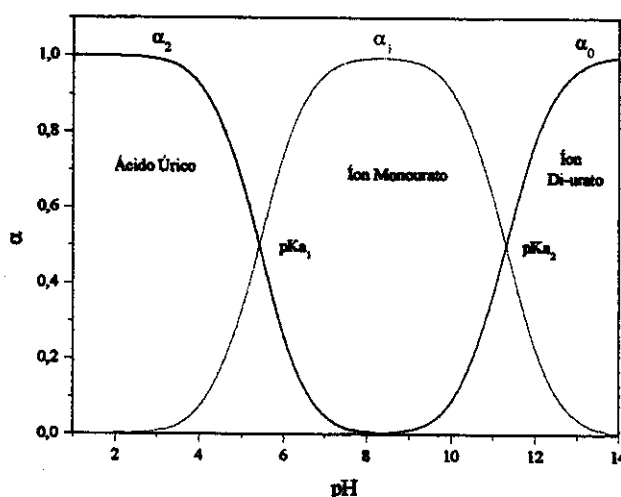


Fig. 1.5 Frações teóricas (α) de ácido úrico presentes em solução aquosa como função do pH.

1.3 A Uréia

A uréia é o produto final do metabolismo dos protídeos, nos mamíferos, anfíbios e alguns peixes. A quantidade de uréia excretada depende da alimentação, sendo mais elevada quando esta é rica em proteínas^[2]. Várias experiências feitas *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a uréia se forma exclusivamente no fígado^[1,85], sendo o processo metabólico dependente da enzima arginase, que hidrolisa o aminoácido arginina em uréia e ornitina^[1,86] (Fig. 1.6). O ciclo da uréia está associado a outros ciclos metabólicos, como o do ácido cítrico. No ciclo do ácido cítrico, o fumarato produzido pela ação da enzima arginina succinase sobre o succinato de arginina (Fig. 1.6, reação 3) é transformado em malato, o qual é oxidado para oxaloacetato. O oxaloacetato pode sofrer aminação para formar aspartato ou conversão para fosfoenolpiruvato, participando então, da *gliconeogenesis* (processo de síntese da glicose através de precursores que não sejam carboidratos, tais como o piruvato e o lactato, o qual ocorre quando o organismo não recebe glicose na sua dieta alimentar).

A síntese da uréia foi primeiramente realizada por Friedrich Wöller, em 1828, a partir da evaporação de uma solução do sal inorgânico cianato de amônio. Este acontecimento, compreende um dos maiores marcos na história da Química, uma vez que tal descoberta acabou com o dogma que estabelecia que as substâncias orgânicas eram provenientes somente da matéria viva e as inorgânicas da matéria inanimada. Os experimentos de Wöller mostraram a possibilidade de interconversão de compostos inorgânicos em orgânicos, mostrando que as substâncias na natureza estão sujeitas aos mesmos princípios químicos^[87].

A uréia é bastante estável em solução e possui grande significado clínico, pois serve como diagnóstico e prognóstico de processos renais e de depuração plasmática. A produção de uréia constitui um processo de desintoxicação do organismo assegurando a excreção de forma inócua, da maior parte do nitrogênio (N) liberado do catabolismo das proteínas, uma vez que uma concentração de 5 mg de N por 100 mL de sangue, na forma de amônia, é mortal para o ser vivo. A nível fisiológico a concentração de uréia em soro sanguíneo se encontra na faixa de $1,1 \times 10^{-3}$ a $1,4 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e na urina entre $4,2 \times 10^{-1}$ a $7,1 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹^[24].

1.3.1 Métodos de Determinação da Uréia

Várias metodologias foram desenvolvidas para a determinação de uréia, algumas delas estão baseadas em reações de formação de compostos pouco solúveis, como a dixantil uréia, no método gravimétrico^[88] ou em reações com formação de compostos que absorvem na região do visível, como o complexo entre diacetil e uréia (diazina) de coloração amarela, no método espectrofotométrico^[89,90]. Contudo, a maioria dos métodos desenvolvidos estão baseados em medidas indiretas, nos quais monitoram os produtos da reação enzimática entre uréia e urease. Dentre eles tem-se, o

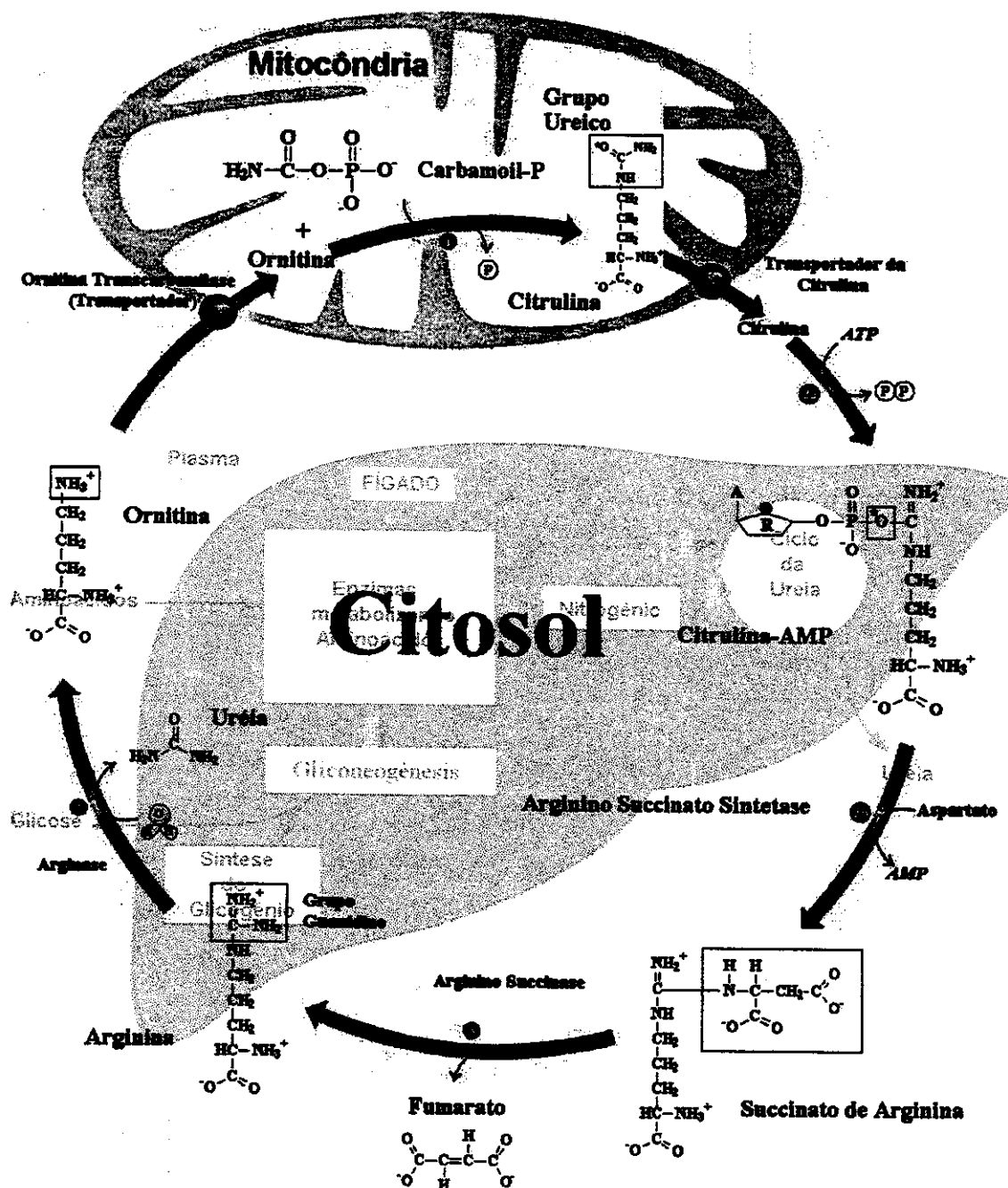
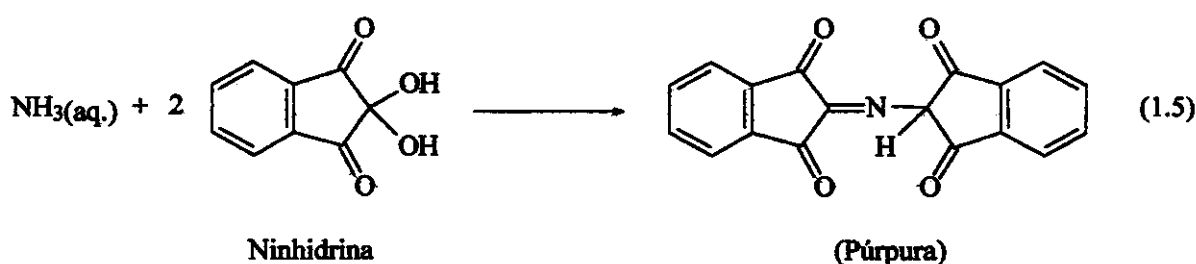
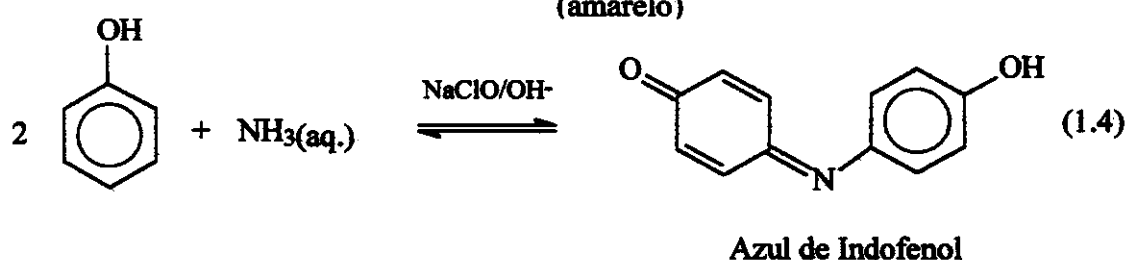
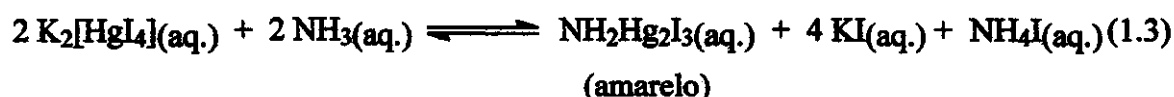


Fig. 1.6 Esquema das reações presentes no ciclo da uréia. 1. Transferência do grupo carbamóil do fosfato de carbamila para ornitina, através da ornitina transcarbamilase produzindo citrulina; 2a. O grupo uréico da citrulina é ativado pela reação com ATP dando o intermediário citrulina-AMP; 2b. O AMP é deslocado pelo aspartato, o qual é ligado ao carbono da citrulina via o grupo α -amino. As duas etapas da reação 2 é catalisada pela enzima arginina succinato sintetase, dando como produto final o succinato de arginina; 3. Arginina e fumarato são produzidos pela ação da enzima arginina succinase no succinato de arginina; 4. A hidrólise da arginina pela arginase produz ornitina e uréia, completando o ciclo. Adaptado da referência [1].

condutimétrico que monitora o aumento da condutividade da água devido a formação de bicarbonato de amônio^[91] ou os espectrofotométricos baseados na reação da amônia entre compostos como tetraiodomercurato de potássio (reagente de Nessler)^[85,92], fenol (reação de Berthelot)^[93] ou ninhidrina^[1], os quais formam produtos de reação que absorvem a 436, 560 e 570 nm, respectivamente. As reações que ocorrem nestes métodos espectrofotométricos são:



Em relação aos métodos eletroquímicos, a maior parte deles combina a especificidade enzimática com a seletividade potenciométrica, onde o aumento na concentração de íons amônio, bicarbonato e hidroxila podem ser detectados por ISE sensíveis para os íons amônio^[94,95] e bicarbonato^[96], gases como amônia^[97-99] e pH, como os eletrodos de membrana de vidro^[100], óxido metálico^[101,102] e polipirrol^[103]. Algumas destas metodologias potenciométricas vem sendo associadas à técnicas dinâmicas de análise, como injeção em fluxo (FLA)^[104,105] e sequencial (SIA)^[106], onde bons resultados têm sido obtidos na determinação de uréia.

Referências

- [1] GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M.; Biochemistry, Saunders College Publishing, Orlando, p. 319, 180-182, 375-376, 491, 1995.
- [2] SUÑER, S. P.; Bioquímica, editorial Paz Montalvo, Madrid, p. 1017-1042, 1956.
- [3] SMITH, T.; U. S. Depart. Agriculture, Bureau Animal Industry, *Annual Reports*, p. 172, 1895.
- [4] HOLST, A.; FRÖLICH, T.; "Experimental Scurvy", *Zeitschr. Hygiene u. Infekt. Krankheiten* 72, 1-120, 1912.
- [5] CHICK, H.; HUME, E. M.; "Distribution among Foodstuffs (Especially those Suitable for the Rationing of Armies) of the Substances Required for Prevention of Beriberi and Scurvy", *J. Royal Army Med. Corps* 29, 121-159, 1917.

- [6] COHEN, B.; MENDEL, L. B.; "Experimental Scurvy of the Guinea Pig in Relation to the Diet", *J. Biol. Chem.* **35**, 425-453, 1918.
- [7] ZILVA, S. S.; "Antiscorbutic Fraction of Lemmon Juice", *Biochem. J.* **22**, 779-785, 1928.
- [8] SZENT-GYÖRGYI, A.; "Observation on the Fuction of Peroxidase Systems and the Chemistry of the Adrenal Cortex. Description of a New Carbohydrate Derivative", *Biochem. J.* **22**, 1387-1409, 1928.
- [9] TILLMANS, J.; HIRSCH, P.; "Vitamin C", *Biochem. Z.* **250**, 312-320, 1932.
- [10] SVIRBELY, J. L.; SZENT-GYÖRGYI, A.; "Hexuronic Acid as the Antiscorbutic Factor", *Nature* **129**, 576, 1932.
- [11] KING, C. G.; WAUGH, W. A.; "The Chemical Nature of Vitamin C", *Science* **75**, 357-358, 1932.
- [12] SZENT-GYÖRGYI, A.; HAWORTH, W. N.; "Hexuronic Acid (Ascorbic Acid) as the Antiscorbutic Factor", *Nature* **131**, 24, 1933.
- [13] HAWORTH, W. N.; HIRST, E. L.; "Synthesis of Ascorbic Acid", *Chem and Ind.*, 645-646, 1933.
- [14] REICHSTEIN, T.; GRUSSNER, A.; OPPENAUER, R.; "Synthesis of d- and l-Ascorbic Acid (Vitamin C)" *Nature* **132**, 280, 1933.
- [15] AULT, R. G.; BAIRD, D. K.; CARRINGTON, H. C.; HAWORTH, W. N.; HERBERT, R.; HIRST, E. L.; PERCIVAL, E. G. V.; SMITH, F.; STACEY, M.; "Synthesis of d- and l-Ascorbic Acid and Analogous Substances - Part II", *J. Chem. Soc.*, 1419-1423, 1933.
- [16] VOET, D.; VOET, J. G.; *Biochemistry*, John Wiley & Sons, pp. 160F, 251F, 536F, 1990.
- [17] COUNSELL, J. N.; HORNING, D. H.; *Vitamin C*, Applied Science Publishers: Barking, 1981.
- [18] CARPENTER, K. J.; *The History of Vitamin C and Scurvy*, Cambridge University Press: Cambridge, 1986.
- [19] SEIB, P. A.; TOLBERT, B. M.; *Ascorbic Acid: Its Chemistry, Metabolism and Uses*, *Advances in Chemistry Ser.* American Chemical Society: Washington, DC, 1982.
- [20] CLEMETSON C. A. B.; *Vitamin C*, CRC Press: Boca Raton, FL, 1989.
- [21] DAVIES, M. B.; PARTRIDGE, D. A.; AUSTIN, J.; *Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry*, Royal Society of Chemistry: London, 1991.
- [22] BAUERNFEIND, J. C.; PINKERT, D. M.; *Ascorbic Acid as an added Nutrient to Beverages*, Hoffmann-La Roche, Basle, p. 5, 1970.
- [23] WILSON, E. D.; SANTOS, A. C.; OLIVEIRA, J. E. D.; *Nutrição Básica*, Sarvier: São Paulo, p. 181, 1982.
- [24] TIETZ, N. W.; *Textbook of Clinical Chemistry*, W. B. Saunders Company: USA-Philadelphia, p. 1849, 1986.
- [25] HODGKINSON, A.; *Oxalic Acid in Biological and Medicine*, Academic Press: London, 1977.
- [26] *Farmacopéia Brasileira*, 3ª edição, Organização Andrei Editora S. A., São Paulo, p. 82-84, 1977.
- [27] ARYA, S. P.; MAHAJAN, M.; "Colorimetric Determination of Ascorbic Acid in Pharmaceutical Preparations and Biological Samples", *Mikrochim. Acta.* **127**, 45-49, 1997.
- [28] SZEPESI, G.; "New Method for Spectrophotometric Determinations of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid", *Fresenius Z. Anal. Chem.* **265**, 334-336, 1973.
- [29] HASSAN, S. S. M.; ABD EL FATLAH; M. M.; ZAKI, M. T. M.; "Spectrophotometric Determination of Vitamin-C in Citrus Fruits Using Peri-Naphthindan-2,3,4-Trione", *Fresenius Z. Anal. Chem.* **277**, 369-371, 1975.
- [30] KAMANGAR, T.; FAWZI, A. B.; MAGHSSOUDI, R. H.; "Rapid Spectrophotometric Determination of Ascorbic-acid in Citrus Fruits", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **60**, 528-530, 1977.
- [31] JASELSKIS, B.; NELAPATY, J.; "Spectrophotometric Determination of Micro Amounts of Ascorbic Acid in Citrus Fruits", *Anal. Chem.* **44**, 379, 1972.

- [32] DELAPORT, N.; MACHEIX, J. J.; "Above a Spectrophotometric Method for Ascorbic Acid Chlorogenic Acid and Catechins Titration in Apples", *Chim. Anal. - Paris* **50**, 187, 1968.
- [33] BAJAJ, K. L.; KAUR, G.; "Spectrophotometric Determination of L-Ascorbic Acid in Vegetables and Fruits", *Analyst* **106**, 117-120, 1981.
- [34] FUNG, Y. S.; LUK, S. F.; "Determination of Ascorbic Acid in Soft Drinks and Fruit Juices. Part 1. Background Correction for Direct Ultraviolet Spectrophotometry", *Analyst* **110**, 201-204, 1985.
- [35] FUNG, Y. S.; LUK, S. F.; "Determination of Ascorbic Acid in Soft Drinks and Fruit Juices. Part 2. Applicability of Direct Ultraviolet Spectrophotometry with Background Correction", *Analyst* **110**, 1439-1441, 1985.
- [36] VERMA K. K.; JAIN, A.; VERMA, A.; CHAURASIA, A.; "Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid in Pharmaceuticals by Background Correction and Flow-injection", *Analyst* **116**, 641-645, 1991.
- [37] JAIN, A.; CHAURASIA, A.; VERMA, K. K.; "Determination of Ascorbic Acid in Soft Drinks, Preserved Fruit Juices and Pharmaceuticals by Flow-injection Spectrophotometry: Matrix Absorbancy Correction by Treatment with Sodium Hydroxide", *Talanta* **42**, 779-787, 1995.
- [38] VUORELA, H.; HINKKANEN, R.; HITUNEN, R.; "Rapid Determination of Ascorbic Acid in Pharmaceuticals and Biological by HPLC", *Acta Pharm. Fenn.* **95**, 141-149, 1986.
- [39] ARCHER, A. W.; "Stability of Aqueous Solutions of Ascorbic Acid Prepared for Analysis by High Performance Liquid Chromatography", *J. Assoc. Public. Anal.* **19**, 91-93, 1981.
- [40] WIMALASIRI, P.; WILLS, R. B. H.; "Simultaneous Analysis of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Fruit and Vegetables by High Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.* **256**, 368-371, 1983.
- [41] DONER, L. W.; HICKS, K. B.; "High Performance Liquid Chromatographic Separation of Ascorbic Acid, Erythorbic Acid, Dehydroascorbic Acid, Dehydroerythorbic Acid, Diketogulonic Acid and Diketogluconic Acid", *Methods in Enzimology* **122**, 3-10, 1986.
- [42] LI, J.; SHEN, G.; YU, R.; "Reversible Potentiometric Ascorbic Acid Solid-state Membrane Sensor Based on 4,4',4'',4'''-Tetra-*tert*-butylphthalocyanine Cobalt (II)", *Analyst* **120**, 2259-2263, 1995.
- [43] LI, J.; HU, M.; YU, R.; "Pressed Pellet Solid Potentiometric Sensor for Ascorbic Acid Based on Derivatives of Cobalt (II) Phthalocyanine Doped with Iodine", *Sensors and Actuators B30*, 65-69, 1996.
- [44] JANDA, P.; WEBER, J.; DUNSCH, L.; LEVER, A. B. P.; "Detection of Ascorbic Acid Using a Carbon Fiber Microelectrode Coated with Cobalt Tetramethylpyridoporphyrine", *Anal. Chem.* **68**, 960-965, 1996.
- [45] CHEN, Z. L.; YU, J. C.; "Potentiometric Detection of Ascorbate Using a Graphite Carbon Electrode", *Talanta* **49**, 661-665, 1999.
- [46] WRING, S. A.; HART, J. P.; BIRCH, B. J.; "Voltammetric Behavior of Ascorbic Acid at a Graphite Epoxy Composite Electrode Chemically Modified with Cobalt Phthalocyanine and its Amperometric Determination in Multivitamin Preparations", *Anal. Chim. Acta* **229**, 63-70, 1990.
- [47] FOGG, A. G.; SUMMAN, A. M.; "Differential Pulse Polarographic Monitoring of Permitted Synthetic Food Coloring Matters and Ascorbic-acid in Accelerated Light Degradation Studies and the Spectrophotometric Determination of the Ammonia and Simpler Amines Formed", *Analyst*, **118**, 691-700, 1983.
- [48] CARSTON, D. H.; JONES, C. P.; WILLIAMS, D. E.; ELMURR, N.; "Microband Electrodes Fabricated by Screen Printing Processes - Applications in Electroanalysis", *Talanta* **38**, 17-26, 1991.
- [49] GREENWAY, G. M.; ONGOMO, P.; "Determination of L-Ascorbic Acid in Fruit and Vegetable Juices by Flow-injection with Immobilized Ascorbate Oxidase", *Analyst* **115**, 1297-1299, 1990.

- [50] HASEBE, Y.; AKIYAMA, T.; YAGISAWA, T.; UCHIYAMA, S.; "Enzyme-less Amperometric Biosensor for L-Ascorbate Using Poly-L-Histidine-Copper Complex as an Alternative Biocatalyst", *Talanta* **47**, 1139-1147, 1998.
- [51] OGATA, Y.; KOSUGI, Y.; MORIMOTO, T.; "Kinetics of the Cupric Salt-Catalysed Autoxidation of L-Ascorbic Acid in Aqueous Solutions", *Tetrahedron* **24**, 4057-4066, 1968.
- [52] OGATA, Y.; KOSUGI, Y.; "Solvent Effect on the Autoxidation of L-Ascorbic Acid", *Tetrahedron* **25**, 1055-1062, 1969.
- [53] KHAN, M. M. T.; MARTELL, A. E.; "Metal Ion and Metal Chelate Catalyzed Oxidation of Ascorbic Acid by Molecular Oxygen. I. Cupric and Ferric Ion Catalyzed Oxidation", *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 4176-4185, 1967.
- [54] DAVIES, M. B.; "Reactions of L-Ascorbic Acid with Transition Metal Complexes", *Polyhedron* **11**, 285-321, 1992.
- [55] Catalog Fluka Chemika-Biochemika Analytika, Fluka Chemie AG Industriestrasse 25 CH-9471 Buchs, Switzerland, p.156, 1995/96.
- [56] DEVLIN, T. M.; Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, John Wiley & Sons, Inc, N.Y., p. 544-547, 1992.
- [57] IWAMOTO, T.; YOSHIURA, M.; IRIYAMA, K.; "Urinary Uric Acid Determination by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection", *J. Liq. Chromatog.* **7**, 2253-2260, 1984.
- [58] IRIYAMA, K.; YOSHIURA, M.; IWAMOTO, T.; OSAKI, Y.; "Simultaneous Determination of Uric Acid and Ascorbic Acids in Human Serum by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection", *Anal. Biochem.* **141**, 238-243, 1984.
- [59] AOKI, T.; YOSHIURA, M.; IWAMOTO, T.; IRIYAMA, K.; "Postmortem Changes of Uric Acid in Various Rat Tissues: Determination of Uric Acid by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection", *Anal. Biochem.* **143**, 113-118, 1984.
- [60] IRIYAMA, K.; YOSHIURA, M.; IWAMOTO, T.; "Electrochemical Detection of Ascorbic and Uric Acids in the Eluate from Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography with Newly Developed Rigid Type Porous Polymer Packing (Polymetacrylate Gels)", *J. Liq. Chromatog.* **8**, 333-344, 1985.
- [61] YOSHIURA, M.; IRIYAMA, K.; "Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Uric Acids in Body Fluids by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection", *J. Liq. Chromatog.* **9**, 177-188, 1986.
- [62] PACHLA, L. A.; KISSINGER, P. T.; "Estimation of Serum Uric Acid by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection", *Clin. Chim. Acta* **59**, 309-312, 1975.
- [63] DÜERRE, P.; ANDREESSEN, J. R.; "Separation and Quantitation of Purines and their Anaerobic and Aerobic Degradation Products by High Pressure Liquid Chromatography", *Anal. Biochem.* **123**, 32-40, 1982.
- [64] SIEKMANN, L.; SIEKMANN, A.; MACKRODT, D.; JOHNNEN, C.; "Isotope Dilution - High Performance Liquid Chromatography as a New Technique for the Development of Reference Methods. Determination of Creatinine and Uric Acid in Human Serum", *Fresenius Z. Anal. Chem.* **324**, 279-280, 1986.
- [65] DÜLFFER, T.; HÄGELE, E.; TOWN, M. H.; ZIEGENHORN, J.; "Determination of Serum Uric Acid with HPLC and Column Switching", *Fresenius Z. Anal. Chem.* **324**, 333-334, 1986.
- [66] TOPP, H.; SANDER, G.; HELLER-SCHÖCH, G.; "A High Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Pseudopurine and Uric Acid in Native Human Urine and Ultrafiltrated Serum",

- Anal. Biochem.* **150**, 353-358, 1985.
- [67] YANG, S.; XU, J.; YANG, L.; MA, Y.; BAI, F.; "Simultaneous Determination of Uric Acid and Creatinine in Human Serum or Plasma by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography", *J. Liq. Chromatog.* **12**, 1791-1807, 1989.
- [68] ISMAIL, A. A. A.; DAKIN, T. A.; TOWARD, A.; "Definitive Assay for Urate in Serum - Gas-Chromatography and Characterization of Tetra-Ethyl Derivatives of Uric-acid", *Clin Chem* **21**, 1015, 1975.
- [69] MILAND, E.; ORDIERES, A. J. M.; BLANCO, P. T.; SMYTH, M. R.; FÁGAIN, C. O.; "Poly(*o*-aminophenol)-modified Bienzyme Carbon Paste Electrode for the Detection of Uric Acid", *Talanta* **43**, 785-796, 1996.
- [70] KUWABATA, S.; NAKAMINAMI, T.; ITO, S.; YONEYAMA, H.; "Preparation and Properties of Amperometric Uric Acid Sensors", *Sensors and Actuators B52*, 72-77, 1998.
- [71] ZHANG, Y.; SHEN, W.; GU, R.; ZHU, J.; XUE, R.; "Amperometric Biosensor for Uric Acid Based on Uricase-Immobilized Silk Fibroin Membrane", *Anal. Chim. Acta* **369**, 123-128, 1998.
- [72] ABAKSHINA, S. A.; ANISIMOVA, L. S.; NAZAROV, B. F.; BELIKHMAER, Y. A.; "Voltammetry of Uric Acid on Solid Electrodes", *J. Anal. Chem.* **49**, 886-889, 1994.
- [73] SHIRAISHI, H.; TAKAHASHI, R.; "Anodic Stripping Voltammetry of Uric Acid at Glassy Carbon Electrodes after Pre-Electrolysis in Solution Containing Copper(II)", *Anal. Sci.* **10**, 133-135, 1994.
- [74] ABAKSHINA, S. A.; ANISIMOVA, L. S.; SLIPCHENKO, V. F.; BELIKHMAER, Y. A.; "Determination of Uric Acid in Biological Media by Differential Voltammetry", *J. Anal. Chem.* **48**, 265-269, 1993.
- [75] SHIMOHIGOSHI, M.; KARUBE, I.; "Development of Uric Acid and Oxalic Acid Sensors Using a Bio-thermochip", *Sensors and Actuators B30*, 17-21, 1996.
- [76] MILLER, P.; OBERHOLZER, V.; "Dichlorobenzoquinone Chloroimine Colorimetry of Uric Acid in Urine", *Clin. Chem.* **36**, 668-669, 1990.
- [77] ELMOSALLAMY, M. A. F.; MOHAMED, R. A.; "A New Potentiometric Membrane Sensor Responsive to Uric Acid", *Anal. Letters* **30**, 2175-2187, 1997.
- [78] HASSAN, S. S. M.; RIZK, M. H.; "Miniaturized Graphite Sensors Doped with Metal-Bathophenanthroline Complexes for the Selective Potentiometric Determination of Uric Acid in Biological Fluids", *Analyst* **122**, 815-819, 1997.
- [79] CARROLL, J. J.; COBURN, H.; DOUGLASS, R.; BABSON, A. L.; "Simplified Alkaline Phosphotungstate Assay for Uric Acid in Serum", *Clin. Chem.* **17**, 158, 1971.
- [80] BULGER, H. A.; JOHNS, H. E.; "The Determination of Plasma Uric Acid", *J. Biol. Chem.* **140**, 427-440, 1941.
- [81] GRIFFITHS, M.; "Oxidation of Uric Acid Catalyzed by Copper and by the Cytochrome-Cytochrome Oxidase System", *J. Biol. Chem.* **197**, 399-407, 1952.
- [82] RAMANA, V. V.; SASTRY, K. S.; "Chromium Uric Acid Complexes as Growth Substrates and Inducers of Uricase in *Neuspora Crassa*", *J. Inorg. Biochem.* **50**, 107-117, 1993.
- [83] RAMANA, V. V.; SASTRY, K. S.; "Effect of Complexation to Cr(III) and Cu(II) on the Photochemical Decomposition of Uric Acid", *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **26**, 233-239, 1994.
- [84] LIDE, D. R.; Handbook of Chemistry and Physics, 78th, p. 7-3, 1997-1998.
- [85] THOMAS, L. C.; CHAMBERLIN, G. J.; Colorimetric Chemical Analytical Methods, 9th Edition, The Tintometer Ltd., Salisbury: England, 1980.
- [86] KOSSEL; DAKIN; *Zeitschr. Physiol. Chemie.* **41**, 321, 1904.
- [87] ALLINGER, N.; CAVA, M. P.; DE JONGH, D. C.; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L.;

Química Orgânica, 2ª edição, Ed. Guanabara Dois: Rio de Janeiro, p. 8, 1978.

- [88] FOSSE, R.; ROBYN, A.; FRANÇOIS, F.; "Quantitative Analysis of Urea in Blood", *Compt. Rend.* **159**, 367-369, 1914.
- [89] FEARON, W. R., "The Carbamido Diacetyl Reaction: A Test for Citrulline", *Biochem. J.* **33**, 902-907, 1939.
- [90] DENIEVES, G; PIKE, R. L.; "An Ultramicro Method for Determination of Urea Nitrogen in Blood Serum", *Anal. Biochem.* **2**, 174, 1961.
- [91] HANSS, M.; REY, A.; "Application de La Conductimétrie a L'Étude des Réactions Enzymatiques: Systeme Urée-Uréase", *Biochim. Biophys. Acta* **227**, 630-638, 1971.
- [92] VOGEL, A. I.; *Análise Inorgânica Quantitativa*, 4ª edição, Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, p. 543, 1981.
- [93] BERTHELOT, M.; *Repert. Chim. Appl.* **1**, 284, 1859.
- [94] MARTÍNEZ-FÀBREGAS, E.; ALEGRET, S.; "A Practical Approach to Chemical Sensors through Potentiometric Transducers. Determination of Urea in Serum by Means of a Biosensor", *J. Chem. Educ.* **71**, A67-A70, 1994.
- [95] GUILBAULT, G. G.; NAGY, G.; KUAN, S. S.; "An Improved Electrode for the Assay of Urea in Blood" *Anal. Chim. Acta* **67**, 195-201, 1973.
- [96] WALCERZ, I.; KONCKI, R.; LESZCZYŃSKA, E.; SALAMONOWICZ, B.; GŁĄB, S.; "Urea Biosensors Based on PVC Membrane Ion-Selective Electrodes", *Anal. Letters* **29**, 1939-1953, 1996.
- [97] MASCINI, M.; GUILBAULT, G. G.; "Urease Coupled Ammonia Electrode for Urea Determination in Blood Serum", *Anal. Chem.* **49**, 795-798, 1977.
- [98] JOSEPH, J. P.; "An Enzyme Microsensor for Urea Based on an Ammonia Gas Electrode"; *Anal. Chim. Acta* **169**, 249-256, 1985.
- [99] LIU, B.; HU, R.; DENG, J.; "Studies on a Potentiometric Urea Biosensor Based on an Ammonia Electrode and Urease, Immobilized on a γ -Aluminum Oxide Matrix", *Anal. Chim. Acta* **341**, 161-169, 1997.
- [100] KUMARAN, S; MEIER, H; DANNA, A. M.; TRANMINH, C.; "Immobilization of Thin Enzyme Membranes to Construct Glass Enzyme Electrodes", *Anal. Chem.* **63**, 1914-1918, 1991.
- [101] ALEXANDER, P. W.; JOSEPH, J. P.; "A Coated-Metal Enzyme Electrode for Urea Determinations", *Anal. Chim. Acta* **131**, 103-109, 1981.
- [102] IANNIELLO, R. M.; YACYNYCH, A. M.; "Urea Sensor Based on Iridium Dioxide Electrodes with Immobilized Urease", *Anal. Chim. Acta* **146**, 249-253, 1983.
- [103] HERNÁNDEZ, E. C.; WITKOWSKI, A.; DAUNERT, S.; BACHAS, L. G.; "Potentiometric Enzyme Electrode for Urea Based on Electrochemically Prepared Polypyrrole Membranes", *Mikrochim. Acta* **121**, 63-72, 1995.
- [104] WALCERZ, I.; GŁĄB, S.; KONCKI, R.; "Potentiometric Enzyme Electrode in a Flow Injection System for the Determination of Urea in Human Serum Samples", *Anal. Chim. Acta* **369**, 129-137, 1998.
- [105] ROVER JR., L.; DE OLIVEIRA NETO, G.; LIMA, J. L. F. C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; SILVA, V. L.; "Potentiometric FIA System with Reactor Based on Natural Urease Source and Tubular Detector of Ammonium Ions. Determination of Urea in Fertilizers", *Anal. Sci.* **13**, 589-594, 1997.
- [106] NOGUEIRA, A. R. A.; REIS, B. F.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; ARAÚJO, A. N.; LIMA, J. L. F. C.; "Sequential Injection System for Potentiometric Determination of Urea in Wines with Immobilized Enzyme", *Book of Abstracts, Flow Analysis VII, Piracicaba, August 25-28*, p. 152, 1997.

A Potenciometria e os ISE Desenvolvidos

A potenciometria é uma técnica bem conhecida dos químicos, sendo os ISE, somente uma pequena parte deste campo da eletroanalítica. A base da potenciometria foi estabelecida em 1888 por Nernst, descrevendo a origem do potencial de eletrodo entre um metal e uma solução contendo íons deste metal, e o potencial redox entre um metal inerte e uma solução contendo um sistema redox^[1]. O primeiro sensor potenciométrico utilizado para medida da acidez de soluções aquosas foi o eletrodo de hidrogênio. Ele foi proposto por Nernst em 1897^[2], mas devido à sua complexidade não tinha finalidade prática. Em 1906, Cremer^[3] desenvolveu o eletrodo de vidro para as medidas de acidez, sendo posteriormente aperfeiçoado por Haber e Klemensiewicz^[4]. Em 1909, Sørensen definiu a escala de pH, devido a necessidade de determinar a influência da acidez sobre uma série de reações enzimáticas^[5]. Quase ao mesmo tempo, em 1935, as empresas Beckman e Radiometer comercializaram, o primeiro medidor de pH^[6,7], provavelmente, inspiradas no trabalho de Elder e Wright^[8] sobre medidas de pH com eletrodo de vidro e potenciômetro de tubo à vácuo. A cooperação entre indústria e academia contribuiu para desenvolvimento da potenciometria, tornando-a uma técnica consagrada e focada na medida de pH^[9]. Apesar de a potenciometria ter surgido no fim do século XIX, a era de ouro dos ISE ocorreu a partir de 1957, com os trabalhos teóricos de Eisenman e Nikolski^[10,11]. A primeira grande revolução na construção dos ISE pode ser atribuída a Ross^[12-14]. Em 1966, trabalhando para a empresa Orion, ele propôs um novo conceito de eletrodo para cálcio, o de membrana líquida, e posteriormente desenvolveu em conjunto com Frant^[13], o que seria um dos ISE mais empregados mundialmente até hoje depois do eletrodo de vidro, o eletrodo de fluoreto à base de cristal de LaF₃. Concomitantemente, Stefanac e Simon^[15,16] descobriram a possibilidade de utilizar polipeptídeos como materiais eletroativos, denominados de carregadores neutros, sendo o mais utilizado, a valinomicina para a elaboração do ISE de potássio. A segunda revolução ocorreu em 1970, na Inglaterra, com Moody, Oke e Thomas^[17], que usaram pela primeira vez, eletrodos de membrana líquida à base do polímero PVC. A introdução de PVC como material de membrana simplificou muito a construção dos ISE. A importância destes trabalhos é demonstrada pelo fato de que o ISE-K baseado em valinomicina e matriz de PVC é atualmente, utilizado em quase todos os analisadores clínicos comercializados^[9]. Dentro desse contexto, a invenção do ISE-Enzimático^[18],

causou a terceira grande revolução nos ISE, permitindo que os sensores potenciométricos pudessem ser utilizados na medida de substâncias biológicas não iônicas. Estes dispositivos, comumente designados como biossensores, se baseiam na imobilização de um material biologicamente ativo, em geral enzimas, sobre a superfície de um transdutor, neste caso, um ISE que responda para a espécie formada na reação enzimática. Finalmente, pode-se considerar que a última revolução dos ISE ocorreu com o desenvolvimento do transistor de efeito de campo sensível a íon (ISFET)^[19]. A importância dos ISFET pode ser atribuída à sua capacidade de miniaturização e a possibilidade de usar os processos da microeletrônica na sua microfabricação. Isto permitiria a produção em massa destes sensores, os quais poderiam ser empregados na monitoração de espécies de interesse *in vivo*^[20]. Uma cronologia do desenvolvimento dos eletrodos íon-seletivo está apresentada na Fig. 2.1.

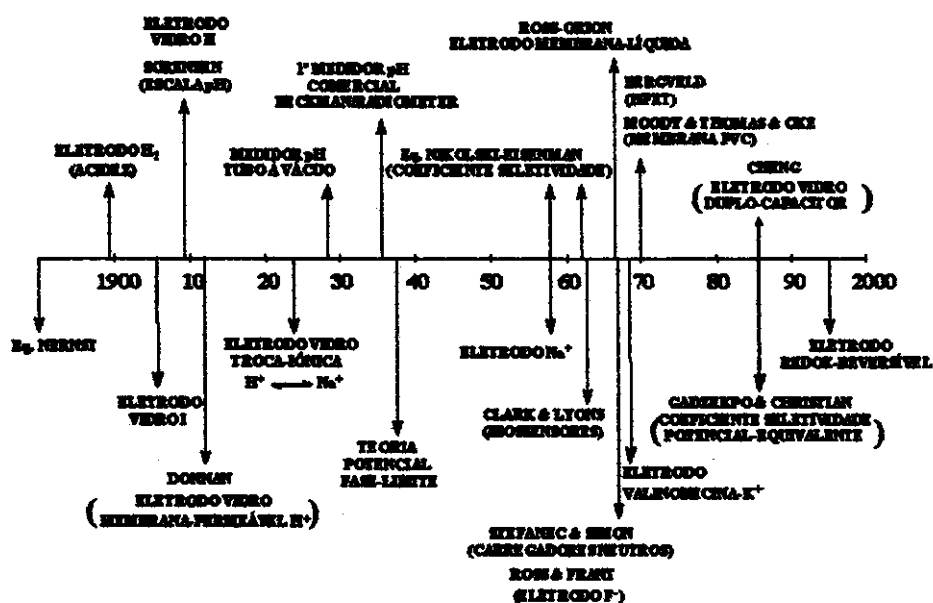


Fig. 2.1 Cronologia do desenvolvimento da potenciometria e dos eletrodos íon-seletivo.

A história da potenciometria e dos ISE é bem mais ampla do que aqui abordada, maiores detalhes podem ser obtidos nos artigos de Janata^[20], Thomas^[21], Frant^[22,23], Ruzicka^[9] e Pungor^[24] ou em monografias^[25] sobre o assunto.

É interessante observar, que durante quase um século desde o aparecimento do eletrodo de vidro^[3], surgiram muitas controvérsias para se explicar o mecanismo de funcionamento dos ISE baseados em membranas. Inicialmente, o mecanismo mais difundido era aquele baseado no potencial de Donnan^[26], onde uma distribuição desigual de íons entre duas fases separadas por uma membrana semi-permeável ocorria quando os íons eram capazes de permear a membrana, provocando assim, um equilíbrio eletroquímico e conseqüentemente, um potencial elétrico era estabelecido entre os dois lados da membrana. Contudo, o mecanismo mais difundido foi o baseado na teoria de troca iônica

entre os íons Na^+ na camada de gel da membrana de vidro com os íons H^+ na solução^[27,28]. Em 1935/36, Teorell^[29], Meyer e Sievers^[30] provaram que o mecanismo de troca iônica não poderia explicar o desenvolvimento do potencial num ISE, e propuseram o potencial de fase-limite (*boundary-potential*). No entanto, eles mantiveram os conceitos teóricos de membrana porosa contendo cargas em sítios fixos. Posteriormente, Pungor e Tóth^[31] assumiram que o potencial se desenvolvia somente na superfície do eletrodo. Atualmente, o conceito da dupla-camada elétrica e duplo capacitor, com ênfase na interface eletrodo-solução tem sido a proposta mais recente para explicar o desenvolvimento do potencial elétrico nos ISE^[29]. Assim, os princípios básicos de funcionamento de um ISE estão diretamente associados com o que ocorre na interface eletrodo-solução.

2.1 A Interface Eletrodo-solução

Os modelos de interface eletrodo-solução foram inicialmente desenvolvidos para compreender os processos que ocorrem nas técnicas voltamétricas, onde o potencial é aplicado ao eletrodo de trabalho. A constante de proporcionalidade entre o potencial aplicado e a carga devida às espécies ordenadas na região interfacial na solução é a capacitância desta camada. Esta constante pode ser medida por técnicas de impedância^[32], mas no início era feita por eletrocapilaridade, essencialmente desenvolvida para o eletrodo de mercúrio e baseada na medida da tensão superficial. Os resultados obtidos com as técnicas de eletrocapilaridade aplicada ao eletrodo de mercúrio foram as bases para a elaboração dos primeiros modelos teóricos que tentavam prever as curvas de capacitância diferencial em função do potencial aplicado para diferentes concentrações de eletrólito (NaF) e as de tensão superficial em função da variação de potencial.

O primeiro modelo para descrever o comportamento na interface eletrodo-solução foi sugerido por Helmholtz^[33,34]. Nele as cargas positivas e negativas estavam ordenada de um modo rígido nos dois lados da interface, o que deu origem à designação de camada compacta. Este modelo também foi desenvolvido paralelamente por Perrin, e sua análise é comparável ao funcionamento de um capacitor de placas paralelas. No entanto, este modelo não levava em consideração as interações que ocorriam além da primeira camada de íons adsorvidas e não previa a variação da capacitância diferencial (C_d) com o potencial, nem a dependência do potencial com a concentração^[35]. Entre 1910 e 1913, Gouy e Chapman^[36,37] desenvolveram independentemente, um modelo de dupla camada onde consideravam que o potencial e a concentração influenciavam a capacitância da dupla camada, assim, esta não seria compacta como na descrição de Helmholtz-Perrin, mas de espessura variável, estando os íons livres para se movimentarem. No entanto, este modelo, denominado de carga-difusa, apesar de não explicar integralmente os dados experimentais, foi a primeira contribuição na qual todos os aspectos essenciais da interface eletrodo-solução foram considerados. Em 1924, Stern^[38] combinou o modelo proposto por Helmholtz-Perrin, da camada compacta de íons com o de Gouy-Chapman,

onde os íons estão dispersos na solução como uma nuvem em desordem térmica. As equações que descrevem o modelo misto envolvem contribuições individuais dos modelos de Helmholtz-Perrin e Gouy-Chapman. Considerando inicialmente, a região linear devida a Helmholtz-Perrin, tem-se pela equação de Lippman, que relaciona a tensão superficial (γ) e as mudanças de potencial na interface (ϕ)^[32,35]:

$$\frac{\partial \gamma}{\partial \phi} = -q_M = q_S \quad (2.1)$$

onde q é a carga no metal (M) e na solução (S).

Levando-se em conta que o potencial num capacitor de placas paralelas é dado por^[35]:

$$d\phi = \frac{d}{A\epsilon} dq \quad (2.2)$$

onde d e A são a distância entre as placas e a área das mesmas, respectivamente; q a carga do capacitor e ϵ é a constante de permissividade do material entre as placas (Faraday m^{-1} ou $C^2N^{-1}m^{-2}$).

Logo, admitindo-se a equivalência entre a interface eletrificada na dupla camada e a teoria eletrostática para os capacitores de placas paralelas, pode-se postular o modelo de Helmholtz-Perrin. Substituindo na Eq. 2.1 para uma variação de potencial num determinado instante, e integrando, tem-se:

$$\int_{\gamma_{\max}}^{\gamma} d\gamma = -\frac{d}{A\epsilon} \int_0^{q_M} q_M dq_M \quad (2.3) \quad \therefore \gamma + cte = -\frac{d}{A\epsilon} \frac{1}{2} q_M^2 \quad (2.4)$$

Quando a carga no metal é igual a zero, a tensão superficial é máxima e então esta varia com o potencial de acordo com^[35]:

$$\gamma = \gamma_{\max} - \frac{d}{A\epsilon} \frac{1}{2} q_M^2 \quad (2.5)$$

$$\text{ou} \quad \gamma = \gamma_{\max} - \frac{A\epsilon}{d} \frac{1}{2} \phi^2 \quad (2.6)$$

sendo a Eq. 2.6 obtida da substituição de 2.2 em 2.5.

Como consequência do modelo de Gouy-Chapman, a carga na solução no modelo de Stern é dada por:

$$q_S = q_{HP} + q_{GC} \quad (2.7)$$

onde q_s é a carga na solução, q_{HP} é a carga devida ao modelo de Helmholtz-Perrin e q_{GC} é a carga devida ao modelo de Gouy-Chapman.

Isto implica em dois potenciais, o primeiro devido ao metal (ϕ_M) e ao plano de Helmholtz-Perrin (ϕ_{HP}), e o segundo potencial devido à carga na solução (ϕ_S). De maneira geral seria:

$$\phi_M - \phi_S = (\phi_M - \phi_{HP}) + (\phi_{HP} - \phi_S) \quad (2.8)$$

A distinção entre $(\phi_M - \phi_{HP})$ e $(\phi_{HP} - \phi_S)$ é a síntese dos modelos da camada compacta com o da difusa. Assim, no modelo de Stern, a variação de potencial que cruza uma interface, consiste de duas regiões, uma linear correspondente aos íons em contato com o eletrodo ($\phi_M - \phi_{HP}$) e uma exponencial ($\phi_{HP} - \phi_S$), correspondendo aos íons que sofrem a influência combinada da força elétrica ordenada com a desordem das forças térmicas^[32,35]. Porém, outra consequência do modelo de Stern é que a interface eletrificada é equivalente a dois capacitores em série. Logo a capacitância diferencial é dada por^[35]:

$$\frac{1}{C_d} = \frac{1}{C_{HP}} + \frac{1}{C_{GC}} \quad (2.9) \quad \therefore \quad \frac{1}{C_d} = \frac{x_H}{\epsilon_r \epsilon_0} + \frac{1}{\sqrt{2\epsilon_r \epsilon_0 z^2 e_0^2 n_i^0 / k_B T} \cosh(ze_0 \phi_A / 2k_B T)} \quad (2.10)$$

onde ϵ_r é a constante de permissividade relativa que é suposto não variar com a distância e ϵ_0 constante de permissividade no vácuo e vale $8,85 \times 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$; x_H é a distância de aproximação máxima das cargas, as quais por serem tratadas como cargas pontuais correspondem ao raio iônico; z é a carga do íon; e_0 é a carga do elétron; n_i^0 é a concentração numérica de íons no interior da solução; k_B é a constante de Boltzman ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$); T a temperatura (K); ϕ_A é o potencial quando a distância entre a interface eletrodo-solução é zero.

Assim, a variação da capacitância diferencial com o potencial obedece a dois casos:

- Próximo de E_z , $C_{HP} \gg \gg C_{GC}$ e $C_d \approx C_{GC}$;
- Afastado de E_z , $C_{HP} \ll \ll C_{GC}$ e $C_d \approx C_{HP}$.

sendo que E_z é o potencial quando a carga é zero.

Para o caso de soluções concentradas, a capacitância da interface é efetivamente igual a capacitância prevista pelo modelo de Helmholtz-Perrin (C_{HP}). Isto significa que a maior parte da carga na solução está comprimida dentro do plano de Helmholtz-Perrin, ou seja, pouca carga está dispersa na solução concentrada. Quando a solução é diluída (concentração baixa) a capacitância torna-se essencialmente devida ao modelo proposto por Gouy-Chapman, onde a carga dispersa na solução sofre influência simultânea das forças elétricas e térmicas. Contudo, o modelo de Stern, nada mais é que uma consideração dos modelos da camada compacta e difusa, sendo uma boa aproximação para o eletrodo de mercúrio, porém, ele não previa o comportamento de outros eletrodos, principalmente os sólidos^[32], além de não levar em consideração a influência das moléculas do solvente^[35]. Outro modelo foi então proposto em 1947, por Grahame^[39]. Este modelo era constituído de três regiões e a principal diferença entre ele e o anterior é a adsorção específica. Um íon especificamente adsorvido

perde sua solvatação aproximando-se mais da superfície do eletrodo. Além disso, o íon pode ter a mesma carga do eletrodo ou oposta, mas a interação é forte. Baseado neste modelo, Bockris, Devanathan e Müller^[40] propuseram um modelo mais preciso. Em solventes dipolares, como a água, existe uma interação entre eletrodos e dipolos. Um fato que corrobora isto, é que a concentração do solvente é muito maior que a concentração do soluto. No caso da água, a concentração é de 55,5 mol L⁻¹. Este modelo mostra a predominância de moléculas da água próximo à interface eletrodo-solução (Fig. 2.2). Os dipolos se orientam de acordo com a carga do eletrodo, formando uma camada com os íons adsorvidos. Considerando o eletrodo como um “íon gigante”, as moléculas do solvente formam a sua primeira camada no plano interior de Helmholtz (IHP), que é o plano passando através dos dipolos e dos íons especificamente adsorvidos no eletrodo. O plano exterior de Helmholtz (OHP) refere-se a adsorção de íons solvatados, que seria devido a uma segunda camada de solvatação e fora deste viria a camada difusa. Neste modelo foi definido um novo plano, o de cisalhamento, que poderia coincidir ou não com o OHP. Este plano, importante na compreensão dos efeitos electrocinéticos limita a região onde a fixação rígida de íons devido à carga do eletrodo pára de operar. O potencial deste plano é denominado de zeta ou electrocinético (ζ).

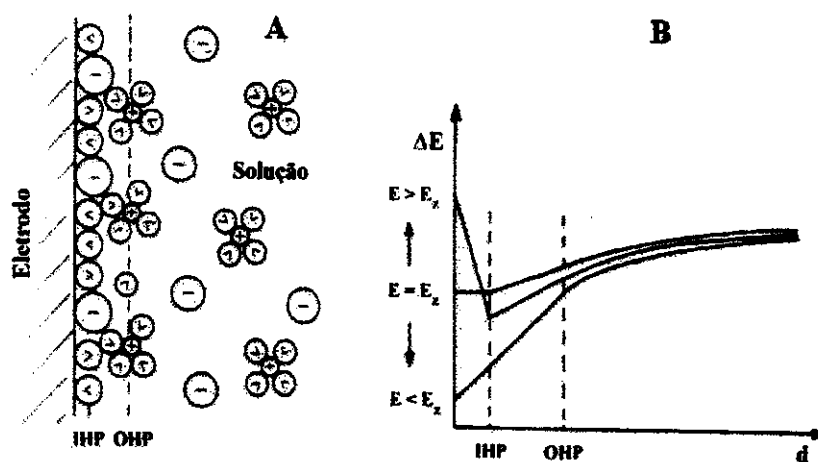


Fig. 2.2 A. Modelo de Bockris *et al.* para representar a dupla camada, com a distribuição dos íons e moléculas do solvente (o símbolo $\odot$ representa a molécula de água); B. Variação do potencial eletrostático em função da distância ao eletrodo. Adaptado da referência [32].

Os modelos apresentados anteriormente dão ênfase às considerações eletrostáticas, no entanto, os mais recentes levam também em consideração a distribuição eletrônica do átomo no eletrodo, relacionando com a sua função trabalho. Modelos deste tipo foram primeiro desenvolvidos por Damaskin e Frumkin^[41] e só foram possíveis depois de uma série de estudos com eletrodos sólidos.

Por outro lado, a região interfacial de um metal até o IHP tem sido considerada como um capacitor eletrônico molecular^[32] e este modelo tem explicado muitos resultados experimentais. Outro modelo importante é o de "Jellium", onde os defeitos da face cristalográfica e a diferença entre metais demonstram que o decaimento de todo o potencial a partir da interface eletrodo-solução para o interior da solução está incorreto. O potencial começa a decair ainda no interior do eletrodo e reflete o fato de os elétrons do sólido penetrarem uma pequena distância na solução devido as propriedades ondulatórias do elétron. Neste modelo, o potencial de Galvani ou elétrico interior (ϕ) e o potencial de Volta ou elétrico exterior (Ψ), que é o potencial fora da distribuição eletrônica do eletrodo ($\cong$ no IHP a 10^{-5} cm da superfície) são distintos um do outro. A diferença entre estes potenciais é o potencial de superfície (χ)^[32]. Recentemente, Gonzalez e Sanz^[42] propuseram uma nova teoria sobre a camada difusa levando em consideração os potenciais químicos das espécies iônicas na solução. Damaskin e Grafov^[43] testaram esta nova teoria com os dados experimentais obtidos para capacitância do eletrodo de mercúrio em soluções aquosas de sulfato de sódio ou lantânio, e os dados concordaram melhor com o novo modelo do que o proposto por Gouy-Chapman-Grahame-Bockris.

O conceito da estrutura da dupla camada ainda não está bem estabelecido e vários estudos vêm sendo realizados para compreendê-la^[44-49]. Brett *et al.*^[32] descrevem as técnicas espectroscópicas *in situ*, como infravermelho e Raman, como as principais técnicas que podem contribuir para uma melhor compreensão da interface eletrodo-solução. Por outro lado, vários pesquisadores têm estudado ISE de estado sólido e com trocadores iônicos ou preparados a partir de carregadores neutros (ionóforos) incorporados em matriz de PVC com plastificante, através de técnicas de impedância^[50-53]. Estas medidas revelaram primeiramente a resistência devido ao tamanho do eletrodo e a capacitância da membrana. Outras técnicas de perturbação elétrica têm sido utilizadas para estudar os ISE, como a cronopotenciometria^[54,55] e cronoamperometria^[56,57], esta última principalmente para investigar as membranas preparadas com PVC e plastificante, enquanto que a voltametria cíclica tem sido muito empregada nos estudos de transferência iônica interfacial por carregadores neutros^[58,59]. Estudos mais recentes levam em consideração a teoria aplicada aos semicondutores^[32], onde circuitos eletrônicos equivalentes têm sido propostos para interpretar a interface de ISE elaborados em semicondutores, como por exemplo, para íons potássio, baseados em valinomicina-platificante-PVC recobrimdo eletrodos de Si com finas camadas de $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{SiO}_2$ ^[60]. A técnica de perturbação da concentração, denominada de medida do tempo de resposta, também têm sido muito empregada nos estudos com ISE^[61-63].

2.2 A Medida de Potencial

O método potenciométrico envolve a medida do potencial elétrico relativo desenvolvido na interface entre dois eletrodos e uma solução. A medida deste é feita quase na ausência de corrente

elétrica, através de um sistema de interfaces ou célula eletroquímica, sendo esta composta de dois eletrodos, um de referência e um indicador (sensível à espécie de interesse), os quais são imersos na solução amostra. Na prática, não é possível medir a diferença de potencial (ddp) absoluta que cruza uma interface eletrodo-solução e somente a ddp relativa, pois o processo por si mesmo, isto é, a imersão do eletrodo na solução, introduz diferenças de potencial, as quais são também medidas. Estas diferenças de potenciais podem ser atribuídas ao potencial de junção líquida que ocorre nas interfaces com concentrações diferentes de eletrólito de mesma natureza. Por exemplo, no caso de duas soluções de HCl, uma 0,1 e a outra 0,01 mol L⁻¹, separadas por uma membrana porosa, haverá tendência de difusão dos íons H⁺ e Cl⁻ da solução mais concentrada para a mais diluída. Como a mobilidade dos íons H⁺ é cerca de cinco vezes maior que a dos íons Cl⁻, eles se difundem mais rapidamente, fazendo com que a transferência de cargas da solução mais concentrada para a mais diluída resulte no aparecimento de um potencial de junção da ordem de + 40 mV. Daí a necessidade das medidas potenciométricas serem realizadas com um eletrodo de referência, onde são em geral, preenchidos com solução de KCl saturado (4,2 mol L⁻¹ a 25 °C), pois a mobilidade dos íons cloreto é apenas ligeiramente maior do que a dos íons potássio e assim, o potencial de junção é apenas da ordem de -1 mV. Outro fator é o potencial de assimetria devido à irregularidade na construção da membrana^[64].

A medida de potencial não pode ser realizada com simples voltímetros. Estes aparelhos drenam uma quantidade de corrente substancial (≈ 1 mA), e desde que o potencial na interface depende da corrente que passa através dela, esta situação pode originar reações químicas na superfície do eletrodo, onde a utilização do instrumento afeta e muda a quantidade que está sendo medida. Esta medida é então realizada com milivoltímetros que apresentam uma alta impedância de entrada e requerem por isto, correntes da ordem de 10⁻¹² A. Alternativamente, um simples circuito de compensação, um galvanômetro ligado em série com uma resistência elevada (≈ 1 M Ω), também pode ser utilizado na medida do potencial de células eletroquímicas com eletrodos íon-seletivo. Neste caso o potencial da cela eletroquímica é balanceado contra uma fonte de potencial externa até que a corrente que atravessa o galvanômetro seja nula^[64].

O equipamento utilizado para realizar a medida de potencial (Fig. 2.3) é denominado de potenciômetro ou de maneira mais atual, analisador de íons. Ele permite que as medidas sejam feitas na escala de milivolts (mV), em pX (-log da atividade de um íon), ou ainda em unidades de concentração, após a devida calibração.

O potencial mensurável é composto de vários componentes e esquematicamente pode ser representado como:

Eletrodo A / eletrólito 1 // eletrólito 2 / Eletrodo B

$$E = E_{ind} + E_j - E_{ref}$$

onde, E é o potencial medido, E_{ind} é o potencial do eletrodo indicador, E_j é o potencial de difusão da junção líquida e E_{ref} é o potencial do eletrodo de referência.

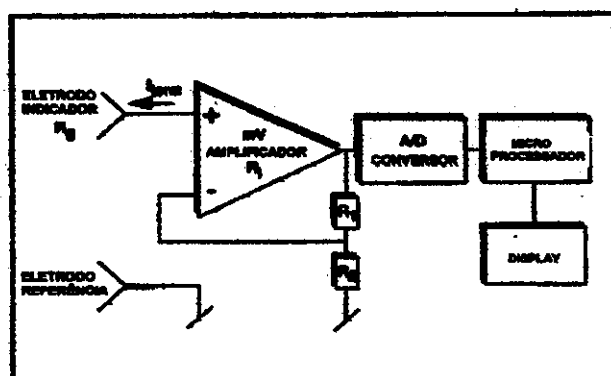


Fig. 2.3 Circuito de um típico analisador de íons. I_{ion} é a corrente enviada pelo amplificador operacional. Quando $R_i \gg R_r$, $I_{ion} = 10^{-12}$ A, e pela Lei de Ohm o $V_{out} = 10^{-12} \text{ A} \times 10^8 \Omega = 10^{-4} \text{ V} = 0,1 \text{ mV}$.

2.2.1 Os Eletrodos de Referência

A medida potenciométrica sempre é feita com dois eletrodos, sendo que um deles, deve manter um potencial constante e estável em função do tempo, independente das propriedades da solução no qual está imerso. Este eletrodo é denominado de referência, o qual será sempre o fator de comparação do eletrodo indicador. Os dois eletrodos mais utilizados como referência são o de calomelano saturado e o de Ag/AgCl. Na construção do eletrodo de calomelano é adicionado uma quantidade de cloreto mercurioso e no de Ag/AgCl, cloreto de prata, para manter o eletrólito saturado, aumentando assim o tempo de vida destes eletrodos. O eletrodo de Ag/AgCl apresenta algumas vantagens em relação ao de calomelano, como baixa histerese e pequeno coeficiente de temperatura. O eletrodo de calomelano saturado, bem como o de Ag/AgCl respondem à atividade do íon cloreto. Assim, quando estes eletrodos são utilizados em medidas em que o íon cloreto do eletrólito pode interferir, uma ponte salina com uma solução que não apresente problemas de interferência pode ser usada ou um eletrodo de dupla-junção. Entretanto deve-se tomar o cuidado para que o potencial de junção não seja crítico para as medidas, de modo que este potencial de difusão deva ser mantido o menor possível e constante.

2.2.2 Os Eletrodos Indicadores

O eletrodo indicador geralmente interage com uma dada espécie, desenvolvendo um potencial de interface, que reflete a sua atividade (concentração). Em potenciometria é desejável que o eletrodo indicador responda de maneira seletiva a uma determinada espécie e que outros compostos não interfiram na medida. Estes eletrodos são normalmente chamados de íon-seletivo. Na atualidade, os

mais diversos tipos de eletrodos podem ser encontrados para uma grande variedade de espécies, mas existem alguns que se destacam pelo seu grande emprego como os eletrodos de fluoreto, cálcio, potássio, o de platina e o de vidro. Os eletrodos indicadores são classificados em dois grupos: os eletrodos metálicos, que podem ser de 1ª classe, 2ª classe ou inerte para sistemas redox e os de membrana.

O potencial do eletrodo indicador é dependente da atividade ou concentração efetiva do íon de interesse. A relação matemática entre a atividade do íon na solução e o potencial desenvolvido no ISE é definida pela equação de Nernst.

2.2.2.1 A Equação de Nernst: Princípios Cinéticos

Agora procurar-se-á estabelecer as funções matemáticas que descrevem o método potenciométrico. As deduções a seguir são válidas para um eletrodo metálico, porém, são extensíveis aos eletrodos de membrana.

Ao introduzir-se um eletrodo metálico numa solução eletrolítica contendo íons deste metal, no instante da imersão o metal está eletricamente neutro, uma vez que a carga total no metal é nula ($q_M = 0$) e também não há excesso de carga na solução ($q_s = 0$). Assim, na interface, a ddp bem como o campo elétrico são nulos, desprezando-se é claro a orientação preferencial dos dipolos da água. A espontaneidade de uma dada reação à transferência eletrônica depende do sistema está em um estado de equilíbrio ou não, isto é, para que não ocorra transferência de carga através da interface, o sistema deve estar no estado de energia livre mínimo, o que corresponde à igualdade dos potenciais eletroquímicos das espécies na solução (s) e no eletrodo (e) que podem passar através da interface^[69]:

$$(\bar{\mu}_i)_s = (\bar{\mu}_i)_e \quad (2.11)$$

O potencial eletroquímico é o trabalho total necessário para transportar um mol de uma dada substância desde o infinito até um ponto no interior da interface. Ao tratarmos de uma interface eletrodo-solução, segundo o modelo de dupla camada elétrica e se a partícula em estudo for carregada, haverá influência das cargas positivas e negativas da interface, bem como dos dipolos do solvente. Logo, o trabalho total executado será a soma do trabalho elétrico com o químico, sendo este último devido as interações íon-solvente, íon-íon e solvente-solvente. Então, o potencial eletroquímico da espécie (i) será^[69]:

$$\bar{\mu}_i = \mu_i + zF\Delta\phi \quad (2.12)$$

onde $\Delta\phi$ é a diferença de potencial da interface eletrificada.

Assim, o gradiente de potencial eletroquímico dá origem ao transporte de espécies com carga, por meio de um mecanismo envolvendo difusão e condução dos íons da solução. Se o campo elétrico é nulo, a igualdade dos potenciais eletroquímicos resume-se à igualdade dos potenciais químicos, e estando a interface em equilíbrio, os potenciais químicos da espécie (i) são iguais em ambos os lados

da interface. Seguindo este raciocínio, será considerado por simplicidade que o íon positivo, A^+ , move alguns ângstrons através da dupla camada, vindo da solução para a superfície do metal. Não é importante saber se os elétrons movem-se do eletrodo para a interface com a solução ou se os íons carregados movem-se da solução para o eletrodo, uma vez que a corrente tem formalmente o mesmo sentido. Embora se trate de um fenômeno eletroquímico, em que a reação química implica na formação de um campo elétrico e este influencia a mesma, considerar-se-á no início somente o processo químico, sendo posteriormente adicionado o efeito do campo elétrico. A medida que um íon se move para a superfície do eletrodo, sua energia potencial varia e a transferência de carga ocorre depois que o íon positivo vence a energia de ativação necessária. Este mecanismo mostra que a frequência ($\bar{f}$) com que o íon salta a barreira de energia por difusão, é dada por^[65]:

$$\bar{f} = \frac{kT}{h} e^{-(\Delta G^0)/RT} \quad (2.13)$$

onde k é a constante de Boltzman, h a constante de Planck e ΔG^0 , a variação de energia livre padrão necessária para o íon alcançar a energia de ativação em campo elétrico nulo.

Ao multiplicarmos esta frequência pela concentração do íon A^+ (C_{A^+}) na interface, obtém-se a velocidade de reação de redução em um campo elétrico nulo^[65]:

$$\bar{v}_c = \frac{\Delta c_{A^+}}{\Delta t} = c_{A^+} \frac{kT}{h} e^{-(\Delta G_c^0)/RT} \quad (2.14)$$

A seta sobre v_c indica que a reação é de redução e o índice c , que se trata de uma reação química em campo elétrico nulo. Esta expressão pode ser desmembrada em duas partes, uma dependente e outra independente da concentração, de acordo com^[65]:

$$\bar{v}_c = \bar{k}_c c_{A^+} \quad (2.15)$$

onde $\bar{k}_c$ é a constante de velocidade, isto é, a frequência com que as partículas da solução vencem a barreira de potencial, e C_{A^+} o número de espécies existentes em solução por unidade de área do eletrodo.

Logo, no instante da imersão do eletrodo em uma solução eletrolítica, embora não haja ddp, nem campo elétrico através da interface, esta pode não estar em equilíbrio, e então, uma reação de transferência de carga pode ocorrer. Neste caso, a velocidade da reação de transferência de carga em campo elétrico nulo é determinada através de parâmetros cinéticos e químicos. No entanto, quando a reação de transferência de elétrons ocorre do eletrodo para espécie iônica receptora (A^+), o eletrodo adquire uma carga elétrica positiva e a solução negativa, dando início à interface eletrificada. Esta separação de cargas na interface implica no desenvolvimento de uma ddp e o aparecimento de um campo elétrico. Como o campo elétrico afeta a velocidade do movimento das cargas, a velocidade da reação eletroquímica é afetada pelo campo na interface e a energia química transforma-se em

eletroquímica. Considerando um íon positivo que passa da solução para o eletrodo, a energia livre de ativação química é dada por^[65]:

$$\Delta \tilde{G}^0 * = \Delta \tilde{G}_C^0 * + \beta F \Delta \phi \quad (2.16)$$

onde o termo $\beta F \Delta \phi$ é devido a energia elétrica, sendo β o fator de simetria (número compreendido entre 0 e 1), $\Delta \tilde{G}_C^0 *$ é a energia livre padrão em campo elétrico nulo e $\beta \Delta \phi$ é a fração da ddp na dupla camada e corresponde a passagem do íon da sua posição inicial até o ponto em que sua energia ultrapassa a barreira de energia onde a reação ocorre espontaneamente.

Assim, a velocidade de redução pode ser escrita como:

$$\bar{v}_e = c_{A^+} \frac{kT}{h} e^{-(\Delta \tilde{G}^0 *)/RT} = c_{A^+} \frac{kT}{h} e^{-[(\Delta \tilde{G}_C^0 *) + \beta F \Delta \phi]/RT} = \bar{v}_e e^{-\frac{\beta F \Delta \phi}{RT}} = c_{A^+} \bar{k}_e e^{-\frac{\beta F \Delta \phi}{RT}} = c_{A^+} \bar{k}_e \quad (2.17)$$

onde o índice (e) indica a influência de um campo elétrico e $\bar{k}_e$ a constante de velocidade da reação eletroquímica.

A velocidade da reação eletroquímica representa o número de íons-grama que reagem por segundo atravessando a unidade de área da interface. Multiplicando esta velocidade, pela carga por mol, tem-se a densidade de corrente de redução ($\bar{I}$), ou melhor a quantidade de carga que passa por unidade de tempo e de área do eletrodo^[65]:

$$\bar{I} = \bar{v}_e F = F c_{A^+} \bar{k}_e e^{-\frac{\beta F \Delta \phi}{RT}} \quad (2.18)$$

sendo F a constante de Faraday (96485 Coulombs).

Então, a Eq. 2.18 estabelece a relação entre campo elétrico e a velocidade de transferência de elétrons através da interface. Sendo esta uma função exponencial, pequenas variações no campo da interface provoca grandes alterações no valor de densidade de corrente.

Em eletroquímica, o equilíbrio existente é dinâmico, onde os íons se movem da solução para o eletrodo e no sentido oposto. No início, a reação redox é mais deslocada num sentido e no equilíbrio as velocidades direta e reversa são iguais. Considerando que as cargas são sensíveis ao movimento segundo o campo elétrico ou contra ele, se na reação de redução os íons positivos se movem contra o campo, para a reação reversa (oxidação) os íons movem-se com o campo. Logo, tem que se fornecer energia ao íon positivo para vencer uma ddp ($\beta \Delta \phi$) no sentido direto, enquanto em termos elétricos a espécie B (C_B) passa espontaneamente gerando uma ddp ($[1-\beta] \Delta \phi$), na reação de oxidação. Assim, a velocidade de reação de oxidação e a densidade de corrente de oxidação são, respectivamente^[65]:

$$\bar{v}_e = c_B \bar{k}_e e^{\frac{(1-\beta)F\Delta\phi}{RT}} \quad (2.19)$$

$$\bar{I} = F c_B \bar{k}_e e^{\frac{(1-\beta)F\Delta\phi}{RT}} \quad (2.20)$$

No equilíbrio, as densidades de correntes de oxidação e redução se igualam e recebem a mesma designação, isto é, densidade de corrente de troca no equilíbrio (I_0).

Resumindo, no instante da imersão do eletrodo na solução eletrolítica, o campo elétrico é nulo, mas a medida que a reação de redução se processa, origina-se um campo elétrico que torna o eletrodo positivo e a solução negativa na interface. Contudo, ocorre a reação reversa, opondo-se ao aumento de cargas positivas no eletrodo. Caso não exista uma fonte externa de elétrons, atinge-se um compromisso entre as reações de redução e oxidação, havendo um valor de campo elétrico e de ddp onde as velocidades de perda e ganho de elétron no eletrodo tornam-se iguais, assim como as correntes de redução e oxidação. A interface metal-solução, no equilíbrio, não apresenta intensidade de corrente resultante, nem variação de potencial ou campo elétrico, ocorrendo apenas reações de oxidação e redução à mesma velocidade.

No entanto, quando há um fluxo de elétrons resultante, consequência do fato das correntes de redução e oxidação serem diferentes, este fluxo resultante é igual a transferência de cargas devido a cada uma das reações direta e reversa, implicando numa intensidade de corrente resultante e transformações químicas, indicando que a interface não está em equilíbrio. A intensidade de corrente resultante é dada pela diferença entre a densidade de corrente de oxidação e de redução. Considerando que a ddp existente na dupla camada num estado de não-equilíbrio ($\Delta\phi_{\text{neq}}$) é a soma de duas contribuições, uma devida ao potencial de equilíbrio ($\Delta\phi_{\text{eq}}$) e a outra a uma fonte extra (η), que indica o quanto o potencial do eletrodo está afastado em relação ao seu valor no equilíbrio. Então, a densidade de corrente resultante pode ser descrita com base nas Eq. 2.18 e 2.20 nos seguintes termos^[65]:

$$I = \left\{ F c_B \bar{k}_e \left[e^{\frac{(1-\beta)F\Delta\phi_{\text{eq}}}{RT}} \right] \left[e^{\frac{(1-\beta)F\eta}{RT}} \right] \right\} - \left\{ F c_A \bar{k}_e \left[e^{\frac{-\beta F\Delta\phi_{\text{eq}}}{RT}} \right] \left[e^{\frac{-\beta F\eta}{RT}} \right] \right\} \quad (2.21)$$

$$\text{ou} \quad I = \left\{ I_0 \left[e^{\frac{(1-\beta)F\eta}{RT}} \right] - \left[e^{\frac{-\beta F\eta}{RT}} \right] \right\} \quad (2.22)$$

Esta é a equação de Butler-Volmer, que estabelece a densidade de corrente numa interface metal-solução dependente de η . Como esta é exponencial, pequenas variações em η causam grandes variações em I . Assim, em um sistema eletroquímico onde é aplicado potencial (cela eletrolítica), o potencial em excesso η é a ddp que causa a corrente, enquanto num sistema oposto (cela galvânica), a corrente produzida através do circuito externo gera um potencial em excesso η . O termo sobretensão é usado para designar η em qualquer sistema eletroquímico. Vale ressaltar que em ambos

os casos, deve-se considerar uma ddp adicional (RI_{Ad}) entre os eletrodos devido a passagem da corrente (I_{Ad}) através da solução. Assim, em uma cela eletrolítica com uma fonte de corrente contínua que faz passar corrente através da cela e dois eletrodos, a ddp desta, é a soma da ddp correspondente a primeira dupla camada elétrica, a passagem de corrente através da solução e aquela devido a segunda dupla camada elétrica.

Agora, considerando um sistema eletroquímico no equilíbrio a sobretensão (η) é nula e a densidade de corrente resultante (I) também, assim, as densidades de corrente de oxidação e redução são iguais. Dividindo a Eq. 2.18 pela 2.20, tem-se^[65]:

$$1 = \frac{c_{A^+} \bar{k}_c}{c_B \bar{k}_o} e^{-\frac{F\Delta\phi_{eq}}{RT}} \quad (2.23)$$

Aplicando o logaritmo natural a Eq. 2.23, tem-se:

$$\Delta\phi_{eq} = \frac{RT}{F} \ln \frac{\bar{k}_c}{\bar{k}_o} + \frac{RT}{F} \ln \frac{c_{A^+}}{c_B} \quad (2.24)$$

O segundo termo da Eq. 2.24, o qual é função das constantes de velocidade de oxidação e redução da reação, é igual ao valor de $\Delta\phi$ quando a razão das concentrações C_{A^+}/C_B é igual à unidade. Este é denominado por conveniência, de $\Delta\phi_{eq}^0$, e a Eq. 2.24 torna-se:

$$\Delta\phi_{eq} = \Delta\phi_{eq}^0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{c_{A^+}}{c_B} \quad (2.25)$$

Esta é a expressão da Lei de Nernst para uma interface em equilíbrio. Contudo, como só se pode medir o potencial em uma cela eletroquímica e considerando a concentração do metal como igual a unidade, a Eq. 2.25 torna-se^[65]:

$$\Delta E = \Delta E^0 + \frac{RT}{F} \ln c_{A^+} \quad (2.26)$$

É importante lembrar que a concentração de uma espécie iônica em solução é afetada por uma propriedade denominada força iônica (Eq. 2.27). Esta propriedade altera a capacidade reativa dos íons na solução devido as interações eletrostáticas (atração e repulsão) entre os mesmos, sendo mais pronunciada com o aumento da concentração. A capacidade reativa dos íons na solução é designada de atividade. A atividade do íon é relacionada com a concentração pelo coeficiente de atividade (Eq. 2.28), o qual mede a eficiência com que uma espécie influencia um equilíbrio no qual ela participa. Em soluções muito diluídas a força iônica é mínima e não afeta o comportamento dos íons na solução^[66].

$$\mu = \frac{1}{2}(c_A z_A^2 + c_B z_B^2 + \dots + c_n z_n^2) \quad (2.27)$$

$$a_A = c_A \times \gamma \quad (2.28)$$

onde μ é a força iônica, z a carga do íon, a_A a atividade da solução e γ o coeficiente de atividade.

Além do efeito da força iônica, todas as deduções foram feitas para um íon em solução de carga unitária que sofre redução. Assim, deve-se adicionar a Eq. 2.26, o efeito da carga do íon, bem como o segundo termo na equação torna-se negativo quando o íon na solução está sofrendo oxidação. Então, a expressão geral da Lei de Nernst é dada por:

$$\Delta E = \Delta E^0 \pm \frac{RT}{zF} \ln a_{A^{z+}} \quad (2.29)$$

2.2.2.2 A Equação de Nernst: Princípios Termodinâmicos

Antes de definir a equação de Nernst a partir de princípios termodinâmicos, um importante conceito que se deve ter em mente é o de reversibilidade e irreversibilidade. Num sentido químico, uma reação é irreversível quando seus produtos, ou não reagem entre si, ou o fazem produzindo compostos diferentes dos reagentes iniciais. Em termos eletroquímicos, uma cela eletroquímica só ocorre em condições de reversibilidade termodinâmica quando uma pequena variação na força eletromotriz (fem) provoca a inversão da reação, o que pode ser obtido numa cela galvânica, opondo à sua fem espontânea, um potencial ligeiramente maior que este. A reversibilidade termodinâmica é um estado ideal de que os sistemas reais se podem aproximar segundo certas considerações. A principal delas é que a reação na cela eletroquímica seja cineticamente rápida, de modo a responder instantaneamente a qualquer variação de potencial^[65].

A definição de reversibilidade termodinâmica é baseada na descoberta que a quantidade de energia convertida em trabalho e liberada espontaneamente depende da velocidade de reação. O trabalho máximo ocorre quando a velocidade da reação espontânea é infinitamente pequena. Quando a temperatura e a pressão se mantêm constante, o trabalho máximo que o sistema é capaz de fornecer é denominado de energia livre de Gibbs (ΔG). Em condições de reversibilidade termodinâmica, o trabalho máximo fornecido pelo sistema eletroquímico a pressão e temperatura constantes é igual a variação da energia livre de Gibbs, cuja a expressão pode ser obtida pela relação de Gibbs-Duhan^[65]:

$$-\Delta G = zFE \quad (2.30)$$

onde ΔG é a mudança do potencial químico da solução; F , a constante de Faraday e E o potencial elétrico.

Em uma cela eletroquímica reversível tem-se^[63]:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{a_p}{a_r} \quad (2.31)$$

onde a_p é a atividade dos produtos e a_r dos reagentes.

Substituindo a Eq. 2.30 em 2.31, se obtém:

$$-zFE = -ZFE^0 + RT \ln \frac{a_p}{a_r} \quad (2.32)$$

Com as devidas considerações sobre as atividades de produtos e reagentes na cela eletroquímica, chega-se a Eq. 2.29.

É importante lembrar, que o potencial reversível da cela é calculado usando as concentrações no interior da solução e não na superfície do eletrodo.

2.2.3 O Transporte de Massa na Solução

A constante cinética para a velocidade de reação do eletrodo é influenciada não só pela reação do eletrodo, mas também pelo transporte de espécies do interior da solução para o eletrodo e vice-versa. Este transporte pode ocorrer por difusão, convecção e por migração. O efeito de migração normalmente é negligenciado pois o efeito do campo elétrico do eletrodo está limitado a distâncias muito pequenas da espécie ao eletrodo^[32]. Assim, pode-se considerar que em condições de estado estacionário, o transporte das espécies é devido somente a difusão e a convecção. Existem dois tipos de convecção, a natural, devida a gradientes térmicos (em geral, negligenciável), e a forçada, associada aos mecanismos de transporte por fluxo.

Em estado estacionário, o transporte de massa na solução deve-se principalmente ao fenômeno de difusão, que nada mais é, que o movimento natural (campo elétrico nulo) das espécies (carregadas ou neutras) na solução, devido a gradientes de concentração, sendo este comportamento expresso pela primeira e segunda lei de Fick^[32]. Para um sistema de coordenada qualquer tem-se:

$$J = -D\nabla c \quad (2.33) \qquad \frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c \quad (2.34)$$

onde J é o fluxo de espécies, ∇^2 o operador de Laplace e D uma constante denominada de coeficiente de difusão, cujo valor em solução aquosa varia entre 10^{-5} à 10^{-6} cm² s⁻¹^[32].

Em um sistema de três coordenadas cartesianas, o operador ∇ é definido por:

$$\nabla = \frac{\partial}{\partial x} + \frac{\partial}{\partial y} + \frac{\partial}{\partial z} \quad (2.35)$$

Um importante fundamento para eletroquímica, que advém do transporte por difusão é o conceito

de camada de difusão, que é o gradiente de concentração na superfície do eletrodo definido pela equação:

$$D \left(\frac{\partial c}{\partial x} \right)_0 = D \frac{(c_\infty - c_0)}{\delta_d} \quad (2.36)$$

onde c_∞ representa a concentração no interior da solução, c_0 a concentração no eletrodo e δ_d a espessura da camada de difusão.

A espessura da camada de difusão (δ_d) normalmente é associada com o coeficiente de transferência de massa (k_d) pela expressão:

$$k_d = \frac{D}{\delta_d} \quad (2.37)$$

Uma clara observação da Eq. 2.37 é que quanto menor a espessura da camada de difusão maior é o gradiente de concentração na superfície do eletrodo, situação ideal que conduz a um sinal mais elevado, seja de corrente em voltametria ou potencial em potenciometria. Esta condição ideal, isto é, uma pequena espessura da camada de difusão, é obtida em sistemas hidrodinâmicos onde a convecção forçada é responsável pelo transporte de massa.

Num sistema hidrodinâmico a convecção e a difusão contribuem significativamente para o transporte de massa, sendo a primeira e segunda lei de Fick, modificadas para^[32]:

$$J = cv - D \nabla c \quad (2.38)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -v \nabla c + D \nabla^2 c \quad (2.39)$$

onde v é a componente de velocidade, que para um sistema de três coordenadas cartesianas é dado por $v_x + v_y + v_z$. Este perfil de velocidade varia com o tipo de escoamento, dependendo do regime ser laminar, de transição ou turbulento.

Nos sistemas hidrodinâmicos, além da camada de difusão, existe uma camada denominada hidrodinâmica, de espessura δ_H , onde ocorre todos os gradientes de velocidade. Levich^[67] relacionou a espessura da camada hidrodinâmica com a espessura da camada de difusão pela expressão:

$$\delta_d \approx \left(\frac{D}{\nu} \right)^{\frac{1}{3}} \delta_H \quad (2.40)$$

Em solução aquosa o coeficiente de difusão, $D \approx 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, e a viscosidade cinemática, $\nu \approx 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, o que indica que $\delta_d \approx 0,1 \delta_H$, o que vale supor que não há convecção dentro da camada de difusão.

Com base nesses conceitos o processo global responsável pela resposta de um eletrodo é devido a duas componentes, a cinética descrita pela constante de velocidade de reação do eletrodo e a de transporte, definida pelo coeficiente de transferência de massa (k_d), que descreve a velocidade das espécies dentro da camada de difusão^[32].

2.2.2.4 O Mecanismo de Resposta dos ISE

Processos eletroquímicos, frequentemente se dividem em processos parciais caracterizados por suas velocidades, as quais são limitadas pela resistência ao processo. Nesses processos, ocorrem acúmulo de cargas em camadas, que podem ser representadas como capacitores. Então, o circuito eletrônico equivalente para uma interface eletrificada é um capacitor associado em paralelo com um resistor (Fig. 2.4)^[35]. Para uma interface idealmente polarizável a resistência tende ao infinito, enquanto para a interface não-polarizável a resistência tende a zero. Quando o circuito é conectado a uma fonte de tensão, se a resistência é muito elevada, o capacitor se carrega até o valor de potencial da fonte. Este é o comportamento da interface polarizável. Caso a resistência em paralelo com o capacitor seja baixa, então qualquer tentativa para mudar o potencial que passa através do capacitor é compensada pelo escoamento de cargas através do caminho de baixa resistência, que nada mais é que o comportamento da interface não-polarizável. O que faz com que a interface decida resistir (interface não-polarizável) ou aceitar mudanças de potencial (interface polarizável) é a velocidade com que ocorre a transferência de cargas através da interface^[35]. O exemplo clássico de interface não-polarizável é o eletrodo de calomelano, ou melhor, os eletrodos utilizados como referência. Contudo, este modelo simplificado de circuito eletrônico, também deve levar em consideração os processos estáticos e dinâmicos que ocorrem em uma cela eletroquímica. Assim, um circuito equivalente para uma cela eletroquímica potenciométrica corresponde a cinco circuitos RC paralelos ligados em série. Cada circuito RC é devido as seguintes características: ao volume do eletrodo, a reação superficial, as reações de adsorção na superfície do eletrodo, a geração e recombinação das cargas carregadas e ao processo de difusão dos íons.

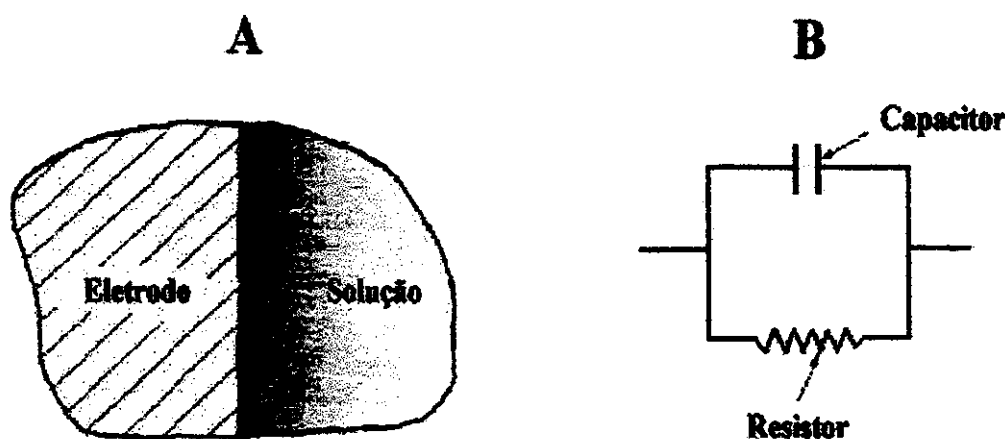


Fig. 2.4 A. Interface eletrificada eletrodo-solução. B. Circuito eletrônico equivalente. Quando $R \rightarrow \infty$ a interface é polarizável e para $R \rightarrow 0$, a interface é não-polarizável. Adaptado da referência [35].

O mecanismo de trabalho dos sensores íon-seletivo pode ser interpretados à luz dos conceitos sobre a teoria dos capacitores e modelos de interface eletrodo-solução. Contudo, o mecanismo de resposta ainda não foi completamente elucidado e várias teorias foram propostas para explicá-lo. Para os eletrodos de primeira espécie (metal), a transferência de elétrons é a etapa da reação determinante do potencial, porém esta explicação, não é aplicável para os eletrodos de membrana, como por exemplo, o de vidro. Donnan^[26] foi quem primeiro propôs uma teoria para explicar o desenvolvimento do potencial nos eletrodos de vidro. Ele separou duas soluções de haleto de metal alcalino por uma membrana semi-permeável. Se o eletrólito de um lado da membrana contém um íon que pode difundir através dela, uma distribuição desigual de íons permeáveis é observada, estabelecendo desta forma um equilíbrio eletroquímico e conseqüentemente, um potencial elétrico era estabelecido entre os dois lados da membrana. Apesar desta explicação ser plausível e clara para o fenômeno observado por Donnan, o conceito de penetração através da membrana de vidro por íons hidrogênio foi definitivamente contestada por Haugaard^[66], através de análise química e por Schwabe e Dahms^[69] com experimentos utilizando trítio. Em tais casos, nenhum fenômeno de difusão através da membrana de vidro foi observado. Outra proposta para o mecanismo de resposta do eletrodo de vidro foi então baseado na teoria de troca iônica. Neste caso, os íons Na^+ na camada de gel da membrana de vidro eram substituídos pelos íons H^+ da solução entrando em um equilíbrio químico^[27,70,71]. Contudo, tal conceito não foi suportado pelos resultados experimentais. Primeiramente, se tal fenômeno de troca iônica ocorresse, não poderia causar uma mudança nas cargas na interface, e conseqüentemente, uma ddp não poderia ser desenvolvida. Por outro lado, os íons sódio na camada gel da membrana deveriam se esgotar depois de um longo tempo de uso do eletrodo de vidro, resultando no colapso do sensor^[25]. Outros trabalhos nesta área^[62,72-77] mostraram definitivamente que o fenômeno de transporte por difusão através de uma membrana semi-permeável não poderia ser aplicado para explicar o potencial desenvolvido em uma membrana de vidro. Com o objetivo de examinar se o transporte de íons realmente poderia ser responsável pelo desenvolvimento do potencial, Horvai *et al.*^[62] investigou as características físico-químicas de eletrodos de membrana contendo diferentes compostos. Ele observou que para transdutores metálicos (Pt, Al, Ag), as quais suas faces eram recobertas com uma membrana de borracha de silicone contendo iodeto de prata, o potencial desenvolvido não dependia do metal. Logo, uma lâmina de prata coberta com iodeto de prata, não poderia tomar parte no transporte de íons Ag^+ , como era anteriormente suposto. Com o desenvolvimento de instrumentos adequados para a medida do tempo real de resposta de um eletrodo, melhores estudos puderam ser realizados com o método de perturbação da concentração. Estes estudos mostraram que eletrodos de lâmina de prata/haleto de prata ou de potássio, onde este último contém um componente complexante para potássio ocluso em uma membrana polimérica, apresentavam tempos de resposta em torno de 20 ms. Isto indicava que o processo de difusão não deveriam contribuir para a formação do potencial, uma vez que a difusão de íons através de uma

membrana é muito menor que em solução, e o tempo para estabelecer o potencial deveria ser muito maior que aquele observado. Além disto, eletrodos íon-seletivo para potássio construídos contendo diferentes agentes complexantes, valinomicina ou bis-crown-éter, apresentavam o mesmo potencial para a mesma concentração de íons potássio na solução, indicando que somente o soluto era responsável pelo desenvolvimento do potencial elétrico.

Antes de definir o mecanismo baseado na teoria do capacitor, é importante ter-se em mente alguns conceitos fundamentais para sua melhor compreensão. É bem conhecido que uma bateria ou pilha gera uma ddp através de uma reação redox. A bateria é um dispositivo que não contém isolante e possui um anodo e um catodo que estão imersos em um meio eletrolítico. Quando o anodo é conectado ao catodo por um circuito externo uma corrente elétrica flui até que a reação química cesse, sendo em sua maioria reações reversíveis, seguindo os princípios de equilíbrio termodinâmico, ou seja, a equação de Nernst. Contudo, é bem conhecido que nenhuma reação redox está envolvida no desenvolvimento do potencial em um eletrodo de vidro^[25,78], pois caso isto ocorresse hidrogênio gasoso teria que estar envolvido. Por outro lado, um capacitor eletrolítico é um dispositivo capaz de armazenar cargas elétricas, através de duas placas paralelas entre as quais há um isolante ou dielétrico, onde nenhuma reação redox reversível ocorre. Além disto, quando as placas carregadas são conectadas, nenhuma corrente significativa flui, condição básica para a medida de ddp com eletrodos íon-seletivo. A ddp é proporcional a carga e uma constante denominada de capacitância (Eq. 2.2). Assim, um eletrodo de vidro, ou melhor, de membrana é mais comparável a um capacitor do que uma bateria^[25], sendo este conceito, o do capacitor eletrolítico, a base atual para compreensão do funcionamento dos ISE^[25,78]. A Fig. 2.5 apresenta um modelo esquemático de um eletrodo de membrana baseado neste conceito.

Quando um eletrodo de vidro é imerso em uma solução eletrolítica, uma dupla camada é formada, contendo cargas na superfície^[25]. Desde que ambas as camadas interna e externa da membrana estão em contato com uma solução eletrolítica, duas dupla camadas são formadas, uma em cada lado com a mesma membrana. Considerando os modelos de interface eletrodo-solução, em que uma dupla camada é considerada como um capacitor, duas dupla camadas constituem um duplo-capacitor. A ddp é obtida pela diferença entre os potenciais na interface externa e interna. Um eletrodo capacitor pode ser considerado como uma membrana feita de qualquer material dielétrico ou semicondutor, o qual pode adsorver cátions e ânions em seus sítios ativos. O potencial de membrana é desenvolvido a partir das duas interfaces que armazenam cargas sobre a superfície através da adsorção na dupla camada. O eletrodo de vidro segue a Lei da Capacitância, onde as características da membrana de vidro são dadas pela constante de permissividade (ϵ), a área (A) e a espessura (d) da membrana, as quais se relacionam com a capacitância (C) da mesma (Eq. 2.2)^[25].

Quando estes fatores são constantes para uma mesma membrana de vidro, o potencial será proporcional a carga (q) adsorvida sobre a membrana^[25], de acordo com:

$$E = K(\sum q_+ - \sum q_-) \quad (2.41)$$

onde K é uma constante que engloba todos os parâmetros citados anteriormente.

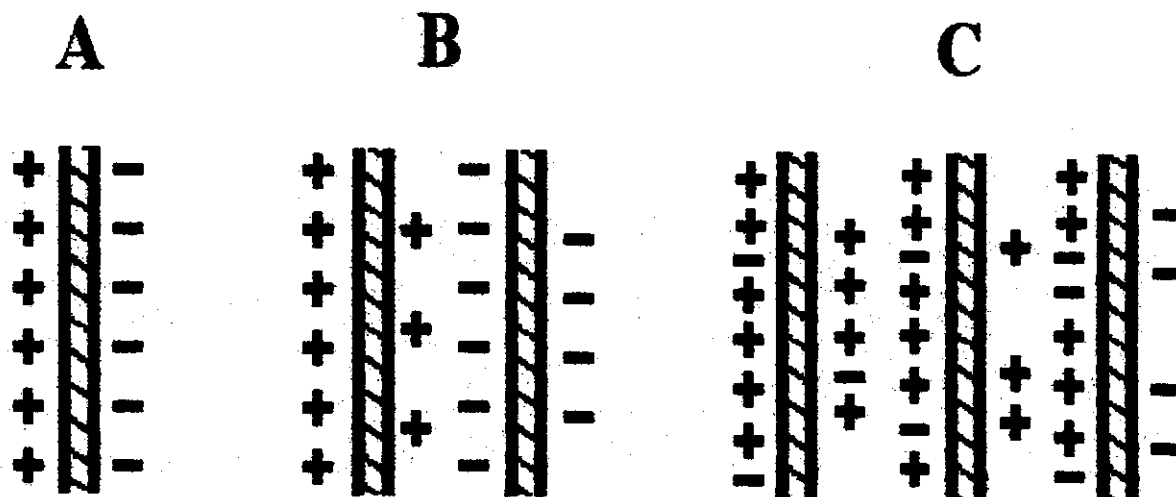


Fig. 2.5 A. Esquema de um capacitor de placas paralelas comumente usado em aparelhos eletrônicos, que é capaz de armazenar cargas quando um potencial é aplicado com uma bateria ou fonte de energia; B. Modelo de um eletrodo de membrana; C. Representação de um eletrodo de vidro ou outro qualquer de membrana, o qual apresenta uma estrutura superficial zwitteriônica. Adaptado da referência [25].

No caso de somente cátions estejam adsorvidos sobre a superfície da membrana, a $\sum q_- = 0$, resultando no aumento do potencial com o aumento das cargas positivas. O inverso ocorre quando somente ânions estão adsorvidos, isto é, ocorre o decréscimo no potencial com o aumento das cargas negativas. Se ambas as cargas estão adsorvidas simultaneamente, o resultado é a soma das cargas positivas e negativas na superfície^[25]. Assim, em meio ácido o potencial aumenta para valores mais positivos como função do aumento dos íons H^+ adsorvidos sobre a superfície do vidro, enquanto que em meio alcalino o potencial aumenta para valores mais negativos como função dos íons OH^- . Esta é a diferença fundamental entre a teoria do eletrodo-capacitor com as teorias do passado, as quais não consideravam os íons OH^- como regra no desenvolvimento do potencial.

Baseado nos conceitos e nas observações mencionadas anteriormente, de maneira geral, o potencial desenvolvido num sensor potenciométrico é causado pela separação de cargas na superfície do eletrodo. Esta interpretação está diretamente associada com processos de quimissorção do íon primário proveniente da solução para a superfície do eletrodo. No caso dos contra-íons, estes se acumulam na fase líquida, a solução, ocorrendo a separação de cargas. Assim, o potencial químico do soluto é o responsável pelo sinal eletroquímico^[76].

2.2.2.5 Características Operacionais dos ISE

Algumas características definem a qualidade de um ISE, sendo as mais importantes o tipo, a faixa, o tempo e a seletividade da resposta potenciométrica.

O tipo de resposta, seja ela nernstiana, sub ou super-nernstiana, é definido pela declividade da curva analítica para o eletrodo na faixa linear de resposta. Esta é determinada em acordo com os limites de detecção e nernstiano (Fig. 2.6)^[69].

O tempo de resposta é definido, como o tempo decorrido para que o potencial final no estado de equilíbrio, devido a mudança de concentração do íon de interesse da solução em contacto com o ISE e o de referência, não varie mais que 0,6 mV/min^[79].

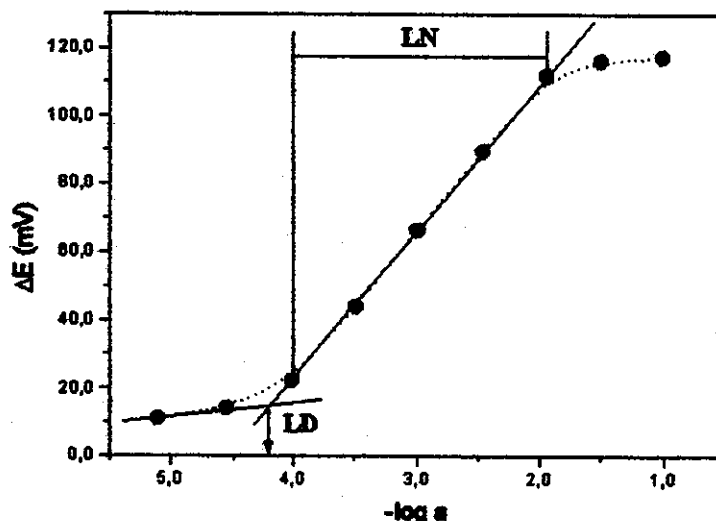


Fig. 2.6 Método gráfico para obtenção do limite nernstiano (LN) e do limite de detecção (LD) nos ISE.

Em relação à seletividade da resposta, é interessante mencionar que no início do surgimento dos eletrodos potenciométricos, a comunidade científica considerou que eles eram específicos. Contudo, com o passar do tempo, os pesquisadores começaram a descobrir que a especificidade dos sensores potenciométricos não era tão grande como se pensava e o termo seletivo foi consagrado, em substituição ao específico. Em potenciometria o estudo de interferentes é feito através da determinação dos coeficientes de seletividade potenciométricos (K^{POT}), pelos métodos da interferência fixa ou das soluções separadas, na qual estes coeficientes são obtidos pela equação de Nicolsky-Eisenman (N-E)^[10,67,80]:

$$E = E^0 \pm \frac{2,303RT}{z_A F} \log \left(a_A + \sum_B K_{A,B}^{POT} a_B^{z_A/z_B} \right) \quad (2.42)$$

A partir desta equação, pode-se determinar o K^{POT} . Quando ambos os íons, primário (A) e interferente (B), contribuem igualmente para a resposta do eletrodo tem-se:

$$a_A = K_{A,B}^{POT} \times a_B^{z_A/z_B} \quad (2.43)$$

Considerando que ambos os íons apresentam a mesma carga, pode-se substituir a Eq. 2.43 na 2.42, e então tem-se:

$$E = E^0 \pm \frac{2,303RT}{z_A F} \log(2a_A) \quad (2.44)$$

Logo, a diferença entre os potenciais do eletrodo em solução de A com e sem B é dada por:

$$\Delta E = \pm \frac{2,303RT}{z_A F} (\log 2a_A - \log a_A) \quad (2.45)$$

$$\Delta E = \pm \frac{2,303RT}{z_A F} (\log 2) \quad (2.46)$$

$$\Delta E \approx \pm \frac{18}{z_A} \text{ mV a } 25^\circ\text{C} \quad (2.47)$$

Então, determina-se graficamente a atividade de A, na qual a curva analítica difere da extrapolação da região linear por $18/z_A$ (Fig. 2.7). Pela substituição deste valor na Eq. 2.43 obtém-se o K^{POT} . Assim, quando um eletrodo é muito seletivo para A em relação a B, o K^{POT} deverá ser muito menor que a unidade.

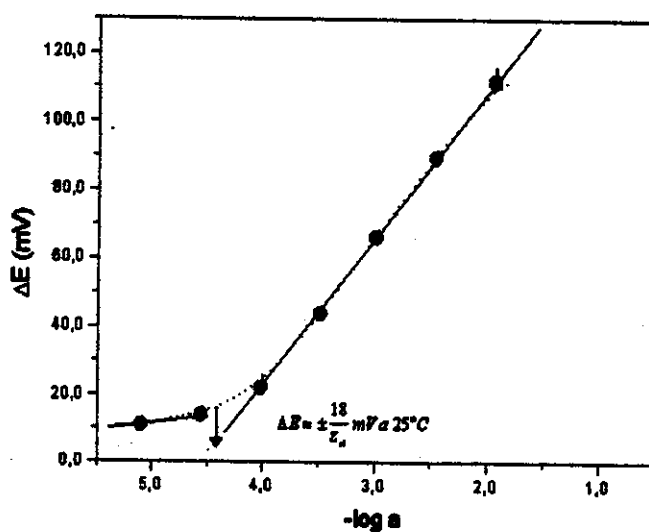


Fig. 2.7 Método gráfico para a determinação do K^{POT} .

Contudo, a equação de N-E apresenta uma série de limitações. A primeira delas ocorre quando a carga do íon primário (A) é diferente da carga do íon interferente (B). Se a carga de A for menor, o coeficiente de seletividade determinado é extremamente baixo, indicando pequena interferência e vice-versa. Isto se deve a relação exponencial do K^{POT} com a carga do íon. Assim, o K^{POT} determinado desta maneira apresenta quase sempre valores fora da realidade com os dados experimentais, não possuindo significado prático. Outro problema da equação de N-E é a forma simétrica com que o eletrodo responde para o íon primário e o interferente, assumindo resposta nernstiana também para o íon interferente. Assim, a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) recomenda como método para calcular o K^{POT} de um sensor potenciométrico, o do potencial-equivalente (*matched-potential*)^[80]. Este método, proposto por Gadzekpo e Christian^[81] consiste em determinar a concentração para o íon interferente na qual a variação de potencial é a mesma para uma dada concentração do íon primário em uma solução de referência. As principais características do método do P-E são:

- a carga do íon primário e do interferente não é levada em consideração;
- o método não assume resposta nernstiana para o íon primário nem para o interferente.

Estas características conferem ao método do P-E maior significado prático, que aquele em que se aplica a equação de N-E. Então, o K^{POT} pelo método do potencial-equivalente pode ser obtido pela equação:

$$K_{A,B}^{POT} = \frac{a'_A - a_A}{a_B} \quad (2.48)$$

onde, a_A é a atividade do íon primário (A) onde o eletrodo começa a responder linearmente para o mesmo; a_B é a atividade do íon interferente que dá o mesmo potencial de uma determinada atividade do íon primário (a'_A).

É importante ressaltar, que o método do potencial-equivalente é do ponto de vista prático, conveniente, pois é simples de calcular e experimentalmente fácil de realizar. No entanto, os coeficientes obtidos não podem ser utilizados para obter valores para a atividade do íon primário em soluções desconhecidas. Assim, este método serve apenas como um guia para indicar o grau de seletividade de um ISE, não podendo ser utilizado de maneira quantitativa.

Outros fatores como tempo de vida do eletrodo, estabilidade e reprodutibilidade da resposta também são utilizados na caracterização da qualidade de um ISE.

2.3 As Técnicas Potenciométricas

A potenciometria pode ser utilizada de duas maneiras: de forma direta ou em titulação. Na potenciometria direta, a concentração da espécie é determinada por interpolação através de uma curva

de calibração, onde o potencial medido para cada padrão é plotado em função do logaritmo na base 10 da concentração do padrão. A quantidade de soluções-padrão a ser empregada na calibração varia de acordo com a precisão desejada, entretanto, é necessário levar em consideração o tipo de amostra a ser analisada. Neste caso, a força iônica das soluções-padrão utilizadas na calibração deve ser a mais similar possível à da amostra. Outro fator que deve ser cuidadosamente considerado é a temperatura, pois o potencial é sensível a esta variável, de modo que se torna necessário realizar a sua compensação ou utilizar sistemas de termostatização.

A potenciometria direta é bastante utilizada para a determinação das mais variadas espécies. Esta técnica não apresenta uma precisão muito grande, entretanto apresenta a vantagem da simplicidade, rapidez, baixo custo e a possibilidade de especificação devido a sua seletividade.

A potenciometria também pode ser utilizada para a determinação do ponto final de uma titulação. Uma vantagem do acompanhamento da variação do potencial de uma célula eletroquímica com a adição de um titulante é o número de informações obtidas sobre o processo da titulação. A curva de titulação é obtida, fazendo-se as medidas de potencial em função do volume adicionado de titulante sobre uma quantidade fixa de titulado. Uma variação de potencial nas proximidades do ponto final é observada, sendo esta dependente da concentração do titulante e do titulado. Existem várias maneiras de determinar o ponto final da titulação. A precisão e a exatidão dependem do método escolhido para este fim. Os métodos mais comumente empregados são o da bissetriz, da primeira e segunda derivadas e o de Gran^[66].

2.4 Os Sensores Potenciométricos Desenvolvidos

Nas seções a seguir serão descritas as estratégias utilizadas no desenvolvimento dos sensores potenciométricos para ácido ascórbico, ácido úrico e uréia, os quais são uns dos principais objetivos deste trabalho. Aqui, procurar-se-ão descrever os princípios de funcionamento dos eletrodos desenvolvidos, bem como suas características operacionais e seu desempenho.

2.4.1 O ISE-Ascorbato

No desenvolvimento do ISE-Ascorbato, duas estratégias apresentaram bons resultados. Numa delas foi utilizada a enzima ascorbato oxidase na elaboração de um biossensor potenciométrico para ácido ascórbico. Contudo, este biossensor não apresentou um tempo de resposta razoável para que ele pudesse ser associado com técnicas dinâmicas de análise. À partir dos estudos realizados com o biossensor desenvolvido, pode-se planejar um outro sensor potenciométrico para o íon ascorbato com melhores características operacionais. Este sensor foi baseado somente no sítio ativo da enzima, e pode ser descrito como um biossensor artificial.

2.4.1.1 O Biossensor à Base de EVA/Ascorbato Oxidase

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo que emprega um receptor biológico intimamente acoplado a um transdutor.

O receptor é o componente ativo do biossensor, sendo responsável pelo reconhecimento seletivo do analito. Ele gera um sinal físico-químico, o qual é monitorado pelo transdutor, que pode ser eletroquímico, óptico, calorimétrico, entre outros^[82]. Os receptores estão divididos em três grupos: os catalíticos, os irreversíveis e os híbridos. Nos receptores catalíticos estão incluídos os sistemas contendo uma única enzima, múltiplas enzimas, organelas, células ou organismos e fatias de tecidos animais ou vegetais. Em geral, as enzimas são a primeira escolha como receptor, pela sua capacidade de amplificação do processo de bio-reconhecimento associada com a sua seletividade, sendo na sua grande maioria proteínas. Durante várias décadas, acreditou-se que somente as enzimas tinham capacidade de catalisar reações específicas, contudo no início dos anos 80 foi descoberta a atividade catalítica de alguns RNA^[83]. Esta descoberta modificou radicalmente as idéias dos pesquisadores, resultando num novo direcionamento das teorias sobre a origem da vida.

Os receptores irreversíveis apresentam uma especificidade superior ao anterior, porém, não exibem nenhum processo de catálise. Estes receptores, também denominados de afinidade, possuem mais aplicação como elementos de detecção do que de monitoração, uma vez que a ligação com eles é irreversível. Os receptores de afinidade possuem menor limite de detecção que os sistemas catalíticos, sendo os imunoreceptores, anticorpos e antígenos, os tipos mais comuns utilizados em aplicações com biossensores.

Alguns pesquisadores têm sugerido o uso de receptores híbridos, que envolvem uma etapa de reconhecimento seguida por uma de amplificação, havendo características de ambos os receptores, catalíticos e irreversíveis. O exemplo mais comum deste tipo de receptor é o DNA devido à sua capacidade de reconhecimento e de associação com seu complemento^[82].

O mecanismo de funcionamento de um biossensor baseia-se na interação entre o analito e a entidade biológica, a qual causará um evento envolvendo uma energia associada com essa interação. Um dispositivo denominado transdutor converte a energia do evento numa forma mensurável. Esta energia é transportada por um comunicador até um instrumento apropriado de medida que quantifica a mesma.

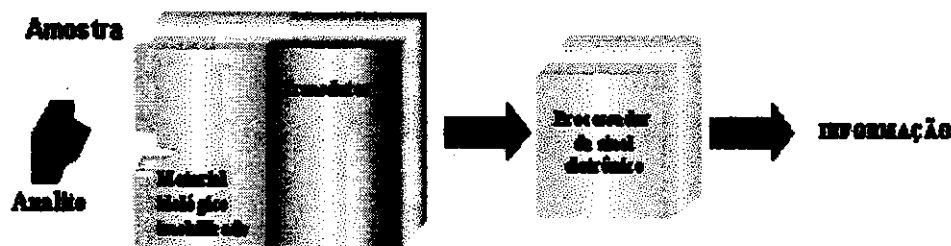


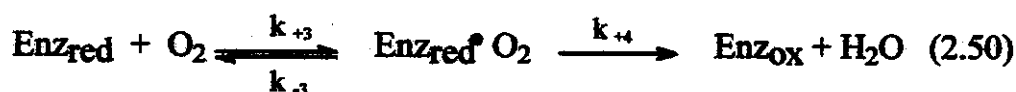
Fig. 2.8 Diagrama esquemático de um biossensor.

Assim, o biossensor proposto para o ácido ascórbico é constituído de um receptor catalítico, a enzima ascorbato oxidase, e um transdutor potenciométrico, o qual converte o sinal químico na superfície do eletrodo em diferença de potencial.

I. A Enzima Ascorbato Oxidase

A enzima ascorbato oxidase é encontrada em diversas fontes naturais da família das *Cucurbitaceae*. A maior concentração da enzima se localiza no epicarpo (casca) do fruto^[84], sendo a planta *Cucumis sativus* L. (Pepineiro), uma das espécies vegetais, cujo fruto (pepino), possui grande quantidade desta proteína. Por isto, foi escolhido neste trabalho o pepino para a extração da enzima. Outro fruto, como o da abóbora (*Cucurbita pepo* L), poderia ser utilizado, já que este, apresenta uma atividade enzimática 20 vezes superior à do pepino^[84], contudo, esta espécie não é disponível comercialmente no Brasil.

A ascorbato oxidase é uma proteína contendo cerca de 8 moles de cobre (II) por mol de enzima^[85]. Estes íons Cu^{2+} , estão presentes na molécula da enzima na forma de três diferentes complexos, os quais foram denominados Tipos I, II e III. No Tipo I, o íon cobre está ligado a dois nitrogénios do grupo imidazol e a um enxofre de cisteína, o qual é responsável pela intensa cor azul da enzima, enquanto no Tipo II, os átomos de cobre formam um complexo com dois grupos imidazóis, e no Tipo III, eles estão ligados a três histidinas, formando assim, os sítios ativos da enzima^[86-89]. Esta enzima catalisa a oxidação aeróbica do ácido ascórbico de acordo com o seguinte mecanismo de reação^[90]:



onde Enz_{ox} e Enz_{red} representam as formas oxidada e reduzida da enzima, respectivamente; Asc representa o íon ascorbato e P o produto (radical livre ascorbato).

Desta forma este princípio pode ser utilizado na construção de um biossensor potenciométrico, onde a variação de potencial é causada pela redução dos íons Cu^{2+} para Cu^{1+} devido à presença do íon ascorbato, mudando a densidade de carga na superfície do eletrodo, a qual é medida pelo transdutor.

II. Extração da Enzima Ascorbato Oxidase

Os efeitos do tempo de interação da solução tampão com a casca de pepino e da relação entre a quantidade de casca e o volume de tampão utilizado na extração da enzima ascorbato oxidase foram estudados (Capítulo 5 - Parte Experimental).

O melhor tempo para se obter o máximo de extração da enzima da casca do pepino foi de 60 min (Fig. 2.9). Um tempo menor não é suficiente para extrair uma quantidade razoável de enzima, enquanto que para tempos maiores, observa-se um ligeiro decréscimo na atividade do extrato obtido, que pode ser atribuído à extração de substâncias presentes na casca que inibem a atuação da enzima. Então, um tempo de 60 min foi fixado para as demais extrações.

O efeito da relação entre a quantidade de casca de pepino e o volume de tampão fosfato utilizado na extração é mostrado na Fig. 2.10. A melhor proporção foi 3:1, considerando a elevada atividade obtida, associada com a facilidade de homogeneização, uma vez que maiores quantidades de casca de pepino dificulta sua trituração. Esta relação foi utilizada nas extrações posteriores da enzima.

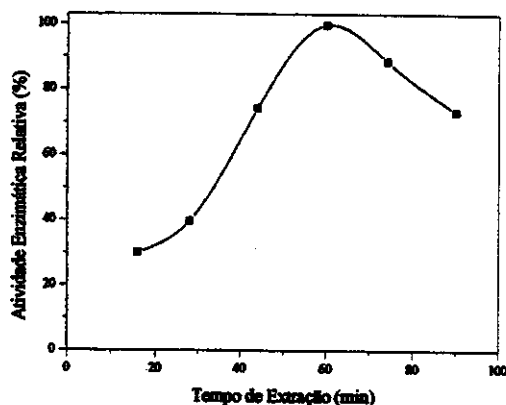


Fig. 2.9 Gráfico da atividade enzimática como função do tempo de extração de ascorbato oxidase da casca de pepino. Relação entre a quantidade de casca de pepino e o volume de tampão (fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ - pH 5,6) utilizado na extração: 1:1.

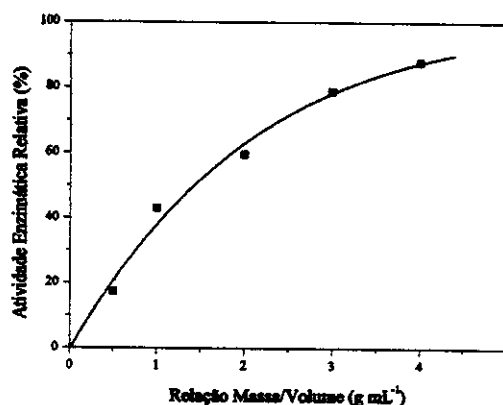


Fig. 2.10 Efeito da relação entre a quantidade de casca de pepino e o volume de solução tampão (fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ - pH 5,6) utilizados na extração da enzima ascorbato oxidase. Tempo de extração: 60 min.

III. Estabilidade do Extrato Enzimático de Ascorbato Oxidase

Maritano *et al.*^[87] demonstraram que a enzima ascorbato oxidase purificada é muito estável e mantém sua atividade até por 10 meses, quando armazenada a 4°C em solução saturada de sulfato

de amônio. Neste trabalho, o extrato enzimático obtido a partir da casca de pepino foi congelado e sua estabilidade monitorada por 1 mês. A atividade relativa do extrato enzimático não decresceu significativamente neste período, como pode ser visto na Fig. 2.11. Resultados similares foram obtidos quando o extrato foi armazenado na presença de glutathione para proteger a enzima.

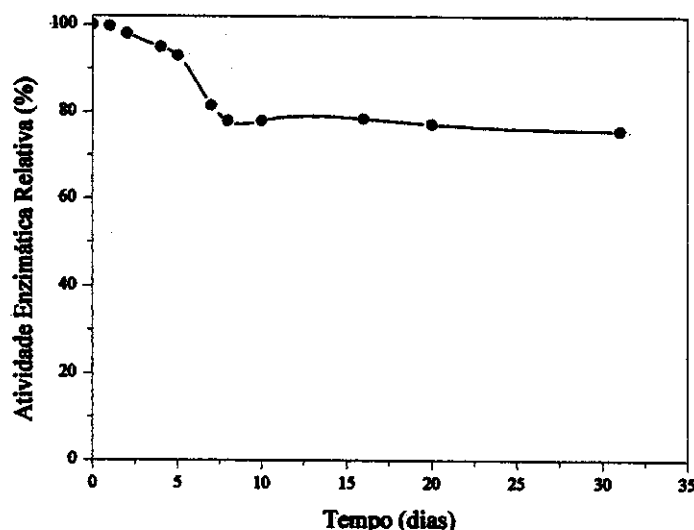


Fig. 2.11 Estabilidade do extrato bruto de ascorbato oxidase como função do tempo de armazenagem. Condição de estocagem: congelado em freezer a -15°C .

Assim, o extrato enzimático de ascorbato oxidase pode ser armazenado sem perda significativa de sua atividade, por um tempo razoável, no mínimo 1 mês. Isto indica que o mesmo pode ser utilizado na construção de vários biossensores para o ácido ascórbico sem a necessidade de obtê-lo no momento da elaboração do biossensor.

IV. Estudo Cinético do Extrato Enzimático de Ascorbato Oxidase

Vários pesquisadores estudaram a cinética de oxidação do ácido ascórbico pela ascorbato oxidase^[90-93]. Eles mostraram que a reação enzimática ocorre na presença de dois substratos: o ácido ascórbico (1°) e o oxigênio (2°). Este tipo de reação enzimática é denominada de “ping-pong” ou duplo-deslocamento, sendo caracterizada por Lineweaver-Burk, como linhas paralelas quando se obtém o gráfico duplo-recíproco de uma série de concentrações do substrato principal como função das velocidades inicial (v) estimadas para diferentes concentrações fixas do segundo substrato. A equação que descreve este tipo de cinética enzimática é dada por^[94]:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m^A}{V_{\max}} \left(\frac{1}{c_A} \right) + \left(1 + \frac{K_m^B}{c_B} \right) \left(\frac{1}{V_{\max}} \right) \quad (2.51)$$

onde, $V_{\max}$ é a velocidade limite da reação enzimática, K_m^A e K_m^B são as constantes de Michaelis-Menten para os substratos A, considerado principal (ácido ascórbico) e B, o secundário (O_2).

A Fig. 2.12 mostra o gráfico de decomposição de ácido ascórbico em diferentes concentrações, pelo extrato enzimático obtido de casca de pepino.

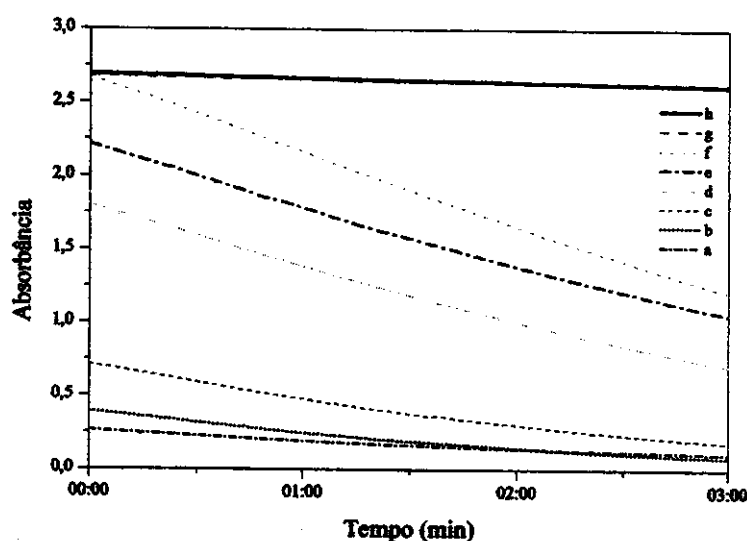


Fig. 2.12 Curvas de cinética enzimática para o extrato bruto de ascorbato oxidase de pepino, obtidas por espectrofotometria na região do UV ($\lambda=265$ nm). Volume de extrato enzimático diluído: 5 μ L. (a. até g.). h. 0. Concentração inicial de solução de ácido ascórbico em mmol L^{-1} : a. 0,020; b. 0,033; c. 0,066; d. 0,133; e. 0,166; f, g. e h. 0,200. A curva g. foi obtida depois do extrato enzimático ser aquecido à 90 °C por 15 min e a h. em solução tampão fosfato.

Como pode ser observado, o ácido ascórbico não é decomposto em presença de solução tampão (curva h), nem quando o extrato enzimático obtido da casca de pepino é aquecido por 15 min a 90 °C (curva g). A curva f mostra claramente que a enzima presente no extrato de pepino é responsável pela catálise da degradação oxidativa do ácido ascórbico.

Os parâmetros cinéticos foram estimados para o extrato enzimático bruto pelos gráficos das Fig. 2.12 a 2.15.

A Fig. 2.13 apresenta uma curva de calibração para o ácido ascórbico em função da absorvância medida no UV ($\lambda=265$ nm). O coeficiente angular desta curva indica a variação da absorvância com o número de mmoles de ácido ascórbico presentes na solução e pode ser utilizado para determinar as

velocidades iniciais (v_0) para as curvas de cinética enzimática da Fig. 2.12. Considerando a regressão linear da Fig. 2.13 tem-se:

$$A = -(0,003 \pm 0,003) + (4500 \pm 60)(n^\circ \text{ de mmoles}_{\text{monoscorbato}}) \quad (2.52)$$

sendo, $r = 0,9997$; EDPR = 0,03; N = 5.

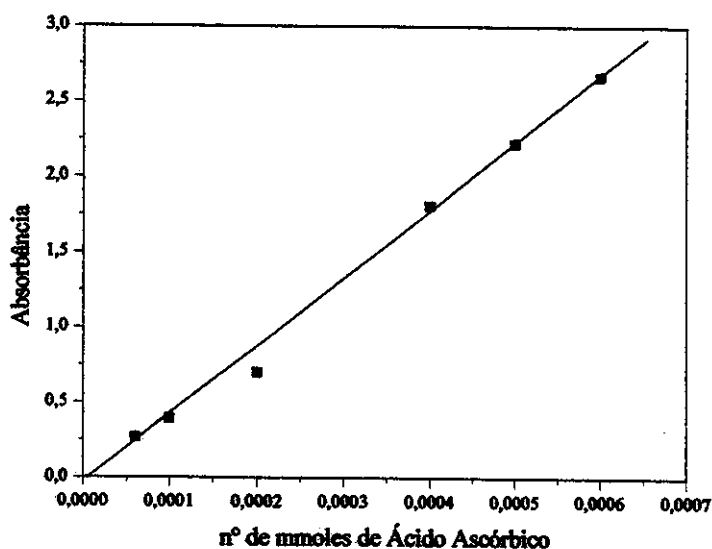


Fig. 2.13 Curva de calibração (espectrofotometria no UV - $\lambda=265$ nm) para ácido ascórbico em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,6. Volume final: 3,00 mL. Temperatura: 25°C .

A velocidade inicial é determinada a partir do início da curva de reação enzimática (Fig. 2.12). Assim, com os dados das Figs. 2.12 e 2.13 pode-se calcular v_0 para as diferentes concentrações do substrato ácido ascórbico de acordo com a equação:

$$v_0(\text{mmoles s}^{-1}) = \frac{CA_{CE}}{CA_{E-UV}} \quad (2.53)$$

onde, CA_{CE} (Absorbância s^{-1}) é o coeficiente angular obtido na região linear para as curvas da Fig. 2.12 e CA_{E-UV} (Absorbância mmoles^{-1}) é o coeficiente angular da curva de calibração da Fig. 2.13.

Desta forma, com os valores de v_0 calculados para cada concentração inicial de ácido ascórbico degradado pelo extrato bruto da casca de pepino (Fig. 2.12), pode-se construir o gráfico de Michaelis-Menten para este substrato (Fig. 2.14). A função matemática que descreve uma cinética enzimática é uma hipérbole retangular^[94]. Logo, a função para a curva da Fig. 2.14, pode ser escrita

na forma da seguinte equação:

$$v_0 = (2,5 \times 10^{-6} \pm 4,3 \times 10^{-7}) \frac{(4,2 \pm 0,7)[\text{monoascorbato}]}{1 + (4,2 \pm 0,7)[\text{monoascorbato}]} \quad (2.54)$$

sendo, $r = 0,998$.

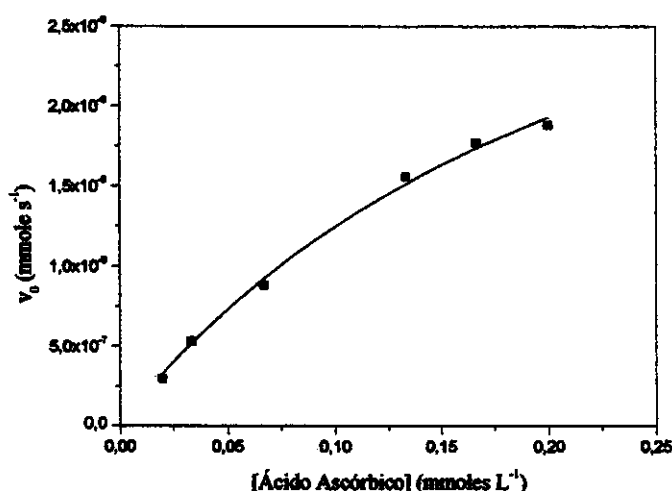


Fig. 2.14 Gráfico de Michaelis-Menten para o substrato ácido ascórbico referente a cinética enzimática do extrato bruto de casca de pepino.

Com a Eq. 2.53 pode-se estimar $V_{\max}$ e K_m para o substrato ácido ascórbico no extrato enzimático bruto de casca de pepino. Para uma estimativa de K_m mais precisa, utilizou-se o gráfico de Lineweaver-Burk da Fig. 2.15, onde o coeficiente angular desta curva está relacionada com K_m pela equação:

$$C.A._{LB} = \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (2.55)$$

onde, $C.A._{LB}$ é o coeficiente angular do gráfico de Lineweaver-Burk.

A equação para a regressão linear do gráfico de Lineweaver-Burk (Fig. 2.15) é dada por:

$$\frac{1}{v_0} = (181.000 \pm 57.000) + (62.000 \pm 2.300) \frac{1}{[\text{monoascorbato}]} \quad (2.56)$$

sendo, $r = 0,997$; EDPR = 91206; N = 6.

O valor estimado para K_m^A aparente foi $157 \mu\text{mol L}^{-1}$, e similar àquele descrito para a enzima pura ($166 \mu\text{mol L}^{-1}$ - Método Polarográfico)^[92]. Este pequeno valor de K_m^A mostra a elevada afinidade da ascorbato oxidase pelo ácido ascórbico. A atividade enzimática para o extrato bruto foi 122 U mL^{-1} . Isto significa que 1 mL do extrato enzimático da casca de pepino tem a capacidade de oxidar $122 \mu\text{mol}$ de ácido ascórbico por minuto a 25°C . O V_{max} estimado (Fig. 2.14) foi em torno de $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{mol}$ de ácido ascórbico decomposto por segundo por $5 \mu\text{L}$ de extrato enzimático diluído 4 vezes.

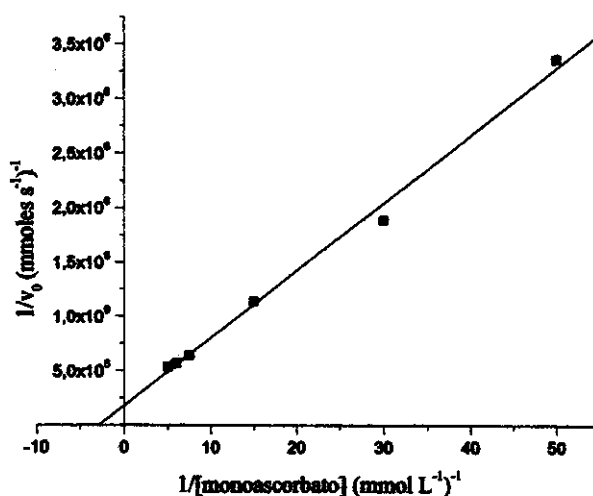


Fig. 2.15 Gráfico de Lineweaver-Burk para a cinética enzimática de ácido ascórbico com o extrato bruto de casca de pepino.

V. Características da Membrana do Biossensor EVA/Ascorbato Oxidase

Inicialmente, foi tentado imobilizar o extrato bruto de casca de pepino por ligação covalente cruzada, com glutaraldeído, sobre o eletrodo de grafite/epóxi. Contudo, o biossensor não apresentou boa seletividade, desde que ele permitia o acesso de íons interferentes sobre a superfície do eletrodo base de grafite/epóxi. Então, utilizou-se uma membrana de EVA para imobilizar por oclusão o extrato enzimático e superar este problema. O EVA é um copolímero muito frequentemente usado em formulação de adesivos *hot-melt*. Ele apresenta temperatura de transição vítrea (T_g) na faixa de 28 a 30°C , dependendo da razão acetato de vinila para etileno na composição^[95].

Em geral, a imobilização de enzimas em matrizes poliméricas^[96-98] é feita usando o PVC. Contudo, este polímero apresenta uma elevada temperatura de transição vítrea ($T_g = 81^\circ\text{C}$) e as membranas resultante dele são rígidas. Assim, é usual utilizar plastificantes na preparação de membranas para ISE com PVC, pois estes reduzem a T_g abaixo da temperatura ambiente, resultando numa membrana mais

flexível.

O EVA tem recebido especial atenção por alguns pesquisadores^[99,100], devido às características desejáveis que ele apresenta em relação ao PVC na construção de membranas sensoras para ISE. A principal delas, é a ausência de plastificantes na preparação da membrana, o que simplifica muito a obtenção do sensor, diminuindo custos e interferência, além de reduzir a lixiviação do componente ativo^[100-102].

Um problema da imobilização de enzimas por oclusão em membranas poliméricas é o curto tempo de vida do biossensor. Esta desvantagem foi atenuada pela inclusão de uma pequena quantidade de glutaraldeído junto com o extrato enzimático bruto de casca de pepino, uma vez que a imobilização por ligação covalente cruzada resulta em um maior tempo de vida^[98]. Neste caso, não é necessário adicionar albumina na membrana, pois a enzima obtida de fonte natural, sem grande purificação, continua em seu ambiente natural.

A membrana obtida para o biossensor-ascorbato foi muito fina e ficou protegida do ambiente pela protuberância do tubo que serve como suporte do eletrodo de grafite/epóxi. Vários eletrodos foram obtidos de maneira similar e seu comportamento foi quase sempre o mesmo.

VI. Efeito de pH, Força Iônica e Temperatura no Biossensor EVA/Ascorbato Oxidase

A Fig. 2.16 mostra o efeito do pH da solução sobre a resposta do biossensor. O substrato da enzima é o íon ascorbato (monoânion), assim, o eletrodo trabalha perfeitamente na região de pH onde esta espécie está presente ($\text{pH} > 4$). Por outro lado, em pH maior que 6,0 o eletrodo não responde muito bem em estado estacionário, uma vez que o ácido áscórbico é instável em meio neutro ou alcalino (Apêndice 1). Além disto, em meio alcalino o biossensor pode sofrer a interferência de alguns açúcares com carbono anomérico, desde que os íons Cu^{2+} da ascorbato oxidase podem reagir com os grupos aldeídicos de acordo com a reação de Fehling^[94]. Assim, o pH 5,0 foi escolhido para as medidas potenciométricas e armazenagem do biossensor. É interessante observar pelo diagrama de Reilley (Fig. 2.16) que o biossensor sofre interferência do pH da solução, possivelmente respondendo para o íon OH^- , devido a sua capacidade de coordenação com Cu^{2+} . Assim, é importante ter um controle adequado do pH da solução com tampão.

O efeito da concentração do tampão utilizado no ajuste da força iônica do meio, em relação à resposta do eletrodo para o íon ascorbato, foi estudada na faixa de 0,1 até 1,0 mol L⁻¹. A variação de força iônica não influenciou a resposta do eletrodo. Valores de força iônica menores que 0,1 mol L⁻¹, não foram estudados, pois o pH da solução poderia ser afetado pela adição da solução de ácido ascorbico, preparada em pH abaixo de 3, uma vez que esta é mais estável em meio fortemente ácido.

O efeito da temperatura no tempo de resposta do biossensor foi estudada entre 25 e 50 °C. O tempo de resposta para o eletrodo variou de 5 min a 25 °C para 2 min a 50 °C, mostrando que o

biossensor responde relativamente mais rápido à temperaturas mais elevadas que a ambiente (Fig. 2.17). Embora a enzima ascorbato oxidase seja bastante estável a altas temperaturas^[92,93], todas as medidas potenciométricas foram realizadas a 25 °C para evitar a desnaturação da enzima e conseqüentemente, diminuir o tempo de vida útil do biossensor.

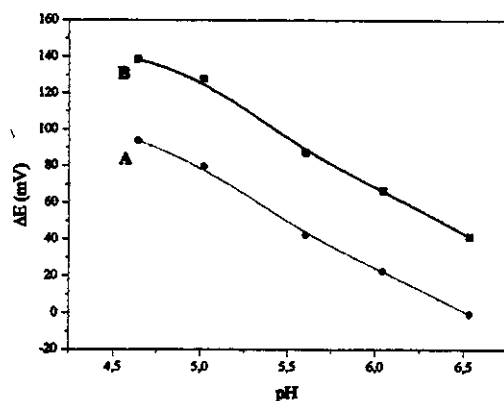


Fig. 2.16 Diagrama de Reilley mostrando a faixa operacional de pH para o biossensor. Temperatura: (25,0±0,1)°C. Força iônica: 0,1 mol L⁻¹. Concentração de ácido ascórbico, mol L⁻¹: A. 1×10⁻⁵ e B. 1×10⁻⁴.

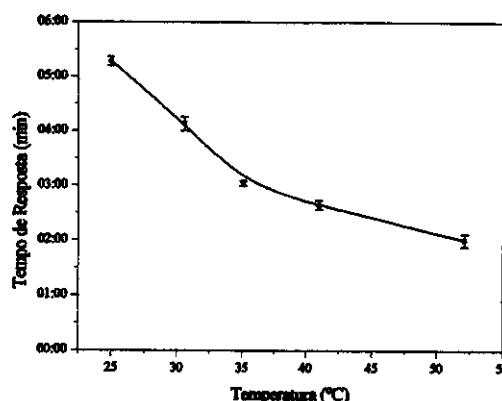


Fig. 2.17 Efeito da temperatura no tempo de resposta do biossensor para ascorbato baseado no extrato bruto de casca de pepino contendo ascorbato oxidase. pH 5,0. Força iônica: 0,1 mol L⁻¹.

VII. Avaliação e Desempenho do Biossensor EVA/Ascorbato Oxidase

O biossensor construído para o íon ascorbato exibiu comportamento sub-nernstiano de 50 mV/década a 25 °C em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0. A faixa de resposta linear foi de $8,0 \times 10^{-6}$ a $4,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $4,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (Fig. 2.18). O tempo de recuperação do eletrodo, isto é, o tempo necessário para atingir um novo equilíbrio após sua utilização numa medida potenciométrica, foi em torno de 10 min sob constante agitação em água deionizada. Apesar deste tempo ser longo, ele foi menor do que descrito na literatura para outros eletrodos potenciométricos para ácido ascórbico, cerca de 30 min^[103]. No caso, é necessário o borbulhamento contínuo de O₂ para a resposta apropriada do biossensor, uma vez que este substrato restaura a enzima na sua forma ativa (Eq. 2.49 e 2.50).

A equação que descreve o desempenho analítico do biossensor é dada por:

$$\Delta E = -(126 \pm 2) + (50,3 \pm 0,6)p[\text{Ácido Ascórbico}] \quad (2.57)$$

onde $r = 0,9998$; EDPR = 0,74; N= 5.

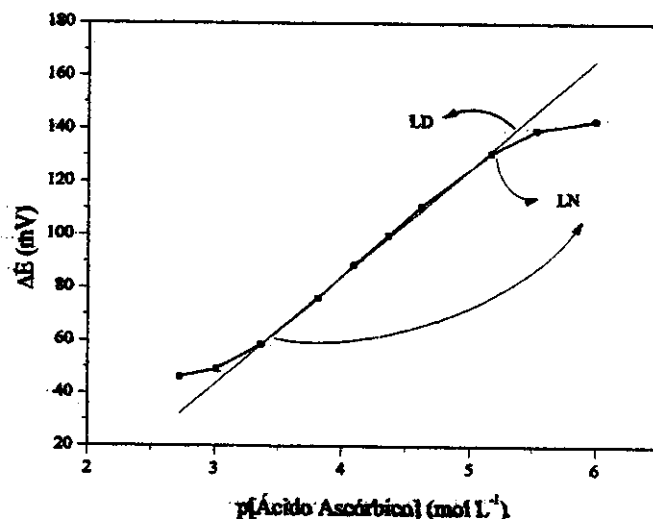


Fig. 2.18 Faixa de linearidade e limite de detecção para o biossensor construído à base de ascorbato oxidase extraída da casca de pepino e imobilizada por oclusão em EVA. Força iônica: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$. pH: 5,0.

O biossensor foi usado continuamente durante 15 dias seguidos, sendo feitas cerca de 300 análises neste período, onde nenhuma mudança na resposta foi observada. Depois de 3 meses, o biossensor mostrou um pequeno decréscimo na sensibilidade para o íon ascorbato (7%).

A interferência de vários compostos, tais como açúcares, sais e conservantes, comumente presentes em amostras biológicas e de fármacos foi estudada. O grau de interferência para algumas substâncias moleculares e iônicas está listado nas Tabelas 2.1 e 2.2, respectivamente. Das espécies moleculares estudadas, a cisteína foi o composto que apresentou maior interferência, desde que a percentagem de recuperação foi 14% maior que o valor esperado. Uréia também apresentou alguma interferência e tem sido descrito como um composto que desativa a ascorbato oxidase, onde este efeito é correlacionado com a complexação dos íons cobre (II) contidos na enzima^[164]. Para as espécies iônicas, o iodeto, o nitrato, o acetato e o cloreto apresentaram uma pequena interferência no biossensor, que pode ser atribuída à afinidade desses ânions pelo Cu^{2+} da enzima. De modo geral, os compostos estudados não interferiram significativamente na resposta do biossensor para ácido ascórbico baseado no extrato bruto de casca de pepino.

Os principais interferentes para este biossensor deveriam ser os íons cianeto, azoteto e fluoreto^[86,88]. Estes ânions são inibidores da enzima ascorbato oxidase por causa da sua capacidade complexante com Cu^{2+} . EDTA também pode coordenar Cu^{2+} , porém nenhum efeito foi observado. Assim, o EDTA pode prevenir a oxidação não enzimática do ascorbato. Substâncias como PIPES e

Tabela 2.1 Grau de interferência obtido para o biossensor em relação a diversas substâncias moleculares. Concentração de ácido ascórbico e interferente: 1×10^{-4} mol L⁻¹ (proporção: 1:1).

Interferente	Ácido Ascórbico (mg L ⁻¹)		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	
Cisteína	17,5	20,0	(114±5)*
Frutose	17,5	18,7	(107±5)
Sacarose	17,5	17,8	(102±5)
Glicose	17,5	18,0	(103±5)
Uréia	17,5	15,8	(90±5)

*Estimado por propagação de erro^[163].**Tabela 2.2** Coeficientes de seletividade potenciométrico para o biossensor. Concentração de interferente: 1×10^{-4} mol L⁻¹.

Interferente	Espécie iônica principal em pH 5.0	Métodos - pK ^{POT}	
		Interferência-fixa	Potential-equivalente
Iodeto de Potássio	I ⁻	1,0	1,9
Nitrato de Potássio	NO ₃ ⁻	1,0	2,3
Acetato de Sódio	H ₃ CCOO ⁻	1,1	3,6
Cloreto de Potássio	Cl ⁻	1,1	n.d.*
Benzoato de Sódio	PhCOO ⁻	1,2	n.d.
Ácido Succínico	Succinato monoânion	1,2	n.d.
L-Histidina	Histidina monoânion	1,4	n.d.
Salicilato de Sódio	Salicilato monoânion	1,6	n.d.
Glicina	Glicina monoânion	1,8	n.d.
Tartarato de Potássio	Tartarato diânion	5,9	1,5
Sulfato de Potássio	SO ₄ ²⁻	6,1	2,3
Citrato de Sódio	Citrato diânion	6,6	n.d.
Oxalato de Potássio	Oxalato diânion	6,9	n.d.
H ₂ EDTANa ₂	H ₂ EDTA diânion	7,1	n.d.

*n.d.: não detectável.

o íon monocitrato são inibidores competitivos para ascorbato^[166], mas este efeito pode ser atenuado no caso de concentração superior do substrato primário em relação aos mesmos^[194]. De qualquer forma, compostos como CN^- , F^- , N_3^- e PIPES, dificilmente estão presentes em preparações farmacêuticas e mesmo em amostras clínicas de sangue ou urina.

O Biossensor foi utilizado na análise de diversas amostras complexas de produtos farmacêuticos. A Tabela 2.3 apresenta os resultados obtidos comparativamente com o método espectrofotométrico^[167].

Tabela 2.3 Resultados obtidos na análise de amostras farmacêuticas de vitamina C usando o biossensor-EVA/ascorbato oxidase.

Amostra	Valor Nominal	FIA-Espectrofotométrico ^[167]	Biossensor	Desvio
#1	1 g/comprimido	$(1,04 \pm 0,02)^{\dagger}$	$(1,0 \pm 0,1)^{\dagger}$	3,8%
#2	1 g/10g de fármaco	$(1,07 \pm 0,02)$	$(1,1 \pm 0,1)$	3,0%
#3	0.24 g/comprimido	$(0,240 \pm 0,001)$	$(0,23 \pm 0,02)$	4,0%
#4	65 mg/10 ml de xarope	(59 ± 1)	(58 ± 2)	2,0%

*Estimativa do desvio relativo obtido entre os métodos espectrofotométrico e potenciométrico com o biossensor.

†Estimativa do desvio padrão para 3-determinações.

Também contém na formulação das amostras de fármacos:

- #1 1,0 g de sacarose, amido e corante laranja;
- #2 5,0 g de glicose e 3,8 g de sacarose;
- #3 0,4 g de ácido acetilsalicílico;
- #4 Vitamina A (2.000 U.I.), B1 (1.30 mg), B2 (1.30 mg), B6 (0.90 mg), B12 (3.0 μg), D (400 U.I.), E (0.0003 ml), ácido fólico (0.50 mg), sulfato de zinco (2.0 mg), sulfato de magnésio (5.0 mg), sulfato de potássio (10.0 mg), sulfato de cobre II (0.50 mg), sulfato de ferro (30.0 mg), iodeto de potássio (0.20 mg), fluoreto de sódio (0.04 mg), sorbitol (10.0 mg) e nicotinamida (13.0 mg), cloridrato de lisina (10.0 mg), citrato de ferro e colina (10.0 mg).

Como pode ser observado os resultados com o biossensor EVA/ascorbato oxidase apresentaram uma boa exatidão em relação ao método espectrofotométrico (desvio relativo em torno de 2 a 4%). Contudo, a precisão dos resultados não foi muito boa (desvio padrão relativo na ordem de 10% para 3 determinações). Isto pode ser explicado pela competição entre a decomposição do ácido ascórbico devido ao oxigênio que é borbulhado na cela eletroquímica de medida, e a cinética de resposta do biossensor. Isto causa um *drift* nas medidas com o biossensor proposto para a uma mesma concentração de ácido ascórbico, principalmente em concentrações diluídas. Esta falta de reprodutibilidade devido a instabilidade do ácido ascórbico, associada com a relação logarítmica na técnica potenciométrica entre o sinal e a concentração (Eq. de Nernst), causa um elevado desvio padrão no teor de ácido ascórbico determinado numa mesma amostra.

2.4.1.2 O Sensor à Base de EVA/Cu²⁺

De acordo com a idéia de que somente os íons Cu²⁺ presentes na estrutura da enzima eram responsáveis pelo desenvolvimento do potencial no biossensor, estudou-se a possibilidade do uso de sais inorgânicos de cobre (II) oclusos na membrana de EVA (Capítulo 5). As características da membrana de EVA 40% dopada com íons Cu²⁺, bem como o seu desempenho na elaboração do sensor potenciométrico para ácido ascórbico serão descritos a seguir.

I. Características da Membrana e Teoria de Resposta do Sensor EVA/Cu²⁺

A principal característica na preparação da membrana sensível para o íon ascorbato baseado em EVA dopado com íons cobre (II), é a necessidade de dissolver o sulfato de cobre (II) em água antes de se adicionar a solução de EVA/THF. Isto é necessário para transportar o cobre (II) na forma iônica através da fase orgânica (EVA/THF) e assim, se manter confinado na rede polimérica por interações de coordenação com o copolímero EVA. Por outro lado, a adição de solução de EVA/THF diretamente sobre o sulfato de cobre (II) sólido, faz com que o eletrodo não exiba resposta potenciométrica.

Fundamentalmente, o mecanismo proposto para a resposta do eletrodo baseado em EVA/Cu²⁺ está apresentado na Fig. 2.19.

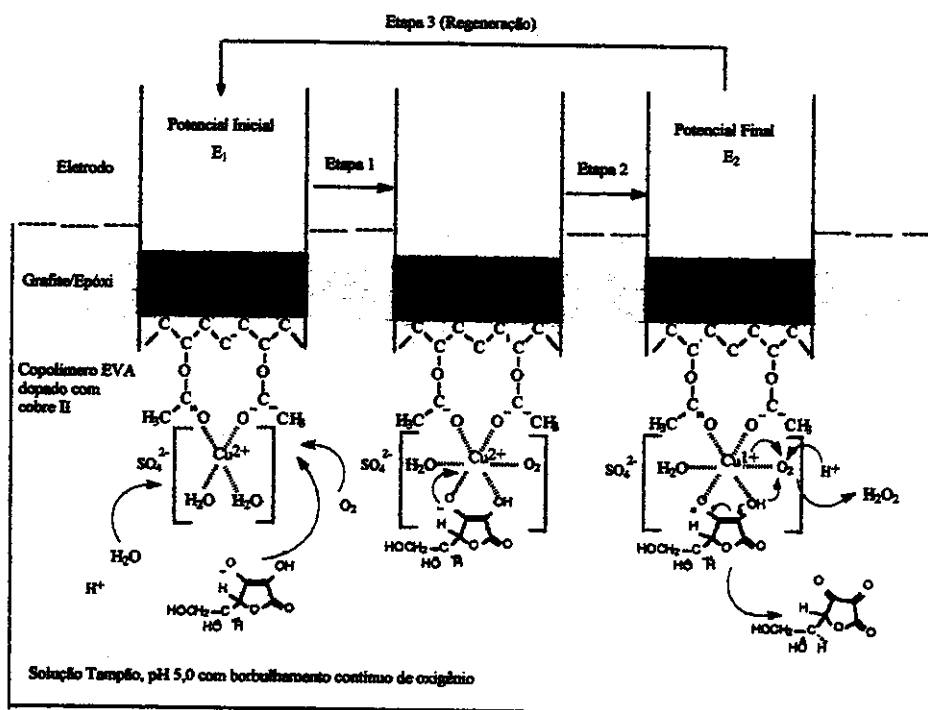
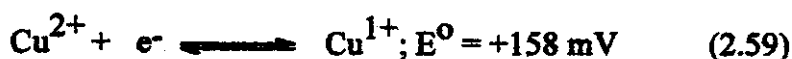


Fig. 2.19 Esquema do mecanismo proposto para a resposta do sensor baseado em membrana de EVA/Cu²⁺ sensível ao íon ascorbato.

Na etapa 1, depois da adição da solução de ácido ascórbico, este sofre dissociação em pH 5.0 produzindo a espécie monoascorbato, a qual forma um complexo octaédrico com o íon cúprico na membrana em presença de oxigênio. Então, os íons Cu^{2+} na membrana de EVA são reduzidos para Cu^{1+} (etapa 2) pelo íon monoascorbato, sendo este oxidado para ácido dehidroascórbico. A mudança na densidade de carga devido ao par redox $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}$ sobre a superfície do eletrodo causa a variação do potencial, a qual é detectada pelo eletrodo de grafite/epóxi. Oxigênio é continuamente borbulhado no sistema para reoxidar o Cu^{1+} a Cu^{2+} , regenerando o eletrodo (etapa 3) e produzindo peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio pode também reagir com o ácido ascórbico, mas este é pouco suscetível a oxidação em baixos níveis de peróxido de hidrogênio^[106]. Assim, a micro-quantidade de peróxido de hidrogênio formado no eletrodo não afeta a medida de potencial. O mecanismo de resposta sugerido está de acordo com a cinética de oxidação do ácido ascórbico catalisada por íons cobre (II)^[109,110]. As semi-reações da cela com os respectivos potenciais redox podem ser escrito como^[111,112]:



O potencial $E_{\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}}$ é dada pela equação de Nernst:

$$E_{\text{Cu(II)/Cu(I)}} = E^0_{\text{Cu(II)/Cu(I)}} + \frac{RT}{zF} \ln \frac{\text{Cu}^{2+}}{\text{Cu}^{1+}} \quad (2.61)$$

Sob concentração constante de O_2 o potencial do eletrodo pode ser representado como:

$$E_{\text{monoascorbato}} = E^0 + \frac{RT}{F} \ln [\text{Monoascorbato}] \quad (2.62)$$

onde E^0 é a soma do $E^0_{\text{monoascorbato}} + E_{\text{Cu(II)/Cu(I)}}$ e z é igual a 1.

Na preparação da membrana, o copolímero EVA foi escolhido em relação ao PVC, porque nele não é necessário o uso de plastificantes, tornando sua formulação mais simples, além de permitir interações entre os íons Cu^{2+} e o EVA, o que não é possível com o PVC. Isto minimiza os problemas de lixiviação dos íons Cu^{2+} da membrana.

II. Efeito da Quantidade de Íons Cobre (II) na Membrana de EVA

A velocidade de oxidação do ácido ascórbico catalisada por íons Cu^{2+} foi determinada por Khan

e Martell^[113] e varia linearmente com a concentração de íons Cu^{2+} , sendo a constante cinética específica cerca de $1620 (\text{mol L}^{-1})^{-1} \text{s}^{-1}$ a 25°C e pH 3.5. É importante enfatizar que para pH superiores esta constante de velocidade será muito maior. Assim, o sensor proposto deverá responder relativamente rápido. A Fig. 2.20 mostra o tempo de resposta obtido com diferentes concentrações de íons Cu^{2+} na membrana. Em geral, ele foi cerca de 2 a 4 min, dependendo da concentração de íons Cu^{2+} na membrana. Um importante fator observado, é que a concentração de íons Cu^{2+} na membrana não deve ser maior que 15%, porque este lixivia para a solução, afetando a estabilidade do potencial (Fig. 2.20C). Em estado estacionário, foi escolhido uma concentração de 5% de íons Cu^{2+} na membrana para evitar o problema da lixiviação.

Vale ressaltar que, em baixas concentrações de íons Cu^{2+} na membrana, o eletrodo apresenta um limite nernstiano menor do que em concentrações maiores. Isto ocorre, pois os íons Cu^{2+} na membrana saturam para uma concentração pequena de monoascorbato, porém, o limite de detecção permanece inalterado.

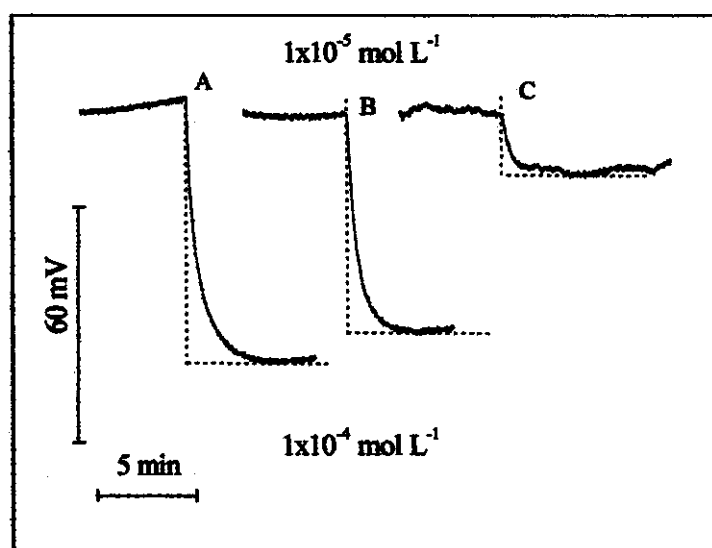


Fig. 2.20 Efeito da concentração de íons Cu^{2+} na membrana de EVA, no tempo de resposta do eletrodo sensível para o íon ascorbato. A. 5%; B. 10%; C. 15%. pH 5,0. Força iônica: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.

III. Efeito do pH e da Força Iônica no Sensor EVA/ Cu^{2+}

A Fig. 2.21 mostra o efeito do pH da solução sobre a resposta do eletrodo para ascorbato. A faixa operacional de pH foi entre 3,5 e 8,0, e pode ser justificada devido ao íon monoascorbato apresentar

maior capacidade redox que a espécie molecular, uma vez que o ácido ascórbico não sofre oxidação catalisada pelos íons Cu^{2+} ^[113]. Contudo, não é recomendado usar o eletrodo em condições de estado estacionário, em pH maior que 6,0, porque a estabilidade das soluções de ácido ascórbico decresce com o aumento do pH da solução (Apêndice 1). Além disto, em meio alcalino o sensor EVA/ Cu^{2+} pode sofrer a interferência de açúcares com carbono anomérico, devido a reação de Fehling^[94]. Então, o pH 5.0 foi escolhido para as medidas potenciométricas. É interessante observar pelo diagrama de Reilley da Fig. 2.21, que o sensor sofre influência do pH da solução, possivelmente respondendo para OH^- , devido a capacidade de coordenação com os íons Cu^{2+} . Logo é importante um adequado controle do pH da solução com tampão. Tais resultados foram similares aos obtidos com o biossensor baseado em ascorbato oxidase de extrato bruto de casca de pepino.

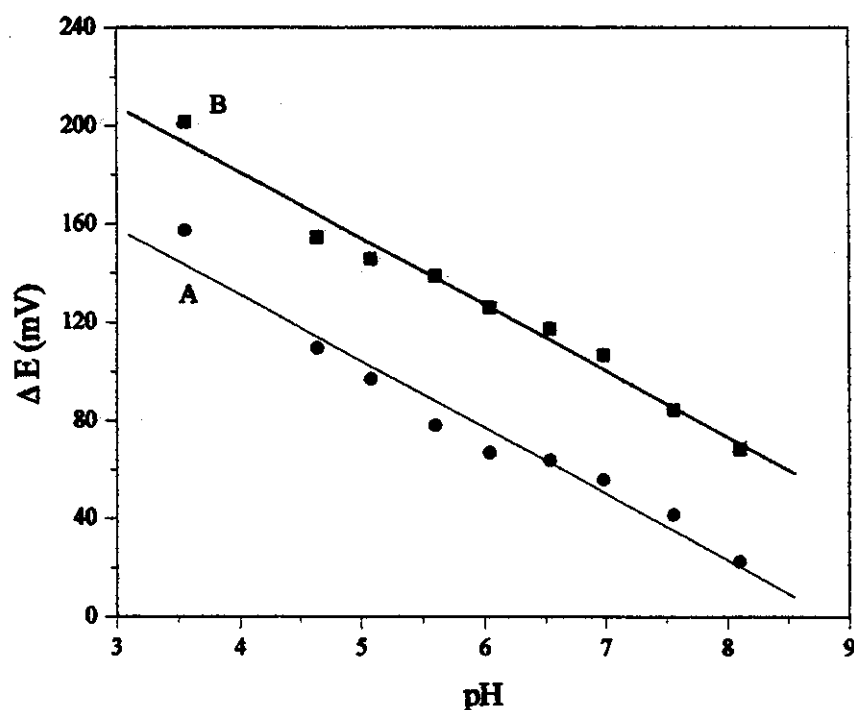


Fig. 2.21 Diagrama de Reilley mostrando a faixa operacional de pH do sensor baseado em EVA/ Cu^{2+} para ácido ascórbico. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Força Iônica: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de ácido ascórbico, mol L^{-1} : A. 1×10^{-4} ; B. 1×10^{-5} .

A força iônica não afetou a resposta do eletrodo na faixa de $0,1$ a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Valores menores que $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ não foram investigados pois o pH do sistema tampão pode ser modificado pela adição da solução de ácido ascórbico, preparada em pH abaixo de 3 para melhorar sua estabilidade. Assim, todas as medidas foram realizadas usando tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

IV. Avaliação e Desempenho do Sensor EVA/Cu²⁺

A Fig. 2.22 apresenta curvas de calibração para ácido ascórbico com o eletrodo preparado com e sem íons Cu²⁺ na membrana. As curvas mostram claramente que os íons Cu²⁺ são responsáveis pelo desenvolvimento do potencial. O sensor apresentou comportamento nernstiano (≈ 55 mV/década) na faixa de concentração $5,6 \times 10^{-6}$ a $3,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para ácido ascórbico em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato, pH 5,0 a 25,0 °C. O limite de detecção foi $3,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. O eletrodo apresentou um limite nernstiano superior, onde acima de $3,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ele não responde linearmente, provavelmente devido a saturação dos íons Cu²⁺ na membrana. A equação que descreve o desempenho analítico do sensor é dada por:

$$\Delta E = -(132 \pm 3) + (55,4 \pm 0,7) p[\text{Ácido Ascórbico}] \quad (2.63)$$

onde, $r = 0,9996$; EDPR = 1,0; N = 7.

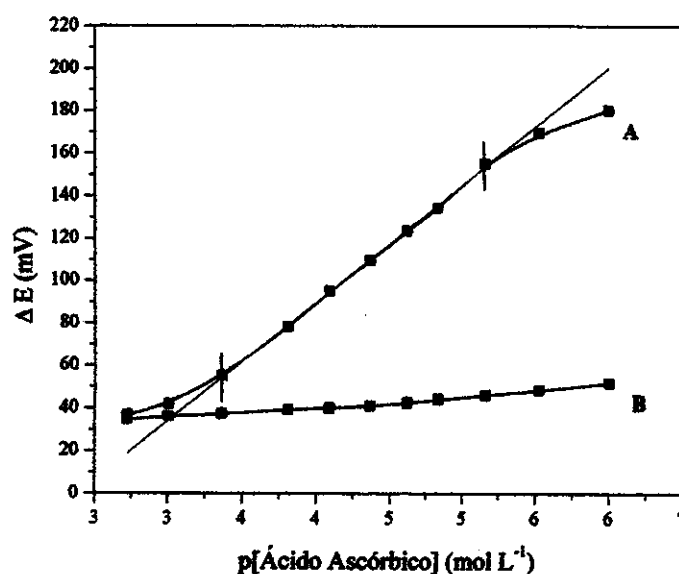


Fig. 2.22 Dependência do potencial do eletrodo como função da concentração de ácido ascórbico. Força iônica: 0,1 mol L⁻¹, pH: 5,0. Temperatura: (25,0 $\pm$ 0,1) °C. Eletrodo baseado em membrana de EVA: A. com e B. sem íons Cu²⁺ (5%) na membrana.

Um problema deste eletrodo foi o tempo requerido para atingir um novo equilíbrio, cerca de 5 a 10 min sobre constante agitação em água deionizada e borbulhamento de O₂, o que provoca uma frequência analítica de 6 amostras por hora.

A presença de alguns compostos normalmente encontrados em amostras farmacêuticas e clínicas foram investigados e o grau de interferência está apresentado nas Tabelas 2.4 a 2.6. Os compostos

moleculares estudados não apresentaram interferência significativa na resposta do sensor, exceto uréia (Tabela 2.4). Este comportamento poderia ser explicado por sua possível capacidade de coordenação com Cu^{2+} , da mesma forma que ocorre com o biossensor baseado na enzima ascorbato oxidase. Outros possíveis interferentes seriam o EDTA e o ácido úrico, pois também podem coordenar com os íons Cu^{2+} . Contudo, nenhuma interferência destes compostos foi observada. A pH 5,0, o EDTA pode sofrer repulsão eletrostática dos grupos acetatos do copolímero EVA, não permitindo a formação do complexo de maneira mais efetiva entre o íon Cu^{2+} e os grupos amino do EDTA. Já o ácido úrico é pouco solúvel em pH 5,0 e está praticamente todo na forma molecular.

Os coeficientes de seletividade potenciométricos para o eletrodo indicaram que este tem maior preferência pelo íon primário. Da mesma forma que ocorreu com o biossensor para ácido ascórbico, baseado na enzima ascorbato oxidase de extrato bruto de casca de pepino, os métodos estudados para determinação dos coeficientes de seletividade mostraram grande discrepância entre eles (Tabela 2.5). Contudo, o método do potencial-equivalente é mais real porque não necessita levar em consideração o comportamento nernstiano do íon interferente, nem é importante a carga dos íons para calcular o K^{POT} , assim, ele apresenta maior aplicação prática (Capítulo 2 - Seção 2.2.2.5). Logo, o sensor respondeu cerca de 250 vezes mais para ácido ascórbico que para iodeto, o composto iônico que causou maior interferência (Tabela 2.5).

Possíveis interferentes para o eletrodo proposto são catecol e seus derivados, porque estas substâncias são também oxidadas pelo oxigênio na presença de íons Cu^{2+} ^[114]. A Tabela 2.6 mostra a influência de alguns compostos fenólicos na resposta do sensor, sendo este efeito estimado pelo K^{POT} , de acordo com o método do potencial-equivalente. O eletrodo apresentou resposta para uma variedade de derivados de catecol, hidroquinona (1,4-dihidroxibenzeno), dopamina (3-hidroxitiramina), catecol (1,2-dihidroxibenzeno) e L-dopa (3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina). Nos casos da hidroquinona e dopamina, o eletrodo responde cerca de seis a quatro vezes mais para estas substâncias que para ácido ascórbico, respectivamente. Porém, estes compostos não estão presentes em formulações farmacêuticas contendo ácido ascórbico e assim, não são um sério problema. Somente em análises clínicas que estas interferências podem ser críticas. Além disto, Balla *et al.*^[114] sugerem uma dependência dos dados cinéticos em função do pH, na oxidação do catecol catalisada por íons Cu^{2+} , a qual envolve mais espécies dissociadas do que espécies moleculares, com uma etapa de propagação em cadeia. O pK^{a} ^[115] dos grupos hidroxilas na hidroquinona (10,4), dopamina (10,4 e 13,1), catecol (9,3 e 13,0) e L-dopa (10,0 e 11,8) sugere que em pH abaixo de 4,0 essas substâncias estão totalmente na sua forma molecular, e então, o eletrodo não responderia para as mesmas. Testes com dopamina em pH 4,0 confirmaram esta hipótese (Fig. 2.23).

O sensor foi usado continuamente em cerca de 300 determinações. Sua sensibilidade não foi modificada apreciavelmente, sendo observado apenas um pequeno decréscimo na resposta do sensor no 15º dia consecutivo de uso (Tabela 2.7), que não prejudicou seu uso posterior.

Tabela 2.4 Grau de interferência obtido para o sensor EVA/Cu²⁺. Concentração de interferente: 1×10⁻⁴ mol L⁻¹.

Interferentes	Ácido Ascórbico (mg L ⁻¹)		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	
Cisteína	7,5	7,3	97±5*
	17,5	19,0	108±5
Frutose	7,5	7,9	105±6
	17,5	18,1	103±6
Sacarose	7,5	7,9	105±6
	17,5	19,0	108±6
Glicose	7,5	7,3	97±6
	17,5	18,5	105±6
Uréia	7,5	6,4	85±5
	17,5	16,4	94±5

*Estimado por propagação de erro.

Tabela 2.5 Coeficientes de seletividade potenciométricos para o sensor EVA/Cu²⁺.

Interferente	Espécie iônica principal em pH 5.0	Método - pK ^{POT}	
		Interferência-Fixa	Potencial-Equivalente
Iodeto de Potássio	I ⁻	1,3	2,4
Acetato de Sódio	H ₃ CCOO ⁻	1,4	3,5
Nitrato de potássio	NO ₃ ⁻	1,5	2,5
Ácido Succínico	Succinato monoânion	1,5	n.d.
L-Histidina	Histidina monoânion	1,5	3,4
Salicilato de Sódio	Salicilato monoânion	1,7	2,6
Benzoato de Sódio	φCOO ⁻	1,7	2,9
Glicina	Glicina monoânion	1,8	n.d.*
Cloreto de Potássio	Cl ⁻	1,9	3,9
Tartarato de Pótassio	Tartarato diânion	6,2	4,0
H ₂ EDTANa ₂	H ₂ EDTA diânion	7,1	3,2
Oxalato de Potássio	Oxalato diânion	7,2	2,8
Sulfato de Potássio	SO ₄ ²⁻	7,4	n.d.

*n.d. não detectável.

Tabela 2.6 Coeficientes de seletividade potenciométricos para o sensor EVA/Cu²⁺, estimado pelo método P-E. Todas as medidas foram realizadas em pH 7,0.

Interferentes	pK ^{POT}	K ^{POT}
Hidroquinona	-0,8	6,0
Dopamina	-0,6	4,2
Catecol	-0,2	1,4
L-Dopa	0,04	0,9
4-Nitrofenol	1,0	0,1
3-Nitrofenol	1,0	0,1
Tirosina	1,1	0,09
2-Nitrofenol	1,1	0,09
Fenol	1,1	0,09
Resorcinol	1,1	0,09

Tabela 2.7 Estabilidade do sensor proposto para ácido ascórbico baseado em membrana de EVA dopada com íons Cu²⁺.

Dias	Coeficiente Angular (mV década ⁻¹)	Coeficiente de correlação (r)
1º	59±1	0,9992
2º	60±1	0,9992
3º	55,4±0.7	0,9996
7º	59,1±0.9	0,9988
11º	58±2	0,9973
15º	50,2±0.4	0,9999

O eletrodo proposto para ácido ascórbico baseado em membrana de EVA/Cu²⁺ foi utilizado com bons resultados para determinação ácido ascórbico em amostras farmacêuticas, como pode ser observado na Tabela 2.8. As drogas analisadas contém vários compostos em suas formulações, tais como açúcares, sais e conservantes, porém nenhuma interferência foi observada. Os resultados para determinação de ácido ascórbico nestas amostras apresentaram boa concordância com o método espectrofotométrico mostrando a aplicabilidade do eletrodo proposto. Contudo, o sensor EVA/Cu²⁺ não apresentou uma boa precisão nas medidas do teor de ácido ascórbico nas replicatas das amostras. Isto pode ser atribuído, a instabilidade do ácido ascórbico associada com a relação logarítmica na

técnica potenciométrica entre o sinal e a concentração (Eq. de Nernst), da mesma forma que no biossensor baseado em EVA/ascorbato oxidase.

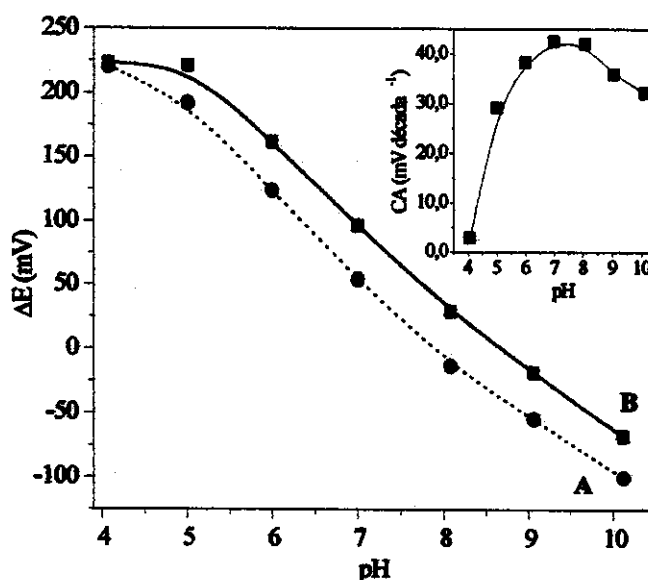


Fig. 2.23 Efeito do pH na resposta do sensor EVA/Cu²⁺ para dopamina. Temperatura: (25,0±0,1) °C. Força Iônica: 0,1 mol L⁻¹. Concentração de dopamina, mol L⁻¹: A. 1×10⁻⁴; B. 1×10⁻⁵.

Tabela 2.8 Resultados obtidos na análise de amostras farmacêuticas de vitamina C com o sensor EVA/Cu²⁺.

Amostra	Valor Nominal	FIA-Espectrofotométrico ^[107]	Sensor EVA/Cu ²⁺	Desvio Relativo*
#1	1 g/comprimido	(1,04±0,02) [†]	(1,1±0,2) [†]	5,5%
#2	1 g/10g de fármaco	(1,07±0,02)	(1,1±0,1)	2,7%
#3	0,24 g/comprimido	(0,240±0,001)	(0,26±0,03)	7,7%
#4	65 mg/10 ml de xarope	(59±1)	(59±6)	0,0%

*Estimativa do desvio relativo obtido entre os métodos espectrofotométrico e potenciométrico.

†Estimativa do desvio padrão para 3 determinações.

Também contém na formulação das amostras de fármacos:

#1 1,0 g de sacarose, amido e corante laranja;

#2 5,0 g de glicose e 3,8 g de sacarose;

#3 0,4 g de ácido acetilsalicílico;

#4 Vitamina A (2.000 U.I.), B1 (1.30 mg), B2 (1.30 mg), B6 (0.90 mg), B12 (3.0 µg), D (400 U.I.), E (0.0003 ml), ácido fólico (0.50 mg), sulfato de zinco (2.0 mg), sulfato de magnésio (5.0 mg), sulfato de potássio (10.0 mg), sulfato de cobre II (0.50 mg), sulfato de ferro (30.0 mg), iodeto de potássio (0.20 mg), fluoreto de sódio (0.04 mg), sorbitol (10.0 mg) e nicotinamida (13.0 mg), cloridrato de lisina (10.0 mg), citrato de ferro e colina (10.0 mg).

2.4.2 O ISE-Urato

Similar ao que ocorre com o ácido ascórbico, o ácido úrico também é um forte agente redutor e sofre oxidação pelo oxigênio catalisada por íons metálicos como Cu^{2+} , Fe^{3+} , citocromo-Fe(III), dentre outros (Capítulo 1 - Seção 1.2.2). Além disto, duas das enzimas que atuam na degradação do ácido úrico, a xantina oxidase e a uricase, são metalo-enzimas. A uricase, por exemplo, apresenta no sítio ativo, íons Cu^{2+} ligados a resíduos de aminoácidos^[116]. Então, na elaboração deste sensor resolveu-se utilizar a mesma idéia adotada para o sensor de ácido ascórbico. Curiosamente, nos testes iniciais utilizando o sensor EVA/ Cu^{2+} , observou-se uma resposta anômala, em que o potencial desenvolvido aumentava com o aumento da concentração de ácido úrico, indicando ocorrer alguma mudança nas cargas da dupla camada elétrica deste eletrodo nas condições de trabalho. Desta forma, optou-se por desenvolver um eletrodo baseado em membrana de EVA dopada com íons Fe^{3+} . Neste caso, o fenômeno anterior não foi observado, e o eletrodo apresentou um comportamento adequado.

2.4.2.1 O Sensor à Base de EVA/ Fe^{3+}

I. Características da Membrana e Teoria de Resposta do Sensor EVA/ Fe^{3+}

Na preparação da membrana sensível para o íon urato, baseada em EVA dopado com íons Fe^{3+} , ocorre o mesmo fenômeno observado na membrana EVA/ Cu^{2+} , isto é, a necessidade de dissolver o sulfato de ferro (III) em água antes de adicionar a solução de EVA/THF (Capítulo 5). Quando isto não é realizado o eletrodo não exibe resposta potenciométrica. Isto vem a confirmar a necessidade de transportar o sulfato de ferro (III) através da fase orgânica (EVA/THF) na forma iônica e assim, se manter confinado na rede polimérica por interações por coordenação com o copolímero EVA.

O eletrodo EVA/ Fe^{3+} para ácido úrico trabalha de acordo com o esquema proposto da Fig. 2.24.

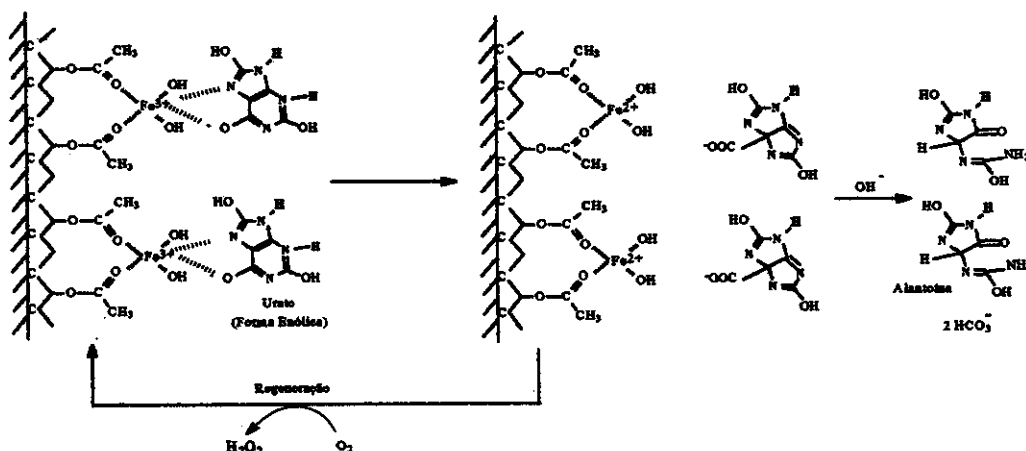


Fig. 2.24 Esquema do mecanismo de resposta do sensor para urato baseado em membrana de EVA/ Fe^{3+} .

Inicialmente, o íon urato em solução alcalina (pH 12) forma um complexo com o íon Fe^{3+} na membrana em presença de oxigênio. Então, os íons Fe^{3+} na membrana de EVA são reduzidos para Fe^{2+} pelo íon urato, sendo este oxidado para alantoína com produção do íon bicarbonato ou carbonato e peróxido de hidrogênio. A mudança na densidade de carga devido ao par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ sobre a superfície do eletrodo causa a variação do potencial, a qual é detectada pelo eletrodo de grafite/epóxi. Ar atmosférico é continuamente borbulhado no sistema através de uma bomba pneumática, para reoxidar o Fe^{2+} a Fe^{3+} com o auxílio do oxigênio, regenerando o eletrodo. Tal mecanismo de resposta está de acordo com a cinética enzimática da uricase e de oxidação do ácido úrico por íons metálicos^[117,118].

O potencial $E_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}}$ é dado pela equação de Nernst:

$$E_{\text{Fe(III)/Fe(II)}} = E_{\text{Fe(III)/Fe(II)}}^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{\text{Fe}^{3+}}{\text{Fe}^{2+}} \quad (2.64)$$

Sob concentração constante de O_2 o potencial do eletrodo pode ser representado como:

$$E_{\text{urato}} = E^0 + \frac{RT}{F} \ln[\text{Urato}] \quad (2.65)$$

onde E^0 é a soma do $E_{\text{urato}}^0 + E_{\text{Fe(III)/Fe(II)}}$ e z é igual a 1.

II. Efeito do pH e da Força Iônica sobre o Sensor EVA/ Fe^{3+}

A Fig. 2.25 mostra o efeito do pH da solução sobre a resposta do eletrodo para urato. A faixa operacional de pH foi entre 9,0 e 12,0, contudo recomenda-se utilizar o eletrodo somente em pH 12, onde a solubilidade do urato é maior. Para valores de pH menores que 8, começa a ocorrer uma ligeira precipitação do ácido úrico.

A força iônica também foi um importante parâmetro que afetou as medidas potenciométricas com o sensor EVA/ Fe^{3+} (Fig. 2.26). Observa-se que em fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ocorre uma ligeira diminuição do sinal em concentrações superiores a $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Isto provavelmente ocorre por causa do baixo efeito tamponante do fosfato em pH 12, favorecendo assim, uma competição entre os íons H^+ gerados na reação catalítica e o processo redox na superfície do eletrodo. Então, todas as medidas foram realizadas em fosfato $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 12.

III. Avaliação e Desempenho do Sensor EVA/ Fe^{3+}

O sensor para ácido úrico baseado em membrana de EVA dopada com íons Fe^{3+} apresentou comportamento sub-nernstiano (42 mV/década) na faixa de concentração $6,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol}$

L^{-1} em $0,25 \text{ mol } L^{-1}$ de tampão fosfato, pH 12,0 a $25,0^\circ C$. O limite de detecção foi $5,2 \times 10^{-6} \text{ mol } L^{-1}$. O eletrodo apresentou um limite nernstiano superior, onde acima de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol } L^{-1}$ o mesmo não responde linearmente, provavelmente devido à saturação dos íons Fe^{3+} na membrana. Contudo esta região pode ser utilizada numa determinação analítica, uma vez que sua curvatura não é muito pronunciada (Fig. 2.26). A equação que descreve o desempenho analítico do sensor é dada por:

$$\Delta E = -(246 \pm 4) + (42,0 \pm 0,8)p[\text{Ácido Úrico}] \quad (2.66)$$

onde, $r = 0,9996$; $EDPR = 0,94$; $N = 4$.

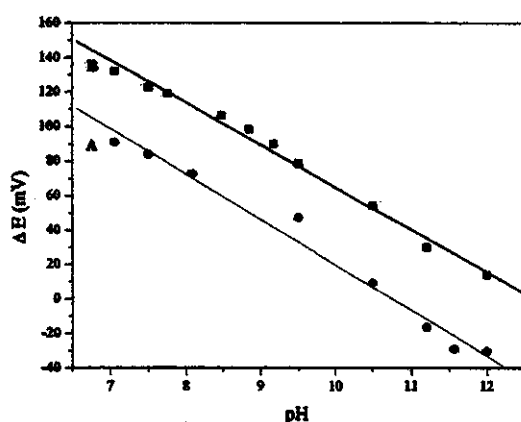


Fig. 2.25 Diagrama de Reilley para o sensor EVA/ Fe^{3+} . Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ C$. Força iônica: $0,1 \text{ mol } L^{-1}$. Concentração de ácido úrico, $\text{mol } L^{-1}$: A. 1×10^{-4} ; B. 1×10^{-5} .

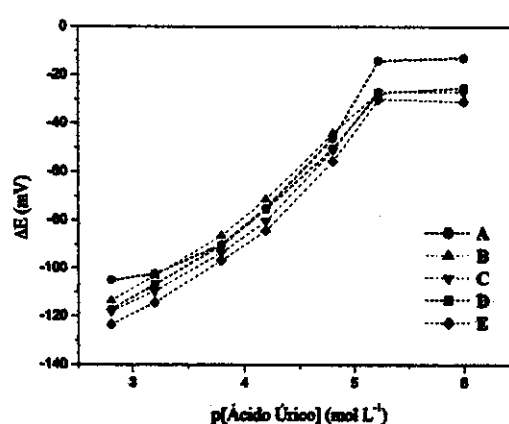


Fig. 2.26 Efeito da força iônica na resposta do sensor EVA/ Fe^{3+} para ácido úrico. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ C$. Concentração de fosfato, $\text{mol } L^{-1}$: A. 0,10; B. 0,25; C. 0,50; D. 0,75; E. 1,00.

O tempo de resposta do sensor proposto para ácido úrico foi em torno de 5 min (Fig. 2.27). Neste caso, procurou-se minimizar as perdas por lixiviação preparando um sensor com uma concentração de Fe^{3+} na membrana em torno de 5%.

Similar ao eletrodo EVA/ Cu^{2+} , elaborado para o ácido ascórbico, foram estudados uma série de compostos interferentes, geralmente encontrados em amostras biológicas. As Tabelas 2.9 e 2.10 apresentam os resultados obtidos para o grau de interferência de espécies moleculares e iônicas, respectivamente. Alguns açúcares, numa proporção 100 vezes superior ao ácido úrico, apresentaram uma possível interferência na resposta do sensor, devendo-se tomar cuidado numa determinação de ácido úrico contendo este tipo de composto molecular.

Em relação aos compostos iônicos, não foi observado nenhuma interferência considerável (Tabela 2.10). Os interferentes para este sensor também devem sofrer oxidação catalisada por Fe^{3+} , que seriam

o ácido ascórbico, catecol e derivados. Apesar destes compostos apresentarem uma resposta no sensor, superior à obtida para o ácido úrico, compostos como ácido ascórbico, catecol, hidroquinona e dopamina são extremamente instáveis em pH alcalino, sendo facilmente decompostos. Como pode ser observado na Fig. 2.28, após a adição destes compostos no sistema em estado estacionário, um sinal pronunciado é obtido devido a resposta do sensor ao interferente. Contudo, o sinal não atinge o equilíbrio por causa da decomposição dos interferentes pelo oxigênio do meio (A, B, C e D), provocando a formação de um pico. Desta forma, tais substâncias não serão interferentes críticos para o sensor, pois podem ser eliminadas antes das análises com o ajuste do pH. A Tabela 2.11 apresenta os coeficientes de seletividade obtidos com estes interferentes, levando em consideração o sinal máximo atingido.

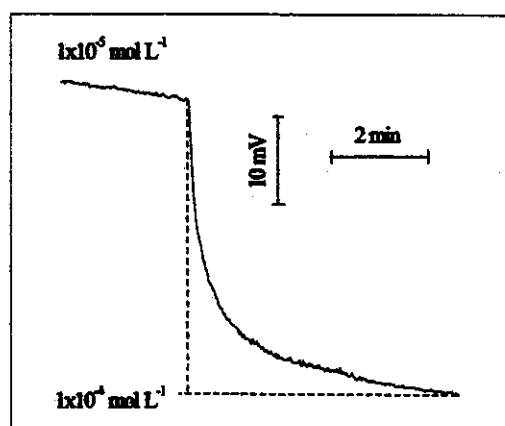


Fig. 2.27 Medida do tempo de resposta do sensor EVA/ Fe^{3+} para o íon urato. Concentração de íons Fe^{3+} na membrana: 5%; pH 12,0; Força iônica: $0,25 \text{ mol L}^{-1}$; Temperatura: $(25,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$.

Tabela 2.9 Grau de interferência obtido para o sensor EVA/ Fe^{3+} , em relação a diversas substâncias moleculares. Concentração de interferente: $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (proporção: 100:1).

Interferente	Ácido Úrico (mg L^{-1})		
	Adicionado	Encontrado	Recuperação (%)
Frutose	1,68	2,01	$(120 \pm 10)^*$
Sacarose	1,68	1,90	(113 ± 10)
Glicose	1,68	1,73	(103 ± 10)
Uréia	1,68	1,75	(104 ± 10)

*Estimado por propagação de erro^[169].

Tabela 2.10 Coeficientes de seletividade potenciométrico obtido pelo método do potencial-equivalente para o sensor EVA/Fe³⁺ construído para ácido úrico. Concentração de interferente: 1×10⁻³ mol L⁻¹.

Interferente	Espécie iônica principal em pH 12,0	pK ^{POT}
Iodeto de potássio	I ⁻	2,3
Carbonato de Sódio	CO ₃ ²⁻	2,6
Nitrato de Potássio	NO ₃ ⁻	4,0
Acetato de Sódio	H ₃ CCOO ⁻	3,6
Cloreto de Potássio	Cl ⁻	3,9
Ácido Succínico	Succinato diânion	4,3
L-Histidina	Histidina triânion	n.d.*
Salicilato de Sódio	Salicilato monoânion	3,4
Glicina	Glicina diânion	n.d.
Tartarato de Potássio	Tartarato diânion	3,7
Sulfato de Potássio	SO ₄ ²⁻	3,0
Citrato de Sódio	Citrato triânion	3,7
Oxalato de Potássio	Oxalato diânion	2,9
H ₂ EDTANa ₂	EDTA tetraânion	2,8

*n.d. não detectável

Tabela 2.11 Coeficientes de seletividade potenciométrico para o sensor EVA/Fe³⁺ estimado pelo método do potencial-equivalente. Todas as medidas foram realizadas em pH 12,0.

Interferentes	pK ^{POT}	K ^{POT}
Ácido Ascórbico	-1,2	15,8
Catecol	-0,9	8,5
Hidroquinona	-0,7	5,0
L-Dopa	-0,4	2,5
Dopamina	-0,3	2,2
Cisteína	1,0	0,1

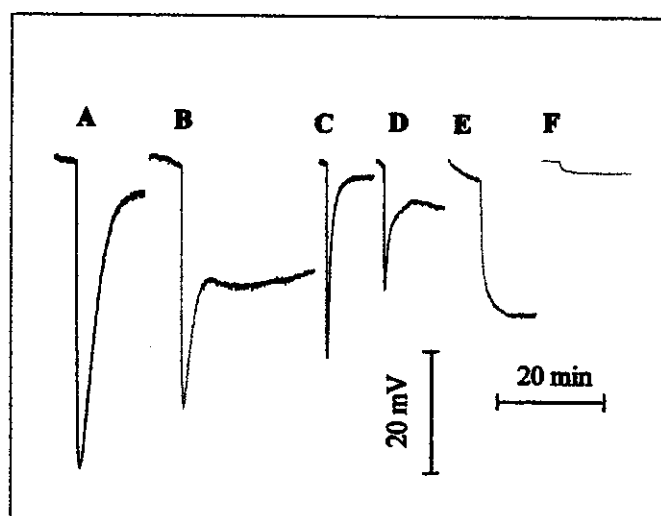


Fig. 2.28 Efeito de algumas biomoléculas na resposta do sensor EVA/ Fe^{3+} . Força iônica: $0,25 \text{ mol L}^{-1}$; pH 12,0; Temperatura: $(25,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$. Concentração de ácido úrico: $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Quantidade de interferente adicionado: $100 \mu\text{L}$ de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A. Ácido ascórbico; B. Catecol; C. Hidroquinona; D. Dopamina; E. L-dopa; F. Cisteína.

Dentre os compostos estudados que apresentam interferência pronunciada no sensor EVA/ Fe^{3+} , somente L-dopa e cisteína são críticos para o sistema, pois apresentam uma boa estabilidade em meio alcalino (Fig. 2.28). Deles, somente a L-dopa possui uma elevada interferência, influenciando cerca de duas vezes e meia mais do que o ácido úrico no sensor. A presença deste interferente em amostras biológicas deve ser eliminada por métodos de extração ou separação.

O sensor proposto foi utilizado na determinação de ácido úrico em amostras de soro fornecidas pelo Hospital das Clínicas (HC) da UNICAMP (Tabela 2.12). Como pode ser observado, os resultados obtidos com o sensor potenciométrico proposto estão na mesma ordem de grandeza que os fornecidos pelo HC-UNICAMP. Contudo, o resultado obtido foi menor que o esperado, com um desvio relativo elevado, cerca de 70%. Isto pode ser atribuído há alguns fatores, como a presença de interferentes que podem influenciar os resultados do método espectrofotométrico utilizado pelo HC-UNICAMP. Um destes interferentes, já citados anteriormente, poderia ser o ácido ascórbico, o que explicaria os resultados superiores ao obtido pelo HC em relação ao ISE-Urato proposto. Por outro lado, as amostras foram armazenadas em freezer, no hospital, por um longo período antes da análise, cerca de cinco meses. Como as amostras de soro sanguíneo apresentam um pH em torno de 7,4, possivelmente, durante o período de armazenagem, parte do ácido úrico presente nas amostras precipitou da solução. Isto explica a turbidez de algumas amostras de soro após descongeladas.

Contudo, era de se esperar que a adição da amostra em meio fortemente alcalino (pH 12) solubilizasse o ácido úrico novamente. Associado a este fato, não se deve esquecer que o método potenciométrico apresenta um desvio relativo nas medidas de concentração em torno de 10% quando o potencial de uma mesma solução varia em torno de 2 mV. Logo, apesar dos resultados serem bastantes discrepantes em relação ao método adotado pelo HC-UNICAMP, eles indicam a potencialidade de aplicação do ISE-Urato baseado em membrana de EVA dopada com íons Fe^{3+} .

Para finalizar, é importante mencionar que mais estudos devem ser necessários para a utilização comercial do sensor para ácido úrico baseado em EVA/ Fe^{3+} .

Tabela 2.12 Resultados obtidos na determinação de ácido úrico em amostras de soro sanguíneo com o sensor EVA/ Fe^{3+} .

Amostra	HC-UNICAMP (mol L^{-1})	Sensor EVA/ Fe^{3+} (mol L^{-1})	Desvio Relativo*
#1	$6,4 \times 10^{-4}$	$(2,2 \pm 0,8^{\dagger}) \times 10^{-4}$	-66%
#2	$8,1 \times 10^{-4}$	$(1,3 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	-84%
#3	$4,7 \times 10^{-4}$	$(1,5 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	-68%
#4	$5,8 \times 10^{-4}$	$(1,6 \pm 0,6) \times 10^{-4}$	-72%
#5	$4,3 \times 10^{-4}$	$(1,4 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	-67%

*Estimativa do desvio relativo obtido entre os métodos HC-UNICAMP e o Potenciométrico.

†Estimativa do desvio padrão para 2 determinações.

2.4.3 O ISE-Uréia

Em geral, a elaboração dos sensores potenciométricos para uréia são baseados na enzima urease imobilizada sobre um transdutor, formando assim o biossensor. As principais estratégias utilizadas na construção de um biossensor para uréia, consiste em monitorar:

- a mudança de pH na superfície do eletrodo devido a hidrólise do bicarbonato de amônio formado na reação enzimática da uréia;
- os íons amônio ou bicarbonato produzidos da reação enzimática, utilizando ISE sensíveis a estas espécies.

Inicialmente, várias tentativas de imobilização da urease em diferentes sensores foram feitas de forma a se estudar qual deles obtinha o melhor sinal analítico. Primeiramente, optou-se por utilizar como transdutor eletrodos de óxido metálico, onde são citados como excelentes sensores para pH com tempos de resposta muito curto (em torno de $10 \text{ s}^{[119]}$).

Vários trabalhos^[120,121] descrevem a utilização de alguns tipos de aço na construção destes sensores para H^+ , onde a principal dificuldade é a formação da camada de óxido metálico. Os testes experimentais mostraram uma série de dificuldades na elaboração deste tipo de sensor, principalmente no tratamento da superfície do metal para a formação do óxido metálico. Assim, os vários eletrodos construídos não responderam adequadamente para variações de pH, apresentando variações anômalas de potencial, as quais não podiam ser relacionadas com o pH. Devido as dificuldades apresentadas esta idéia foi abandonada. Então, optou-se pela construção de um sensor para bicarbonato baseado no trocador iônico, Aliquat, similar ao descrito por Herman e Rechnitz^[122]. A princípio, a formação do íon bicarbonato produzido na reação enzimática seria sentida por este sensor. No entanto, estudos com o sensor construído para bicarbonato mostraram que o mesmo só desenvolvia potencial em pH 4, indicando que o mesmo respondia para CO_2 . Contudo, o pH ótimo da enzima solúvel é em torno de 6 e em pH 4 a urease sofre desnaturação^[123]. Assim, o sensor baseado no trocador aniônico Aliquat não é adequado para ser usado como transdutor para a urease.

Desta forma as perspectivas obtidas não eram muito boas, e então optou-se por realizar alguns testes com eletrodos de Pt, sensível para H^+ e com eletrodos para íons amônio (NH_4^+), utilizando o ionóforo nonactina. Os resultados preliminares foram bastante promissores com as duas estratégias. Assim, a seguir serão descritas a avaliação dos sensores potenciométricos à base de Pt para pH e de nonactin para íons amônio, bem como dos biossensores para uréia baseados na imobilização de urease em EVA e PVC-COOH nestes transdutores, respectivamente.

I. A Enzima Urease

A urease é uma enzima presente em diversas fontes naturais, como na soja (*Soja hypsida*), na semente de melancia (*Citrullus vulgaris*), abóbora (*Cucurbita maxima*) e em diferentes espécies de feijão (*Canavalia ensiformis* - "jack bean", *Canavalia maritima* e *Canavalia brasiliensis*)^[124]. Esta enzima foi isolada pela primeira vez por Sumner, em 1926^[125], e sua massa molecular é cerca de $590.000 \text{ g mol}^{-1}$ ^[126]. Ela é uma metaloenzima constituída de dois moles de Ni^{2+} por cada uma das suas seis sub-unidades, cujo massa molecular está em torno de $96.600 \text{ g mol}^{-1}$. A urease contém em sua estrutura protéica grupos sulfidrilas provenientes de resíduos de cisteína. Estes resíduos foram divididos em essencial e não essencial, onde o primeiro, quando desativado por compostos que reagem com grupos sulfidrilas, como o ácido 5,5'-di-tio-bis(2-nitrobenzóico), provoca a perda de atividade da enzima, enquanto que no outro isto não ocorre^[127]. Alguns pesquisadores^[128] mostraram que os íons Ni^{2+} presentes na urease não estão ligados aos grupos cisteína, uma vez que não há indicação de transferência de carga entre os grupos sulfidrilas e o íon Ni^{2+} . Eles sugeriram que os resíduos essenciais de cisteína servem como um catalisador ácido no mecanismo de ação da urease^[129]. No mecanismo proposto, a estrutura da enzima em pH neutro contém uma molécula de água

coordenada para um dos íons Ni^{2+} , enquanto o outro está coordenado pelo íon hidroxila. O substrato é ativado pelo ataque nucleofílico do oxigênio para o íon Ni^{2+} hidratado, sendo que o grupo $=\text{NH}_2^+$ resultante interage com o grupo carregado negativamente mais próximo, onde foi postulado que este grupo seria o íon carboxila. Então, o íon Ni^{2+} coordenado pelo grupo hidroxila ataca o carbono da carbonila do substrato coordenado, formando um intermediário tetraédrico. Este intermediário sofre uma cisão para formar um carbamato coordenado ou o íon carboxila, sendo esta cisão favorecida pelo grupo sulfidríla presente no sítio ativo, o qual provoca uma catálise ácida. O íon carbamato ou carboxila coordenado é hidrolisado regenerando a enzima (Fig. 2.29).

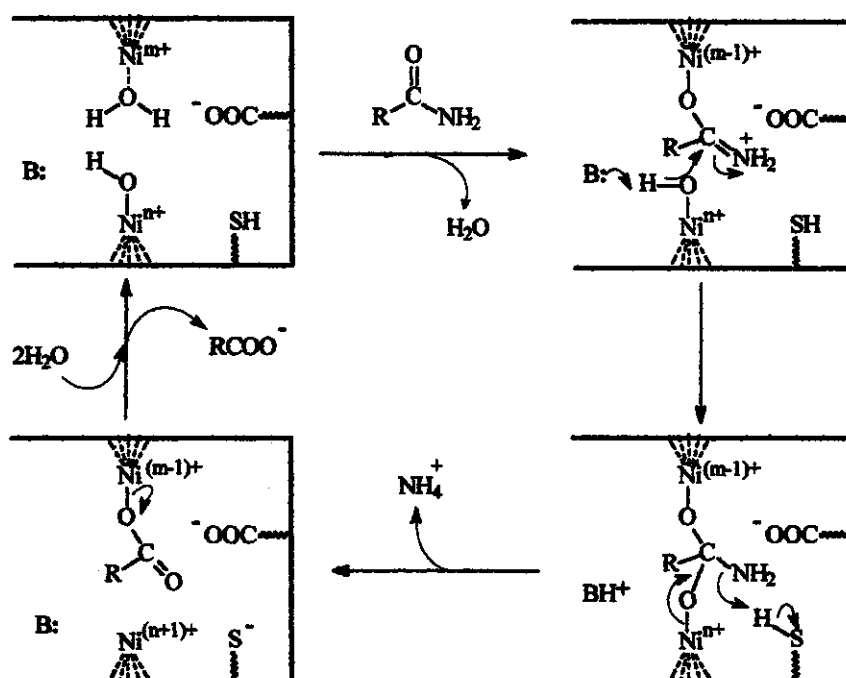
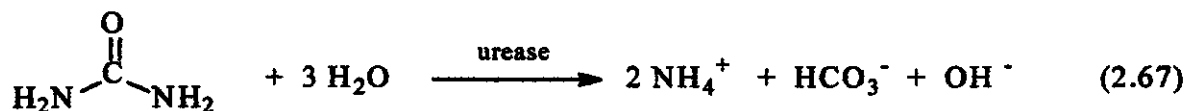


Fig. 2.29 Esquema do mecanismo de ação catalítica da urease na hidrólise da uréia. $\text{R} = \text{NH}_2$. Adaptado da referência [129].

A reação global da hidrólise da uréia pela urease é dada por^[130]:



A urease foi muito estudada na década de 80 e a completa sequência de aminoácidos correspondente a sua estrutura molecular foi determinada. A enzima consiste de uma única espécie de cadeia polipeptídica, contendo cerca de 840 resíduos de aminoácidos, conforme descrito por Takishima *et al.*^[127,131]. Estes pesquisadores sugeriram que a região onde pode conter os íons Ni^{2+}

e conseqüentemente os sítios ativos da enzima estaria entre os resíduos de aminoácidos 479 e 607, região esta que contém 13 dos 25 resíduos de histidina, o qual foi proposto como o aminoácido responsável pela coordenação dos íons Ni^{2+} [132].

2.4.3.1 O Biossensor à Base de EVA/Urease/Pt

I. Efeito da Concentração do Tampão no Biossensor EVA/Urease/Pt

O efeito da capacidade tampão do meio, na resposta do biossensor para uréia é apresentado na Fig. 2.30. Pode-se observar, que o aumento na concentração do tampão causa uma diminuição na sensibilidade do biossensor como causa da diminuição da variação de pH na superfície do eletrodo devido ao maior efeito tamponante. Por outro lado, uma concentração muito diluída do tampão provoca uma diminuição na faixa de linearidade do biossensor. O mesmo satura mais rapidamente para concentrações elevadas de uréia como causa do efeito de adsorção dos produtos da reação enzimática na membrana. Assim, um comportamento super-ernstiano é observado, uma vez que o meio tamponante não é suficiente para restaurar as condições iniciais do eletrodo. Logo, uma concentração do tampão entre 1×10^{-3} a 1×10^{-2} mol L^{-1} parecem ser as concentrações mais adequadas para o biossensor responder satisfatoriamente as variações de pH em sua superfície. A concentração de 1×10^{-3} mol L^{-1} foi escolhida para realizar os demais estudos. Resultados similares têm sido descritos em vários trabalhos em que o biossensor para uréia responde à variações de pH na superfície do eletrodo [96-98].

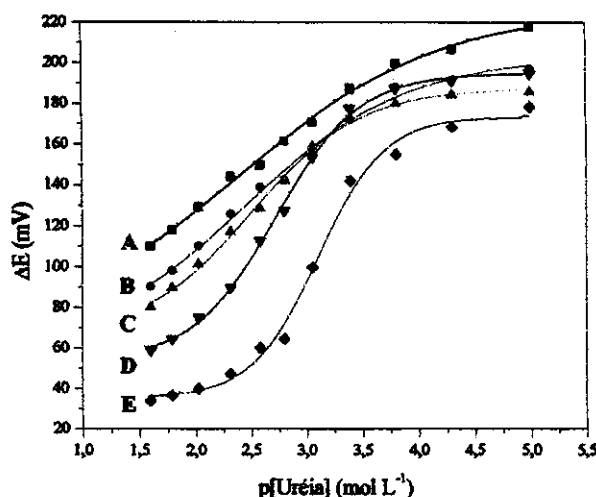


Fig. 2.30 Curvas analíticas para uréia mostrando o efeito tamponante do meio na resposta do biossensor. pH 6,0. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Concentração do tampão TRIS-SO_4 , mol L^{-1} : A. 1×10^{-1} ; B. 1×10^{-2} ; C. 1×10^{-3} ; D. 1×10^{-4} ; E. 1×10^{-5} .

II. Efeito do pH, Força iônica e Temperatura no Biossensor EVA/Urease/Pt

A hidrólise enzimática da uréia pela urease pode aumentar o pH do meio até um valor máximo de 9,3^[133]. Por outro lado, a perda de atividade catalítica da urease ocorre em pH abaixo de 5,1^[134] mostrando que a faixa de trabalho do eletrodo de pH usado como transdutor deve estar entre 5 e 10. Então, foi estudado a resposta para pH do eletrodo de Pt utilizado como transdutor. A Fig. 2.31 mostra as curvas de calibração típicas de pH para o sensor de Pt, na presença e na ausência do íon cloreto. Observa-se que na presença de NaCl o eletrodo de Pt apresentou resposta sub-nernstiana para pH (~ 36 mV/pH), provavelmente devido a formação de cloro complexos na superfície da Pt. Na ausência de íons Cl^- o eletrodo respondeu nernstianamente para pH, com declividade em torno de 57 mV/pH na faixa de 4 a 12, o que é satisfatório para o mesmo ser utilizado como transdutor para o eletrodo de uréia. O problema da interferência dos íons Cl^- não é muito significativa uma vez que a membrana de EVA utilizada na imobilização da urease pode servir como uma barreira efetiva para íons interferentes atuarem no transdutor.

A faixa de pH em que o biossensor responde para uréia foi estudada através do diagrama de Reilley apresentado na Fig. 2.32. O biossensor respondeu melhor para mudanças na concentração de uréia entre pH 5,5 a 6,5. O pH 5,5 foi escolhido para os demais estudos.

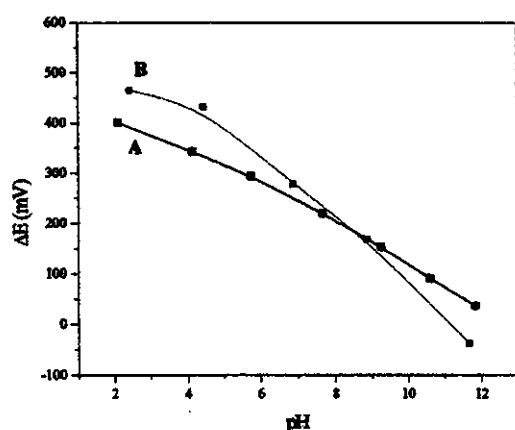


Fig. 2.31 Resposta para pH do eletrodo de Pt utilizado como transdutor para o biossensor de uréia. Na presença (A) e na ausência (B) de NaCl 0,1 mol L⁻¹. Temperatura: (25,0±0,1)°C.

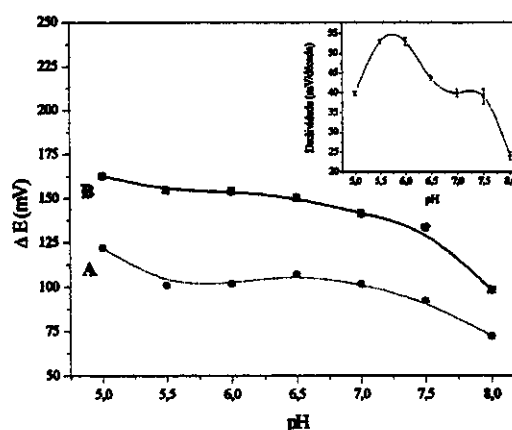


Fig. 2.32 Diagrama de Reilley para o biossensor EVA/urease/Pt. Concentração do tampão TRIS- SO_4 : 1×10^{-3} mol L⁻¹. Temperatura: (25,0±0,1)°C. Concentração de uréia, mol L⁻¹: A. 2×10^{-2} ; B. 2×10^{-3} .

O efeito da força iônica na resposta do biossensor para uréia é mostrado na Fig. 2.33. Pode-se

observar que o aumento na concentração de KCl provoca uma diminuição na sensibilidade do biossensor, o que é sentido pela diminuição no coeficiente angular da curva para o sensor em concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl. Em princípio podia-se esperar que este efeito negativo fosse devido a interferência dos íons Cl^- no transdutor. Contudo, testando este efeito com LiNO_3 , para uma nova membrana preparada, foi verificado que a resposta do biossensor era similar à do KCl, indicando que a inadequada resposta do biossensor não era devido aos íons Cl^- . Uma possível explicação seria que o aumento da força iônica pode modificar a estrutura terciária da enzima afetando os sítios ativos e conseqüentemente a resposta do biossensor^[135].

O efeito da temperatura no tempo de resposta do biossensor EVA/Urease/Pt está apresentado na Fig. 2.34. O aumento da temperatura favorece o desenvolvimento do potencial no biossensor fazendo com que o tempo de resposta diminua apreciavelmente. Apesar disto, a temperatura de trabalho foi fixada em 25°C por causa do efeito de desnaturação da enzima com a temperatura. O efeito da temperatura no tempo de resposta de biossensores para uréia tem sido descrito por Liu *et al.*^[136] e está associado ao aumento da velocidade da reação enzimática com a temperatura. Estes pesquisadores mostraram que a enzima imobilizada em γ -alumina apresenta uma elevada estabilidade em relação a enzima solúvel até uma temperatura em torno de 70°C sem uma significativa perda de atividade.

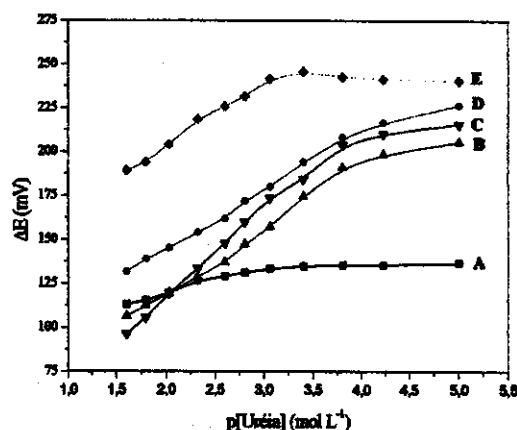


Fig. 2.33 Efeito da força iônica na resposta do biossensor EVA/Urease/Pt para uréia. pH: 5,5. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Tampão: TRIS-SO_4 , $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de sal, mol L^{-1} : A. $\text{KCl } 1 \times 10^{-1}$; B. $\text{KCl } 1 \times 10^{-2}$; C. Nula; D. $\text{KCl } 5 \times 10^{-2}$; E. LiNO_3 , 1×10^{-2} .

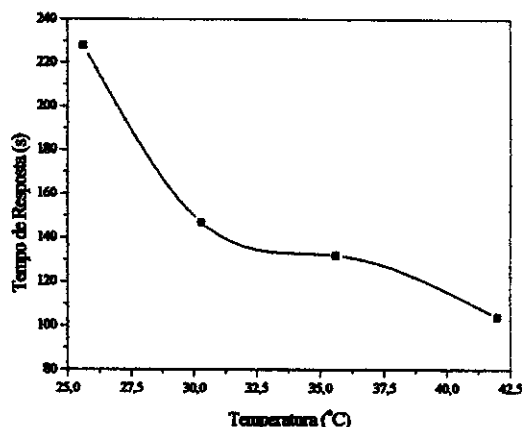


Fig. 2.34 Efeito da temperatura no tempo de resposta do biossensor EVA/Urease/Pt para uréia. Tampão: TRIS-SO_4 , $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. pH 5,5.

III. Avaliação e Desempenho do Biossensor EVA/Urease/Pt

O biossensor EVA/Urease/Pt para uréia exibiu comportamento sub-nernstiano (52 mV/década a 25 °C), sendo a resposta linear na faixa de concentração entre $6,2 \times 10^{-4}$ a $2,7 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção em torno de $5,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A Fig. 2.35 mostra uma curva de calibração típica para uréia com o biossensor EVA/Urease/Pt. A equação que descreve o desempenho analítico deste biossensor é dada por:

$$\Delta E = (24 \pm 4) + (52 \pm 2)p[\text{Uréia}] \quad (2.68)$$

onde, $r = 0,997$; EDPR = 2,74; N = 8.

O tempo de restauração do biossensor foi entre 10 e 15 min em tampão TRIS-SO₄ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, pH 5,5. O eletrodo apresentou um tempo de vida útil de uma semana sendo feito cerca de 180 análises sem decréscimo pronunciado em sua resposta, onde o coeficiente angular variou menos que 2 mV década⁻¹ neste período.

Antes de se avaliar a seletividade do biossensor para uréia, uma consideração é importante. Os métodos para determinação dos coeficientes de seletividade potenciométricos somente são aplicáveis a compostos iônicos, uma vez que o potencial produzido por um eletrodo potenciométrico é de maneira geral, devido a variações de densidade de carga na superfície do sensor. Então, não se faz sentido determinar K^{POT} para substâncias moleculares. Assim, o grau de interferência para o biossensor potenciométrico desenvolvido para uréia foi determinado pelo método de recuperação, no caso de composto moleculares derivados de uréia (Tabela 2.13). Os interferentes iônicos para o biossensor EVA/Urease/Pt foram estudados pelo método do potencial-equivalente (Tabela 2.14).

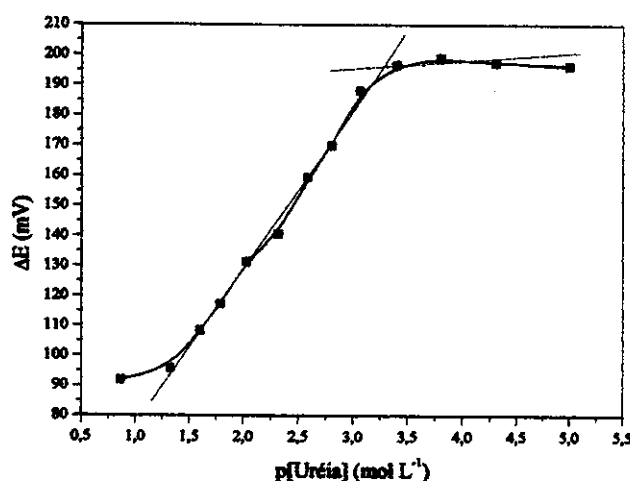


Fig. 2.35 Curva analítica típica para uréia com o biossensor EVA/Urease/Pt. Tampão: TRIS-SO₄ 1×10^{-3} mol L⁻¹; pH 5,5; Temperatura: (25,0 ± 0,1) °C.

Tabela 2.13 Grau de interferência obtido para o biossensor EVA/Urease/Pt, em relação a algumas substâncias moleculares. Concentração de interferente: 1×10^{-3} mol L⁻¹.

Interferente	Uréia (mg L ⁻¹)		
	Adicionado	Encontrado	Recuperação (%)
Tiouréia	60,1	853,0	(1420±100)*
N-hidroxi-uréia	60,1	108,7	(180±6)
Dimetilol uréia	60,1	13,7	(23±1)

*Estimado por propagação de erro^[185].**Tabela 2.14** Coeficientes de seletividade potenciométrico obtido pelo método do potencial-equivalente para o biossensor EVA/Urease/Pt para uréia. Concentração de interferente: 1×10^{-4} mol L⁻¹.

Interferente	Espécie iônica principal em pH 5,5	pK ^{POT}
Ácido Ascórbico	Ascorbato monoânion	-2,7
Oxalato de Potássio	Oxalato diânion	n.d.*
Ácido Úrico	Urato monoânion	n.d.

*n.d. não detectável

É interessante ressaltar, que no início das pesquisas com a urease, os bioquímicos acreditavam que a especificidade desta enzima para uréia era absoluta^[137]. Contudo, Fishbein *et al.*^[138,139] descobriram em 1965, que N-hidroxi-uréia era um substrato para urease. A partir daí, descobriu-se que outros derivados de uréia eram substratos para a urease, tais como N,N'-dihidroxi-uréia, N-metil-uréia, dimetiloluréia e semicarbazida^[129,140-143]. Neste trabalho procurou-se estudar o efeito de alguns destes interferentes na resposta do biossensor para uréia. Observou-se que compostos como tiouréia e N-hidroxi-uréia apresentam um elevado grau de interferência no biossensor, fazendo com que o mesmo responda acima do esperado (Tabela 2.13). Já com a substância dimetilol uréia é observado o efeito oposto. Esta substância sozinha, não provoca resposta no biossensor, contudo ela afeta a curva analítica para uréia tornando a resposta para uréia mais lenta (cerca de 20 min). Assim, a presença do dimetilol uréia inibe a ação da urease sobre a uréia. Em relação a tiouréia e N-hidroxi-uréia já era de se esperar um certo grau de interferência devido a suas estruturas similares a da uréia. Dixon *et al.*^[129] mostraram que a N-hidroxi-uréia sofre hidrólise similar a uréia pela urease (Fig. 2.29, onde R

= HONH). Contudo, estes pesquisadores não observaram nenhum efeito enzimático da urease sobre a tiouréia. Apesar disto, Dixon e seus colaboradores descrevem que seus resultados são contraditórios com os reportados por outros pesquisadores^[144], os quais observaram que a tiouréia era substrato para a urease, sendo os resultados obtidos por estes últimos mais consistentes com o grau de interferência determinado para o biossensor proposto neste trabalho.

Dos interferentes estudados, o mais surpreendente foi o íon ascorbato, uma vez que este não apresenta similaridade alguma com a uréia. Ele respondeu cerca de 540 vezes mais no biossensor EVA/Urease/Pt do que a uréia. Isto poderia ser devido a incapacidade da membrana de EVA/Urease impedir a interação do íon ascorbato na superfície do transdutor (Pt), porém, não explica o fato do fenômeno não ocorrer com outros ânions. Outra explicação pelo elevado grau de interferência, seria devido à impurezas de íons metálicos presentes na enzima urease. Estes catalisariam a oxidação do íon ascorbato na superfície do sensor, fazendo com que o mesmo exibisse uma resposta similar ao eletrodo EVA/Cu²⁺.

Outros possíveis interferentes para o biossensor são a formamida, a acetamida, os ácidos hidroxâmicos, o íon fluoreto, a fosforamida e o β -mercaptol. Os dois primeiros são considerados substratos para urease^[129], enquanto que os demais são inibidores competitivos^[126,145]. Contudo como estes compostos dificilmente estão presentes em amostras biológicas eles não foram estudados em mais detalhes.

Logo, na presença de ácido ascórbico, tiouréia, *N*-hidroxi-uréia e dimetilol uréia não é possível utilizar o sensor proposto numa determinação de uréia.

2.4.3.2 O Biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina

Desde que o biossensor para uréia baseado na urease imobilizada por oclusão em matriz de EVA não apresentou um tempo de resposta muito bom (≈ 5 min a 25 °C), optou-se por desenvolver outro biossensor para este analito de forma a superar esta deficiência. A alternativa escolhida foi modificar o tipo de imobilização utilizando o método de ligação covalente com carbodimida. Esta metodologia vem sendo muito utilizada por alguns pesquisadores^[98,133,134], onde tem sido observado uma melhora considerável no tempo de resposta do sensor e um aumento no tempo de vida útil do mesmo^[98]. Ela está baseada na formação de uma fina camada mono ou bimolecular entre a enzima e o polímero PVC-COOH (Fig. 2.36), que não restringe a interação do substrato à superfície do eletrodo, resultando num baixo tempo de resposta.

A elaboração das membranas com PVC-COOH segue o mesmo procedimento padrão que para o PVC não modificado (Capítulo 5). No entanto, a condutância das membranas com PVC-COOH é maior, além delas apresentarem melhor adesão com as superfícies^[130]. As características obtidas com o biossensor para uréia utilizando esta estratégia são descritas a seguir.

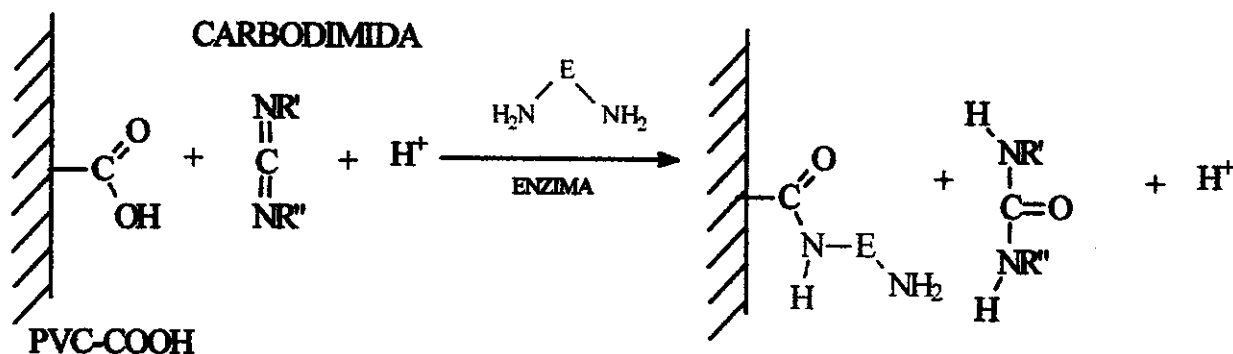


Fig. 2.36 Esquema de imobilização de uma enzima por ligação covalente usando carbodimida e PVC-COOH.

1. Efeito do pH e da Temperatura no Biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina

As Fig. 2.37 e 2.38 mostram o efeito do pH da solução sobre a resposta do eletrodo seletivo para íons amônio (sensor base) e para o biossensor, Urease-carbodimida/PVC-COOH/Nonactina, respectivamente.

A faixa operacional de pH para o ISE- NH_4^+ foi entre 2,0 e 7,5. Acima de pH 7,5 o eletrodo apresenta um desvio na resposta devido a formação de amônia (NH_3) em pH alcalino (Fig. 2.37). Já o biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina apresentou uma faixa de trabalho para pH de 6,0 a 7,2, sendo o pH ótimo 7,0 (Fig. 2.38).

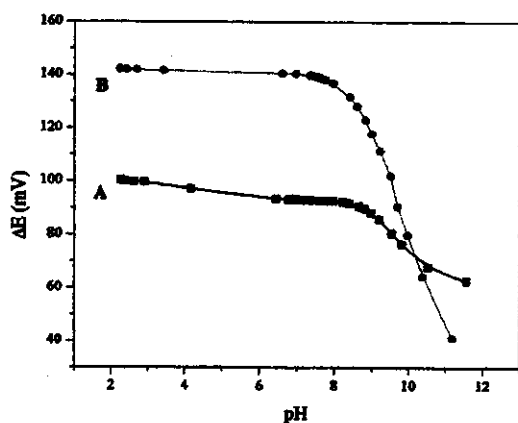


Fig. 2.37 Efeito do pH na resposta do ISE- NH_4^+ . Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Tampão: TRIS-SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de íons NH_4^+ , mol L^{-1} : A. 1×10^{-3} ; B. 1×10^{-2} .

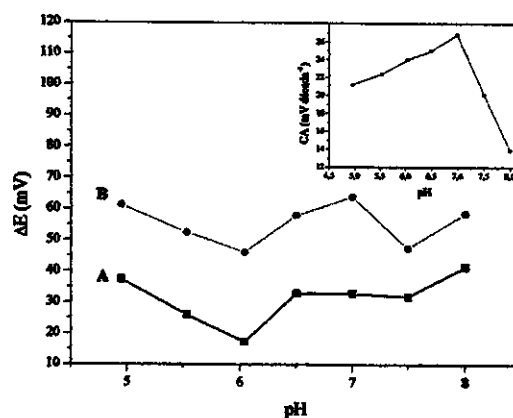


Fig. 2.38 Diagrama de Reilley mostrando a faixa operacional de pH do biossensor para uréia baseado em urease imobilizada por ligação covalente em PVC-COOH. Temperatura: $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$. Tampão: TRIS-SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Concentração de uréia, mol L^{-1} : A. 1×10^{-2} ; B. 1×10^{-1} .

A temperatura afeta o tempo de resposta do biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina. Este respondeu em cerca de 20 s a temperatura ambiente, para uma variação de concentração de 1×10^{-2} para 1×10^{-1} mol L⁻¹ de uréia. Um aumento de 5 °C na temperatura (25 para 30 °C), diminui o tempo de resposta do eletrodo em 10 segundos. Contudo, em temperaturas superiores a 30 °C, não se observou uma melhora considerável no tempo de resposta do sensor, por isto os demais estudos foram realizados na temperatura de 30 °C (Fig. 2.39).

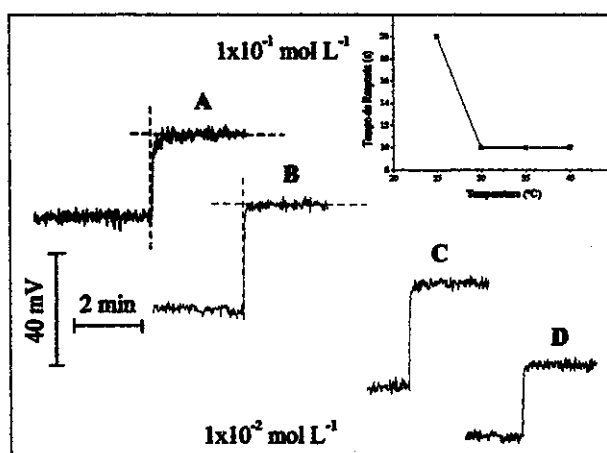


Fig. 2.39 Medida do tempo de resposta para o biossensor baseado em urease imobilizada em PVC-COOH. pH: 7,0. Tampão: TRIS-SO₄ 0,1 mol L⁻¹. Temperatura ($\pm 0,1^\circ\text{C}$): A. 25,0; B. 30,0; C. 35,0; D. 40,0.

II. Avaliação e Desempenho do Biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina

O biossensor para uréia baseado em urease imobilizada por ligação covalente em matriz de PVC-COOH apresentou comportamento sub-nernstiano (≈ 27 mV/década) na faixa de concentração entre $1,0 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹, em 0,1 mol L⁻¹ de tampão TRIS-SO₄, pH 7,0 a 25,0 °C. O limite de detecção foi $6,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Fig. 2.40). A equação que descreve o desempenho analítico deste biossensor é dada por:

$$\Delta E = (87 \pm 2) + (26,8 \pm 0,9)p[\text{Uréia}] \quad (2.69)$$

onde, $r = 0,996$; EDPR = 1,95; N = 9.

O tempo de vida deste biossensor foi melhor que o anterior, cerca de 2 semanas. Contudo, tem sido descrito que a elaboração de um biossensor por imobilização com uma camada monomolecular de enzima com o uso de carbodimida e PVC-COOH, como descrito nesta seção, pode apresentar um tempo de vida útil de até 7 semanas^[130].

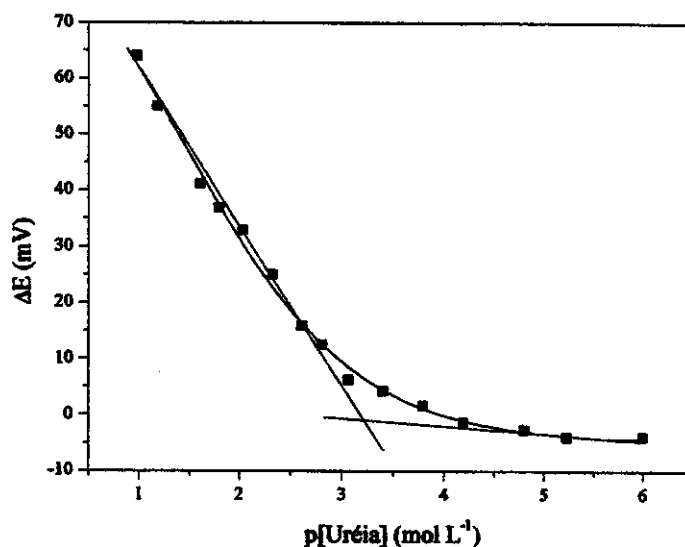


Fig. 2.40 Curva analítica típica para uréia com o biossensor baseado em urease imobilizada em PVC-COOH. pH 7,0; Tampão: TRIS-SO₄ 0,1 mol L⁻¹; Temperatura: (25,0±0,1) °C.

Os interferentes para o sensor de uréia proposto podem ser de dois tipos: cátions do tipo metais alcalino e alcalino terrosos que respondem para o sensor de amônio e derivados de uréia. As Tabelas 2.15 e 2.16 apresentam os resultados obtidos para o grau de interferência de algumas destas espécies estudadas.

Tabela 2.15 Grau de interferência obtido para o biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina, em relação à alguns derivados de uréia. Concentração de interferente: 1×10^{-2} mol L⁻¹ (proporção: 10:1).

Uréia (mg L ⁻¹)			
Interferente	Adicionado	Encontrado	Recuperação (%)
N-hidroxi-uréia	60,1	63,5	(106±6)
Dimetilol uréia	60,1	63,5	(106±6)

*Estimado por propagação de erro^[105].

É interessante observar que os derivados de uréia não apresentaram o mesmo grau de interferência para o biossensor baseado em Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina, do que o obtido para o sensor EVA/Urease/Pt. Isto pode ser explicado pela mudança do pH ótimo de medida, o qual pode alterar a cinética enzimática da urease no caso destes interferentes. De qualquer maneira, é importante

tomar-se cuidado na determinação de uréia com o biossensor proposto, quando estes derivados de uréia estão presentes.

Tabela 2.16 Coeficientes de seletividade potenciométrico obtido pelo método do potencial-equivalente para o biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina para uréia.

Interferente	Espécie iônica principal em pH 7,0	pK ^{POT}
Cloreto de Amônio	NH ₄ ⁺	-0,4
Cloreto de Potássio	K ⁺	0,0
Cloreto de Sódio	Na ⁺	0,4
Cloreto de Magnésio	Mg ²⁺	n.d.*
Nitrato de Cálcio	Ca ²⁺	n.d.
Nitrato de Lítio	Li ⁺	n.d.
Ácido Ascórbico	Ascorbato monoânion	n.d.
Ácido Úrico	Urato monoânion	n.d.

*n.d. não detectável

Outro fato interessante que deve ser mencionado, é que o biossensor para uréia baseado em urease imobilizada com carbodimida sobre PVC carboxilado em um transdutor potenciométrico sensível a íons amônio, não apresentou interferência para o ácido ascórbico. Por outro lado, a interferência de cátions de metais alcalinos, como Na⁺ e K⁺ foi muito pronunciada, porém alguns pesquisadores têm estabelecidos certas estratégias, através de medidas por diferença utilizando sistemas por injeção em fluxo que compensam a deficiência deste biossensor^[146].

De qualquer forma, cabe ressaltar que apesar de este biossensor apresentar menor sensibilidade em relação ao anterior, ele apresenta melhores características operacionais, como tempo de resposta e vida útil.

O sensor proposto foi utilizado na determinação de uréia em amostras de soro fornecidas pelo Hospital das Clínicas (HC) da UNICAMP (Tabela 2.17). Como pode ser observado, os resultados obtidos com o sensor potenciométrico proposto estão na mesma ordem de grandeza que os fornecidos pelo HC-UNICAMP, com um desvio relativo de no máximo 30%. Este desvio pode ser atribuído a possível interferência de íons sódio ou potássio presentes em alta concentração na amostra de soro. Associado a este fato, deve-se novamente mencionar, que o método potenciométrico apresenta um desvio relativo nas medidas de concentração em torno de 10% quando o potencial de uma mesma solução varia em torno de 2 mV. Assim, os resultados podem ser considerados aceitáveis, indicando a aplicabilidade do ISE proposto na determinação de uréia em amostras biológicas.

Tabela 2.17 Resultados obtidos na determinação de uréia em amostras de soro sanguíneo com o biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina.

Amostra	HC-UNICAMP (mol L ⁻¹)	Biossensor (mol L ⁻¹)	Desvio Relativo*
#1	9,5×10 ⁻³	(9±1) [†] ×10 ⁻³	-5,3%
#2	10,9×10 ⁻³	(10±2)×10 ⁻³	-8,4%
#3	7,8×10 ⁻³	(10±1)×10 ⁻³	28%
#4	10,8×10 ⁻³	(14±2)×10 ⁻³	30%
#5	5,3×10 ⁻³	(6,6±0,6)×10 ⁻³	25%

*Estimativa do desvio relativo obtido entre os métodos HC-UNICAMP e o Potenciométrico.

†Estimativa do desvio padrão para 2 determinações.

Referências

- [1] NERNST, W.; LOEB, K.; *Z. Phys. Chem.* **2**, 948, 1888.
- [2] NERNST, W.; "Die Electrolytische Zersetzung Wässriger Lösugen", *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **30**, 1547-1563, 1897.
- [3] CREMER, M.; *Z. Biol.* **47**, 562, 1906.
- [4] HABER, F.; KLEMENSIEWICZ, Z.; "Über Elektrische Phasengrenzkräfte", *Z. Physik. Chem.* **67**, 385-431 1909.
- [5] SØRENSEN, S. P. L.; "Comptes-Rendus des Travaux du Laboratoire de Calsberg 8 me, Volume I re Livraison, Copenhagen, 1909.
- [6] BECKMAN, A. O.; FRACKER, H. E.; "Electrical Acidity Testing Apparatus for Indicating Potential", US Patent 2.058.761, 1936. *Chem Abst.* **31**, 11³, 1937.
- [7] Radiometer Annual Report, Copenhagen, 1994/1995.
- [8] ELDER, L. W.; WRIGHT, W. H.; "pH Measurement with the Glass Electrode and Vacuum Tube Potentiometer", *Proc. Nat. Acad. Sci.* **14**, 936-939, 1928.
- [9] RŮŽICKA, J.; "The Seventies - Golden Age for Ion Selective Electrodes", *J. Chem. Educ.* **74**, 167-170, 1997.
- [10] EISENMAN, G.; RUDIN, D. O.; CASBY, J. U.; "Glass Electrode for Measuring Sodium Ion", *Science* **126**, 831-834, 1957.
- [11] NIKOLSKII, B. P.; SCHULTS, M. M.; "Some Aspects of Glass Electrode Theory", *Zh. Fiz. Khim.* **36**, 1327-1330, 1962.
- [12] ROSS, J. W.; "Ion Exchange Electrodes", Belgian Patent 668409, 1966. *Chem Abst.* **65**, 5032a, 1966.
- [13] FRANT, M.; ROSS, J. W.; "Electrode for Sensing Fluoride Ion Activity in Solution", *Science* **154**, 1553, 1966.
- [14] ROSS, J. W.; "Calcium Selective Electrode with Liquid Ion Exchanger", *Science* **156**, 1378, 1967.
- [15] STEFANAC, Z.; SIMON, W.; "In-vitro-verhalten Von Makrotetroliden in Membranen Als Grundlage fur Hochselektive Kationenspezifische Elektrodensysteme", *Chimia* **20**, 436, 1966.
- [16] STEFANAC, Z.; SIMON, W.; "Ion Specific Electrochemical Behavior of Macrotetrolides in Membranes",

- Microchem. J.* **12**, 125, 1967.
- [17] MOODY, G. J.; OKE, R. B.; THOMAS, J. D. R.; "Calcium Sensitive Electrode Based on a Liquid Ion Exchanger in a Poly(vinyl-chloride) Matrix", *Analyst* **95**, 910, 1970.
- [18] CLARK, L. C.; LYONS, C.; "Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102**, 29, 1962.
- [19] BERGVELD, P.; "Development of an Ion Sensitive Solid-State Device for Neurophysiological Measurements", *IEEE T. Bio-Med Eng.* **BM17**, 70, 1970.
- [20] JANATA, J.; "Twenty Years of Ion Selective Field Effect Transistors", *Analyst* **119**, 2275-2278, 1994.
- [21] THOMAS, J. D. R.; "Selective Membrane Electrodes for Analysis", *Analyst* **119**, 203-208, 1994.
- [22] FRANT, M. S.; "History of the Early Commercialization of Ion Selective Electrodes", *Analyst* **119**, 2293-2301, 1994.
- [23] FRANT, M. S.; "Where Did Ion Selective Electrodes Come From? The Story of Their Development and Commercialization", *J. Chem. Educ.* **74**, 159-166, 1997.
- [24] PUNGOR, E.; "Ion Selective Electrodes - History and Conclusions", *Fresen. J. Anal. Chem.* **357**, 184-188, 1997.
- [25] STOCK, J. T.; ORNA, M. V.; *Electrochemistry, Past and Present*, American Chemical Society, Washington, DC; CHENG, K. L.; "pH Glass Electrode and Its Mechanism", Chapter 20, p. 286, 1989.
- [26] DONNAN, F. G.; "Theorie der Membrangleichgewichte und Membranpotentiale bei Vorhandensein von Nicht Dialysierenden Elektrolyten. Ein Beitrag zur Physikalisch-Chemischen Physiologie", *Z. Elektrochem.* **17**, 572-581, 1911.
- [27] HOROVITZ, K.; "Ionic Replacement in Dielectrics. (I). The Electrode Function of Glasses", *Z. Physik* **15**, 369-398, 1923.
- [28] NIKOLSKII, B. P.; "Theory of the Glass Electrode. I. Theoretical", *J. Phys. Chem. (USSR)* **10**, 495-503, 1937 (English). *Acta Physicochim (URSS)* **7**, 597-610, 1937.
- [29] TEORELL, T.; "An Attempt to Formulate a Quantitative Theory of Membrane Permeability", *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* **33**, 282-285, 1935.
- [30] MEYER, K. H.; SIEVERS, J. F.; "La Perméabilité des Membranes. I. Théorie de la Perméabilité Ionique", *Helv. Chim. Acta* **19**, 649-664, 1936.
- [31] PUNGOR, E.; TÓTH, K.; "Ion Selective Membrane Electrodes - A Review", *Analyst* **95**, 625, 1970.
- [32] BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A.; *Electroquímica - Princípios, Métodos e Aplicações*, Oxford University Press, Inc., Livraria Almedina: Coimbra, 1996.
- [33] HELMHOLTZ, H. L. F.; *Ann. Physik (Ser 2)* **89**, 211, 1853.
- [34] HELMHOLTZ, H. L. F.; *Ann. Physik (Ser 3)* **7**, 337, 1879.
- [35] BOCKRIS, J. O'M.; REDDY, A. K. N.; *Modern Electrochemistry - An Introduction to an Interdisciplinary Area*, 3rd, Vol. 1, 2; Plenum Press: New York, 1977.
- [36] GOUY, G.; "Constitution of the Electric Charge at the Surface of an Electrolyte", *Compt. Rend.* **149**, 654-657, 1910.
- [37] CHAPMAN, D. L.; "Theory of Electrocapillarity", *Phil. Mag.* **25**, 475-481, 1913.
- [38] STERN, O.; "Zur Theorie der Elektrolytischen Doppelschicht", *Z. Elektrochem.* **30**, 508-516, 1924.
- [39] GRAHAME, D. C.; "The Electrical Double Layer and the Theory of Electrocapillarity" *Chem. Rev.* **41**, 441-501, 1947.
- [40] BOCKRIS, J. O'M.; DEVANATHAN, M. A.; MÜLLER, K.; "On Structure of Charged Interfaces", *Proc. R.*

- Soc. (London) SER A274*, 55, 1963.
- [41] DAMASKIN, B. B.; FRUMKIN, A. N.; "Potentials of Zero Charge, Interaction of Metals with Water and Adsorption of Organic Substances. 3. Role of Water Dipoles in Structure of Dense Part of Electric Double-Layer", *Electrochim. Acta* 19, 173-176, 1974.
- [42] GONZALEZ, R.; SANZ, F.; "A Thermodynamic Test of the Diffuse Layer Theory and Its Implications on Electrode Kinetics", *Electroanal.* 9, 169-175, 1997.
- [43] DAMANSKIN, B. B.; GRAFOV, B. M.; "Comparing the Gonzalez-Sanz Theory of the Diffuse Layer with the Experimental Data on the Mercury Electrode Capacitance in Aqueous Solutions of Na₂SO₄ and La₂(SO₄)₃", *Russian J. Electrochem.* 34, 967-971, 1998.
- [44] HIRATA, Y.; MIZUTANI, F.; YOKOYAMA, H.; "In Situ Observation of Electrode Surfaces Using Scanning Maxwell-Stress Microscopy Under Water", *Surf. Interf. Anal.* 27, 317-323, 1999.
- [45] BEHRENS, S. H.; BORKOVEC, M.; "Electrostatic Interaction of Colloidal Surfaces with Variable Charge", *J. Phys. Chem. B* 103, 2918-2928, 1999.
- [46] DAS, D.; SENAPATI, S.; CHANDRA, A.; "Structure of Dipolar Liquids Near Charged Solid Surfaces: A Nonlinear Theory Based on a Density Functional Approach and Monte Carlo Simulations", *J. Chem Phys.* 110, 8129-8138, 1999.
- [47] LAMPERSKI, S.; OUTHWAITE, C. W.; "A Non-Primitive Model for the Electrode Vertical Bar Electrolyte Interface Based on the Percus-Yevick Theory. Analysis of the Different Molecular Sizes, Ion Valences and Electrolyte Concentrations", *J. Electroanal. Chem.* 460, 135-143, 1999.
- [48] MATTHE, T.; KECKE, H. J.; "Molecular Dynamic Simulations of Single, Interacting, and Sheared Double Layers - 1. Configuration of a Double Layer. 2. Influence of System Properties, Overlap, and Shear", *J. Coll. Interf. Sc.* 208, 555-569, 1998.
- [49] FAWCETT, W. R.; KLOSS, A. A.; CALVENTE, J. J.; MARINKOVIC, N.; "SNIFTIRS Studies of the Electrical Double Layer at Gold Electrodes", *Electrochim. Acta* 44, 881-887, 1998.
- [50] BUCK, R. P.; "Electroanalytical Chemistry of Membranes", *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 5, 323-420, 1976.
- [51] ARMSTRONG, R. D.; LOCKHART, J. C.; TODD, M.; "The Mechanism of Transfer of K⁺ Between Aqueous-Solutions and PVC Membranes Containing Valinomycin", *Electrochim. Acta* 31, 591-594, 1986.
- [52] XIE, S. L.; CAMMANN, K.; "Apparent Ion-Exchange Current Densities at Valinomycin Based Potassium Ion-Selective PVC Membranes Obtained with an AC-Impedance Method", *J. Electroanal. Chem.* 229, 249-263, 1987.
- [53] HORVAL, G.; GRÁF, E.; TÓTH, K.; PUNGOR, E.; BUCK, R. P.; "Plasticized Poly(Vinyl-Chloride) Properties and Characteristics of Valinomycin Electrodes. 1. High-Frequency Resistances and Dielectric Properties. 2. Low-Frequency, Surface-rate, and Warburg Impedance Characteristics", *Anal. Chem.* 58, 2735-2744, 1986.
- [54] CAMMANN, K.; RECHNITZ, G. A.; "Exchange Kinetics at Ion-Selective Membrane Electrodes", *Anal. Chem.* 48, 856-862, 1976.
- [55] CAMMANN, K.; "Exchange Kinetics at Potassium-Selective Liquid Membrane Electrodes", *Anal. Chem.* 50, 936-940, 1978.
- [56] IGLEHART, M. L.; BUCK, R. P.; PUNGOR, E.; "Plasticized Poly(Vinyl-Chloride) Properties and Characteristics of Valinomycin Electrodes - DC Current Voltage Curves", *Anal. Chem.* 60, 290-295, 1988.
- [57] IGLEHART, M. L.; BUCK, R. P.; HORVAL, G.; PUNGOR, E.; "Plasticized Poly(Vinyl-Chloride) Properties and Characteristics of Valinomycin Electrodes - Current Time Responses to Voltage Steps", *Anal. Chem.*

- 60, 1018-1022, 1988.
- [58] KORYTA, J.; "Electrochemical Polarization Phenomena at the Interface of Two Immiscible Electrolyte Solutions", *Electrochim. Acta* **24**, 293-300, 1979.
- [59] VANISEK, P.; RUTH, W.; KORYTA, J.; "Valinomycin Mediated Transfer of Potassium Across the Water Nitrobenzene Interface - A Study by Voltammetry at the Interface Between Two Immiscible Electrolyte Solutions", *J. Electroanal. Chem.* **148**, 117-121, 1983.
- [60] DEMOZ, A.; VERPOORTE, E. M. J.; HARRISON, D. J.; "An Equivalent Circuit Model of Ion-Selective Membrane Broken Vertical Bar Insulator Broken Vertical Bar Semiconductor Interfaces Used for Chemical Sensors", *J. Electroanal. Chem.* **389**, 71-78, 1995.
- [61] TÓTH, K.; GAVALLÉR, I. G.; PUNGOR, E.; "Transient Phenomena of Ion-Selective Membrane Electrodes", *Anal. Chim. Acta* **57**, 131, 1971.
- [62] HORVAI, G.; TÓTH, K.; PUNGOR, E.; "Theoretical Models of Ion-Selective Electrode Membranes", *Anal. Chim. Acta* **216**, 163-176, 1989.
- [63] PUNGOR, E.; "Ion-Selective Electrodes - Analogies and Conclusions", *Electroanal.* **8**, 348-352, 1996.
- [64] GIOLITO, I.; Métodos Eletrométricos e Eletroanalíticos - Fundamentos e Aplicações, 2ª edição, 1980.
- [65] GONÇALVES, M. L. S. S.; Métodos Instrumentais para Análise de Soluções - Análise Quantitativa, Fundação Calouste-Gulbenkian: Lisboa, 1983.
- [66] BAILEY, P. L.; Analysis with Ion-Selective Electrodes, Second Edition, Heyden: London, 1980.
- [67] LEVICH, V. G.; Physicochemical Hydrodynamics, Prentice-Hall, Englewood Cliffs: NJ, 1962.
- [68] HAUGAARD, G.; "The Mechanism of the Glass Electrode", *J. Phys. Chem.* **45**, 148-157, 1941.
- [69] SCHWABE, K.; DAHMS, H.; "Vergleichende Untersuchungen der Elektromotorischen Eigenschaften und des Chemischen Verhaltens von Glaselektroden mit Hilfe Radioaktiver Indikatoren. I. Untersuchungen im Gebiet des Alkalifehlers", *Z. Elektrochem.* **65**, 518-526, 1961.
- [70] EISENMAN, G.; "Cation Selective Glass Electrodes and Their Mode of Operation", *Biophys. J. Supplement* **2**, 259-323, 1962. Proceeding of the Symposia Presented at the International Biophysics Congress, July 31 - August 4, 1961.
- [71] LENGYEL, B. V.; "The Phase-Boundary Potential Between Quartz and Electrolyte Solutions", *Z. Physik. Chem. Abt. A153*, 425-442, 1931.
- [72] HORVÁTH, V.; HORVAI, G.; PUNGOR, E.; "Ion Exchange at Neutral Carrier Ion-Selective Membranes", *Fres. J. Anal. Chem.* **346**, 569-571, 1993.
- [73] PUNGOR, E.; "Ion-Selective Electrodes Misinterpretation of Functional Mechanism, and New Results", *Microchem. J.* **57**, 251-254, 1997.
- [74] NAGY, G.; TÓTH, K.; PUNGOR, E.; "How Far the Ion-Selectivity Should be Improved - A task Oriented Limit of Ion-Selective Electrode Design", *Anal. Letters* **26**, 1391-1396, 1993.
- [75] PUNGOR, E.; "How to Understand the response Mechanism of Ion-Selective Electrodes", *Talanta* **44**, 1505-1508, 1997.
- [76] PUNGOR, E.; "The Theory of Ion-Selective Electrodes", *Anal. Sc.* **14**, 249-256, 1998.
- [77] PUNGOR, E.; "Working Mechanism of Ion-Selective Electrodes", *Pure & Appl. Chem.* **64**, 503-507, 1992.
- [78] CHENG, K. L.; CHANG, H.; "The Deviation Potential of pH Glass Electrode", *Mikrochim. Acta* **1**, 95-101, 1985.
- [79] BUCK, R. P.; LINDNER, E.; "Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes", *Pure & Appl. Chem.* **66**, 2527-2536, 1994.

- [80] UMEZAWA, Y.; UMEZAWA, K.; SATO, H.; "Selectivity Coefficients for Ion-Selective Electrodes: Recommended Methods for Reporting K^{pot} Values", *Pure & Appl. Chem.* **67**, 507-518, 1995.
- [81] GADZÉKPO, V. P. Y.; CHRISTIAN, G. D.; "Determination of Selectivity Coefficients of Ion Selective Electrodes by a Matched-Potential Method", *Anal. Chim. Acta* **164**, 279-282, 1984.
- [82] COLLIBGS, A. F.; CARUSO, F.; "Biosensors: Recent Advances", *Rep. Prog. Phys.* **60**, 1397-1445, 1997.
- [83] CECH, T. R.; ZAUGH, A. J.; GRABOWSKI, P. J.; "In Vitro Splicing of the Ribosomal RNA Precursor of Tetrahymena: Involvement of a Guanosine Nucleotide in the Excision of the Intervening Sequence" *Cell* **27**, 487-496, 1981.
- [84] SAARI, N. B.; FUJITA, S.; MIYAZOE, R.; OKUGAWA, M.; "Distribution of Ascorbate Oxidase Activities in the Fruits of Family Cucurbitaceae and Some of Their Properties", *J. Food Biochem.* **19**, 321-327, 1995.
- [85] TOKUYAMA, K.; CLARCK, E. E.; DAWSON, C. R.; "Ascorbate Oxidase - A New Method of Purification. Characterization of Purified Enzyme", *Biochemistry* **4**, 1362, 1965.
- [86] MEYER, T. E.; MARCHESINI, A.; CUSANOVICH, M. A.; TOLLIN, G.; "Direct Measurement of Intramolecular Electron Transfer Between Type I and Type III Copper Centers in the Multi-Copper Enzyme Ascorbate Oxidase and Its Type II Copper-Depleted and Cyanide-Inhibited Forms", *Biochemistry* **30**, 4619-4623, 1991.
- [87] MARITANO, S.; KOHZUMA, T.; SUZUKI, S.; MARCHESINI, A.; "Stability of Ascorbate Oxidase Extracted from *Cucurbita pepo*", *Phytochemistry* **41**, 349-351, 1996.
- [88] COLE, J. L.; AVIGLIANO, L.; MORPURGO, L.; SOLOMON, E. L.; "Spectroscopic and Chemical Studies of the Ascorbate Oxidase Trinuclear Copper Active Site: Comparison to Laccase", *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9080-9089, 1991.
- [89] FARVER, O.; WHERLAND, S.; PECHT, L.; "Intramolecular Electron Transfer in Ascorbate Oxidase is Enhanced in the Presence of Oxygen", *J. Biol. Chem.* **269**, 22933-22936, 1994.
- [90] NAKAMURA, T.; MAKINO, N.; OGURA, Y.; "Purification and Properties of Ascorbate Oxidase from Cucumber", *J. Biochemistry* **64**, 189-195, 1968.
- [91] MOSER, O.; KANELIS, A. K.; "Ascorbate Oxidase of *Cucumis melo* L. var. *reticulatus*: Purification, Characterization and Antibody Production", *J. Experim. Botany* **45**, 717-724, 1994.
- [92] CARVALHO Jr., L. B.; LIMA, C. J.; MEDEIROS, P. H.; "Ascorbate Oxidase from *Cucurbita maxima*", *Phytochemistry* **20**, 2423-2424, 1981.
- [93] MACCARRONE, M.; D'ANDREA, G.; SALUCCI, L.; AVIGLIANO, L.; FINAZZI, AGRO, A.; "Temperature, pH and UV Irradiation Effects on Ascorbate Oxidase", *Phytochemistry* **32**, 795-798, 1993.
- [94] GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M.; *Biochemistry*, Saunders College Publishing: Orlando, p. 319, 180-182, 375-376, 491, 1995.
- [95] SKEIST, H.; *Handbook of Adhesives*, Second Edition, Van Nostrand Reinhold Company: New York, p. 484-506, 1977.
- [96] ALEXANDER, P. W.; JOSEPH, J. P.; "A Coated-Metal Enzyme Electrode for Urea Determinations", *Anal. Chim. Acta* **131**, 103-109, 1981.
- [97] IANNIELLO, R. M.; YACYNICH, A. M.; "Urea Sensor Based on Iridium Dioxide Electrodes with Immobilized Urease", *Anal. Chim. Acta* **146**, 249-253, 1983.
- [98] GLĄB, S.; KONCKI, R.; KOPCZEWSKA, E.; WĄLCERZ, L.; HULANICKI, A.; "Urea Sensors Based on PVC Membrane pH Electrode", *Talanta* **41**, 1201-1205, 1994.
- [99] ROVER Jr., L.; GARCIA, C. A. B.; NETO, G. O.; KUBOTA, L. T.; GALEMBECK, F.; "Acetylsalicylic Acid

- Determination in Pharmaceutical Samples by FIA-Potentiometry Using a Salicylate-Sensitive Tubular Electrode with an Ethylene-Vinyl Acetate Membrane", *Anal. Chim. Acta* **366**, 103-109, 1998.
- [100] ET-JAMMAL, A.; BOUKLOUZE, A. A.; PATRIARCHE, G. J.; CHRISTIAN G. D.; "Use of Ethylene-Vinyl-Acetate as a New Membrane Matrix for Calcium Ion-Selective Electrode Preparation", *Talanta* **38**, 929-935, 1991.
- [101] FIEDLER, U.; RŮŽICKA, J.; "Selectrode - Universal Ion-Selective Electrode. 7. Valinomycin-Based Potassium Electrode with Nonporous Polymer Membrane and Solid-State Inner Reference System", *Anal. Chim. Acta* **67**, 179-193, 1973.
- [102] THOMAS, J. D. R.; "Solvent Polymeric Membrane Ion-Selective Electrodes", *Anal. Chim. Acta* **180**, 289-297, 1986.
- [103] LI, J.; SHEN, G.; YU, R.; "Reversible Potentiometric Ascorbic Acid Solid-state Membrane Sensor Based on 4,4',4'',4'''-Tetra-*tert*-butylphthalocyanine Cobalt (II)", *Analyst* **120**, 2259-2263, 1995.
- [104] DAWSON, C. R.; The Biochemistry of Copper, Proceedings of the Symposium on Copper in Biological Systems Held, Arden House, Harriman, New York (Ed. PEISACH, J.; Aisen, P.; Blumberg, W. E.); Academic Press, p.314, 1966.
- [105] SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; Fundamentals of Analytical Chemistry, Seventh Edition, Saunders College Publishing: Philadelphia, p. 11-70, 1996.
- [106] GERWIN, B.; BURSTEIN, S. R.; WESTLEY, J.; "Ascorbate Oxidase : Inhibition, Activation and pH Effects", *J. Biol. Chem.* **249**, 2005-2008, 1974.
- [107] FERNANDES, J. C. B.; NETO, G. O.; KUBOTA, L. T.; "Use of Column with Modified Silica for Interfering Retention in a FIA Spectrophotometric Method for Direct Determination of Vitamin C in Medicine", *Anal. Chim. Acta* **366**, 11-22, 1998.
- [108] DEUTSCH, J. C.; "Ascorbic Acid Oxidation by Hydrogen Peroxide", *Anal. Biochem.* **255**, 1-7, 1998.
- [109] OGATA, Y.; KOSUGI, Y.; MORIMOTO, T.; "Kinetics of the Cupric Salt-Catalysed Autoxidation of L-Ascorbic Acid in Aqueous Solutions", *Tetrahedron* **24**, 4057-4066, 1968.
- [110] OGATA, Y.; KOSUGI, Y.; "Solvent Effect on the Autoxidation of L-Ascorbic Acid", *Tetrahedron* **25**, 1055-1062, 1969.
- [111] Catalog Fluka Chemika-Ciochemika Analytika, Fluka Chemie AG Industriestrasse 25 CH-9471 Buchs: Switzerland, p. 156, 1995/96.
- [112] BARD, A. J.; FAULKNER, L. R.; Electrochemical Methods – Fundamental and Applications, Vol. II, John Wiley & Sons: USA, 1980.
- [113] KHAN, M. M. T.; MARTELL, A. E.; "Metal Ion and Metal Chelate Catalyzed Oxidation of Ascorbic Acid by Molecular Oxygen. I. Cupric and Ferric Ion Catalyzed Oxidation", *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 4176-4185, 1967.
- [114] BALLA, J.; KISS, T.; JAMESON, R. F.; "Copper (II)-Catalyzed Oxidation of Catechol by Molecular Oxygen in Aqueous Solution", *Inorg. Chem.* **31**, 58-62, 1992.
- [115] LIDE, D. R.; Handbook of Chemistry and Physics, 78th, p. 7-3, 1997-1998.
- [116] MAHLER, H.R.; HÜBSCHER, G.; BAUM, H.; "Studies on Uricase: I. Preparation, Purification and Properties of a Cuproteins", *J. Biol. Chem.* **216**, 625-641, 1955.
- [117] MAHLER, H.R.; BAUM, H.; HÜBSCHER, G.; "Enzymatic Oxidation of Urate", *Science* **124**, 705-708, 1956.
- [118] GRIFFITHS, M.; "Oxidation of Uric Acid Catalyzed by Copper and by the Cytochrome-Cytochrome

- Oxidase System", *J. Biol. Chem.* **197**, 399-407, 1952.
- [119] GLĄB, S.; HULANICKI, A.; EDWALL, G.; FOLKE, I.; "Metal-Metal Oxide and Metal-Oxide Electrodes as pH Sensors", *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* **21**, 29-47, 1989.
- [120] NOMURA, K.; UJIHIRA, Y.; "Magnetite Coated Iron Wire and Molybdenum Oxide-Coated Molybdenum Wire as pH Sensor", *Anal. Sci.* **3**, 125-129, 1987.
- [121] NOMURA, K.; UJIHIRA, Y.; "Response of Oxide-Films on Stainless-Steel as a pH Sensor", *Anal. Chem.* **60**, 2564-2567, 1988.
- [122] HERMAN, H. B.; RECHINITZ, G. A.; "Preparation and Properties of a Carbonate Ion-Selective Membrane Electrode", *Anal. Chim. Acta* **76**, 155-164, 1975.
- [123] LEHNINGER, A. L.; Fundamentos de Bioquímica, Ed. Sarvier: São Paulo, p. 33, 1980.
- [124] MACHADO, M.; *Rev. Ass. Med. Bras.* **4**, 3, 1958.
- [125] SUMNER, J. B.; "The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease", *J. Biol. Chem.* **69**, 435-441, 1926.
- [126] DIXON, N. E.; HINDS, J. A.; FIELLY, A. K.; GAZZOLA, C.; WINZOR, D. J.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B.; "Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). IV. The Molecular Size and the Mechanism of Inhibition by Hydroxamic Acids. Spectrophotometric Titration of Enzymes with Reversible Inhibitors", *Can. J. Biochem.* **58**, 1323-1333, 1980.
- [127] TAKISHIMA, K.; SUGA, T.; MAMIYA, G.; "The Structure of Jack Bean Urease - The Complete Amino Acid Sequence, Limited Proteolysis and Reactive Cysteine Residues", *Eur. J. Biochem.* **175**, 151-165, 1988.
- [128] BLAKELEY, R. L.; DIXON, N. E.; ZERNER, B.; "Jack Bean Urease. 7. Light-Scattering and Nickel(II) Spectrum - Thiolate-Nickel(II) Charge-Transfer Peaks in the Spectrum of the β -mercaptoethanol-Urease Complex", *Biochim. Biophys. Acta* **744**, 219-229, 1983.
- [129] DIXON, N. E.; RIDDLES, P. W.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B.; "Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). V. On the Mechanism of Action of Urease, Formamide, Acetamide, N-methylurea, and Related Compounds", *Can. J. Biochem.* **58**, 1335-1344, 1980.
- [130] KONCKI, R.; HULANICKI, A.; GLĄB, S.; "Biochemical Modifications of Membrane Ion-Selective Sensors", *TRAC Trends Anal. Chem.* **16**, 528-536, 1997.
- [131] MAMIYA, G.; TAKISHIMA, K.; MASAKUNI, M.; KAYUMI, T.; OGAWA, K.; "Complete Amino-Acid-Sequence of Jack Bean Urease", *J. Protein. Chem.* **6**, 55-59, 1987.
- [132] ALAGNA, L.; HASNAIN, S. S.; PIGGOT, B.; WILLIAMS, D. J.; "The Nickel Ion Environment in Jack Bean Urease", *Biochem. J.* **220**, 591-595, 1984.
- [133] GLĄB, S.; KONCKI, R.; HULANICKI, A.; "Kinetic-Model of pH-Based Potentiometric Enzymatic Sensors. 3. Experimental-Verification", *Analyst* **117**, 1675-1678, 1992.
- [134] KONCKI, R.; LESZCZYŃSKI, P.; HULANICKI, A.; GLĄB, S.; "Urea Sensors Based on Glass pH Electrodes with Physically Immobilized Urease", *Anal. Chim. Acta* **257**, 67-72, 1992.
- [135] GUILBAULT, G. G.; Enzymatic Methods of Analysis, Pergamon Press: Oxford, p. 17, 1970.
- [136] LIU, B.; HU, R.; DENG, J.; "Studies on a Potentiometric Urea Biosensor Based on an Ammonia Electrode and Urease, Immobilized on a γ -Aluminum Oxide Matrix", *Anal. Chim. Acta* **341**, 161-169, 1997.
- [137] VARNER, J. E.; The Enzymes; BOYER, P. D.; LARDY, H.; MIRBÄCK, K.; Second edition, Academic Press: New York, Vol. 4, p. 247-256, 1960.
- [138] FISHBEIN, W. N.; WINTER, T. S.; DAVIDSON, J. D.; "Urease Catalysis. I. Stoichiometry Specificity and Kinetics of a Second Substrate - Hydroxyurea", *J. Biol. Chem.* **240**, 2402, 1965.
- [139] FISHBEIN, W. N.; CARBONE, P. P.; "Urease Catalysis. II. Inhibition of Enzyme by Hydroxyurea,

- Hydroxylamine and Acetohydroxamic Acid", *J. Biol. Chem.* **240**, 2407, 1965.
- [140] BLAKELEY, R. L.; HINDS, J. A.; KUNZE, H. E.; WEBB, E. C.; ZERNER, B.; "Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5) . Demonstration of a Carbamoyl-Transfer Reaction and Inhibition by Nydroxamic Acids", *Biochemistry* **8**, 1991, 1969.
- [141] FISHBEIN, W. N.; "A Simple Sensitive and Specific Colorimetric Assay for Dihydroxyurea", *Anal. Chim. Acta* **40**, 269, 1968.
- [142] FISHBEIN, W. N.; "Urease Catalysis. 3. Stoichiometry Kinetics and Inhibitory Properties of a Third Substrate - Dihydroxyurea", *J. Biol. Chem.* **244**, 1188, 1969.
- [143] GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B.; "Substrate-Specificity of Jack Bean Urease (Urea Amidohydrolase, EC 3.5.1.5)", *Can. J. Biochem.* **51**, 1325-1330, 1973.
- [144] BENETT, J.; WREN, E. A.; "Interaction of Para-Nitrophenyl Carbamate with Urease", *Biochim. Biophys. Acta* **482**, 421-426, 1977.
- [145] DIXON, N. E.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B.; "Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). III. The Involvement of Active-Site Nickel Ion in Inhibition by β -mercaptoethanol, Phosphoramidate, and Fluoride", *Can. J. Biochem.* **58**, 481-488, 1980.
- [146] WALCERZ, I.; GLAB, S.; KONCKI, R.; "Potentiometric Enzyme Electrode in a Flow Injection System for the Determination of Urea in Human Serum Samples", *Anal. Chim. Acta* **369**, 129-137, 1998.

Técnicas Dinâmicas de Análise

Técnicas dinâmicas e automatizadas de análise^[1-3] têm recebido grande atenção por parte dos pesquisadores em Química Analítica nas três últimas décadas. O interesse por análises mais rápidas, com a utilização de pequena quantidade de amostra, levou os pesquisadores a desenvolverem técnicas que permitissem melhorar o desempenho dos instrumentos existentes, fazendo com que mais detectores e sensores pudessem ser utilizados de forma mais reproduzível e eficiente. Com base nestes objetivos, grandes corporações de empresas investiram milhões de dólares no desenvolvimento e fabricação de analisadores automáticos. Contudo, tais aparelhos apresentavam um alto custo de compra e de operação, além de serem muito complexos.

Análise por injeção em fluxo (FIA) foi uma das primeiras técnicas propostas, que permitiu realizar de forma eficaz, ensaios rápidos, com baixo custo e consumo de reagentes. Introduzida no Brasil, em 1974/75, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), FIA obteve grande aceitação por parte da comunidade científica, tendo recebido, até o momento, mais de 10.000 contribuições de vários pesquisadores no mundo. A importância desta técnica é verificada pelas edições especiais de revistas internacionais^[4-12], pelos artigos de revisões^[13-19] e por uma série de monografias^[20-23]. Embora FIA seja uma técnica de laboratório bem sucedida, versátil, reproduzível e confiável, suas aplicações em análises de rotina para controle de processos e de qualidade, apesar de virem crescendo, não encontraram grande aceitação no ambiente industrial^[2]. A necessidade de complexos sistemas de vias e bombas multicanais, talvez tenha sido um dos fatores principais, pela resistência das indústrias, em relação aos sistemas de análises por injeção em fluxo. Consequentemente, novas técnicas vêm sendo propostas como alternativa ao sistema FIA. Duas destas técnicas, surgidas no início dos anos 90, foram a Análise por Injeção Sequencial (SIA)^[2] e a Análise por Injeção em Batelada (BIA)^[3].

Da mesma maneira que ocorreu no início do surgimento do sistema FIA, a aceitação de BIA e SIA no meio acadêmico, vem sendo lenta. Até o momento, o número de trabalhos publicados para estas técnicas não são superiores a 100 e 800, respectivamente.

O princípio de funcionamento das três técnicas está fundamentado no mesmo conceito: o transporte reproduzível da amostra até próximo ao detector sobre condições controláveis de dispersão. Além disto, em todas estas técnicas a altura do pico obtido devido a injeção da amostra é

diretamente relacionada com a resposta do detector. Contudo, a forma como este conceito é implementado caracteriza a diferença entre uma e outra técnica. Em FIA, este princípio está baseado na injeção de uma amostra líquida para dentro de um fluido transportador em contínuo movimento. A amostra injetada forma uma zona, na qual é transportada para próximo ao detector que continuamente registra o parâmetro físico que relaciona o sinal analítico com a concentração da amostra^[1,20]. A Fig. 3.1 mostra um diagrama básico desta idéia.

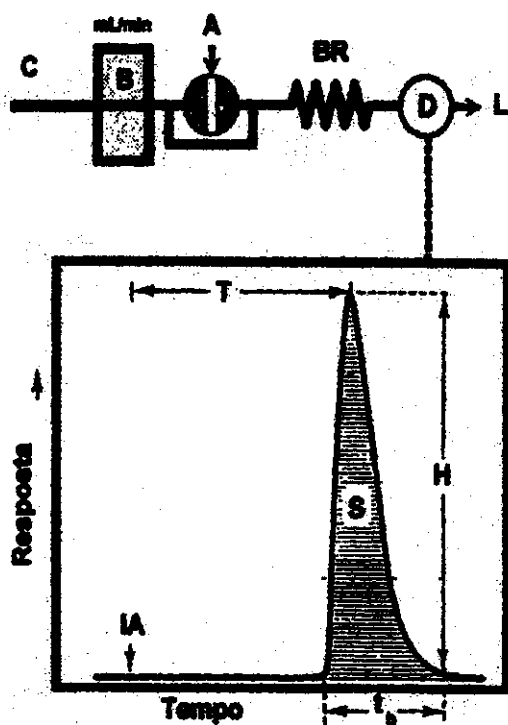


Fig. 3.1 Diagrama esquemático de um simples sistema FIA monocanal. (B) é uma bomba peristáltica para a propulsão do reagente da linha carregadora (C). (A) é um injetor, onde um volume definido de solução amostra é inserido em (C). A amostra é conduzida até a cela de detecção (D), passando por uma bobina de reação (BR), para que a mesma reaja com o componente de (C) formando uma espécie sensível ao detector. A passagem da amostra por (D) produz um pico típico, o qual é mostrado abaixo do sistema FIA. (IA) é o ponto de partida da injeção da amostra; (T) é o tempo de residência da amostra até a sua detecção; (S) e (H) são respectivamente a área e a altura do pico, a qual relaciona a concentração do analito com a medida instrumental; e (t_b) é o tempo de lavagem da cela de detecção ou de retorno do sinal à linha base. Após a detecção, a amostra é conduzida até um recipiente de acúmulo de resíduo (L). Adaptado da referência [20].

Os sistemas FIA podem utilizar dois tipos de estratégia:

- Injeção em fluxo contínuo (CFI): a amostra é injetada num canal ou tubo onde está fluindo continuamente uma solução transportadora em um único sentido;
- Injeção em fluxo intermitente (SFI): a solução carregadora move-se em um único sentido até uma região apropriada onde a amostra é dispersada e posicionada no campo de observação do detector para a medida da velocidade de reação sem fluxo.

Desde que surgiu, a proposta original de FIA vem sendo modificada com o passar do tempo. Planejado inicialmente para automatizar análises em série, FIA encontrou utilização nas mais diversas áreas. Além de várias aplicações em análises de rotina e pesquisa, FIA tem sido usado na monitoração de processos químicos, no desenvolvimento e teste de sensores, em processos de separação e pré-concentração, em especiação de metais, além de melhorar o desempenho de vários instrumentos. O

sistema FIA também encontrou emprego como metodologia para medida de coeficientes de difusão, constantes de velocidade de reação química, de estabilidade e composição de complexos, de extração, de produtos de solubilidade e de viscosidade^[24,25]. Contudo, dependendo do tipo de aplicação e de amostra, diferentes sistemas FIA são planejados a partir da configuração básica (Fig. 3.1)

Em relação à SIA, seu princípio de funcionamento está baseado em certas etapas discretas. Cada medida é partida pela aspiração de uma solução de lavagem, seguida pela "injeção" da solução da amostra e da solução reagente em um único canal ou duto. A medida ocorre durante o movimento de aspiração do pistão da bomba tipo seringa. Neste processo, zonas bem definidas são sequencialmente injetadas para um canal, o qual serve como reator, cela de detecção e reservatório de retenção. Dispersões recíprocas das zonas injetadas são obtidas através de um pré-programável movimento destas zonas em direção ao detector. A medida de um ciclo é terminada quando o fluxo é revertido e as zonas dispersas são impulsionadas através do sistema até um depósito de resíduo.

O planejamento do sistema SIA segue as regras estabelecidas para FIA, a fim de providenciar baixa, média ou alta dispersão das zonas da amostra injetada. Os coeficientes de dispersão da amostra e reagente em SIA têm que ser cuidadosamente considerados no desenvolvimento do ensaio, para que seja obtido um ótimo desempenho do sistema. Em SIA, a válvula de seleção serve como um distribuidor central e junto com a bomba tipo seringa auxilia no transporte de um volume preciso de solução amostra. Consequentemente, alguns pré-requisitos são necessários tanto para a bomba quanto a válvula de seleção, as quais devem ter zero de inércia e de elasticidade. A etapa crítica em SIA é a injeção, pois depende de uma aspiração reproduzível de pequenos volumes de soluções. Logo, há necessidade de um sincronismo entre o pistão da bomba e a válvula de seleção. Por este motivo, apesar de SIA ser instrumentalmente mais simples que seu comparável sistema FIA, SIA requer um complexo programa computacional de controle do sistema^[2]. Além disto, por realizar todas as operações de detecção e lavagem numa mesma via, SIA quase sempre apresenta uma menor frequência de amostragem que FIA^[26], porém com menor consumo de reagentes que em CFI. A Fig. 3.2 mostra um diagrama esquemático de um sistema SIA com o seu perfil típico de resposta.

Vários trabalhos têm demonstrado a versatilidade de SIA. A mesma pode ser aplicada na determinação de constantes cinéticas, em métodos de separação *on-line*, controle de processos industriais e análise de rotina. Várias metodologias analíticas têm sido acopladas ao sistema SIA, desde métodos ópticos, como espectrofotometria no UV/VIS e absorção ou emissão atômica, até eletroquímicos, tais como voltametria, condutometria e potenciometria.

Assim como FIA e SIA, o conceito de BIA também está fundamentado no transporte reproduzível da amostra até próximo ao detector. No caso de BIA, isto é realizado colocando-se a saída do injetor, em geral, a ponteira de uma micropipeta, próximo à superfície plana do sensor. A passagem da amostra sobre o detector resulta em um pico, similar àqueles obtidos em FIA^[3]. Para o completo

sucesso do sistema, uma operação de lavagem efetiva é requerida. Assim, um largo volume de solução (~1 L) sob agitação, é utilizado na cela de detecção.

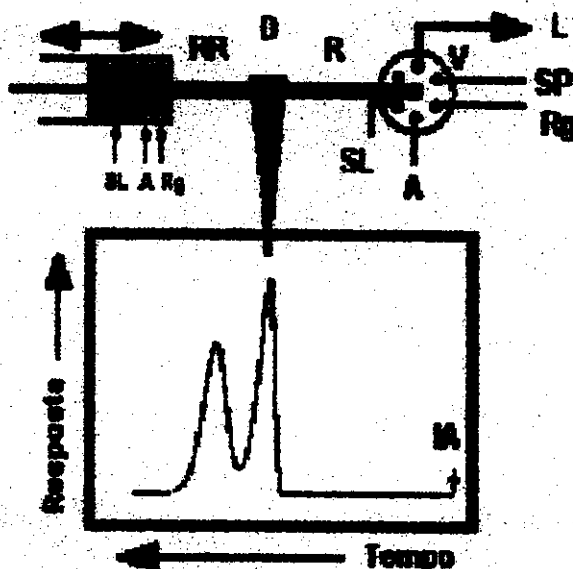


Fig. 3.2 Esquema de um sistema SIA com o seu perfil de resposta. Os símbolos representam: (SL) solução de lavagem; (A) solução do analito; (Rg) solução reagente; (SP) solução do padrão; (R) região de reação; (D) cela de detecção; (RR) reservatório de retenção; (IA) momento de injeção da amostra. A válvula de seleção (V) providencia a injeção sequencial das soluções para dentro do canal, através de etapas pré-programáveis e sincronizadas com o movimento do pistão. Adaptado da referência [2].

BIA é uma técnica mais limitada, suas aplicações são na maioria análises de rotina, sendo associado principalmente à métodos eletroquímicos, por causa dos sensores tipo eletrodos e alguns métodos ópticos, como fluorimetria^[27] e espectrofotometria no UV/VIS^[28]. A Tabela 3.1 apresenta algumas aplicações de FIA, SIA e BIA e a Fig. 3.3 mostra um sistema BIA típico.

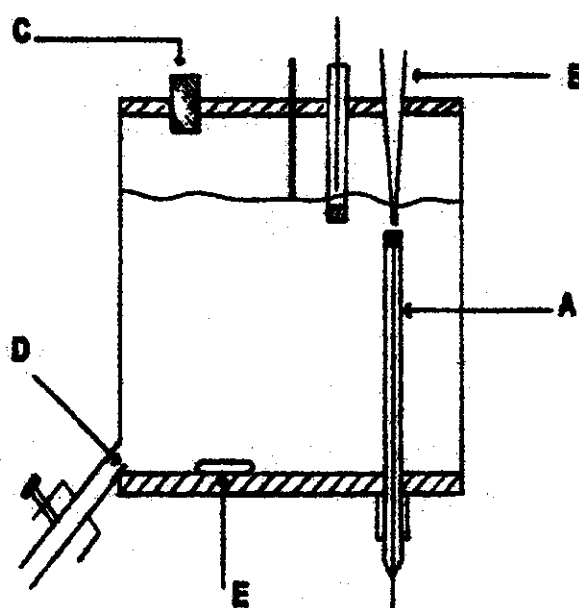


Fig. 3.3 Diagrama esquemático de um sistema BIA típico. (A) detector; (B) ponteira de uma micropipeta; (C) orifício; (D) dreno e (E) barra de agitação. Adaptado da referência [3].

Tabela 3.1 Alguns exemplos de aplicações das técnicas FIA, SIA e BIA.

Área de Aplicação	Método de detecção	Referências		
		FIA	SIA	BIA
Agricultura	Potenciometria	[29]		
Alimentos	Espectrofotometria de Absorção ou Emissão Atômica e UV/VIS	[30,31]		
Ambiental				
Água	Amperometria			[73]
	Espectrofotometria no UV/VIS	[32]	[58-60]	
	Fluorimetria	[33]		
	Potenciometria			[74,75]
	Quimioluminescência	[34,35]		
	Voltametria	[36]		[76-79]
Ar	Potenciometria	[37]		
Especiação	Espectrofotometria de Absorção Atômica	[38,39]		
Bioquímica	Amperometria	[40]		[80]
	Termometria			[81]
	Voltametria			[82]
Clinica				
Urina	Espectrofotometria no UV/VIS	[41]	[61,62]	
Plasma e Soro Sanguíneo	Espectrofotometria no UV/VIS	[42]		
	Fotometria de Chama	[43]		
Controle de Processos		[44-46]	[63-65]	
Farmacêutica	Espectrofotometria no UV/VIS		[66]	
	Potenciometria	[47]		
Medida de constantes				
Coeficientes de difusão	Amperometria	[48]		
Cinética	Espectrofotometria no VIS	[49]	[67]	
pK _a e formação de complexos	Espectrofotometria no VIS	[50]	[68]	
Método de Separação				
Díálise	Quimioluminescência	[51]		
	Espectrofotometria no VIS		[69]	
Extração	Espectrofotometria no UV/VIS	[52-54]	[70,71]	
Pré-concentração	Espectrofotometria de Absorção Atômica	[55-57]	[72]	

*Associado com Cromatografia de Alta Resolução (HPLC).

3.1 A Análise por Injeção em Batelada

O sistema BIA é relativamente simples, pois não necessita de bombas, válvulas, tubos associados, nem reservatórios para dispensa de soluções reagentes. Vários trabalhos ilustram a maior simplicidade dos sistemas BIA em comparação com as outras técnicas dinâmicas de análise^[83,84]. Contudo, BIA é menos versátil que FIA e SIA no manuseio do analito em reações químicas. Por causa da limitada capacidade de manusear a amostra, a superfície do detector ou do sensor em BIA têm que ser altamente reativa ou seletiva. Entretanto, superfícies de sensores podem acomodar uma larga variedade de reações químicas e biológicas. Biossensores e eletrodos quimicamente modificados apresentam condições atraentes para serem utilizados em BIA^[83]. Além disto, pode ser possível acomodar membranas de permeação no sensor, o que permitiria realizar processos de separação ou outra operação física na superfície do detector.

Outros problemas que ocorrem em BIA são o método de injeção, a necessidade de colocar o sensor invertido no sistema e a deterioração do sinal com o acúmulo do analito no reator. No primeiro caso, as dificuldades ocorrem com o uso de micropipetas manuais, pois há necessidade de repetibilidade na forma de injeção^[3], exigindo treinamento exaustivo. Isto foi atenuado com o uso de micropipetas computadorizadas. Além de permitir uma melhor reprodutibilidade na injeção, estas micropipetas eletrônicas melhoram a capacidade de manuseio das soluções de analito, uma vez que elas permitem uma série de modos de operações, como titular, diluir, misturar e injetar volumes sequencialmente^[85] (Fig. 3.4). Quanto ao problema de colocar o sensor invertido, isto ocorre principalmente com o uso de eletrodos potenciométricos, pois limita o número de ISE que podem ser utilizados, uma vez que os mesmos não podem conter solução de preenchimento. No entanto, alguns pesquisadores têm sugerido a possibilidade de injeções sobre eletrodo rotatório em posição convencional com o uso de ponteiros curvas^[86].

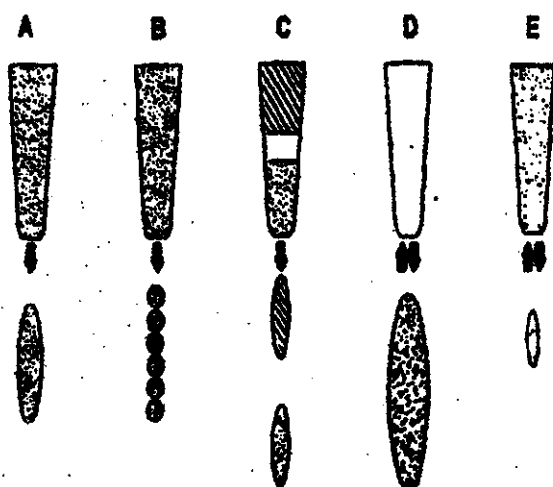


Fig. 3.4 Possíveis modos de operação nas micropipetas eletrônicas motorizadas: (A) Normal; (B) Titular; (C) Diluir; (D) Misturar; (E) Injeção sequencial de volumes. Retirado da referência [85].

Já a deterioração do sinal com o acúmulo de amostra injetada no sistema não é crítica. Desde que pequenos volumes de amostra são injetados (10 a 50 mil vezes menor que o volume da cela), estes são rapidamente dispersos no sistema, não influenciando nas medidas posteriores. Assim, BIA pode tolerar o gradual aumento da concentração da amostra sem nenhuma mudança aparente no sinal. Wang estimou que mais de 1000 amostras poderiam ser injetadas no sistema sem problemas^[83]. É claro, que este valor depende do limite de detecção do sensor utilizado, da concentração da amostra injetada e do volume do analisador BIA. Em alguns sensores amperométricos foi observado uma ligeira deterioração na linha base com cerca de 500 injeções^[9]. Com analisadores BIA de pequeno volume (~40 mL) este problema começa a ser observado com cerca de 250 injeções, havendo assim, a necessidade de restaurar a solução do mesmo^[80,87].

Até o momento, os projetos de construção dos sistemas BIA são realizados sem critérios. Apesar de se conhecer, que os principais parâmetros experimentais que afetam o sinal das medidas em BIA são a distância da ponteira à superfície do detector, o volume de injeção da amostra, o método de injeção e a velocidade de agitação^[3,83,87], pouco se tem contribuído para a evolução do sistema e compreensão dos aspectos teóricos envolvendo os princípios de formação do sinal. Wang descreveu em seus trabalhos preliminares sobre BIA, que o conceito deste estava diretamente relacionado com a teoria *wall-jet* aplicada à mecânica dos fluidos^[1,83]. Brett *et al.*^[88] têm estudado estes aspectos teóricos em sistemas BIA-amperométricos e comparado a teoria de eletrodos *wall-jet* em condições de estado estacionário. Contudo, sua contribuição sugere que mais estudos devem ser realizados nesta área.

Nas seções a seguir será proposta uma nova forma de planejar e otimizar a construção dos sistemas BIA, baseando-se nos conceitos descritos nos manuais de engenharia sobre os projetos de reatores de mistura e de agitação^[89-91]. Além disto, procurar-se-á fundamentar os conceitos envolvidos na formação do sinal no sistema BIA elaborado.

3.1.1 Elaboração e Planejamento do Sistema BIA

Uma das etapas críticas dos reatores em batelada é a agitação e a conseqüente mistura dos fluidos, fator este que parece ser negligenciado na elaboração dos sistemas BIA atuais. A forma mais comum de agitar líquidos é em tanques ou recipientes cilíndricos com o eixo na vertical^[89]. As proporções do tanque variam com a natureza do problema de agitação. Em geral, um tanque de agitação possui um fundo semi-arredondado para eliminar os bordos retos ou regiões onde penetrariam correntes de fluido que prejudicariam a uniformidade da agitação. Sobre um eixo suspenso desde a parte superior, vem montado o agitador. O eixo é conectado diretamente num motor ou através de uma caixa de engrenagens redutoras. Também se incluem nestes tanques acessórios para termostatização, como serpentinas e camisas.

O agitador cria um certo tipo de fluxo dentro do sistema, permitindo uma circulação do líquido por todo o recipiente. Os agitadores se dividem em duas classes: os de fluxo axial, que geram correntes paralelas ao eixo do agitador e os de fluxo radial, que originam correntes em direção tangencial ou radial, como mostra a Fig. 3.5. Os três tipos principais de agitadores (Fig. 3.6) são: os de hélice, os quais são estritamente de fluxo axial e os de palheta e de turbina, que impulsionam o líquido radial e tangencialmente.

O tipo de fluxo que se produz em um tanque agitado depende do tipo de lâmina, das características do fluido, do tamanho e proporções do tanque, placas defletoras (chincanas) e agitador. A velocidade do fluxo de um ponto do tanque tem três componentes:

- a componente de velocidade radial que atua na direção perpendicular da lâmina;
- a componente longitudinal que atua na direção paralela ao eixo;
- a componente tangencial ou rotacional, atuando na direção tangencial a trajetória circular descrita pelas lâminas.

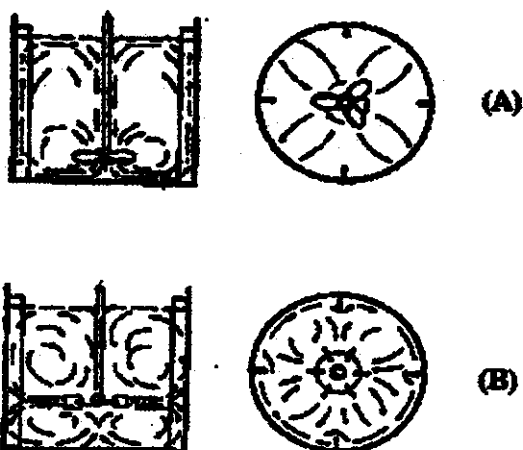
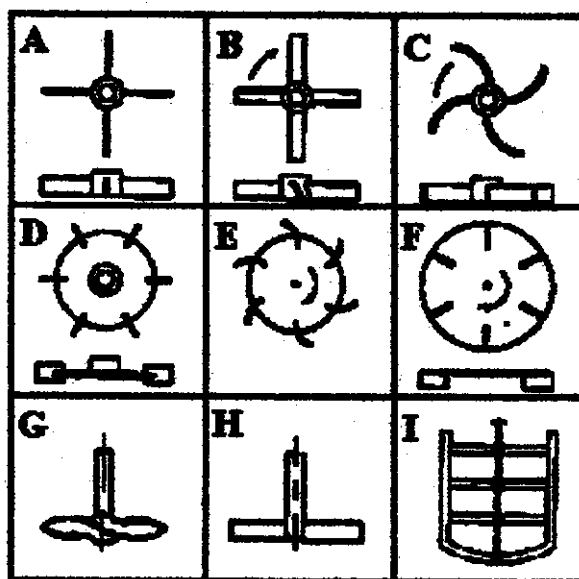


Fig. 3.5 Tipos de escoamentos em agitadores: A. Axial para o tipo hélice; B. Radial para o tipo turbina. Retirado da referência [91].

Fig. 3.6 Tipos de agitadores: A. Turbina de lâminas planas; B. Turbina de lâminas planas inclinadas; C. Turbina de lâminas curvas; D. Turbina, com disco de lâminas planas; E. Turbina, com disco de lâminas curvas; F. Turbina, ventoinha; G. Hélice; H. Palheta, plana; I. Agitador de âncora. Retirado da referência [91].



Para o caso comum de um eixo na vertical, as componentes radial e tangencial estão em um plano horizontal e a longitudinal na vertical. As componentes radial e longitudinal são úteis pois dão o fluxo necessário para produzir a mistura. As componentes tangenciais seguem uma trajetória circular ao redor do eixo, produzindo vórtices e redemoinhos na superfície do líquido devido a circulação do fluxo laminar, dando lugar a diferentes níveis de substâncias sem se misturar, pois não existe fluxo longitudinal de um nível para outro. Este problema deve ser evitado, o que pode ser feito por um dos três métodos seguintes (Fig. 3.7):

- montando-se o agitador na parte lateral deslocado do centro;
- inclinando-se o agitador;
- utilizando placas defletoras ou chincanas.

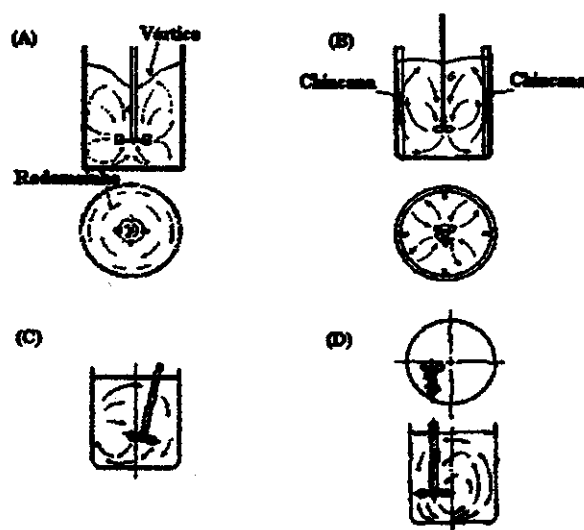


Fig. 3.7 Tipos de fluxo obtidos em um tanque: A. Agitado (formação de vórtice); B. Agitado com chincanas para eliminação de vórtice; C. Agitado com um impulsor em posição inclinada; D. Agitado com um impulsor em posição não centrada. Retirado da referência [91].

Outro fator importante para a construção de um sistema em batelada é a geometria do tanque de agitação (Fig. 3.8). Os livros técnicos de engenharia^[89,90] estabelecem relações importantes, as quais devem ser seguidas para se obter uma eficiente agitação. As principais delas são:

- Razão D/T: Normalmente esta relação é cerca de 1/3 de B, para regimes de fluxo turbulento.
- Razão Z/T: Esta relação descreve o nível de fluido no tanque, sendo normalmente igual a unidade. De forma geral, ela pode variar entre 0,5 até 1,0;
- Razão B/T: O planejamento das chincanas é baseado para o máximo de energia aplicada no movimento do fluido. A relação normal é:

$$\frac{B}{T} = \frac{1}{12} \quad (3.1)$$

- Razão C/T: A distância das lâminas do agitador ao fundo do tanque é um fator importante, cujo

valor mais comum é dado pela relação:

$$\frac{C}{T} = \frac{1}{3} B \quad (32)$$

Contudo, ela pode variar na faixa:

$$0,1 \leq C/T \leq 0,4 \quad (33)$$

De maneira geral, C/T deverá se aproximar do limite inferior se um baixo nível de mistura é desejado.

- Razão W/D e L/D : A relação W/D normalmente é escolhida como sendo igual a $1/5$ ou $1/8$. Quanto à L/D , o valor típico é $0,25$.

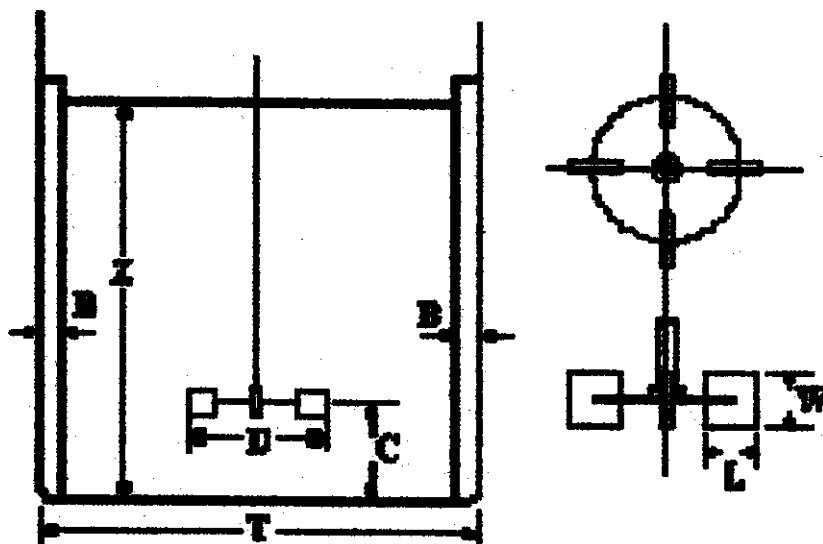


Fig. 3.8 Dimensões características de um tanque com agitador tipo turbina. B é a largura de cada chincana; C é a distância do fundo do tanque à linha central do agitador; T é o diâmetro interno do tanque; D é o diâmetro do impulsor; Z é a profundidade do fluido no tanque; W e L é a largura e o comprimento das lâminas do agitador tipo turbina, respectivamente. Retirado da referência [89].

Baseado nestas considerações construiu-se o projeto do sistema BIA apresentado na Fig. 3.9. Devido as dificuldades de construção do sistema com agitador inclinado ou com o mesmo não centrado, optou-se pelo uso de chincanas para evitar a formação de vórtices e redemoinhos. A utilização de agitadores magnéticos para os sistema BIA não são muito convenientes desde que os sensores são colocados invertidos no sistema, assim, um micromotor DC Tipo 2233T4,5 S, da

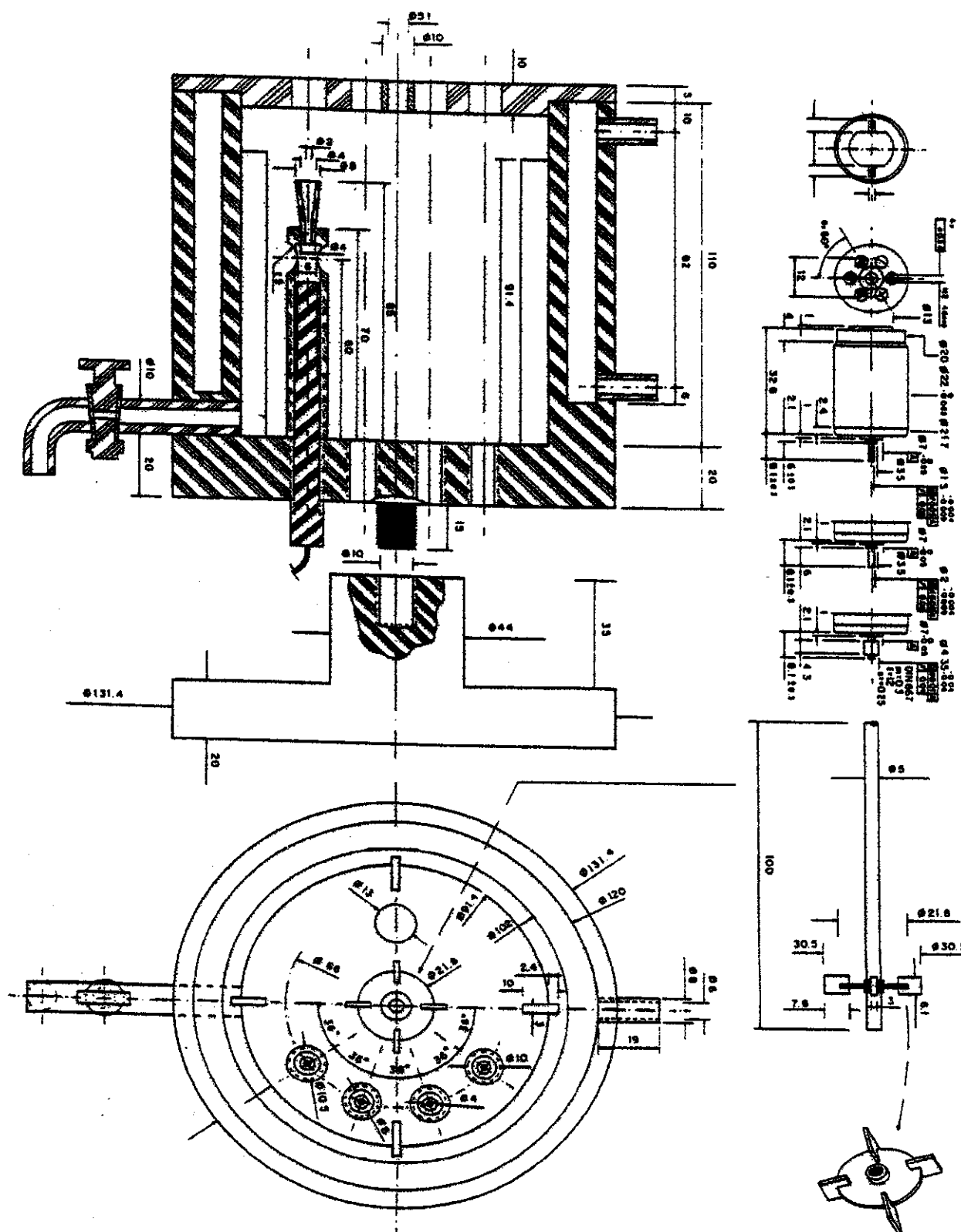


Fig. 3.9 Desenho esquemático do sistema BIA.

Minimotor S.A., foi empregado para impulsionar o agitador, sendo a velocidade deste motor controlada por computador. O agitador escolhido foi do tipo turbina de 4 lâminas por permitir uma homogeneização na direção radial e tangencial, o que o agitador de hélice não o faz, além de ser mais eficaz para um amplo intervalo de viscosidade^[89] e ser mais fácil de miniaturizar.

O reator BIA foi projetado na forma circular com uma “camisa” de termostatização. Ele pode conter 4 sensores potenciométricos em um volume de 700 ml. O valor escolhido para o diâmetro interno (T) do tanque foi 91,4 mm, sendo as relações propostas para a geometria do sistema as seguintes:

$$\frac{D}{T} = \frac{1}{3}; \quad \frac{Z}{T} = 1; \quad \frac{Z}{D} = 3; \quad (3.4)$$

$$\frac{B}{T} = \frac{1}{12}; \quad \frac{W}{D} = \frac{1}{5}; \quad \frac{L}{D} = \frac{1}{4};$$

O sistema BIA projetado, associado com um sistema eletrônico para análise de multi-componentes (Capítulo 5), está apresentado na fotografia da Fig. 3.10.

3.1.2 A Teoria “Wall-jet”

O termo *wall-jet* foi primeiro proposto por Glauert em 1956^[92] e foi associado a um jato de ar que atinge uma superfície num determinado ângulo, difundindo radialmente sobre si mesmo.

Segundo o Princípio de Conservação do Momento, quando duas massas (m_A e m_B) que se movem na mesma direção colidem ou coalescem, o momento total do sistema permanece constante e as massas continuam movimentando-se com uma velocidade comum (V_a)^[91]:

$$\frac{m_A V_A}{g_c} + \frac{m_B V_B}{g_c} = \frac{(m_A + m_B) V_a}{g_c} \quad (3.5)$$

Para líquidos em escoamento, a Eq. 3.5 torna-se:

$$F_N = \frac{\omega \Delta V_a}{g_c} = \frac{\rho v_v \Delta V_a}{g_c} \quad (3.6)$$

onde F_N é a força (N) que atua sobre o fluido; ω é a vazão mássica (Kg s^{-1}); ΔV_a é a variação de velocidade (m s^{-1}); ρ é a densidade do fluido (Kg m^{-3}); v_v é a vazão volumétrica ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$); g_c é a aceleração da gravidade (m s^{-2}).

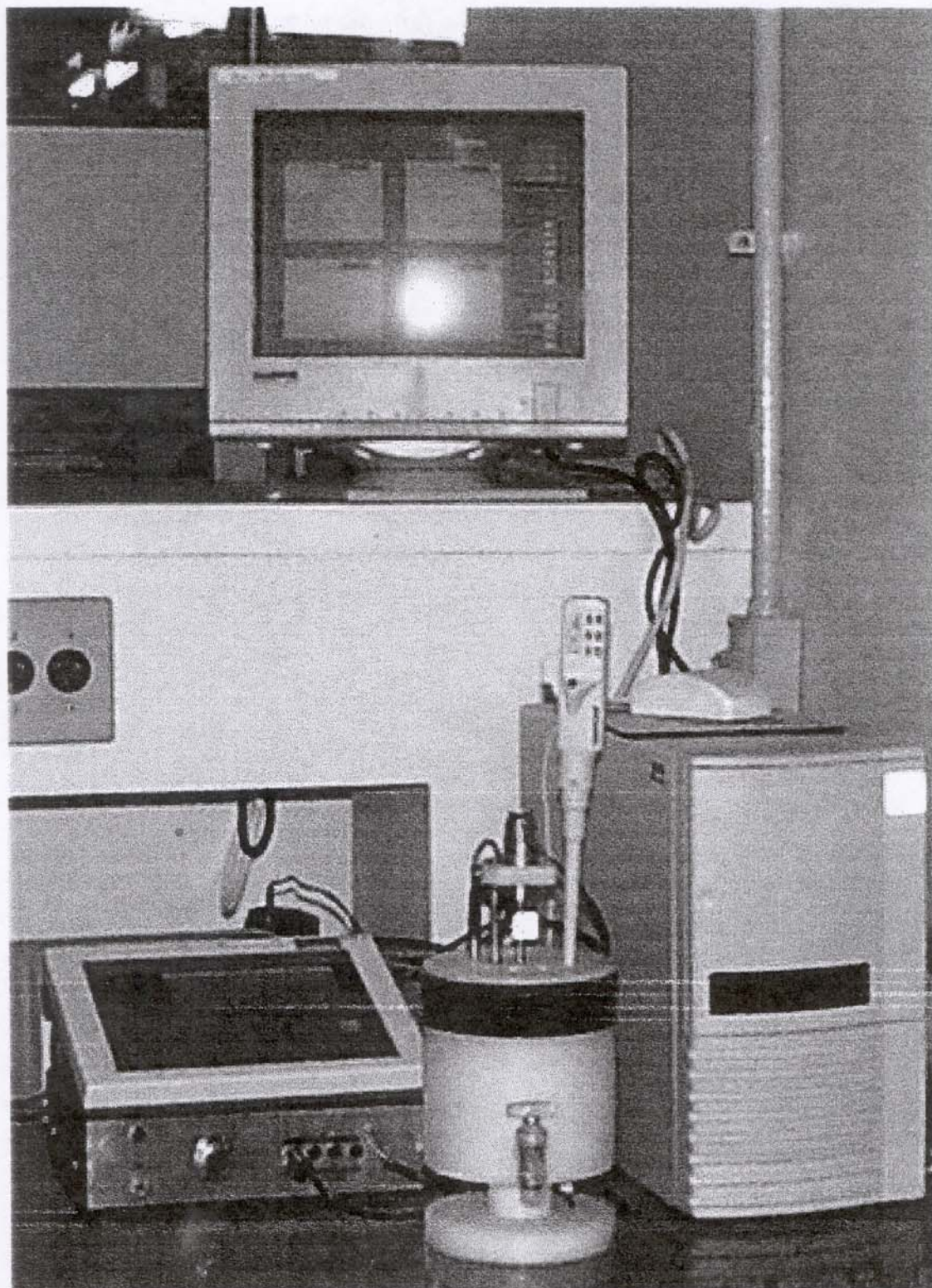


Fig. 3.10 Fotografia do reator BIA associado com o sistema de aquisição de dados e análise multi-componente.

Generalizando para um fluido, líquido ou gás, que sofre um impacto sobre uma placa oblíqua estacionária (Fig. 3.11), supondo que a placa é lisa (força tangencial nula) e que não há perda de energia, a força normal à placa é dada por^[91]:

$$F_N = \frac{\rho v_v V_a}{g_c} \sin \theta \quad (3.7)$$

Esta força é uma grandeza vetorial e suas componentes podem ser determinadas. Logo a divisão do fluxo, dada por v_{v1} e v_{v2} é:

$$v_{v1} = \frac{v_v}{2} (1 + \cos \theta) \quad (3.8)$$

$$v_{v2} = \frac{v_v}{2} (1 - \cos \theta) \quad (3.9)$$

onde θ é o ângulo de inclinação da placa.

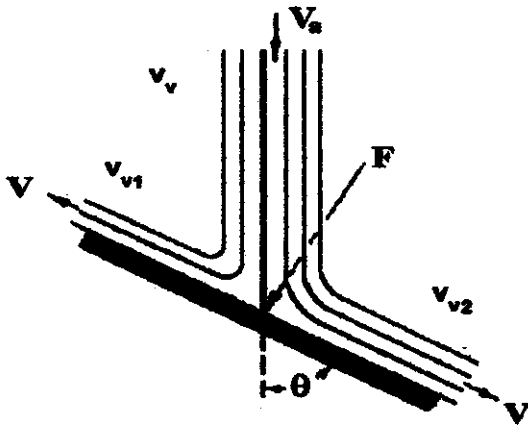


Fig. 3.11 Diagrama esquemático do impacto do jato de um fluido sobre uma superfície inclinada. Adaptado da referência [91].

Para o caso de BIA, no qual o ângulo θ entre o fluido injetado e a superfície do sensor é 90° , a força, F , devida ao impacto sobre a superfície do sensor, e a divisão do fluxo sobre as bordas serão dadas por:

$$F = \frac{\rho v_v V_a}{g_c} \quad (3.10)$$

$$v_{v1} = v_{v2} = \frac{v_v}{2} \quad (3.11)$$

O conceito de eletrodo *wall-jet* foi primeiro introduzido por Yamada e Matsuda em 1973^[93], onde eles descreveram uma função para a corrente-limite de difusão em termos de parâmetros hidrodinâmicos (vazão volumétrica, diâmetro do bocal cujo fluido é impelido e o raio do eletrodo).

$$I_L = 1,38 n F C_\infty D^{2/3} \nu^{-5/12} v_v^{3/4} a^{-1/2} R^{3/4} \quad (3.12)$$

onde a é o diâmetro do bocal em metro, ν a viscosidade cinemática em $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

Um fato interessante que deve ser mencionado é que a equação de Yamada e Matsuda não incluía

um termo para expressar a separação entre o bocal e o eletrodo. Eles assumiram que o jato do líquido saindo do bocal não quebrava antes de colidir sobre o eletrodo. Contudo, na prática eles observaram que as medidas deveriam ser realizadas com uma determinada separação cujo valor deveria ser obtido empiricamente.

Em 1983, Gunasingham e Fleet derivaram expressões para a espessura da camada de difusão e para camada hidrodinâmica bem como a equação para a corrente limite para o eletrodo *wall-jet* em processos voltamétricos^[94]. Quando um fluido passa sobre uma superfície sólida, estabelece-se um gradiente de velocidade perpendicular à direção do fluxo, por causa das forças viscosas que atuam no interior do fluido. O fluido em contato com a superfície é retardado e a força de atrito do fluido na superfície é transmitida através de todo fluido. Contudo, para distâncias progressivamente maiores da superfície, o efeito do atrito torna-se menor e considera-se que o gradiente de velocidade esteja confinado a uma região junto a superfície denominada camada-limite^[95]. Supõe-se que todo o gradiente de velocidade reside no interior da camada-limite e fora dela a velocidade permanece constante. Esta fina camada, onde ocorre a maior variação nos gradientes de velocidade, é denominada camada-limite hidrodinâmica. A espessura da camada-limite é função da distância à aresta frontal a superfície (Fig. 3.12A). Quando a espessura da camada-limite é pequena, o fluxo é laminar e a velocidade a qualquer distância da superfície é uma função desta distância. Porém, a uma certa espessura crítica, o fluxo muda de laminar para turbulento, exceto no interior de uma camada muito fina rente à superfície, onde permanece laminar. Esta camada fina é conhecida por sub-camada laminar. Entre a sub-camada laminar e a porção turbulenta da camada-limite existe uma região na qual o fluxo não é laminar nem completamente turbulento, sendo esta camada conhecida como amortecedora^[95]. É importante ter-se em mente que o fluxo laminar ou viscoso caracteriza-se pela ausência de movimento de massa na direção perpendicular à corrente de fluxo principal. Alguma dispersão radial pode ocorrer por causa da difusão e consiste em correntes de fluxo paralelas que não interferem uma nas outras. Já o fluxo turbulento é caracterizado pelo movimento rápido do fluido, onde aparecem oscilações que se fragmenta dando origem a turbilhões com orientações ao acaso (Fig. 3.12B)^[95].

Para um fluxo laminar sobre uma lâmina plana, com ângulo de incidência zero, a fronteira da camada hidrodinâmica é tomada como o ponto a partir da superfície da lâmina onde a velocidade se aproxima de 99% da velocidade de impulso do fluido^[94]. Gunasingham e Fleet definiram que a camada-limite para o eletrodo de jato colidido deveria ser a camada onde a maior parte da velocidade radial se encontra^[94]. De acordo com Glauert a componente da velocidade radial (u) é dada pela expressão^[92]:

$$u = \left(\frac{15F}{2\nu x^3} \right) f'(\eta) \quad (3.13)$$

onde F é o momento do fluxo exterior, x é a dimensão ao longo da superfície do eletrodo

(longitudinal) tendo sua origem no centro do eletrodo e η_x (distância do bocal à parede) é uma função da velocidade radial, a qual é definida por^[92]:

$$\eta_x = \left(\frac{135F}{32\nu^3 x^5} \right)^{1/4} y \quad (3.14)$$

sendo y a dimensão normal à superfície.

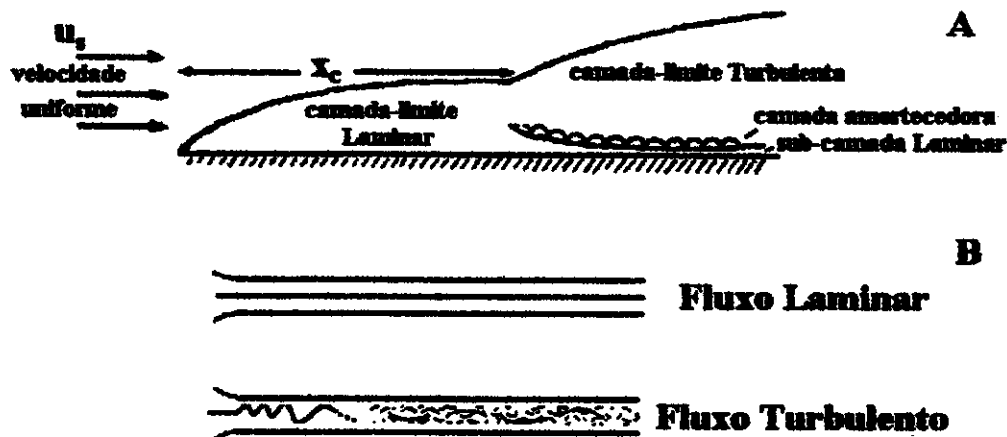


Fig. 3.12 A. Desenvolvimento da camada-limite; B. Tipos de regimes de fluxo de um fluido em movimento. Adaptado da referência [95].

O momento do fluxo exterior é uma constante, a qual Glauert^[92] demonstrou poder ser estimada por $F = 1/2(\text{velocidade típica})(\text{fluxo de volume pelo raio})^2$. Assim, para um jato impulsionado à partir de um bocal de diâmetro, a (cm), com uma vazão volumétrica, v_v ($\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$), o momento de fluxo exterior é dado por^[94]:

$$F = \frac{1}{2} k_1 \left(\frac{4v_v}{\pi a^2} \right) \left(\frac{v_v}{2\pi} \right)^2 \quad (3.15)$$

onde a constante k_1 tem sido determinada por Yamada e Matsuda^[93] como igual a 0,55.

Glauert^[92] mostrou que o perfil da velocidade radial (Eq. 3.14) permanecia praticamente constante à partir de η_x igual a 6 para um fluxo laminar. Assim, substituindo a Eq. 3.14 em 3.15 obtém-se a espessura da camada-limite hidrodinâmica em termos de parâmetros hidrodinâmicos, a qual é característica do eletrodo *wall-jet*:

$$\delta_H = 5,8\pi^{3/4} a^{1/2} \nu^{3/4} x^{5/4} v_v^{-3/4} \quad (3.16)$$

Baseado nestas equações, importantes aspectos devem ser mencionados em relação as diferenças entre a teoria elaborada para o eletrodo de disco rotatório e o *wall-jet*. No primeiro, a camada-limite

é definida como a região onde se encontra a maior parte das componentes de velocidade radial e tangencial, sendo esta última devido ao movimento rotatório do eletrodo. Para o eletrodo *wall-jet* somente a velocidade radial é responsável pela camada hidrodinâmica. Outra diferença, é que no eletrodo de disco rotatório a espessura da camada-limite hidrodinâmica é independente do raio do eletrodo, enquanto que no eletrodo *wall-jet*, esta aumenta rapidamente à partir do centro do eletrodo (Fig. 3.13). Assim, o eletrodo rotatório é uniformemente acessível para as espécies eletroativas, isto é, a espessura da camada de difusão é constante sobre toda a superfície do eletrodo. Já o eletrodo *wall-jet* não é uniformemente acessível^[96].

Em relação a espessura da camada de difusão, Gunasingham e Fleet^[94] acharam razoável supor que esta deveria ser proporcional a expressão deduzida por Levich (Eq. 2.40) corrigida por uma constante:

$$\delta_d = k_2 \left(\frac{D}{\nu} \right)^{\frac{1}{3}} \delta_H \quad (3.17)$$

A constante k_2 foi estimada por Gunasingham e Fleet como igual a 0,17^[94].

Logo, a proposta nesta etapa do trabalho é estudar os principais parâmetros que afetam a resposta no sistema BIA-potenciômetro, bem como associá-los a teoria *wall-jet*, com intuito de contribuir para o aperfeiçoamento do sistema e aprender mais sobre seu funcionamento.

3.1.3 Os Regimes de Fluxo no Sistema BIA

Em BIA existem dois regimes de escoamento: um devido à injeção da amostra com a micropipeta eletrônica e o outro devido à agitação da solução carregadora no reator. Inicialmente, determinar-se-á o comportamento do fluido segundo a vazão volumétrica. A micropipeta eletrônica Eppendorf modelo 4850 possibilita três modos de operação em função da vazão de escoamento do fluido na ponteira: baixo (*low*), médio (*medium*) e alto (*high*). Então, ela foi calibrada com água destilada e o tempo de escoamento medido para a estimar sua vazão volumétrica (Capítulo 5). A Tabela 3.2 apresenta os valores obtidos.

Tabela 3.2 Resultados obtidos para a estimativa da vazão volumétrica da micropipeta Eppendorf modelo 4850, nos seus três modos de operação.

Modo de Operação	Vazão Volumétrica (mL s ⁻¹)
<i>Low</i>	0,60 ± 0,01*
<i>Medium</i>	0,86 ± 0,01
<i>High</i>	0,95 ± 0,02

* Estimativa do desvio padrão para 6 medidas.

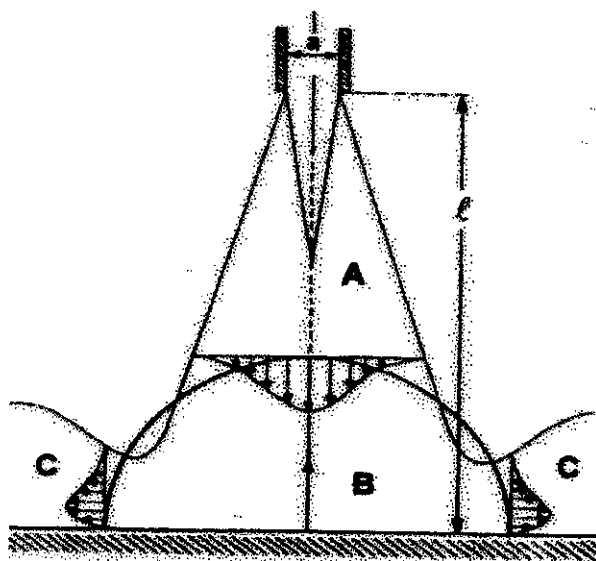


Fig. 3.13 Transferência de massa em um eletrodo wall-jet. A. Região de fluxo estabelecida; B. Região de estagnação; C. Região wall-jet. Retirado da referência [96].

De acordo com Gunasingham e Fleet^[94], a estabilidade do jato depende do regime de fluxo, o qual pode ser determinado pela estimativa de um número adimensional, o número de Reynolds. O regime de fluxo permanece laminar até um valor crítico do número de Reynolds, usualmente da ordem de 10^5 ^[95]. Quando o número de Reynolds aumenta além do número crítico, o jato fica mais concentrado e menos estável, fragmentando e tornando-se turbulento. O número de Reynolds pode ser estimado pela equação^[96]:

$$N_{Re} = \frac{U_v a}{\nu} \quad (318)$$

sendo U_v , a velocidade do jato em cm s^{-1} .

Então, para um diâmetro do bocal da ponteira (a) da micropipeta igual a 0,035 cm e admitindo que a viscosidade cinemática do fluido (ν) que está sendo injetado é igual a da água ($10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) pode-se determinar o tipo de regime de escoamento do fluido da ponteira como função da velocidade do fluido injetado pela micropipeta eletrônica. A Tabela 3.3 apresenta o comportamento do fluxo nas condições de operação da micropipeta.

Tabela 3.3 Características do regime de fluxo para um jato expelido com a micropipeta Eppendorf modelo 4850. Consideração: o volume escoado é o mesmo de um cilindro ($\pi r^2 \ell$).

Vazão volumétrica da micropipeta (mL s^{-1})	Velocidade do jato (cm s^{-1})	Re	Regime de Fluxo
$0,60 \pm 0,01$	625	$2,2 \times 10^3$	Laminar
$0,86 \pm 0,01$	895	$3,1 \times 10^3$	Laminar
$0,95 \pm 0,02$	990	$3,5 \times 10^3$	Laminar

Tais resultados mostram que as equações deduzidas anteriormente por Gunasingham e Fleet sobre a camada hidrodinâmica e de difusão^[94] podem ser utilizadas no seu todo para o problema do BIA, uma vez que as mesmas assumem que o regime de fluxo é laminar.

Por outro lado, a agitação do líquido no tanque também está sujeito a diferentes regimes de fluxo. O comportamento de um fluido em um tanque agitado por um impulsor é dado pelo número de Reynolds do impulsor (Re_{imp})^[91]:

$$Re_{imp} = \frac{d^2 V_{rot} \rho}{\mu_{visc}} \quad (319)$$

onde d é o diâmetro do impulsor (m); ρ é a densidade do fluido ($g\ m^{-3}$), V_{rot} é a velocidade de rotação (rps) e μ_{visc} é a viscosidade ($g\ m^{-1}\ s^{-1}$).

O escoamento será turbulento quando Re_{imp} for maior que 10.000 e laminar quando menor que 10. Na faixa de transição, o escoamento é turbulento no impulsor e laminar nas partes mais afastadas^[91]. Admitindo que o diâmetro do impulsor é igual a 30,5 mm e, a densidade e a viscosidade da água a 25 °C são iguais a 0,99707 $g\ cm^{-3}$ e 0,8937 $mN\ s\ m^{-2}$, respectivamente, o comportamento do fluido do tanque como função da velocidade de agitação pode ser calculado. A Tabela 3.4 apresenta o comportamento do fluido agitado para a faixa de rotação do agitador, entre 100-800 rpm.

Tabela 3.4 Características do regime de fluxo para um fluido agitado no sistema BIA elaborado.

Velocidade de Agitação (rpm)	Velocidade de Agitação (rps)	Re_{imp}	Regime de Fluxo
100	1,66	1.730	Transição
200	3,33	3.460	Transição
300	5,00	5.189	Transição
400	6,66	6.919	Transição
500	8,33	8.649	Transição
600	10,00	10.378	Turbulento
700	11,66	12.108	Turbulento
800	13,33	13.839	Turbulento

Sendo assim, o regime de fluxo devido a injeção da amostra é laminar, sendo válidas as equações de Gunasingham e Fleet^[94] para a camada hidrodinâmica e de difusão. Em relação ao líquido sob agitação no sistema BIA, o regime é de transição na faixa de 100 a 600 rpm, isto é, turbulento no impulsor e laminar próximo ao eletrodo. Para velocidades de agitação maiores que 600 rpm o fluxo é turbulento no global.

3.1.4 Efeito do diâmetro do bocal do Injetor-Ponteira no Sistema BIA

A Fig. 3.14 mostra o efeito na variação máxima do sinal como função do diâmetro do bocal onde a amostra é injetada (Capítulo 5). Para diâmetros superiores a 0,10 cm ocorre uma diminuição no sinal em módulo. Considerando que a vazão volumétrica foi $0,95 \text{ mL s}^{-1}$, o diâmetro do eletrodo é igual a 0,60 cm e que o coeficiente de difusão para um sistema aquoso, desconsiderando o efeito da concentração do tampão, vale $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e a viscosidade cinemática da água (ν) $10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [94,96], pode-se estimar a espessura da camada hidrodinâmica (δ_H) e de difusão (δ_D) pelas Eq. 3.16 e 3.17, respectivamente, como função do diâmetro do bocal da ponteira da micropipeta (Fig. 3.15). Observa-se, que ocorre um aumento na espessura da camada de difusão e hidrodinâmica com o aumento do diâmetro do bocal da ponteira. Com o aumento da camada de difusão ocorre uma diminuição no gradiente de concentração na mesma (Eq. 2.36), daí ocorrer uma diminuição no sinal.

Cabe ressaltar, que o aumento do diâmetro do bocal provoca uma diminuição na velocidade do fluido injetado (vide Tabela 3.3), e esta é a causa indireta da diminuição da espessura da camada de difusão e conseqüentemente do sinal. Assim, é necessário uma velocidade ótima de injeção do fluido para que o comportamento do sistema BIA seja apropriado. Esta velocidade está em torno de 800 cm s^{-1} (Fig. 3.15b).

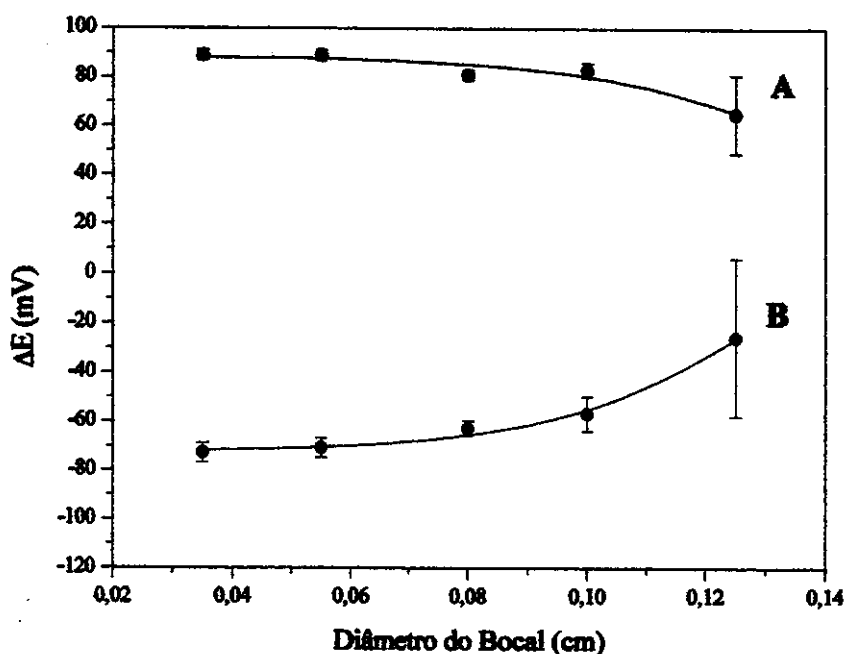


Fig. 3.14 Efeito do diâmetro do bocal da ponteira de injeção na resposta do sistema BIA-Potenciométrico. Velocidade de agitação: 400 rpm. Distância da ponteira da micropipeta ao detector: 2 mm. Volume de Injeção: 20 μL . pH: A. 4,00; B. 10,01.

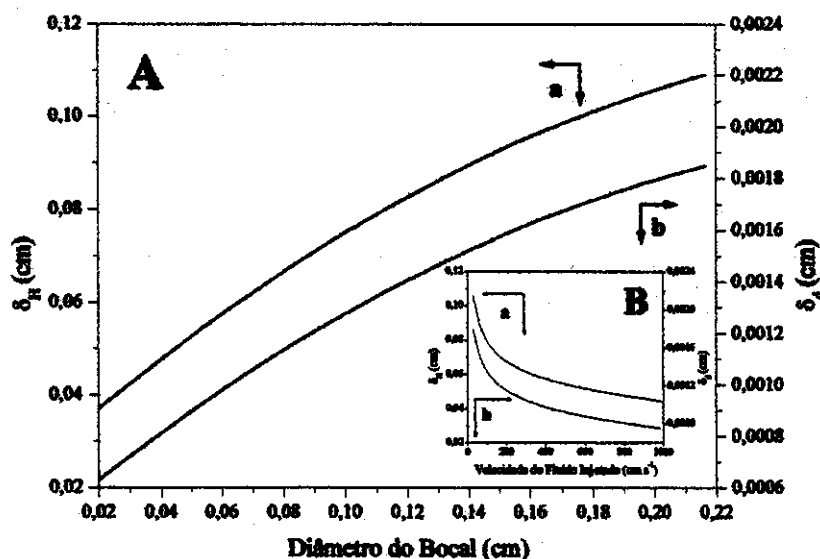


Fig. 3.15 Efeito do diâmetro do bocal da ponteira do injetor (A) e da velocidade do fluido injetado (B), na estimativa teórica da espessura da camada-limite: a. Hidrodinâmica; b. Difusão.

3.1.5 Efeito do Volume do Fluido Injetado no Sistema BIA

A Fig. 3.16 mostra o efeito do volume do fluido injetado, para uma solução padrão pH 4,00, no comportamento da resposta no BIA. O sinal aumenta linearmente na faixa de 5 a 20 μL permanecendo praticamente constante acima deste valor. Esta variação está diretamente relacionada com o número de espécies carregadas, no caso H^+ , que chegam a superfície do eletrodo de Pt para formar o duplo-capacitor. Estas espécies sob fluxo radial formam a camada de difusão e a hidrodinâmica, onde ocorre o gradiente de concentração e de velocidade, respectivamente. Assim, a partir do volume de 20 μL a quantidade de íons H^+ presente neste volume é suficiente para saturar a superfície da Pt, e então o potencial não varia mais com o volume injetado. Contudo, a resposta não é bem reproduzível na injeção de volumes abaixo de 20 μL , apresentando desvios relativos elevados. Isto pode ser explicado por distúrbios na camada de difusão, onde a diminuição do gradiente de concentração pelo volume injetado aumenta a mesma (Eq. 2.36), deixando esta mais suscetível as linhas de fluxo da solução sob agitação no tanque ou reator do BIA. Por outro lado, como pode ser observado na Fig 3.11, existe uma grande dependência com o ângulo de incidência do jato sobre a superfície e este pode ficar mais suscetível com a injeção de pequenos volumes. No entanto, o mesmo comportamento foi obtido quando foi injetada uma solução padrão pH 10,01. Então, a maior dispersão do sinal deve-se mesmo ao efeito da agitação do reator BIA.

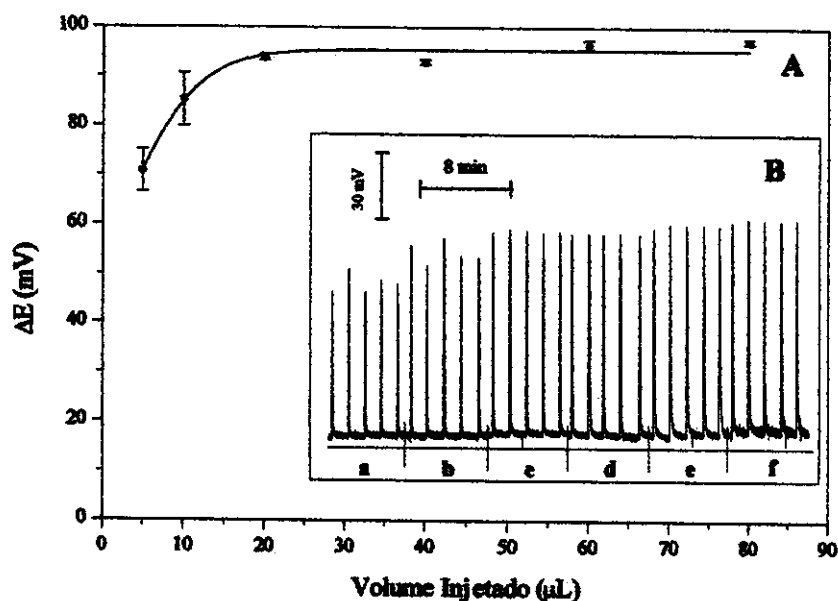


Fig. 3.16 A. Gráfico da variação máxima de potencial no BIA como efeito do volume injetado. B. Resposta obtida devido a injeção de a. 5 µL; b. 10 µL; c. 20 µL; d. 40 µL; e. 60 µL; f. 80 µL de solução tampão pH 4,00. Velocidade de agitação: 400 rpm. Distância da ponteira da micropipeta ao detector: 2 mm. Vazão volumétrica: 0,95 mL s⁻¹. Diâmetro do bocal da ponteira: 0,035 cm.

3.1.6 Efeito da Vazão Volumétrica da Micropipeta no Sistema BIA

A Fig. 3.17 mostra o efeito da vazão volumétrica do volume injetado na resposta do sistema BIA-potenciométrico, bem como o sinal obtido para injeção de tampão pH 4,00. Pode-se observar, que o sinal aumenta com o aumento da vazão volumétrica de injeção, permanecendo praticamente constante à partir de vazões volumétricas superiores a 0,86 mL s⁻¹. Considerando que o diâmetro (x) do eletrodo é igual a 0,60 cm e do bocal (a) da ponteira da micropipeta igual a 0,035 cm, e que para um sistema aquoso, desconsiderando o efeito da concentração do tampão, o coeficiente de difusão vale 10⁻⁵ cm² s⁻¹ [94,96] e a viscosidade cinemática da água (ν) 10⁻² cm² s⁻¹ [94,96], pode-se estimar a espessura da camada hidrodinâmica (δ_H) e de difusão (δ_d) pelas Eq. 3.16 e 3.17, respectivamente. A Fig. 3.18 apresenta um gráfico da estimativa da espessura das camadas hidrodinâmica e de difusão calculada a partir da faixa da vazão volumétrica de injeção, estudada com a micropipeta eletrônica Eppendorf (modelo 4850). Com a diminuição da vazão volumétrica de injeção, ocorre um aumento da espessura da camada de difusão, havendo uma diminuição no gradiente de concentração. Conseqüentemente, a menor resposta observada em uma vazão volumétrica de 0,60 mL s⁻¹, pode ser atribuída a menor quantidade de espécies iônicas (H⁺) interagindo com a superfície da Pt na formação

do duplo-capacitor. Por outro lado, foi observado experimentalmente que o sinal para vazões volumétricas superiores a $0,86 \text{ mL s}^{-1}$ não sofre grandes variações (Fig. 3.17B). Pela Fig. 3.18, observa-se que na mudança da vazão volumétrica de $0,95 \text{ mL s}^{-1}$ para $0,86 \text{ mL s}^{-1}$, a espessura da camada de difusão aumenta somente 8,1%. Contudo, a espessura da camada de difusão aumenta 24% em relação à diminuição da vazão volumétrica de $0,86 \text{ mL s}^{-1}$ para $0,60 \text{ mL s}^{-1}$. Curiosamente, o sinal médio para uma vazão volumétrica de $0,60 \text{ mL s}^{-1}$ reduz cerca de 31% em relação a de $0,86 \text{ mL s}^{-1}$, e esta última apenas 1,5% em relação à de $0,95 \text{ mL s}^{-1}$, mostrando que tal efeito é realmente devido ao aumento da espessura da camada de difusão. Assim, o aumento da camada hidrodinâmica, e conseqüentemente da camada de difusão, faz com que o sinal sofra uma maior influência da agitação do líquido do reator no sistema BIA, ocorrendo uma pior repetibilidade do sinal. Da mesma forma que anteriormente, resultados similares foram obtidos com a injeção de tampão pH 10,01.

Cabe lembrar que, da mesma forma que o diâmetro do bocal, a vazão volumétrica do fluido injetado, também altera a velocidade de injeção e assim, indiretamente ela é responsável pelo efeito causado no sinal (Tabela 3.3 e Fig. 3.15B).

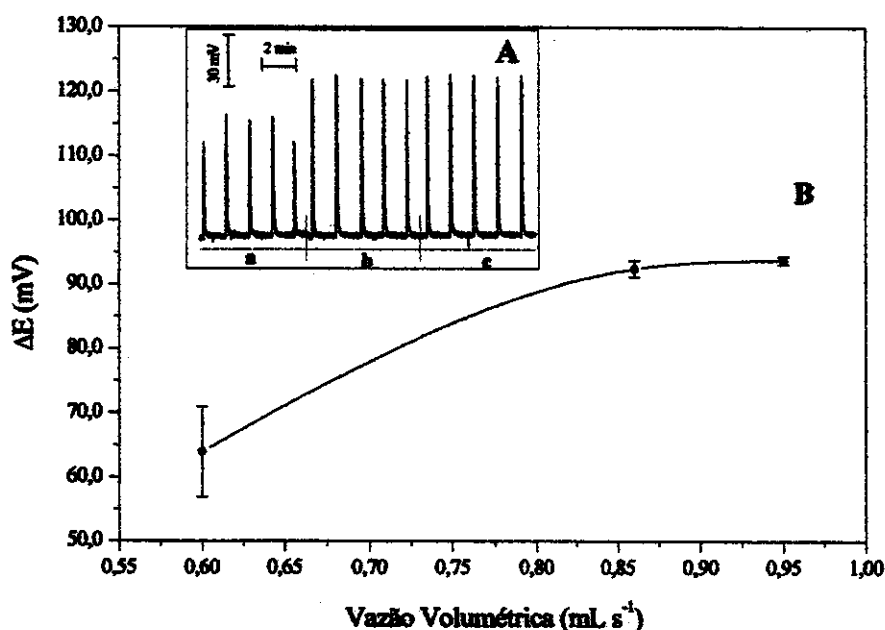


Fig. 3.17 A. Efeito da vazão volumétrica na resposta do sistema BIA-potenciométrico. a. $0,60 \text{ mL s}^{-1}$; b. $0,86 \text{ mL s}^{-1}$; c. $0,95 \text{ mL s}^{-1}$. Velocidade de agitação: 400 rpm; Distância da ponteira da micropipeta ao detector: 2 mm; Volume de Injeção: 20 μL . pH 4,00. Diâmetro do bocal da ponteira: 0,035 cm. B. Gráfico da vazão volumétrica da micropipeta Eppendorf (modelo 4850) como função da variação máxima do potencial.

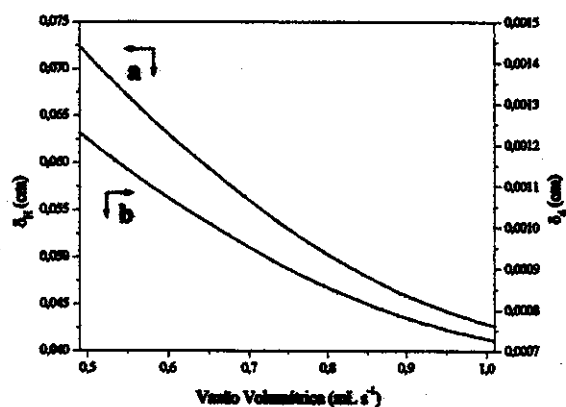


Fig. 3.18 Estimativa teórica da espessura da camada-limite, calculada a partir da vazão volumétrica do líquido injetado. a. Hidrodinâmica e b. Difusão.

3.1.7 Efeito da Velocidade de Agitação do Líquido no Sistema BIA

A Fig. 3.19 apresenta o comportamento do sinal obtido no sistema BIA-potenciométrico a partir de diferentes velocidades de agitação da solução carregadora no reator. Observa-se que a resposta do eletrodo de Pt para as variações de pH, é praticamente independente da velocidade do impulsor na faixa de 100 a 500 rpm, diminuindo gradualmente para velocidades de agitação superiores a 600 rpm, o que pode ser explicado pelo regime de fluxo turbulento da solução no tanque. Isto demonstra que a espessura da camada de difusão é pouco influenciada pela agitação, e então, o sinal é praticamente invariável (Fig. 3.19B). Por outro lado, o retorno do sinal à linha base é fortemente influenciado pela agitação, diminuindo o tempo com o aumento da velocidade de agitação (Fig. 3.19b). Isto indica que a retirada das espécies da superfície do eletrodo é facilitada pela força centrífuga gerada pelo movimento do fluido no tanque. Este mesmo comportamento, também foi observado para a injeção de solução tampão pH 10,01.

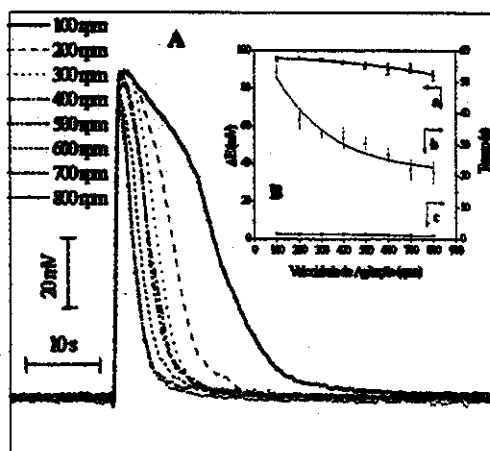


Fig. 3.19 A. Perfil do sinal no sistema BIA-potenciométrico para diferentes velocidades de agitação da solução do tanque. B. Gráfico obtido a partir da velocidade de agitação: a. Variação máxima de potencial; b. Tempo de lavagem; c. Tempo de resposta. Vazão volumétrica: 0,95 mL s⁻¹. Distância da ponteira da micropipeta ao detector: 2 mm. Volume de Injeção: 20 μL. pH: 4,00. Diâmetro do bocal da ponteira: 0,035 cm.

3.1.8 Efeito da Distância Injetor-Detector no Sistema BIA

O efeito da distância do bocal da ponteira da micropipeta à superfície do detector, segundo às equações deduzidas por Gunasingham e Fleet^[94], parece não ter influência sobre a espessura das camadas hidrodinâmicas e de difusão num sistema *wall-jet*. Contudo, os trabalhos sobre o sistema BIA têm demonstrado que este fator tem um efeito considerável sobre o sinal^[3,97,98]. A Fig. 3.20 mostra o perfil do sinal obtido variando a distância do eletrodo ao bocal de injeção e o gráfico da variação do sinal como função desta distância.

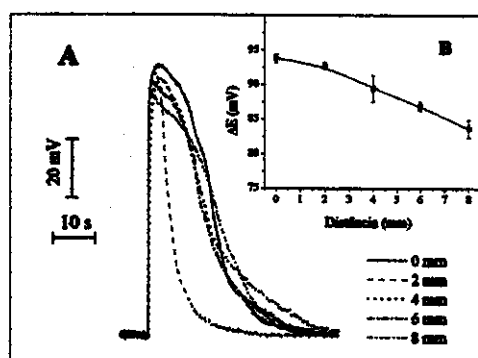


Fig. 3.20 A. Perfil do sinal no sistema BIA-potenciométrico para diferentes distâncias do bocal de injeção à superfície do detector. B. Gráfico da distância do injetor ao detector em função da variação máxima de potencial. Vazão volumétrica: $0,95 \text{ mL s}^{-1}$. Velocidade de agitação: 400 rpm. Volume de injeção: $20 \mu\text{L}$. pH: 4,00. Diâmetro do bocal da ponteira: $0,035 \text{ cm}$.

Observa-se que ocorre uma pequena diminuição na magnitude do sinal com o aumento da distância, conforme foi observado por Wang em seus trabalhos^[3,97,98]. Este efeito pode ser devido a influência da agitação sobre a amostra injetada, fragmentando o jato do fluido antes de atingir a superfície, além de aumentar a dispersão do mesmo. Contudo, Gunasingham tem demonstrado que este efeito não segue sempre este comportamento, sendo observado às vezes até um aumento no sinal^[99]. Ele atribui que tal comportamento é governado por uma série de fatores, como diâmetro do eletrodo, vazão volumétrica da solução, viscosidade da solução e a geometria do bocal de injeção. Um fato interessante que pode ser observado na Fig. 3.20, é o aumento no tempo de lavagem para distâncias superiores a 2 mm. Contudo, isto pode ser ocasionado pela “camisa” do eletrodo que serve como apoio para a micropipeta. Esta camisa apresenta um orifício de 1 cm de diâmetro que serve para facilitar a difusão da amostra para o reator BIA após o contato com o detector. O mesmo comportamento é observado quando a distância entre a ponteira-detector é “nula”, ou seja, a ponteira está encostada sobre a superfície do eletrodo. Tal efeito deve-se a influência do bloqueio mecânico do corpo da ponteira na superfície do detector. É importante ressaltar, que é útil “encamisar” o sensor, pois evita a dispersão da amostra injetada sob o efeito da agitação do tanque, melhorando a sensibilidade do detector. Este artifício tem sido utilizado em sistemas BIA com detecção termométrica^[98].

Assim, tudo isto indica que as equações deduzidas da camada de difusão e hidrodinâmica não estão incorretas, mas apresentam uma forte dependência com relação a este fator. Vários trabalhos realizados com o sistema BIA^[3,97,98] têm demonstrado que a distância ótima de separação entre a ponteira e a superfície do detector é 2 mm, o que foi observado também nestes ensaios. Assim, é mais lógico que tal fator seja fixado, o que vem sendo observado em trabalhos mais recentes sobre BIA^[76,98], onde esta separação está sendo mantida entre 1-3 mm para reatores BIA de 40 mL e 700 mL de capacidade.

3.1.9 Estudo dos Parâmetros do Sistema BIA por Planejamento Fatorial

A Tabela 3.5 apresenta os dados obtidos nos estudos por planejamento fatorial dos principais parâmetros que afetam a resposta no sistema BIA. Os níveis foram escolhidos de acordo com os estudos univariados procurando-se estudar a região onde eles variaram linearmente. Além dos fatores citados antes, foram estudados também, o efeito de alguns fatores físicos associados com a construção do reator ou cela BIA, tais como a distância do impulsor do agitador ao fundo do tanque e a utilização de chincanas presas na parede do reator para eliminação de vórtices. Os níveis escolhidos foram:

- A. Volume de injeção: (-) 15 μL e (+) 20 μL ;
- B. Distância do impulsor ao fundo do reator: (-) 25 mm e (+) 60 mm;
- C. Temperatura: (-) 30 °C e (+) 25 °C.
- D. Vazão volumétrica de injeção: (-) 0,86 mL s^{-1} e (+) 0,95 mL s^{-1} ;
- E. Velocidade de agitação: (-) 600 rpm e (+) 400 rpm;
- F. Distância ponteira-detector: (-) 2 mm e (+) 1 mm;
- G. Chincanas: (-) com e (+) sem;

O planejamento fatorial foi fracionado para serem realizados apenas oito experimentos. Ele foi construído segundo o método^[100]:

- Oito experimentos foram planejados segundo o bloco (2^{7-4}), escrevendo um planejamento fatorial completo para três variáveis A, B e C (2^3). As variáveis restantes, D, E, F e G, foram associadas, respectivamente, com todas as interações possíveis dos três primeiros fatores, isto é, +AB, +AC, +BC e +ABC;

O planejamento final foi analisado segundo o módulo das variações dos sinais em função do pH, 4,00 e do tempo de lavagem. A Tabela 3.6 apresenta a análise dos efeitos principais, sendo negligenciado possíveis interações de ordem superior, uma vez que tais efeitos se confundem com o principal.

Tabela 3.5 Resposta obtida no sistema BIA nos estudos por planejamento fatorial.

Nº	A	B	C	D	E	F	G	Resposta Média e Estimativa do desvio padrão*	
								$ \Delta E_{max} $ (mV)	TL (s)
1	-	-	-	+	+	+	-	(88,0±3,0)	(157,0±3,0)
2	+	-	-	-	-	+	+	(78,0±4,0)	(112,0±3,0)
3	-	+	-	-	+	-	+	(45,9±0,8)	(30,9±0,4)
4	+	+	-	+	-	-	-	(57,0±3)	(28,0±3,0)
5	-	-	+	+	-	-	+	(75,0±2,0)	(66,0±3,0)
6	+	-	+	-	+	-	-	(92,0±0,8)	(212,0±7,0)
7	-	+	+	-	-	+	-	(48,0±2,0)	(44,7±0,9)
8	+	+	+	+	+	+	+	(60,0±1,0)	(75,0±2,0)

* Média de três sinais injetados seqüencialmente.

TL, Tempo de Lavagem das espécies da superfície do sensor.

Tabela 3.6 Análise dos efeitos principais e de interação entre os parâmetros estudados no sistema BIA para a solução tampão pH 4,00.

Fator	Efeito Principal e Estimativa do Erro Padrão (EP)	
	ΔE_{max} (mV)	TL (s)
Volume de Injeção	(7,5±1,2)	(32±5)
Velocidade de Agitação	(7,0±1,2)	(56±5)
Distância Ponteira-Detector	(1,0±1,2)	(13±5)
Vazão Volumétrica de Injeção	(4,0±1,2)	-(19±5)
Chincanas	-(6,5±1,2)	-(39±5)
Distância do Impulsor ao Fundo do Reator	-(30,5±1,2)	-(92±5)
Temperatura	(1,5±1,2)	(18±5)

$ep = \sqrt{V(efeito)}$, onde a variância, $V(efeito) = (4/N)s^2$; N é o número de experimentos realizados, contando as replicatas (no caso N=24) e s, a estimativa do desvio padrão; $s^2 = \left(\nu_1 s_1^2 + \dots + \nu_g s_g^2 \right) / \left(\nu_1 + \dots + \nu_g \right)^{-1}$, onde ν_g são os graus de liberdade, sendo igual ao número de replicatas (n_g) - 1.

Para avaliar se os efeitos calculados são significativamente diferentes de zero, o teste $t_{Student}$ foi empregado^[10]. Para um nível de confiança de 99% o valor de t para 16 graus de liberdade é 2,921. Então, só será considerado estatisticamente significativo o efeito na magnitude do sinal cujo valor

absoluto for superior a 3,5 mV ($0+2,921 \times 1,2$) para as variações de sinal, e 15 s ($0+2,921 \times 5$) para o tempo de lavagem. Os efeitos significativos aumentam de intensidade seguindo a ordem: distância do impulsor ao fundo do reator > volume de injeção > velocidade de agitação > chincanas. Para a variação na distância do impulsor, quando esta é alterada para mais próxima do eletrodo (nível, +) ocorre uma diminuição no sinal na ordem de 30 mV e o tempo de lavagem diminui em 92 s em relação ao impulsor próximo do fundo do tanque (nível, -). Isto deve-se ao efeito mais intenso da força centrífuga provocado pela agitação quando o impulsor está perto do detector. Em relação ao volume de injeção e a velocidade de agitação os resultados eram os esperados e estão de acordo com os estudos univariados. No caso, o sinal aumenta em 7,5 mV, com o aumento do volume de injeção de 15 para 20 μL , e diminui em cerca de 7,0 mV, com o aumento da rotação do agitador de 400 para 600 rpm. Contudo, de todos os efeitos significativos observados o efeito das chincanas é o mais interessante. Na presença das chincanas, o sinal foi cerca de 6,5 mV maior que na sua ausência. Isto pode ser atribuído à formação de vórtices na ausência das chincanas, contribuindo para turbulência do líquido no reator, com conseqüente aumento na camada de difusão. Fazendo os mesmos estudos com tampão pH 10,01, observou-se um comportamento similar. Algumas pequenas anomalias foram observadas, porém podem ser atribuídas à diferente forma de interação entre os íons H^+ (pH 4,00) e OH^- (pH 10,01) na superfície da Pt, para o efeito na magnitude do sinal, ou as diferentes velocidades de difusão, no caso relacionado ao tempo de lavagem.

Assim, com base nos estudos realizados algumas considerações importantes podem ser ressaltadas sobre o efeito de alguns parâmetros na resposta do sistema BIA. A distância do impulsor ao fundo do tanque é fundamental e deve ser controlada no nível mais baixo. As chincanas também causam uma influência considerável na resposta do BIA, devendo ser utilizadas para eliminação de vórtices. A distância da ponteira ao detector deve ser mantida em torno de 2 mm e a vazão volumétrica de injeção da amostra tem de ser superior a 0,85 mL s^{-1} , quando o diâmetro do bocal do injetor é próximo de 0,04 cm. Qualquer fator que modifique a espessura da camada hidrodinâmica ou de difusão deve ser bem controlado, para não causar dispersão no sinal. Fixando estes parâmetros, a resposta do sistema BIA-potenciométrico será somente dependente do volume de injeção e da concentração da amostra, além da velocidade de agitação do tanque.

3.2 Comparação entre FIA e BIA

Com o objetivo de avaliar o sistema BIA elaborado, procurou-se utilizá-lo com o ISE-Ascorbato baseado em EVA dopado com Cu^{2+} . A título de comparação montou-se também um sistema FIA para determinação de ácido ascórbico com o mesmo sensor desenvolvido (Capítulo 5).

Uma deficiência do sensor baseado em EVA/ Cu^{2+} para ácido ascórbico é o tempo necessário para regeneração do eletrodo quando usa-se o oxigênio dissolvido da solução. Técnicas cinéticas de análise

podem superar este problema, pois possibilitam a utilização de oxidantes mais fortes, como peróxido de hidrogênio no transportador, permitindo que o eletrodo seja regenerado mais rapidamente.

Desde que os sistemas FIA já estão bem estabelecidos, procurou-se utilizar esta técnica inicialmente, para otimizar os parâmetros de análise para determinação de ácido ascórbico com o sensor EVA/Cu²⁺.

3.2.1 Otimização e Avaliação dos sistemas FIA e BIA

Uma linha carregadora contendo somente tampão produz um sinal com longo tempo de regeneração, como pode ser visto na Fig. 3.21A (a). Isto é explicado pela pequena quantidade de oxigênio dissolvido na linha carregadora, assim, o tempo requerido para regenerar o eletrodo é alto, o que não é apreciável em FIA. Então, para melhorar o tempo de regeneração do eletrodo, sem um significativo decréscimo no sinal, um oxidante mais forte foi testado. Assim, utilizou-se peróxido de hidrogênio misturado ao tampão para melhorar a relação entre o sinal e o tempo de regeneração, sendo verificado que a concentração ótima de peróxido de hidrogênio foi 0,1 mol L⁻¹ (Fig. 3.21B). Para um aumento na concentração de peróxido de hidrogênio acima de 0,1 mol L⁻¹ o tempo de regeneração diminui, porém ocorre também um decréscimo proporcional no sinal devido à uma maior decomposição do ácido ascórbico pelo oxidante.

De modo geral, similar ao que ocorre em estado estacionário, o eletrodo tubular proposto para ascorbato baseado em EVA/Cu²⁺ trabalha em acordo com as Eq. 2.58 e 2.59, sendo a restauração do mesmo dada pela seguinte equação^[162]:



A influência do volume do fluido injetado e da vazão sobre o sinal potenciométrico é mostrado na Fig. 3.22. O sinal aumenta com o volume de injeção e tende a ser constante para um volume injetado maior que 100 µL, indicando a saturação dos íons cobre pelo íon monoascorbato na superfície do sensor. A vazão causa uma influência significativa no sinal, aumentando o mesmo até 2,2 ml min⁻¹ e decrescendo consideravelmente para fluxos maiores. Isto ocorre porque a velocidade de oxidação do íon monoascorbato catalisada pelo os íons Cu²⁺ é reduzida. Então, a melhor condição para obter boa sensibilidade, proporcionando alta frequência analítica, é utilizar uma vazão de 2,2 ml min⁻¹ e um volume de injeção de 50 µL. O tempo de resposta e o tempo de regeneração nestas condições foram 4,3 s e 15,0 s, respectivamente.

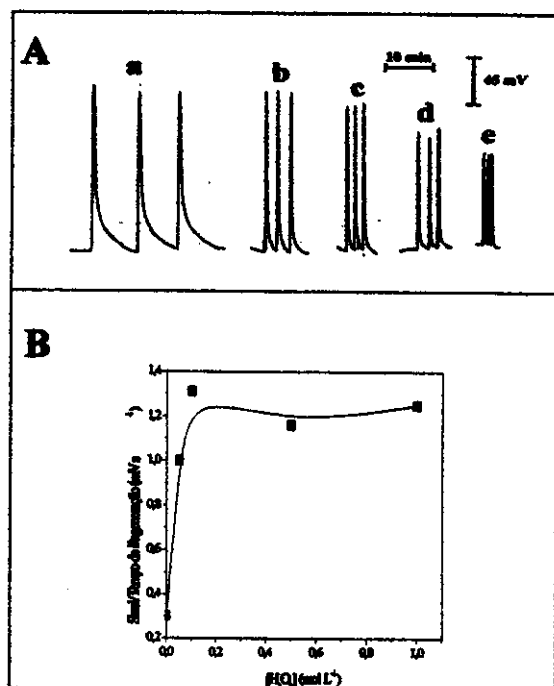
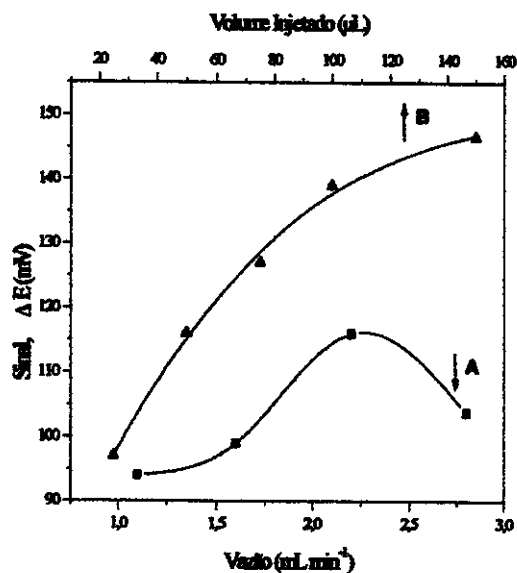


Fig. 3.21 Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio no sinal e no tempo de regeneração do eletrodo no FIA. Volume de injeção: 50 μ L de 0,1 mol L⁻¹ de ácido ascórbico. Vazão: 2,2 mL min⁻¹. A. Sinal obtido para diferentes concentrações de H_2O_2 , mol L⁻¹: a. Sem; b. 0,05; c. 0,1; d. 0,5; e. 1,0. B. Representação gráfica.

Fig. 3.22 Influência do volume injetado e da vazão no sinal do sistema FIA-potenciométrico para ácido ascórbico usando eletrodo tubular baseado em membrana de EVA/ Cu^{2+} . Concentração de ácido ascórbico: $3,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. Efeito: A. Vazão da bomba peristáltica (volume injetado: 50 μ L); B. Volume de amostra injetado (vazão: 2,2 mL min⁻¹).



O desempenho do sistema FIA é apresentado na Fig. 3.23. Ela mostra os sinais das soluções padrões para obter a curva calibração para ácido ascórbico com o sistema FIA-potenciométrico proposto. O sensor apresentou um comportamento super-nernstiano na faixa de concentração entre $1,0 \times 10^{-3}$ e $1,0 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ para ácido ascórbico, com um limite de detecção de $8,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ nas

condições otimizadas (Fig. 3.24). O comportamento super-nernstiano pode ser explicado pelo efeito de memória devido a adsorção do ácido ascórbico na membrana. A equação que descreve o desempenho analítico do sensor é dada por:

$$\Delta E = -(212 \pm 6) + (69 \pm 3)p[\text{Ácido Ascórbico}] \quad (321)$$

onde, $r = 0,997$; EDPR = 4,96; $N = 5$.

O sistema permite uma frequência analítica de cerca de 120 amostras por hora com uma precisão de 3,6% (estimativa do desvio padrão relativo para uma repetibilidade de 15 injeções).

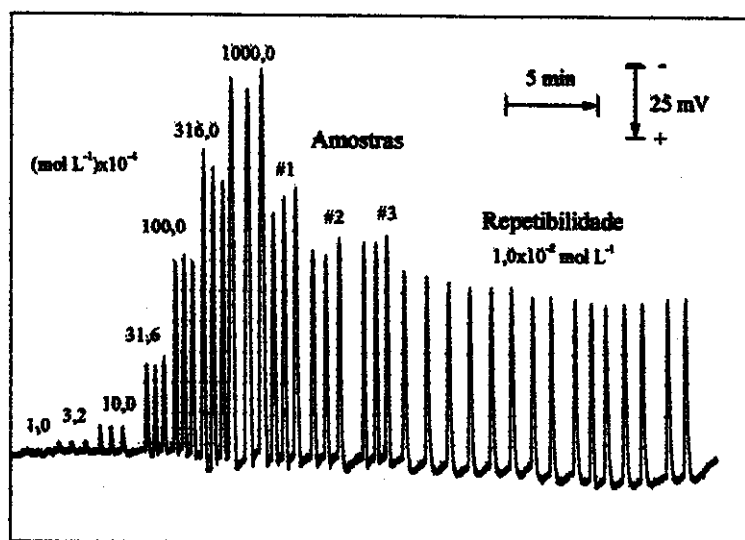


Fig. 3.23 Diagrama mostrando o sinal típico obtido com o sistema FIA-potenciométrico proposto para determinação de ácido ascórbico usando eletrodo tubular baseado em membrana de EVA/Cu²⁺.

Na otimização do sistema BIA para ácido ascórbico, usando o eletrodo potenciométrico baseado em membrana EVA/Cu²⁺, a concentração ótima para a regeneração do eletrodo com peróxido de hidrogênio também foi como em FIA, 0,1 mol L⁻¹ (Fig. 3.25). Contudo, os resultados não foram similares entre os sistemas. No BIA, o sinal permaneceu praticamente constante não sofrendo influência da concentração de peróxido de hidrogênio como no FIA (Fig. 3.25B). Isto indica que o efeito *wall-jet* é muito mais rápido que a decomposição do ácido ascórbico pela água oxigenada do meio. O sistema BIA-potenciométrico para ácido ascórbico permite uma frequência analítica de 9 amostras por hora (Fig. 3.25A), a qual é bastante inferior ao do sistema FIA. Isto pode ser explicado pelo fluxo contínuo utilizado no sistema FIA, que permite uma melhor interação do peróxido de

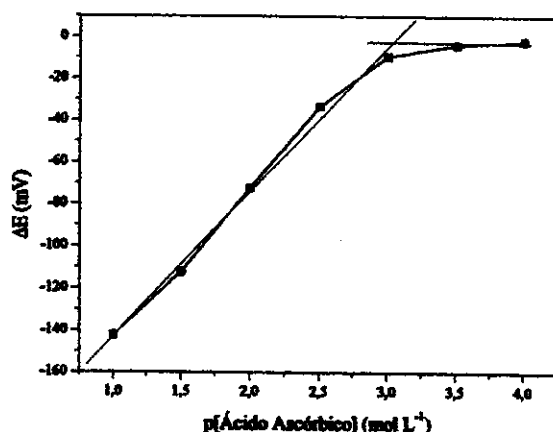


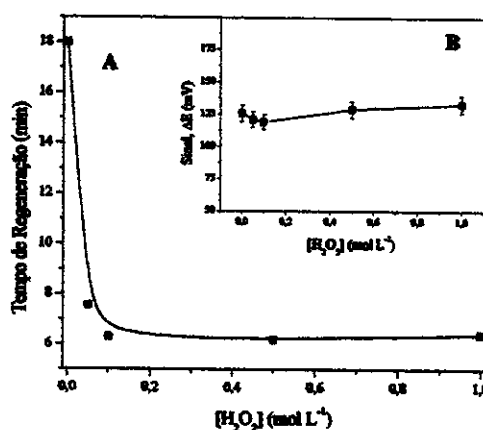
Fig. 3.24 Curva de calibração para ácido ascórbico com o sistema FIA-potenciométrico usando eletrodo tubular baseado em membrana de EVA/Cu²⁺.

hidrogênio com a superfície do sensor, além do mesmo estar sendo continuamente renovado, o que não ocorre no BIA. Contudo, vale lembrar que a frequência analítica no sistema BIA foi superior ao do eletrodo em estado estacionário.

A influência do volume de injeção sobre o sinal potenciométrico no BIA é mostrado na Fig. 3.26. O sinal aumenta com o volume de injeção e tende a ser constante para um volume injetado superior a 50 μL .

A velocidade de agitação do sistema BIA foi estudada na faixa de 300 a 600 rpm, e não influenciou significativamente a resposta, nem o tempo de restauração do sensor (Fig. 3.27).

Fig. 3.25 Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio no tempo de regeneração (A) e no sinal (B) do ISE-Ascorbato com o sistema BIA. Volume de injeção: 50 μL de 0,1 mol L⁻¹ de ácido ascórbico. Velocidade de agitação: 400 rpm. Distância ponteira-detector: 2 mm; Vazão volumétrica da micropipeta: 0,95 mL s⁻¹; Diâmetro do bocal da ponteira: 0,035 cm.



As melhores condições de análise foram obtidas com um volume de injeção de 50 μL , utilizando como solução no reator, tampão fosfato (pH 5,0) contendo peróxido de hidrogênio, ambos na concentração de 0,1 mol L⁻¹. A velocidade de agitação da solução do reator foi 400 rpm.

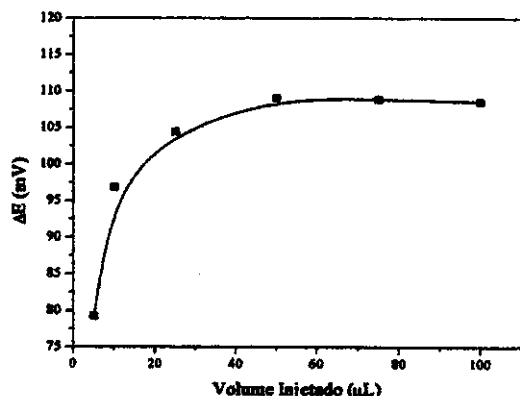


Fig. 3.26 Influência do volume de injeção no sinal do sistema BIA-potenciométrico usando ISE baseado em membrana de EVA/Cu²⁺. Concentração de ácido ascórbico: $3,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. Velocidade de agitação: 400 rpm; Distância ponteira-detector: 2 mm; Vazão volumétrica da micropipeta: 0,95 mL s⁻¹; Diâmetro do bocal da ponteira: 0,035 cm.

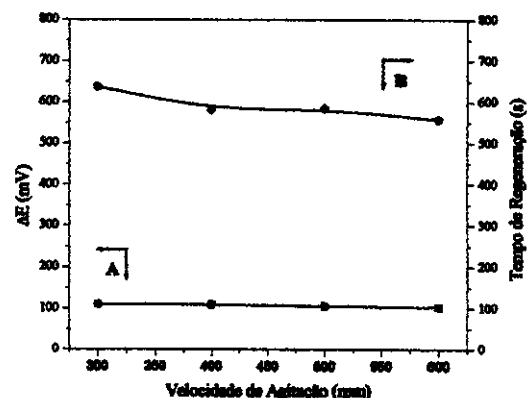


Fig. 3.27 Influência da velocidade de agitação do sistema BIA-potenciométrico no sinal (A) e no tempo de regeneração (B) do ISE-Ascorbato baseado em membrana de EVA/Cu²⁺. Concentração de ácido ascórbico: $3,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹. Volume de injeção: 50 μL; Distância ponteira-detector: 2 mm; Vazão volumétrica da micropipeta: 0,95 mL s⁻¹; Diâmetro do bocal da ponteira: 0,035 cm.

A Fig. 3.28 mostra os sinais das soluções padrão, para obter a curva calibração para ácido ascórbico com o sistema BIA-potenciométrico usando o sensor EVA/Cu²⁺. O ISE-Ascorbato respondeu nernstianamente (59 mV por década) no sistema BIA na faixa de concentração de $3,2 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, sendo o limite de detecção de $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Fig. 3.29). O tempo de resposta do sensor no BIA foi de 10 a 15 s e a estimativa do desvio padrão para 15 repetições no sistema foi 2,7%.

A equação que descreve o desempenho analítico do sensor no BIA é dada por:

$$\Delta E = -(225 \pm 1) + (58,5 \pm 0,4)p[\text{Ácido Ascórbico}] \quad (3.22)$$

onde, $r = 0.99997$; EDPR = 0,46; N = 6.

Comparando os dois sistemas dinâmico de análise, o sistema FIA apresentou um melhor resultado, pois permite uma frequência analítica superior ao do BIA. Contudo, o consumo do tampão/H₂O₂ no sistema BIA é bem inferior ao do FIA, além dele apresentar menor limite de detecção (Tabela 3.7). Assim, não se pode afirmar se um sistema supera o outro. Em princípio, o sistema FIA parece mais vantajoso de imediato e pronto para ser aplicado como metodologia analítica para determinação de ácido ascórbico usando o eletrodo potenciométrico baseado em EVA dopado com íons Cu²⁺. No caso do BIA, mais estudos devem ser realizados de modo a melhorar a frequência analítica do sistema. Possivelmente, outros métodos para restaurar o sensor EVA/Cu²⁺ ou mesmo um melhor planejamento

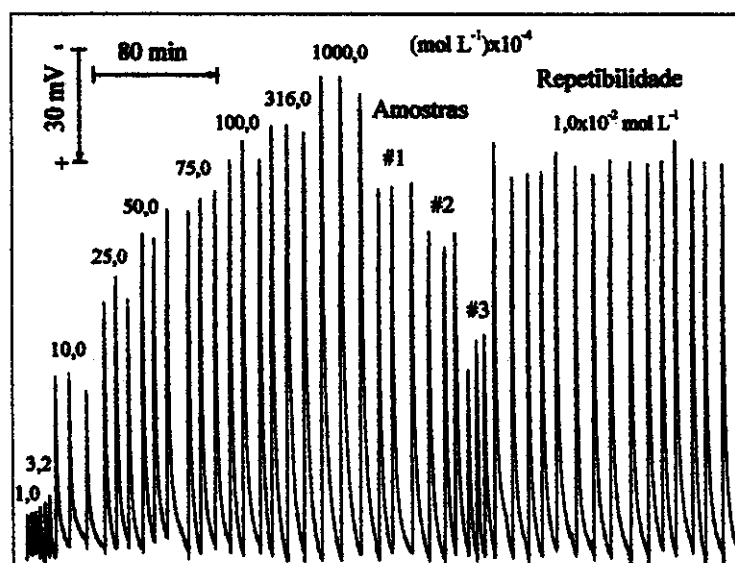


Fig. 3.28 Diagrama obtido com a injeção de ácido ascórbico no sistema BIA-potenciométrico, usando o sensor baseado em membrana de EVA/Cu²⁺. Volume de injeção: 50 μ L; Velocidade de agitação: 400 rpm; Distância ponteira-detector: 2 mm; Vazão volumétrica da micropipeta: 0,95 mL s⁻¹; Diâmetro do bocal da ponteira: 0,035 cm.

do sistema de injeção do BIA pode fazer com que o mesmo supere seu similar FIA. Vale ressaltar, que como o sinal no BIA é maior que o do sistema FIA para uma mesma concentração de amostra, um menor volume de injeção poderia ser utilizado no BIA. Isto provocaria um aumento na frequência de análise, pois menos tempo seria necessário para regenerar o eletrodo.

Fig. 3.29 Curva de calibração para ácido ascórbico com o sistema BIA-potenciométrico usando o sensor baseado em membrana de EVA/Cu²⁺.

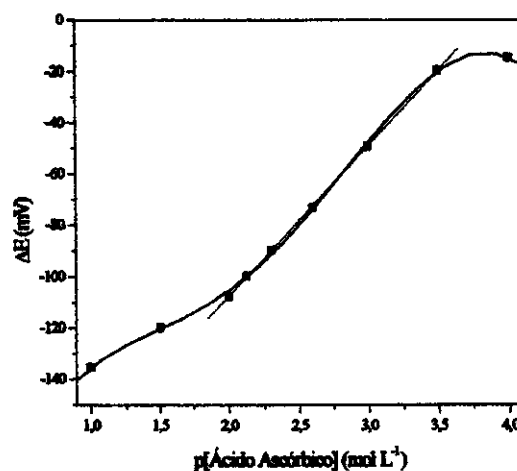


Tabela 3.7 Características de desempenho entre FIA e BIA na determinação de ácido ascórbico usando o ISE-Ascorbato baseado em EVA dopado com íons Cu^{2+} .

<i>Características</i>	<i>FIA</i>	<i>BIA</i>
Frequência de Análise (Amostras h^{-1})	120	9
Volume de Amostra (μL)	50	50
Faixa de Linearidade (mol L^{-1})	$1,0 \times 10^{-3} - 1,0 \times 10^{-1}$	$3,2 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-2}$
Limite de Detecção (mol L^{-1})	$8,5 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$
Repetibilidade (EDP%)	3,6	2,7

Os dois sistemas propostos (FIA e BIA) foram utilizados na determinação de ácido ascórbico em amostras farmacêuticas de vitamina C usando o eletrodo baseado em membrana de EVA/ Cu^{2+} . Os resultados apresentaram boa concordância com o método da Farmacopéia Britânica^[163], mostrando a aplicabilidade do eletrodo potenciométrico desenvolvido associado a técnicas dinâmicas de análise (Tabela 3.8).

Tabela 3.8 Resultados obtidos na determinação de ácido ascórbico em amostras farmacêuticas.

Amostra	Valor Nominal	Farmacopéia	Estado Estacionário	FIA	BIA
#1	1 g/Comprimido	$1,032 \pm 0,004$	$1,1 \pm 0,2$	$1,02 \pm 0,05$	$1,17 \pm 0,03^*$
#2	1 g/10 g de fármaco	$1,01 \pm 0,01$	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,03 \pm 0,04$
#3	0,24g/Comprimido	$0,23 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,02$

Contém também:

#1 - 1 g de sacarose; #2 - 3,8 g de sacarose e 5 g de glicose; #3 - 0,40 g de ácido acetilsalicílico.

*Estimativa do desvio padrão para três determinações.

É interessante observar que a associação do sensor desenvolvido para ácido ascórbico (EVA/ Cu^{2+}) com técnicas dinâmicas de análise (FIA ou BIA), fez com que o problema relativo ao tempo de restauração da membrana em estado estacionário fosse superado, além de melhorar a precisão das análises.

Referências

- [1] RŮŽIČKA, J.; HANSEN, E. H.; "Flow Injection Analysis. Part I. A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis", *Anal. Chim. Acta* 78, 145, 1975.

- [2] RŮŽIČKA, J.; MARSHALL, G. D.; "Sequential Injection: A New Concept for Chemical Sensors, Process Analysis and Laboratory Assays", *Anal. Chim. Acta* 237, 329, 1990.
- [3] WANG, J.; TAHA, Z.; "Batch Injection Analysis", *Anal. Chem.* 63, 1053, 1991.
- [4] PARDUE, H. L.; TOWNSHEND, A.; VAN DER LINDEN, W. E.; WORSFOLD, P. J.; Special Issue: Flow Analysis (FIA 7), Piracicaba, Brazil, August 25-28, 1997. *Anal. Chim. Acta* 366, 1998.
- [5] PARDUE, H. L.; TOWNSHEND, A.; CLERC, J. T.; VAN DER LINDEN, W. E.; WORSFOLD, P. J.; Special Issue: Papers presented at the Sixth International Conference on Flow Analysis, Toledo, Spain, June 8-11, 1994. *Anal. Chim. Acta* 303, 1995.
- [6] PARDUE, H. L.; TOWNSHEND, A.; CLERC, J. T.; VAN DER LINDEN, W. E.; WORSFOLD, P. J.; Special Issue: Papers presented at the Fifth International Conference on Flow Analysis, Kumamoto, Japan, August 21-24, 1991. *Anal. Chim. Acta* 261, 1992.
- [7] PARDUE, H. L.; TOWNSHEND, A.; CLERC, J. T.; VAN DER LINDEN, W. E.; Special Issue: Proceedings of the First International Symposium on detection in Liquid Chromatography and Flow Injection Analysis, Córdoba, Spain, September 19-21, 1989. *Anal. Chim. Acta* 234, 1990.
- [8] MacDONALD, A. M. G.; PARDUE, H. L.; TOWNSHEND, A.; CLERC, J. T.; VAN DER LINDEN, W. E.; Special Issue: Proceedings of the 4th International Conference on Flow Analysis, Las Vegas, NV, USA, April 17-20, 1988. *Anal. Chim. Acta* 214, 1988.
- [9] MacDONALD, A. M. G.; PARDUE, H. L.; TOWNSHEND, A.; CLERC, J. T.; Special Issue: Flow Analysis III, Proceedings of the International Conference held in Birmingham, Great Britain, 5-8th, September 1985. *Anal. Chim. Acta* 179, 1986.
- [10] MacDONALD, A. M. G.; PARDUE, H. L.; TOWNSHEND, A.; CLERC, J. T.; Special Issue: Flow Analysis II, Proceedings of a Conference held in Lund, Sweden, June 18-21, 1982. *Anal. Chim. Acta* 145, 1983.
- [11] MacDONALD, A. M. G.; PARDUE, H. L.; Special Issue: Flow Analysis, Proceedings of a Conference held in Amsterdam, September 11-13, 1979. *Anal. Chim. Acta* 114, 1980.
- [12] SNEDDON, J.; Special Issue: Present and Future of Flow-Injection Analysis, *Microchemical J.* 45, 1992.
- [13] HASWELL, S. J.; "Development and Operating Characteristics of Micro Flow Injection Analysis Systems based on Electroosmotic Flow - A Review", *Analyst* 122, R1-R10, 1997.
- [14] CAMPANELLA, L.; PYRZYNSKA, K.; TROJANOWICZ, M.; Chemical Speciation by Flow-Injection Analysis - A Review, *Talanta* 43, 825-838, 1996.
- [15] FERNANDEZ, J. M. L.; RIOS, A.; "Assessment of Quality of Flow Injection Methods used in Food Analysis - A Review", *Analyst* 120, 2393-2400, 1995.
- [16] KUBAN, V.; "Continuous Precipitation Techniques in Flow Injection Analysis A Review", *Fresenius J. Anal. Chem.* 346, 873-881, 1993.
- [17] TROJANOWICZ, M.; SZPUNARLOBINSKA, J.; "Solvent Extraction in Flow Injection Analysis - A Review", *Chemia Anal.* 37, 517-536, 1992.
- [18] PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A.; ATIENZA, J.; HERRERO, M. A.; "State of the Art in on-line Techniques coupled to Flow Injection Analysis FIA/ON-LINE - Critical Review", *J. Autom. Chem.* 12, 163-173, 1990.
- [19] VANSTADEN, J. F.; "Flow Injection Analysis of Substances in Water. 2. Cations - A Critical Review", *Water SA* 15, 153-168, 1989.
- [20] RŮŽIČKA, J.; HANSEN, E. H.; Flow Injection Analysis, John Wiley & Sons, New York, 2nd edition, 1988.
- [21] VALCÁRCCEL, M.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; Flow Injection Analysis - Principles and Applications, Horwood, Chichester, 1987.

- [22] MOLLER, J.; Flow Injection Analysis, Springer, Berlin, Heidelberg, 1988.
- [23] BURGUERA, J. L. (Ed.); Flow Injection Atomic Spectroscopy, Dekker, New York, 1989.
- [24] BETTERIDGE, D.; CHENG, W. C.; DAGLESS, E. L.; DAVID, P.; GOAD, T. B.; DEANS, D. R.; NEWTON, D. A.; PIERCE, T. B.; "An Automated Viscometer Based on High-Precision Flow Injection Analysis. Part I. Apparatus for High-precision Flow Injection Analysis", *Analyst* **108**, 1-16, 1983.
- [25] BETTERIDGE, D.; CHENG, W. C.; DAGLESS, E. L.; DAVID, P.; GOAD, T. B.; DEANS, D. R.; NEWTON, D. A.; PIERCE, T. B.; "An Automated Viscometer Based on High-Precision Flow Injection Analysis. Part II. Measurement of Viscosity and Diffusion-Coefficients", *Analyst* **108**, 17-32, 1983.
- [26] IVASKA, A.; RŮŽICKA, J.; "From Flow Injection to Sequential Injection: Comparison of Methodologies and Selection of Liquids Drives", *Analyst* **118**, 885-889, 1993.
- [27] WANG, J.; RAYSON, G. D.; TAHA, Z.; "Batch injection Analysis using Fiber-Optic Fluorometric Detection", *Applied Spectroscopy* **46**, 107-110, 1992.
- [28] WANG, J.; ANGNES, L.; "Batch Injection Spectroscopy", *Anal. Letters* **26**, 2329-2339, 1993.
- [29] ROVER JR, L.; NETO, G. O.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; LIMA, J. L. F. C.; SILVA, V. L.; "Potentiometric System by FIA with Reactor Based on Natural Urease Source and Tubular Detector of Ammonium Ions. Determination of Urea in Fertilizers", *Anal. Sci.* **13**, 589-594, 1997.
- [30] FERNANDES, S. M. V.; RANGEL, A. O. S. S.; LIMA, J. L. F. C.; "Flow Injection determination of Sodium Potassium, Calcium and Magnesium in Beer by Flame Emission and Atomic Absorption Spectrometry", *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1269-1272, 1997.
- [31] ARJONA, A. V.; DE CASTRO, M. D. L.; "A Robotic-Flow Injection Approach to the Fully Automated Determination of Starch in Food", *Anal. Chim. Acta* **333**, 205-213, 1996.
- [32] FERRE, J.; BOQUE, R.; FERNANDEZ BAND, B.; LARRECHI, M. S.; "Figures of Merit in Multivariate Calibration. Determination of Four Pesticides in Water by Flow Injection Analysis and Spectrophotometric Detection", *Anal. Chim. Acta* **348**, 167-175, 1997.
- [33] BLOXHAM, M. J.; HILL, S. J.; WORSFOLD, P. J.; "Determination of Mercury in Filtered Sea-Water by Flow Injection with On-Line Oxidation and Atomic Fluorescence Spectrometric Detection", *J. Anal. Atomic Spectrometry* **11**, 511-514, 1996.
- [34] ZHOU, Y. X.; ZHU, G. Y.; "Rapid Automated In-Situ Monitoring of Total Dissolved Iron and Total Dissolved Manganese in Underground Water by Reverse-Flow Injection with Chemiluminescence Detection During the Process of Water Treatment", *Talanta* **44**, 2041-2049, 1997.
- [35] AOKI, T.; FUKUDA, S.; HOSOI, Y.; MUKAI, H.; "Rapid Flow Injection Analysis Method for Successive Determination of Ammonia, Nitrite and Nitrate in Water by Gas-Phase Chemiluminescence", *Anal. Chim. Acta* **349**, 11-16, 1997.
- [36] DUKASZEWSKI, Z.; ZEMBRZUSKI, W.; PIELA, A.; "Direct Determination of Ultratracess of Thallium in Water by Flow-Injection-Differential-Pulse Anodic Stripping Voltammetry", *Anal. Chim. Acta* **318**, 159-165, 1996.
- [37] ALDSTADT, J. H.; OLSON, D. C.; MARTIN, A. F.; "Determination of Volatile Arsenicals in Ambient Air by Flow Injection", *Anal. Chim. Acta* **338**, 215-222, 1997.
- [38] WILLIE, S. N.; "First Order Speciation of As Using Flow Injection Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry with In-Situ Trapping of the Arsine in a Graphite Furnace", *Spectrochim. Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **51**, 1781-1790, 1996.
- [39] CUESTA, A.; TODOLI, J. L.; CANALS, A.; "Flow Injection Method for the Rapid Determination of

- Chemical Oxygen Demand Based on Microwave Digestion and Chromium Speciation in Flame Atomic Absorption Spectrometry", *Spectrochim. Acta Part B- Atomic Spectroscopy* **51**, 1791-1800, 1996.
- [40] WANG, J.; CHEN, L.; CHICHARRO, M.; "Trace Measurements of Nucleic Acids Using Flow Injection Amperometry", *Anal. Chim. Acta* **319**, 347-352, 1996.
- [41] RODENAS, V.; GARCIA, M. S.; PEDRENO, C. S.; ALBERO, M. I.; "Spectrophotometric Methods for the Determination of Cephadrine or Ceftazidine in Human Urine Using Batch and Flow-Injection Procedures", *J. Pharm. Biom. Anal.* **15**, 1687-1693, 1997.
- [42] RAIMUNDO Jr., I. M.; PASQUINI, C.; "Automated Monosegmented Flow Analyser. Determination of Glucose, Creatinine and Urea", *Analyst* **122**, 1039-1044, 1997.
- [43] DE PAIVA, A. C.; NETO, G. O.; TUBINO, M.; HOEHR, N. F.; "Direct Determination of Potassium in Human Blood Serum by Flow Injection Flame Photometry with Automatic Dilution", *Anal. Letters* **29**, 1719-1727, 1996.
- [44] CHONG, K.; LOUGHLIN, T.; MOEDER, C.; PERPALL, H. J.; THOMPSON, R.; GRINBERG, N.; SMITH, G. B.; BRUPATHY, M.; BICKER, G.; "Drug Substance Manufacture Process Control - Application of Flow Injection Analysis and HPLC for Monitoring an Enantiospecific Synthesis", *J. Pharm. Biom. Anal.* **15**, 111-121, 1996.
- [45] JURGENS, H.; AKHNOUKH, R.; KRETZMER, G.; SCHUGERL, K.; "Development of Enzyme-Cartridge Flow Injection Analysis for Industrial Process Monitoring. 3. Application for Monitoring of Recombinant Animal Cell Cultivations", *Anal. Chim. Acta* **315**, 153-157, 1995.
- [46] ANDREW, K. N.; WORSFOLD, P. J.; COMBER, M.; "On-line Flow Injection Monitoring of Ammonia in Industrial Liquid Effluents", *Anal. Chim. Acta* **314**, 33-43, 1995.
- [47] HASSAN, S. S. M.; EL BAHNASAWY, R. M.; RIZK, N. M.; "Membrane Sensors for Batch and Flow Injection Potentiometric Determination of Ethamsylate (Cyclonamine) in Pharmaceutical Preparations", *Mikrochim. Acta* **126**, 217-222, 1997.
- [48] ZOU, G. W.; LIU, Z.; WANG, C. X.; "Flow Injection Analysis Methods for Determination of Diffusion Coefficients", *Anal. Chim. Acta* **350**, 359-363, 1997.
- [49] NOBREGA, J. A.; ROCHA, F. R. P.; "Ionic Strength Effect on the Rate of Reduction of Hexacyanoferrate (III) by Ascorbic Acid - A Flow Injection Kinetic Experiment", *J. Chem. Educ.* **74**, 560-562, 1997.
- [50] PASQUINI, C.; LU, J.; TRAN, C. D.; SMIRNOV, S.; "Detection of Flow Injection Analysis with pH Gradient by Acousto-Optic Tunable Filter Based Spectrophotometry", *Anal. Chim. Acta* **319**, 315-324, 1996.
- [51] HASEBE, T.; NAGAO, J.; KAWASHIMA, T.; "Simultaneous Flow Injection Determination of Acetylcholine and Choline Based on Luminol Chemiluminescence in a Micellar System with On-Line Dialysis", *Anal. Sci.* **13**, 93-98, 1997.
- [52] SONG, W. L.; ZHI, Z. L.; WANG, L. S.; "Amberlite XAD Resin Solid-Phase Extraction Coupled On-Line to a Flow Injection Approach for the Rapid Enrichment and Determination of Phenols in Water and Waste Waters", *Talanta* **44**, 1423-1433, 1997.
- [53] FAN, S. H.; FANG, Z. L.; "Two-Step Solvent Extraction Flow Injection System for the Determination of Anionic Surfactants by Spectrophotometry", *Fresenius J. Anal. Chem.* **357**, 416-419, 1997.
- [54] FACCHIN, I.; ROHWEDDER, J. J. R.; PASQUINI, C.; "An Automated System for Liquid-Liquid Extraction in Monosegmented Flow Analysis", *J. Autom. Chem.* **19**, 33-38, 1997.
- [55] YAN, X. P.; ADAMS, F.; "Flow Injection On-Line Sorption Separation and Preconcentration with a Knotted Reactor for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometric Determination of Lead in Biological

- and Environmental Samples", *J. Anal. Atomic Spectrometry* **12**, 867, 1997.
- [56] YAN, X. P.; VANMOL, W.; ADAMS, F.; "Flow-injection On-Line Sorption Preconcentration in a Knotted Reactor for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometric Determination of Ultratrace Amounts of Cobalt in Natural Waters", *Lab. Robot. Autom.* **9**, 191-199, 1997.
- [57] IVANOVA, E.; YAN, X. P.; VAN MOL, W.; ADAMS, F.; "Determination of Thallium in River Sediment by Flow Injection On-Line Sorption Preconcentration in a Knotted Reactor Coupled with Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry", *Analyst* **122**, 667-671, 1997.
- [58] LUO, Y.; NAKANO, S.; HOLMAN, D. A.; RŮŽIČKA, J.; CHRISTIAN, G. D.; "Sequential Injection Wetting Film Extraction Applied to the Spectrophotometric Determination of Chromium (VI) and Chromium (III) in Water", *Talanta* **44**, 1563-1571, 1997.
- [59] TORRES, F. M.; MUNOZ, A.; ESTELA, J. M.; CERDA, V.; "Simultaneous Determination of Phosphate and Silicate in Waste Water by Sequential Injection Analysis", *Analyst* **122**, 1033-1038, 1997.
- [60] VAN STADEN, J. F.; TALJAARD, R. E.; "Determination of Ammonia in Water and Industrial Effluent Streams with the Indophenol Blue Method Using Sequential Injection Analysis", *Anal. Chim. Acta* **344**, 281-289, 1997.
- [61] PETERSON, K. L.; LOGAN, B. K.; CHRISTIAN, G. D.; RŮŽIČKA, J.; "Sequential Injection Extraction for Sample Preparation", *Anal. Chim. Acta* **337**, 99-106, 1997.
- [62] VAN STADEN, J. F.; TALJAARD, R. E.; "Determination of Calcium in Water, Urine and Pharmaceutical Samples by Sequential Injection Analysis", *Anal. Chim. Acta* **323**, 75-85, 1996.
- [63] CHEN, S. C.; CHEN, N. T.; HSU, K. S.; HSU, K. F.; "Study of Polymer Melt Flow in Sequential Injection Molding Process", *Aiche J.* **42**, 1706-1714, 1996.
- [64] HEDENFALK, M.; MATTIASSON, B.; "Sequential Injection Analysis of Ethanol Using Immobilized Alcohol Dehydrogenase", *Anal. Letters* **29**, 1109-1124, 1996.
- [65] LUKKARI, I.; IRGUM, K.; LINDGREN, P.; LINDEN, J.; "On-line Determination of Pyrocatechol, Protocatechuic Acid, Pyrogallol and Gallic Acid in Black Liquor by Sequential Injection and High-Performance Liquid Chromatography", *Process Control and Quality* **7**, 185-193, 1995.
- [66] SULIMAN, F. E. O.; SULTAN, S. M.; "Sequential Injection Technique Employed for Stoichiometric Studies Optimization and Quantitative Determination of Some Fluoroquinolone Antibiotics Complexed with Iron (III) in Sulfuric Acid Media", *Talanta* **43**, 559-568, 1996.
- [67] SULTAN, S. M.; SULIMAN, F. E. O.; "Use of Sequential Injection Technique for Mechanistic Studies and Kinetic Determination of Bromazepam Complexed with Iron (II) in Hydrochloric Acid", *Analyst* **121**, 617-621, 1996.
- [68] SULTAN, S. M.; DESAI, N. I.; "Sequential Injection Analysis Technique for the Concentration, Stoichiometry and Formation Constants Studies of Promethazine Hydrochloride Complexed with Palladium (II) in Hydrochloric Acid", *Analyst* **122**, 911-914, 1997.
- [69] OMS, M. T.; CERDA, A.; CLADERA, A.; CERDA, V.; FORTEZA, R.; "Gas Diffusion Techniques Coupled Sequential Injection Analysis for Selective Determination of Ammonium", *Anal. Chim. Acta* **318**, 251-260, 1996.
- [70] LUO, Y. Y.; ALOTHMAN, R.; RŮŽIČKA, J.; CHRISTIAN, G. D.; "Solvent Extraction-Sequential Injection without Segmentation and Phase Separation Based on the Wetting Film Formed on a Teflon Tube Wall", *Analyst* **121**, 601-606, 1996.
- [71] NAKANO, S.; LUO, Y.; HOLMAN, D.; RŮŽIČKA, J.; CHRISTIAN, G. D.; "Sequential Injection Photometric Determination of Molybdenum Using Organic Wetting Film Extraction", *Microchem. J.* **55**, 392-398, 1997.

- [72] RUBÍ, E.; JIMÉNEZ, M. S.; DE MIRABÓ, F. B.; FORTEZA, R.; CERDÀ, V.; "Preconcentration and Atomic Absorption Determination of Iron by Sequential Injection Analysis", *Talanta* **44**, 553-562, 1997.
- [73] WALCARIUS, A.; LAMBERTS, L.; DEROUANE, E. G.; "Cation Determination in Aqueous Solution Using the Methyl Viologen-Doped Zeolite-Modified Carbon Paste Electrode", *Electroanal.* **7**, 120-128, 1995.
- [74] DIAMOND, D.; LU, J.; CHEN, Q.; WANG, J.; "Multicomponent Batch-Injection Analysis Using an Array of Ion-Selective Electrodes", *Anal. Chim. Acta* **281**, 629-635, 1993.
- [75] LU, J. M.; CHEN, Q.; DIAMOND, D.; WANG, J.; "Inverted Poly(Vinyl Chloride)- Liquid Membrane Ion-Selective Electrodes for High-Speed Batch-Injection Potentiometric Analysis", *Analyst* **118**, 1131-1135, 1993.
- [76] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MATYSIK, F. M.; MATYSIK, S.; KUMBHAT, S.; "Nafion-Coated Mercury Thin Film Electrodes for Batch-Injection Analysis with Anodic Stripping Voltammetry", *Talanta* **43**, 2015-2022, 1996.
- [77] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; TUGULEA, L.; "Anodic-Stripping Voltammetry of Trace Metals by Batch-Injection Analysis", *Anal. Chim. Acta* **322**, 151-157, 1996.
- [78] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; TUGULEA, L.; "Batch-Injection Analysis with Adsorptive Stripping Voltammetry for the Determination of Traces of Nickel and Cobalt", *Electroanal.* **8**, 639-642, 1996.
- [79] WANG, J.; LU, J.; CHEN, L.; "Batch Injection Stripping Voltammetry of Trace Metals", *Anal. Chim. Acta* **259**, 123-128, 1992.
- [80] AMINE, A.; KAUFFMANN, J. M.; PALLESCHI, G.; "Investigation of the Batch Injection Analysis Technique with Amperometric Biocatalytic Electrodes Using a Modified Small-Volume Cell", *Anal. Chim. Acta* **273**, 213-218, 1993.
- [81] SHIMOHIGOSHI, M.; KARUBE, I.; "Development of Uric Acid and Oxalic Acid Sensors Using a Biothermochip", *Sensors and Actuators B30*, 17-21, 1996.
- [82] BARBOSA, R. M.; ROSARIO, L. M.; BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; "Electrochemical Studies of Zinc in Zinc-Insulin Solution", *Analyst* **121**, 1789-1793, 1996.
- [83] WANG, J.; "Injection Analysis - From Flow-Injection Analysis to Batch-Injection Analysis", *Microchemical J.* **45**, 219-224, 1992.
- [84] VLASOV, Y. G.; ERMOLENKO, Y. E.; KOLODNIKOV, V. V.; IPATOV, A. V.; AL-MAROK, S.; "A Mercury Sensor for Flow- and Batch-Injection Analyses", *Sensors and Actuators B24*, 317-319, 1995.
- [85] WANG, J.; CHEN, L.; ANGNES, L.; TIAN, B.; "Computerized Pipettes with Programable Dispension for Batch Injection Analysis", *Anal. Chim. Acta* **267**, 171-177, 1992.
- [86] CHEN, L.; WANG, J.; ANGNES, L.; "Batch Injection Analysis with the Rotating Disk Electrode", *Electroanal.* **3**, 773-776, 1991.
- [87] WANG, J.; CHEN, L.; "Small-Volume Batch-Injection Analyser", *Analyst* **119**, 1345-1348, 1994.
- [88] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MITOSERIU, L. C.; "Amperometric Batch Injection Analysis - Theoretical Aspects of Current Transients and Comparison with Wall-Jet Electrodes in Continous Flow", *Electroanal.* **7**, 225-229, 1995.
- [89] McCABE, W. L.; SMITH, J. C.; Operaciones Basicas De Ingenieria Química, Editorial Reverté, S. A.: Barcelona, p. 251-287, 1981.
- [90] BRODKEY, R. S.; HERSHEY, H. C.; Transport Phenomena - A Unified Approach, McGraw-Hill, Inc.: New York, p. 359-398, 1988.
- [91] PERRY, R. H.; CHILTON, C. H.; Manual de Engenharia Química, 5ª edição, Ed. Guanabara Dois S. A.: Rio de Janeiro, p.19-3 a 19-12, 1973.

- [92] GLAUERT, M. B.; "The Wall Jet", *J. Fluid Mech.* **1**, 625-643, 1956.
- [93] YAMADA, J.; MATSUDA, H.; "Limiting Diffusion Currents in Hydrodynamic Voltammetry. 3. Wall Jet Electrodes", *J. Electroanal. Chem.* **44**, 189-198, 1973.
- [94] GUNASINGHAM, H.; FLEET, B.; "Wall-Jet Electrode in Continuous Monitoring Voltammetry", *Anal. Chem.* **55**, 1409-1414, 1983.
- [95] COULSON, J. M.; RICHARDSON, J. F.; Tecnologia Química - Fluxo de Fluidos, Transferência de Calor e Transferência de Massa, 3ª edição, Fundação Calouste Gulbekian: Lisboa, Vol. 1, p. 401, 1980.
- [96] BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A.; Electroquímica - Princípios, Métodos e Aplicações, Oxford University Press, Inc.: Coimbra, 1996.
- [97] WANG, J.; TAHA, Z.; "Batch Injection with Potentiometric Detection", *Anal. Chim. Acta* **252**, 215-221, 1991.
- [98] WANG, J.; TAHA, Z.; "Batch Injection Analysis with Thermistor Sensing Devices", *Anal. Letters* **24**, 1389-1400, 1991.
- [99] GUNASINGHAM, H.; "Large-Volume Wall-Jet Cells As Electrochemical Detectors for High-Performance Liquid Chromatography", *Anal. Chim. Acta* **159**, 139-147, 1984.
- [100] BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S.; Statistics for Experimenters - An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building, John Wiley & Sons: New York, p. 352-555, 1978.
- [101] NETO, B. B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. E.; Planejamento e Otimização de Experimentos, Ed. Da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP: Campinas-SP, 1995.
- [102] BARD, A. J.; FAULKNER, L. R.; Electrochemical Methods - Fundamental and Applications, Vol. II, John Wiley & Sons: USA, 1980.
- [103] British Pharmacopoeia, HMSO: London, p. 733, 1980.

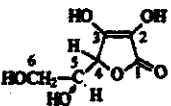
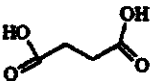
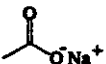
Parte Experimental

Neste capítulo procurar-se-á descrever os reagentes, aparelhagens, procedimentos, técnicas e métodos adotados durante o desenvolvimento desta pesquisa.

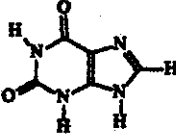
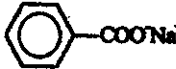
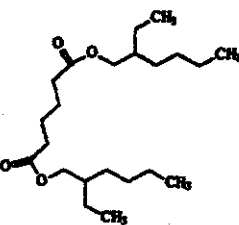
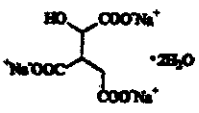
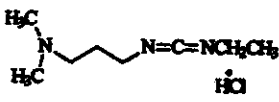
4.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico ou de laboratório, sem prévia purificação. Exceção é feita a enzima ascorbato oxidase, a qual foi extraída da casca do fruto do pepineiro (pepino) e o Araldite® (resina epóxi/endurecedor de polimercaptana). A relação dos reagentes está apresentada na Tabela 4.1.

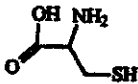
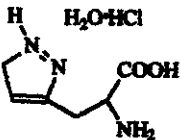
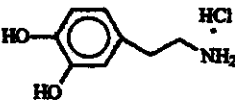
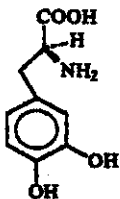
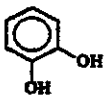
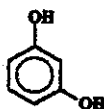
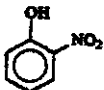
Tabela 4.1 Relação dos reagentes utilizados na pesquisa.

Substância	Fórmula	MM, g mol ⁻¹	Grau de Pureza, %	Procedência
Acetona		58,08	99,5 (d = 0,79)	Merck (Art. 21605)
Ácido L(+)-Ascórbico		176,13	99,7	Merck (Art. 127)
Ácido orto-Fosfórico	H ₂ PO ₄	98,00	85 (d = 1,71)	Merck
Ácido Succínico		118,09	P.A.	Carlo Erba
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	98,08	95 - 97 (d = 1,84)	Merck (Art 731)
Acetato de Sódio Anidro		82,04	99	Carlo Erba

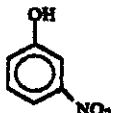
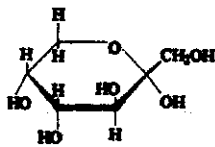
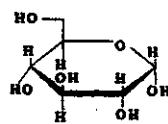
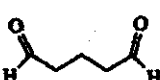
continuação da Tabela 4.1:

Substância	Fórmula	MM, g mol ⁻¹	Grau de Pureza, %	Procedência
Amido	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	162,14 _n	P.A.	Reagen (Lot. 73183)
Ácido Úrico		168,11	>99	Merck (Lot 646)
Benzoato de Sódio		144,11	PA	Fisher (Lot 713021)
Bicarbonato de Sódio	NaHCO ₃ (0,024 mol L ⁻¹)	84,01	Solução Tampão (pH 10,01 - 25°C)	Corning (Lot. 44G11)
Carbonato de Sódio	Na ₂ CO ₃ (0,025 mol L ⁻¹)	105,99		
Bis(2-Etil Hexil) Adipato		370,58	>99 (d ₄ ²⁰ = 0,925)	Fluka (CA10977)
Citrato Tri-Sódio Dihidratado		294,10	99	Merck (Art. 6448)
1-Etil-3-(3-Dimetil Aminopropil) Carbodimida		191,71	>98	Sigma (L. 107H03901)
Cloreto de Amônio	NH ₄ Cl	53,5	P.A.	Ecibra
Cloreto de PolíVinila (PVC)	$[-CH_2CHCl-]_n$	>48.000	Selectofore	Fluka
Cloreto de Poli-Vinila Carboxilado (PVC-COOH)		220.000	1,8 (Carboxil)	Aldrich (Lot. 16812HR)
Cloreto de Potássio	KCl	74,56	99	Synth (Lot. 44896)
Cloreto de Sódio	NaCl	58,44	PA	Nuclear

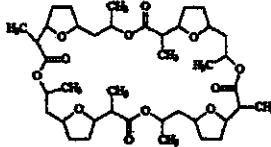
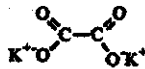
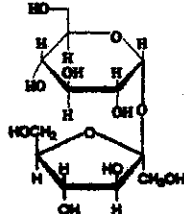
continuação da Tabela 4.1:

Substância	Fórmula	MM, g mol ⁻¹	Grau de Pureza, %	Procedência
L-Cisteína		121,20	98	Sigma (Lot 39H1090)
Cloridrato de L-Histidina		209,63	99	Carlo Erba (Cod. 456952)
Cloridrato de 3-Hidroxi Tiramina (Dopamina)		189,64	>99	Sigma (Lot. 27H2515)
Cloreto de Magnésio	MgCl ₂ ·6H ₂ O	203,31	PA	Ecibra
L-3,4-Dihidroxi fenil Alanina (L-DOPA)		197,19	>99	Sigma (Lot. 55H0565)
1,2-Dihidroxi Benzeno (Catecol)		110,11	>99	Aldrich (Lot. 06105LW)
1,3-Dihidroxi Benzeno (Resorcinol)		110,11	>99	Merck
1,4-Dihidroxi Benzeno (Hidroquinona)		110,11	>99	Merck (Art 822333)
Etileno Diamino Tetracético Sal Dissódico	EDTANa ₂ ·H ₂ O	372,25	99	Qeel
Fenol		94,11	PA	Ecibra (Lot. 12609)
2-Nitrofenol		139,11	98	Merck

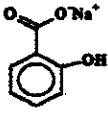
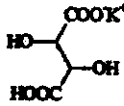
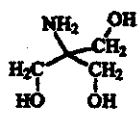
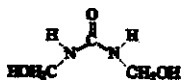
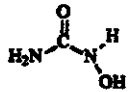
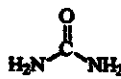
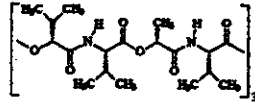
continuação da Tabela 4.1:

Substância	Fórmula	MM, g mol ⁻¹	Grau de Pureza, %	Procedência
3-Nitrofenol		139,11	95	Merck
4-Nitrofenol		139,11	97	Merck
Fosfato de Potássio Monobásico	KH_2PO_4	136,09	99,5	Merck (Lot. 306100)
Fosfato de Sódio Dibásico	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,041 mol L ⁻¹)	177,99	Solução Tampão (pH 7,00 - 25°C)	Corning (Lot. 44D04)
Fosfato de Potássio Monobásico	KH_2PO_4 (0,026 mol L ⁻¹)	136,09		
D(-)-Frutose		180,16	>99	Sigma (L. 109F0752)
D(+)-Glicose		180,16	>99,5	Sigma (L.34H05413)
Glicina		75,07	>99	Sigma (L. 44H2505)
Grafite	C	120,1	Pó (1-2 µm)	Aldrich
Glutaraldeído		100,12	25 (Solução Aquosa)	Sigma (L. 58H5400)
Hidróxido de Lítio	LiOH	23,95	98	Merck (Lot. 438)
Hidrogenofalato de Potássio	$\text{HO}_2\text{CC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{K}$ (0,049 mol L ⁻¹)	204,23	Solução Tampão (pH 4,00 - 25°C)	Corning (Lot. 44A05)
Hidróxido de Potássio	KOH	56,11	85	Merck (Art 5033)
Hidróxido de Sódio	NaOH	40,00	99	Merck (Art 6498)

continuação da Tabela 4.1:

Substância	Fórmula	MM, g mol ⁻¹	Grau de Pureza, %	Procedência
Iodeto de Potássio (Neutro)	KI	166,01	99,5	Merck (Art 5043)
Iodo Ressublimado	I ₂	253,81	99,5	Merck (Art 21538)
Nitrato de Cálcio	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236,15	98,5	Merck (L. A487621)
Nitrato de Lítio	LiNO ₃	68,94	95	Vetec (Lot. 920802)
Nitrato de Prata	AgNO ₃	169,88	PA	Degussa
Nitrato de Potássio	KNO ₃	100,11	PA	Nuclear (Lot. 16336)
Nonactina		736,95	Grau Bioquímico	Sigma (L. 67H4060)
Nitrogênio	N ₂	28,00	99	White Martins
Oxigênio	O ₂	32,00	99	White Martins
Oxalato de Potássio		184,24	PA	Ecibra
Poli-(Etileno-co-Acetato de Vinila) (EVA)	$(\text{CH}_2\text{CH}_2)_x$ $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{O}_2\text{CCH}_3)]_y$	≈150.000	40 (Acetato de Vinila)	Aldrich (L. 07322DR)
Peridrol	H ₂ O ₂	34,02	30 (d ₄ ²⁰ = 1,11)	Merck (Lot. 749)
D(+)-Sacarose		342,3	PA	ACS-QM (Lot. 2085)
Sulfato de Cobre (II)	CuSO ₄ ·5H ₂ O	249,68	>98	Synth (Lot. 12667)
Sulfato de Potássio	K ₂ SO ₄	174,27	PA	Mallinckrodt

continuação da Tabela 4.1:

Substância	Fórmula	MM, g mol ⁻¹	Grau de Pureza, %	Procedência
Sulfato de Ferro (III)	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	399,88 (Anidro)	21-23 (Fe)	Vetec (Lot. F1194)
Salicilato de Sódio		160,11	99,5	Merck (Lot. 719)
Tetrafluorborato de Potássio	KBF_4	125,91	99,5	Aldrich
Tartarato de Potássio		188,18	99	Merck
Tetrahidrofurano (THF)		72,11	>99	Mallinckrodt (Lot. 8498)
Tiouréia		76,12	99	Merck
L-Tirosina		181,19	99,9	Aldrich
Tris[Hidroxi Metil] Amino Metano (Tampão TRIS)		121,2	99	Sigma (L. 85H5432)
1,3-Bis[Hidroxi Metil] Uréia ou Dimetilol Uréia		120,1	95	Sigma (L.27H0737)
N-Hidroxi Uréia		76,06	Grau Bioquímico	Merck (Lot. 232)
Uréia		60,06	Ultra-Pura	Sigma (L. 54H0290)
Urease	EC 3.5.1.5	480.000	5U mg ⁻¹ pH 6,1 - 30 °C	Merck (Art. 8489)
Valinomicina		1.111,3	90	Sigma (L.129H4035)

As amostras farmacêuticas e de soro sanguíneo usadas na análise de ácido ascórbico, úrico e uréia, foram obtidas em drogaria local ou cedidas pelo Centro de Patologia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-UNICAMP), respectivamente. As amostras de bebidas isotônicas foram adquiridas em supermercado.

4.2 Aparelhagem

- Balança Semi-Analítica: Ohaus TP2KS ($\pm 0,01$ g);
- Balança Analítica: Sartorius BP211D ($\pm 0,01$ mg);
- Espectrofotômetro: Pharmacia Biotech - Ultrospec 2000;
- Unidade de controle de temperatura: Peltier-Pharmacia Biotech 80-2105-49;
- Fotômetro de Chama: Micronal B262
- Banho termostatzado: Colora KT 10 K e Quimis 214.D2;
- pH/Analisador de íons: Corning 350;
- Eletrodo de Cl^- : Corning 476126;
- Eletrodos de referência: Ag/AgCl (Corning 476340), calomelano saturado (Corning 476350) e Ag/AgCl-dupla-junção com solução de preenchimento de LiNO_3 , 1 mol L^{-1} (Corning 476370);
- Sensor de temperatura: ATC, Corning 477968;
- Micropipeta eletrônica: Eppendorf 4850 ($5 \mu\text{L}$ - $100 \mu\text{L}$ e $100 \mu\text{L}$ - $5000 \mu\text{L}$);
- Bomba peristáltica: Ismatec IPC-8;
- Ultrassom: Thornton T14 - 25 KHz;
- Tacômetro: Minipa MDT-2244;
- Placa de controle e aquisição de dados: ACL-8111 da ADLink Technology;
- Microcomputador: Processador AMD 586/P75S-133MHz e 20 Mb de RAM;

4.3 Procedimento

4.3.1 Preparo das Soluções

Todas as soluções foram preparadas em água deionizada no momento da sua utilização. As soluções-mãe foram preparadas como descritas a seguir:

- Ácido Ascórbico $0,100 \text{ mol L}^{-1}$: 1,7613 g de ácido ascórbico foram dissolvidos em 100,0 mL de água deionizada. Para o estudo de estabilidade das soluções de ácido ascórbico foi adicionado uma quantidade de EDTA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, de modo que a concentração final desta substâncias fosse $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Já nas medidas espectrofotométricas no UV a 243 nm, adicionou-se solução de HCl

- e KCl 1 mol L⁻¹, na proporção 1:1, para que as soluções resultantes de ácido ascórbico apresentassem um pH em torno de 2.
- Ácido Úrico 0,100 mol L⁻¹: Foram pesados, separadamente, 0,8406 g de ácido úrico e 0,2395 g de hidróxido de lítio. Adiciona-se 20 mL de água deionizada a cada uma das massas pesadas, misturando-se ambas em seguida. Então, agita-se a mistura até a dissolução completa do ácido úrico. Finalmente, completa-se o volume para 50,0 mL com água deionizada, em balão volumétrico.
 - Uréia 1,00 mol L⁻¹: 6,0060 g foram dissolvidos em 100,0 mL de água destilada.
 - Cloreto de Amônio 1,00 mol L⁻¹: 5,3490 g foram dissolvidos em 100,0 mL de água destilada.
 - Cloreto de Potássio 1,00 mol L⁻¹: 7,4560 g foram dissolvidos em 100,0 mL de água destilada.
 - Nitrato de Prata 0,100 mol L⁻¹: 1,6988 g foram dissolvidos em 100,0 mL de água destilada.
 - Tampão Fosfato 1 mol L⁻¹: Cerca de 27 g de K₂HPO₄ anidro foram dissolvidos em 200 mL de água deionizada. O pH foi ajustado no valor desejado com KOH ou H₃PO₄, ambos 1 mol L⁻¹.
 - Tampão Tris-SO₄ 0,1 mol L⁻¹: Cerca de 12 g de tris[hidroximetil]amino metano foram dissolvidos em 1L de água deionizada. O pH foi ajustado no valor desejado com H₂SO₄ 1 mol L⁻¹.
 - EVA 2,5 % m/v: Cerca de 0,25 g foram dissolvidos em 10 mL de THF.

As soluções de menor concentração foram preparadas por diluição das soluções-mãe. Já as amostras analisadas foram preparadas de maneira similar aos seus padrões, sendo diluídas adequadamente para a faixa linear de resposta dos métodos potenciométricos desenvolvidos ou de referência.

4.3.2 Calibração da Vazão Volumétrica da Micropipeta Eletrônica

Para determinar a vazão volumétrica de injeção da micropipeta eletrônica foi cronometrado o tempo de escoamento de 5,00 mL de água destilada. Os dados obtidos e a vazão volumétrica calculada estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Dados obtidos na calibração da micropipeta eletrônica.

Modo de Operação	Tempo de Escoamento	Média±EDP	Vazão Volumétrica
LOW	8s40; 8s34; 8s28; 8s34; 8s46	8s36±0,06*	0,60±0,01 mL s ⁻¹
MEDIUM	5s72; 5s78; 5s71; 5s84; 5s81	5s77±0,06	0,86±0,01 mL s ⁻¹
HIGH	5s21; 5s15; 5s34; 5s28; 5s21	5s27±0,09	0,95±0,02 mL s ⁻¹

*Estimativa do desvio padrão para 5 medidas.

4.3.3 Estudo de Estabilidade das Soluções Aquosas de Ácido Ascórbico

4.3.3.1 Efeito do pH×O₂×Temperatura×Tempo

O estudo de estabilidade das soluções aquosas de ácido ascórbico foi realizado por planejamento fatorial (2⁴)^[1]. Para este estudo, foi monitorado espectrofotometricamente no comprimento de onda de 265 nm, a decomposição das soluções aquosas de ácido ascórbico $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, nas condições da matriz fatorial (Tabela 4.3). Os principais fatores estudados foram o pH, o oxigênio, o tempo e a temperatura, sendo os seguintes níveis:

- **pH:** 5,0 (nível inferior) e 5,6 (nível superior), porque é a faixa de pH onde a maior capacidade redox do ácido ascórbico ocorre.
- **Oxigênio (O₂):** Ausência (nível inferior) e presença (nível superior). O oxigênio dissolvido na solução está diretamente envolvido na reação de oxidação.
- **Tempo (t):** 30 min (nível inferior) e 60 min (nível superior), porque são períodos de tempo suficientes para uma determinação analítica de ácido ascórbico.
- **Temperatura (T):** 10 °C (nível inferior) e 25 °C (nível superior). Este fator está diretamente relacionado com a cinética de decomposição, por isto foi escolhida uma temperatura baixa que facilmente pode ser obtida em laboratório (refrigerador) e a ambiente, respectivamente.

4.3.3.2 Efeito da Radiação Eletromagnética

O efeito da radiação eletromagnética na estabilidade das soluções aquosas de ácido ascórbico ($2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) foi realizado monitorando-se no comprimento de onda de 243 nm, o grau de decomposição por uma hora destas soluções, quando expostas diretamente à luz ultravioleta ou não.

Todas as medidas foram feitas a 25 °C, usando a unidade de controle de temperatura do espectrofotômetro.

4.3.4 Elaboração dos Sensores Potenciométricos

4.3.4.1 Construção do Sensor Base

I. Eletrodo de Grafite/Epóxi^[2]

Cerca de 0,0648 g de resina epóxi (36%), 0,0260 g de polimercaptana (14%) e 0,0910 g de grafite (50%) foram pesados em balança analítica e misturados com 200 µL de acetona. A pasta obtida foi colocada em uma cavidade de um tubo de acrílico de 7 mm de diâmetro (38 mm² de área)

Tabela 4.3 Matriz fatorial para o estudo de estabilidade das soluções aquosas de ácido ascórbico, contendo o planejamento e os dados obtidos.

Número do experimento	Aleatorização	Fatores estudados				Resposta (% decomposta)			Média	Desvio Padrão
		pH	O ₂	t	T	1	2	3		
1	13	-	-	-	-	0	0,8	1,1	0,6	0,6
2	14	+	-	-	-	0	0	0	0	0
3	9	-	+	-	-	0,1	0	0,3	0,1	0,1
4	10	+	+	-	-	0,5	1,7	0	0,7	0,8
5	15	-	-	+	-	0	0	0	0	0
6	16	+	-	+	-	1,1	0,9	0	0,6	0,6
7	11	-	+	+	-	1,1	3,5	—	2,3	1,7
8	12	+	+	+	-	1,5	0	1,6	1,0	0,9
9	6	-	-	-	+	0,6	0	0	0,2	0,3
10	5	+	-	-	+	0,4	0,7	0	0,3	0,3
11	1	-	+	-	+	6,2	10,1	7,5	7,9	2,0
12	2	+	+	-	+	17,6	19,6	16,5	17,9	1,6
13	7	-	-	+	+	0,5	2,0	1,9	1,5	0,8
14	8	+	-	+	+	0,7	0	0	0,2	0,4
15	4	-	+	+	+	17,0	11,6	13,0	13,9	2,8
16	3	+	+	+	+	22,4	19,6	31,0	24,3	5,9

e conectada à um fio de cobre. Este sensor foi utilizado como sensor base para a elaboração dos eletrodos para ácido ascórbico, úrico e uréia. Um eletrodo tubular foi construído de modo similar para uso em sistemas FIA.

II. Eletrodo de pH (Pt)

Um sensor base para H⁺ foi construído baseado numa placa de platina Pt de 0,60 cm de diâmetro (28 mm² de área), a qual foi conectada à um fio de platina-cobre e montada sobre um tubo de PVC. Este sensor foi utilizado na elaboração de um biossensor para uréia e nos estudos com o sistema BIA.

III. Eletrodo de NH₄⁺ (PVC-COOH/Nonactina/Adipato)^[3]

Cerca de 0,2100 g de PVC-COOH (39%), 0,3231 g de bis-2-etil hexil adipato (60%), 0,0054 g de nonactina (1%) foram pesados em balança analítica e dissolvidos em 3 mL de THF. Então, 80 µL desta solução foi adicionada sobre à superfície de um eletrodo de grafite/epóxi (38 mm²). O eletrodo

foi deixado ao ambiente por 30 min para evaporar o solvente (THF) e formar a membrana sensora. Antes de ser utilizado, os eletrodos elaborados desta maneira foram condicionados em solução concentrada de cloreto de amônio 1 mol L^{-1} .

IV. Eletrodo de K^+ (PVC/Valinomicina/Adipato)^[4]

A composição da membrana elaborada em percentagem em massa (% m/m) foi 0,73% de valinomicina, 66,9 % de bis-2-etil hexil adipato, 32,4 % cloreto de polivinila (PVC) e 0,02 % tetrafluorborato de potássio. A mistura foi gotejada sobre a superfície de um eletrodo de grafite/epóxi. Antes do uso, ambos os eletrodos foram condicionados em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução aquosa de cloreto de potássio por um dia. Quando não em uso, o eletrodo de potássio foi guardado à seco para evitar a lixiviação do material sensível da membrana.

4.3.4.2 Construção do ISE-Ascorbato

I. Extração da Enzima Ascorbato Oxidase de Casca de Pepino e Elaboração do Biossensor

A Fig. 4.1 mostra um fluxograma do processo de extração da enzima ascorbato oxidase da casca de pepino e de preparação do biossensor seletivo para o íon ascorbato.

I.1 Ensaio para Determinação da Atividade Enzimática do Extrato de Ascorbato Oxidase

A atividade da ascorbato oxidase, presente no extrato obtido da casca de pepino, foi determinada segundo o método espectrofotométrico^[5-7]. A medida da atividade do extrato foi determinada monitorando-se a decomposição de $0,4 \text{ } \mu\text{moles}$ de ácido ascórbico presentes em $2,95 \text{ mL}$ de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ - pH 5,6) na presença de $5 \text{ } \mu\text{L}$ do extrato enzimático bruto diluído quatro vezes. Uma unidade de ascorbato oxidase (1 U) foi definida como a quantidade de enzima que decompõe $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de ácido ascórbico por minuto na temperatura de $30 \text{ } ^\circ\text{C}$ ^[7] em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,6. As medidas foram realizadas numa cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico no comprimento de onda de 265 nm , imediatamente após a mistura dos reagentes. O sistema foi termostatizado em $30 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Os parâmetros cinéticos para o extrato de ascorbato oxidase foram estimados pelos gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk, variando-se a concentração de ácido ascórbico, conforme o procedimento descrito anteriormente. A velocidade inicial para cada concentração do substrato de interesse foi estimada pela melhor regressão linear obtida na região onde a cinética enzimática é de 1ª ordem. A concentração de oxigênio, o qual é o segundo substrato da reação enzimática, não foi

modificada durante as medidas cinéticas. Foi considerado que a quantidade de oxigênio, que está dissolvida numa solução aquosa é suficientemente elevada para os ensaios enzimáticos realizados, uma vez que a concentração de enzima utilizada foi baixa.

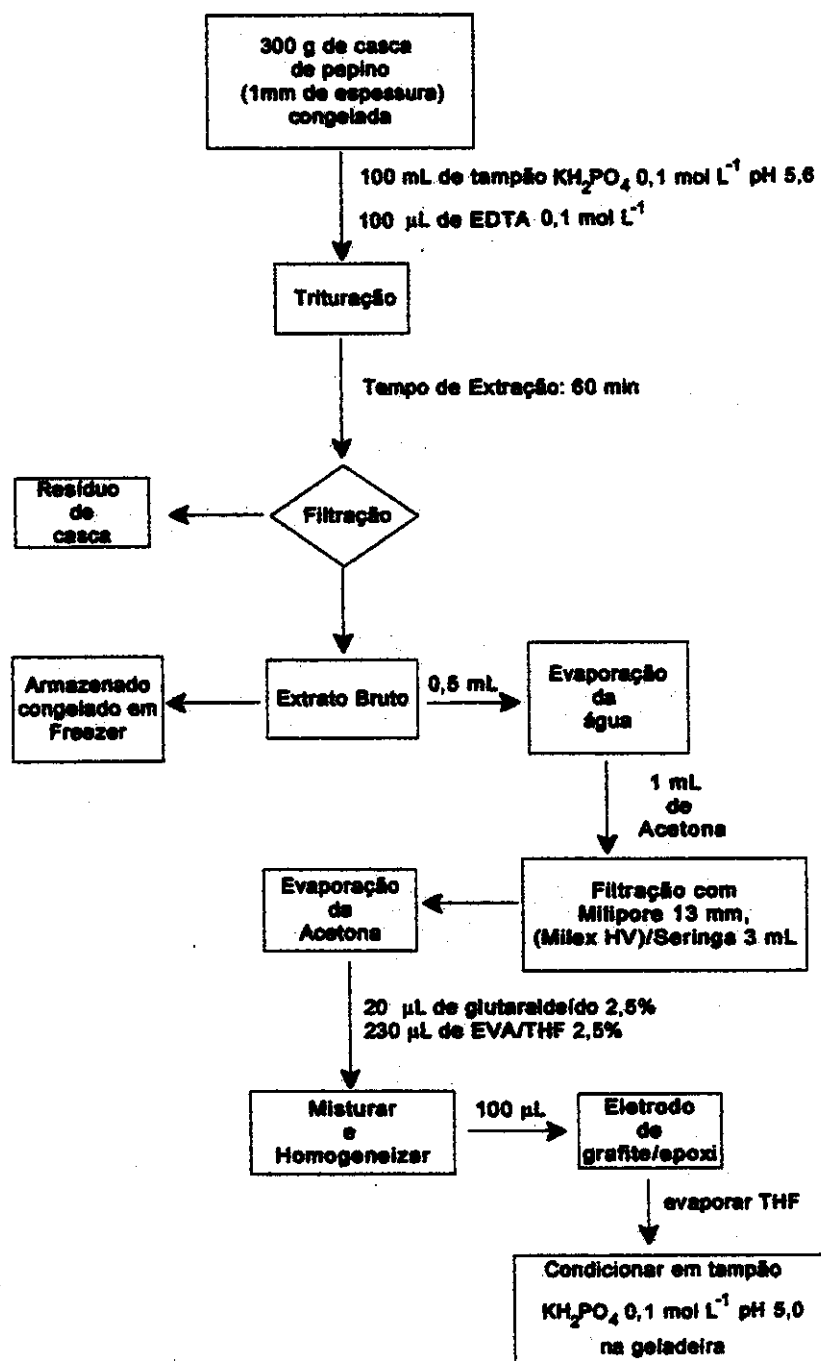


Fig. 4.1 Fluxograma do esquema de extração da enzima ascorbato oxidase da casca de pepino e construção do biossensor potenciométrico para o íon ascorbato.

II. Elaboração do Sensor EVA/Cu²⁺

Para os eletrodos utilizados em estado estacionário, cerca de 0,001 g de sulfato de cobre (II) foram pesados em balança analítica e dissolvidos em 100 µL de água deionizada e então, foi adicionado 500 µL da solução de EVA 2,5% m/v. Depois da mistura de ambas as soluções e separação de fase, 100 µL da fase orgânica foi gotejada sobre a superfície de um eletrodo de grafite/epóxi (38 mm² de área). A membrana foi deixada secar por 30 min e antes das medidas condicionada em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0.

Na elaboração dos sensores utilizados em FIA (eletrodo tubular) e BIA, o procedimento foi similar com algumas modificações. Inicialmente, foi preparada uma solução aquosa saturada de sulfato de cobre (II). Então, 500 µL de solução de EVA 2,5% m/v foi adicionado em 100 µL da solução de Cu²⁺, e da mesma forma anterior, gotejado no sensor base (grafite/epóxi). Os eletrodos foram lavados com tampão para retirar o excesso de sulfato de cobre (II) que não ficou aderido à membrana.

4.3.4.3 Construção do ISE-Urato

I. Elaboração do Sensor EVA/Fe³⁺

Cerca de 0,001 g de sulfato de ferro (III) foram pesados em balança analítica e dissolvidos em 100 µL de água deionizada. Então, 500 µL de solução EVA 2,5 % m/v foi adicionada em 100 µL da solução de Fe³⁺. Após misturar ambas as soluções e ocorrer a separação de fase, 100 µL da fase orgânica foi gotejada sobre a superfície de um eletrodo de grafite/epóxi (38 mm²). O eletrodo foi deixado ao ambiente por 30 min para evaporar o solvente (THF) e formar a membrana sensora. Os eletrodos elaborados desta maneira foram guardados à seco.

4.3.4.4 Construção do ISE-Ureia

I. Elaboração do Biossensor EVA/Urease/Pt⁽⁴⁰⁾

Uma mistura de 100 mg de urease e 20 mg de EVA foi dissolvida em 1,5 mL de THF e homogeneizada com o auxílio de um equipamento de ultrasom. Então, cerca de 15 µL desta mistura foi gotejada de 5 em 5 µL na superfície de um eletrodo de platina Pt (28 mm² de área), onde foi deixada secar a temperatura ambiente por 30 min, para a formação da membrana biossensora. Os eletrodos elaborados desta forma foram guardados à seco na temperatura de +4 °C. A mistura preparada de Urease/EVA foi armazenada em freezer a -15 °C.

II. Elaboração do Biossensor Urease-Carbodimida/PVC-COOH/Nonactina^[9]

Uma mistura 0,020 g de urease e 0,004 g de carbodimida foram pesadas em balança analítica e dissolvida em 1,0 mL de H₂O. Então, cerca de 25 µL desta mistura foi gotejada sobre a superfície do ISE-NH₄⁺ (PVC-COOH/Nonactina) onde foi deixada secar por 12 horas a temperatura ambiente para a formação da membrana biossensora. Antes de ser utilizado nas medidas potenciométricas, os eletrodos assim elaborados, foram lavados com tampão para retirar o excesso de enzima urease que não ficou aderida ao PVC-COOH. Quando fora de uso, os eletrodos foram guardados dentro da solução de urease/carbodimida na temperatura de +4 °C.

4.3.5 Elaboração e Princípios de Funcionamento do Sistema de Medição Multi-Componente

A Fig. 4.2 apresenta um diagrama esquemático do sistema multi-componente elaborado para comutação dos eletrodos potenciométricos, controle de velocidade de agitação e aquisição de dados. O sistema foi baseado na placa ACL-8111 da ADLink Technology (Apêndice 2) associada com um analisador de íons (Corning modelo 350) e um microcomputador (Processador AMD 586/P75S-133MHz e 20 Mb de RAM). Esta placa possui 1 conversor A/D com resolução de 12-bit e 16 canais de saída e entrada digitais.

Sete canais de saída digital de bit menos significativo (LSB) foram usados para controlar um oscilador à cristal programável (301-864), que providencia 57 diferentes frequências de saída na faixa de 0,005 Hz a 1MHz, em função do nível lógico que alimenta os pinos 2 a 7 (Apêndice 2). De maneira geral, o controle de velocidade do motor (DC-micromotor, tipo 2233T4.5S da Minimotor S.A.) funciona modulando a largura ou a frequência do pulso gerado pelo oscilador^[10]. Basicamente, o período de tempo que o motor permanece ligado/desligado é responsável pela velocidade. O circuito eletrônico, cristal-motor, permite uma velocidade de agitação entre 0 e 800 rpm sobre carga líquida (água), a qual foi calibrada com um tacômetro da Minipa, modelo MDT-2244.

Para o controle de comutação dos eletrodos foi empregada uma chave analógica (ADG201) e quatro canais de saída digital de bit mais significativo (MSB) da placa ACL-8111, de maneira similar à outro trabalho descrito anteriormente^[11]. A chave analógica (ADG201) possui quatro interruptores e deixa conduzir corrente quando a tensão nos pinos de controle é "nula" (Apêndice 2). Assim, a mudança no nível lógico dos pinos de entrada do interruptor, pode-se comutar a leitura de um ou outro eletrodo conectados nos pinos de saída dos interruptores. Alterando a tensão do pino de controle do CI por aplicação direta de sinal digital da placa de aquisição, habilita-se ou desabilita-se a leitura de potencial do eletrodo. Quando o nível lógico no primeiro pino é baixo, os outros terão de estar em nível alto ($0111 = 2^0 \times 0 + 2^1 \times 1 + 2^2 \times 1 + 2^3 \times 1 = 14$), fazendo assim, com que o eletrodo conectado no primeiro interruptor esteja disponível para leitura. Comutando os níveis lógicos para

(1011 = 13), (1101 = 11) e (1110 = 7) os eletrodos habilitados serão o segundo, o terceiro e o quarto, respectivamente.

Para aquisição de dados foi usado o conversor analógico para digital de 12 bits da placa ACL-8111, conectado diretamente para a saída de registrador do pH/analizador de íons. Um software foi desenvolvido para controlar o sistema multi-componente e a aquisição de dados (Apêndice 3).

4.3.5.1 Implementação do Software de Controle

Para o controle da placa ACL-8111, e conseqüentemente da comutação dos eletrodos, velocidade de agitação e aquisição de dados, foi desenvolvido um software na linguagem orientada à objeto, VISUAL BASIC 4.0 (Apêndice 3). A biblioteca DLL (inpout32.dll), a qual permite acessar os comandos para controlar a entrada e saída (I/O) de dados, foi obtida na Internet^[12]. Esta biblioteca deve ser colocada no diretório C:\Windows\System. A estrutura do software foi elaborada de acordo com o diagrama de blocos da Fig. 4.3. Basicamente, depois da seleção do número de eletrodos que deverão ser utilizados na análise, modo de aquisição e parâmetros de análises, o sistema pode ser iniciado. Dois modos são possíveis para aquisição de dados, manual (*MANUAL*) ou automático (*AUTOMATIC*). No modo manual, o sistema fica continuamente adquirindo dados, enquanto que no automático o software foi implementado para ser usado com técnicas dinâmicas onde pode ser também controlado o volume injetado através de uma válvula de seleção ou solenóide. Neste modo, o sistema automaticamente para a aquisição de dados na injeção da amostra, de acordo com o tempo de amostragem (*Sampling time*) escolhido. Assim, os dados do período de amostragem que são de pouca importância para a análise não são adquiridos. Outros parâmetros de análise (*Analysis parameters*) que deverão ser escolhidos são a duração do experimento (*Duration* - máximo 2 horas), frequência de aquisição (*Acquisition period*), número médio de pontos (*Average*) e faixa de potencial (E/min e E/max - $\pm 1,25$ V). O período de aquisição estabelece o tempo que a placa ACL-8111 lê o canal de entrada analógico, enquanto que o "*Average*" é o número de pontos que deverão ser utilizados no período de aquisição para apresentar o potencial médio, minimizando o ruído do sistema. Foi observado que o mínimo tempo possível para aquisição de dados com o sistema é 0,1 s, levando em consideração o algoritmo implementado e a potência do microcomputador empregado. Logo, este sistema potenciométrico permite o uso de ferramentas como FIA ou BIA, as quais requerem uma rápida resposta do ISE quando a solução passa através da superfície do eletrodo em elevada vazão (FIA) ou quando um volume de amostra é injetado em alta velocidade sobre a superfície do eletrodo (BIA).

A faixa de potencial está associada com a escala do gráfico a ser apresentada na tela do monitor de vídeo. Os demais parâmetros como vazão volumétrica de injeção (*injection rate*), distância do injetor ao detector (*injector distance*) e vazão (*flow-rate*) foram implementados para serem utilizados



com sistemas FIA ou BIA, não sendo necessários para as medidas em equilíbrio (estado estacionário).

A análise é iniciada pelo botão “play” no painel (botão semelhante aos utilizados em aparelhos de gravação de fita cassete) ou pelo menu. Para terminar a mesma pode-se parar a aquisição pelos botões de “pause” e “stop” ou pelo menu, ou ainda esperar finalizar o tempo escolhido de análise.

Para finalizar, há duas opções de salvar os dados, em formato (*.pot), em que os dados de aquisição e as condições de análise serão salvos ou em formato ASC II (*.dat), em que somente os dados de aquisição serão salvos, podendo ser editados por qualquer programa gráfico como EXCEL ou ORIGIN, dentre outros. Se houver falta de energia durante a análise, os dados poderão ser recuperados no arquivo Backup.bk!, o qual também se encontra em formato ASC II.

4.3.5.2 Avaliação e Desempenho do Sistema Multi-Componente

O desempenho do sistema multi-componente proposto foi avaliado na determinação simultânea de cloreto e potássio em bebidas isotônicas (Apêndice 3). As amostras foram preparadas em tampão Tris-SO₄ 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0.

As medidas de potencial das soluções padrões e amostras foram adquiridas em intervalos de 8 min, com 2 min em estado de espera (*Sampling time*) para a permutação para uma nova concentração.

4.3.6 Medidas Potenciométricas com os ISE

4.3.6.1 Estado-Estacionário

Todas as medidas potenciométricas realizadas com os sensores desenvolvidos foram feitas em uma temperatura constante, com um pH/analizador de íons utilizando um eletrodo referência. Nas medidas de potencial em estado estacionário, o eletrodo indicador e o de referência foram inicialmente imersos em 9,90 mL de uma solução tampão sob agitação constante. Adições sucessivas de 100 µL das soluções padrões na faixa de concentração entre 1×10^{-4} – 1×10^0 mol L⁻¹ foram feitas em tampão 0,1 mol L⁻¹ (Fosfato pH 5,0-Ácido Ascórbico; Fosfato pH 12,0-Ácido Úrico; Tris-SO₄ pH 7,0-Uréia). A variação de potencial medida no equilíbrio, devida a cada adição do padrão, foi relacionada com a concentração da espécie de interesse, corrigida com a diluição. Para os casos dos sensores potenciométricos para ácido ascórbico e úrico, oxigênio foi continuamente borbulhado através do sistema com o auxílio de um cilindro de O₂ ou com uma bomba pneumática (ar), respectivamente.

O tempo de resposta dos sensores foi determinado usando o software e o sistema eletrônico de aquisição de dados desenvolvido.

Os interferentes de espécies iônicas foram estudados pelos métodos da interferência fixa, assumindo que a equação de Nicolsky-Eisenman é válida ou pelo método do potencial equivalente

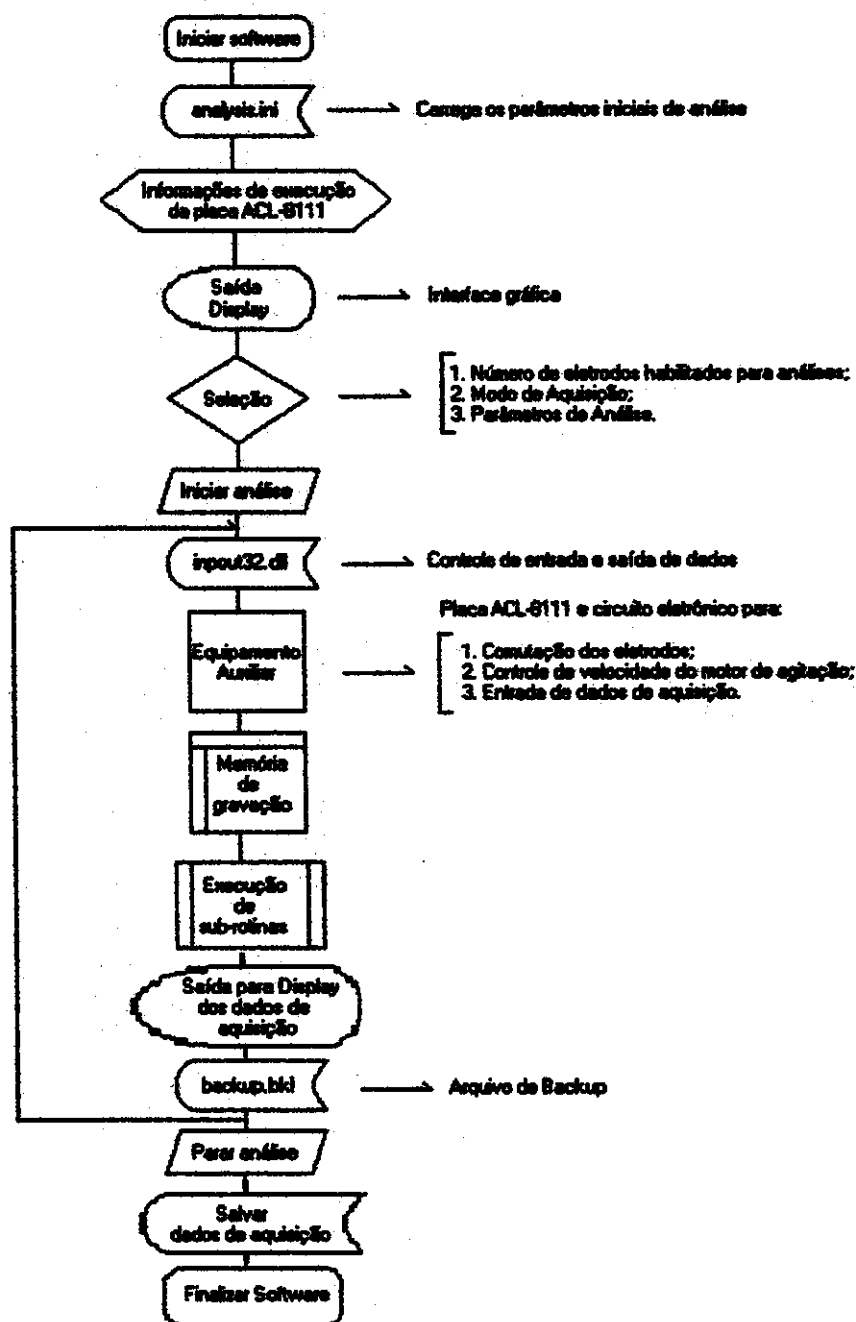


Fig. 4.3 Diagrama de bloco da estrutura lógica do software implementado para controle computacional da placa ACL-8111.

(*matched-potential*)^[13]. No caso de espécies moleculares, o grau de interferência foi calculado pela relação entre a quantidade da substância de interesse encontrada e a adicionada na solução, contendo uma certa concentração da espécie interferente (método de recuperação).

4.3.6.2 Estado Dinâmico

As medidas potenciométricas associadas com as técnicas dinâmicas, FIA e BIA, também foram realizadas com o sistema eletrônico de aquisição de dados desenvolvido. O tempo de aquisição foi de 0,1 s, tomando como média, 20 leituras do conversor digital para analógico (D/A).

Para a injeção da amostra no sistema FIA foi empregado um injetor manual e tubos de tygon e polietileno nas conexões (1,42 mm de diâmetro interno). No caso do BIA, a injeção da amostra sobre a superfície do sensor foi feita com o auxílio de uma micropipeta eletrônica.

O tempo de resposta do sensor, em ambos os sistemas dinâmicos, foi definido como o tempo decorrido para que o sinal potenciométrico mude o sinal da linha base até o máximo do pico, enquanto o tempo de lavagem, definido como o tempo necessário para que o sinal retorne para linha base a partir do pico.

O efeito dos principais parâmetros que afetam a resposta no sistema BIA foram, de início, estudados univariadamente. Estes fatores foram: o volume de injeção da amostra, a distância da ponteira à superfície do detector e a velocidade de agitação da solução no tanque e a vazão volumétrica de injeção da amostra. Então, foi estudado na faixa linear destes parâmetros, os efeitos principais através de planejamento fatorial (Capítulo 3 - Tabela 3.5) associados com elementos de construção do sistema BIA proposto (chincanas e impulsor de agitação).

Nas medidas com FIA (Fig. 4.4) e BIA, para a determinação de ácido ascórbico em amostras farmacêuticas, as soluções de ácido ascórbico foram injetadas diretamente no sistema contendo tampão fosfato pH 5,0 misturado com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 .

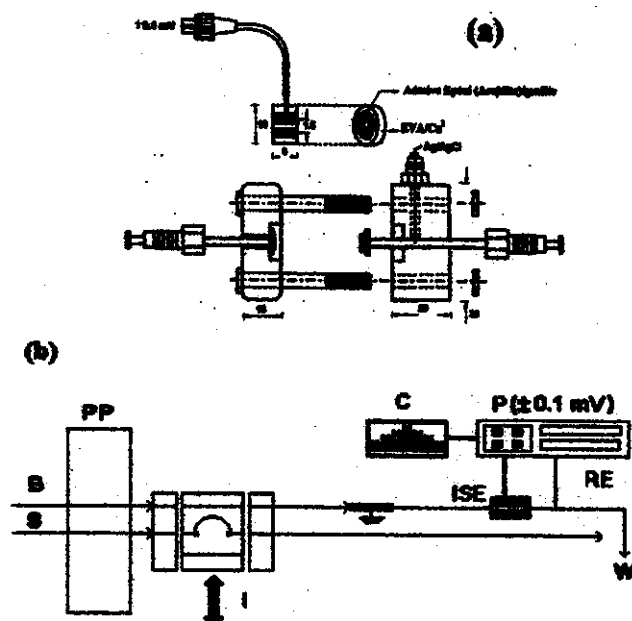


Fig. 4.4 Esquema (a) do eletrodo tubular e (b) do sistema FIA. B. Linha carregadora; S. Linha da amostra; PP. Bomba peristáltica; ISE. Eletrodo indicador; RE. Eletrodo de referência; W. Descarte; P. pH/Analizador de íons; C. Sistema de Aquisição.

4.3.7 Métodos de Referência

4.3.7.1 Determinação de Ácido Ascórbico

Os métodos descritos a seguir foram usados para comparar os resultados obtidos com os eletrodos propostos na determinação de ácido ascórbico em amostras farmacêuticas, em estado estacionário e usando as técnicas dinâmicas de análise, FIA e BIA.

I. Espectrofotométrico^[14]

A Fig. 4.5 mostra um diagrama esquemático do sistema FIA-espectrofotométrico utilizado como método comparativo para a determinação de ácido ascórbico em amostras farmacêuticas. As condições de trabalho do sistema também estão apresentadas na figura.

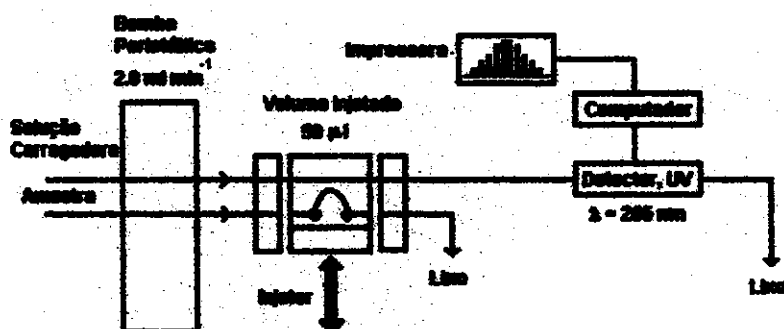


Fig. 4.5 Diagrama esquemático do sistema FIA-espectrofotométrico. A solução carregadora foi tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 5,6.

II. Titulação Iodométrica^[15]

Método padrão da Farmacopéia Britânica, que consiste na titulação do ácido ascórbico usando iodo como titulante e goma de amido como indicador.

4.3.7.2 Determinação de Potássio e Cloreto^[16]

Os métodos empregados foram a fotometria de chama para potássio (K) e titulação potenciométrica (ISE-Cl⁻) usando solução de nitrato de prata 0,100 mol L⁻¹ como titulante, respectivamente.

Referências

- [1] BOX, G.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S.; Statistics for Experimenters - An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building, John Wiley & Sons, 1978.
- [2] MACHADO, A. A. S. C.; "Conductive Epoxy-based on Ion-Selective Electrodes", *Analyst* **119**, 2263, 1994.
- [3] WALCERZ, I.; GLĄB, S.; KONCKI, R.; "Potentiometric Enzyme Electrode in a Flow Injection System for the Determination of Urea in Human Serum Samples", *Anal. Chim. Acta* **369**, 129-137, 1998.
- [4] BAND, D. M.; KRATOCHVIL, J.; TREASURE, T.; "Ion-Selective Electrode for Determination of Potassium", *J. Physiol. (London)* **265**, P5-P6, 1977.
- [5] MOSER, O.; KANELIS, A. K.; "Ascorbate Oxidase of *Cucumis melo* L. var. *reticulatus*: Purification, Characterization and Antibody Production", *J. Experim. Botany* **45**, 717-724, 1994.
- [6] GERWIN, B.; BURSTEIN, S. R.; WESTLEY, J.; "Ascorbate Oxidase : Inhibition, Activation and pH Effects", *J. Biol. Chem.* **249**, 2005-2008, 1974.
- [7] Catalog Fluka Chemika-Ciochemika Analytika, Fluka Chemie AG Industriestrasse 25 CH-9471 Buchs: Switzerland, p. 156, 1995/96.
- [8] GLĄB, S.; KONCKI, R.; KOPCZEWSKA, E.; WALCERZ, I.; HULANICKI, A.; "Urea Sensors Based on PVC Membrane pH Electrode", *Talanta* **41**, 1201-1205, 1994.
- [9] WALCERZ, I.; KONCKI, R.; LESZCZYŃSKA, E.; SALAMONOWICZ, B.; GLĄB, S.; "Urea Biosensors Based on PVC Membrane Ion-Selective Electrodes", *Anal. Letters* **29**, 1939-1953, 1996.
- [10] WOBSCHELL, D.; Circuit Design for Electronic Instrumentation - Analog and Digital Devices from Sensor to Display; Second edition; McGraw-Hill Book Company: New York, p. 367-368, 1987.
- [11] FREIRE, R. S.; "Desenvolvimento de um Sistema Voltamétrico Multicanal para Estudo de Voltametria Multiplexada"; Dissertação de Mestrado, Orientador, Prof. Dr. ROHWEDDER, J. J. R., Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 1998.
- [12] <http://149.69.43.7/jason/visualb.htm>, 1998.
- [13] UMEZAWA, Y.; UMEZAWA, K.; SATO, H.; "Selectivity Coefficients for Ion-Selective Electrodes: Recommended Methods for Reporting K^{POT} Values", *Pure & Appl. Chem.* **67**, 507-518, 1995.
- [14] FERNANDES, J. C. B.; NETO, G. O.; KUBOTA, L. T.; "Use of Column with Modified Silica for Interfering Retention in a FIA Spectrophotometric Method for Direct Determination of Vitamin C in Medicine", *Anal. Chim. Acta* **366**, 11-22, 1998.
- [15] British Pharmacopoeia, HMSO: London, p. 733, 1980.
- [16] SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; Fundamentals of Analytical Chemistry, Seventh Edition, Saunders College Publishing: Philadelphia, 1996.

Aspectos Gerais, Recentes Avanços e Perspectivas Futuras

A análise com eletrodos íon-seletivo atingiu sua era de ouro nos anos setenta. Desde então, após a descoberta dos ISFET parecia que a era dos eletrodos íon-seletivo chegara ao fim. Contudo, ainda hoje os ISE têm sido extensivamente estudados. Em 1990, vinte anos após o surgimento dos ISFET, mais de 7000 trabalhos foram publicados sobre aplicações de ISE^[1], indicando que esta metodologia ainda não pode ser considerada inteiramente esgotada.

Por outro lado, a metodologia potenciométrica tem sido muito utilizada em aplicações analíticas, que requerem a determinação simultânea de misturas de íons, devido à sua capacidade de resposta mesmo na presença de substâncias interferentes^[2-4]. Assim, os eletrodos íon-seletivo apresentam grandes atrativos para serem usados em análises multi-elementares.

A principal limitação da potenciometria, em comparação com outras metodologias de análise, é a relação exponencial entre o fator medido, a diferença de potencial, e a concentração da amostra. Isto faz com que a potenciometria não seja um método muito preciso. Por outro lado, a associação da potenciometria com técnicas dinâmicas de análise, como FIA ou BIA, tem ajudado a superar este problema, melhorando muito o desempenho do método potenciométrico. O presente trabalho tem demonstrado tal afirmação.

Neste capítulo final, procurar-se-á discutir e abordar as principais virtudes e deficiências da presente contribuição, em relação aos ISE desenvolvidos para ácido ascórbico, úrico e uréia, o sistema de análise multi-componente e o BIA. Nele também, procurar-se-á abordar os recentes avanços na área e a importância da continuidade dos estudos sobre a metodologia potenciométrica e dos sistemas de análise por injeção em batelada.

5.1 A Contribuição

Apesar do número de publicações na área de potenciometria terem crescido nos últimos anos, poucas novidades têm surgido. A novidade mais recente na área surgiu com os eletrodos reversíveis de estado sólido baseados em derivados de ftalocianina de cobalto^[5-7]. Estes sensores foram desenvolvidos para determinação de sulfeto^[8], nitrito^[6], ácido ascórbico^[7-9], cisteína^[7], dentre outras espécies redox. O princípio de funcionamento destes sensores baseia-se na mudança de densidade de carga na superfície do eletrodo devido à redução dos íons Co^{2+} para Co^{1+} por um agente redutor, sendo o eletrodo restaurado pelo oxigênio dissolvido na solução, que é continuamente borbulhado.

Neste projeto, esta idéia foi utilizada na elaboração dos sensores potenciométricos para ácido ascórbico e ácido úrico, baseados em poli(etileno co-acetato de vinila) dopado com íons Cu^{2+} ou Fe^{3+} , respectivamente. O desempenho destes ISE de membrana foram surpreendentes, principalmente no que diz respeito à seletividade. Os sensores propostos para detecção de ácido ascórbico e ácido úrico só sofreram interferência de catecol e derivados, como dopamina, L-dopa e hidroquinona. Contudo, apesar do eletrodo responder para estas substâncias, a interferência não é grave, pois ela pode ser eliminada com o simples ajuste de pH, uma vez que a espécie molecular destes compostos não causam resposta no sensor. Isto é válido para o sensor proposto para ácido ascórbico, baseado em membrana de EVA dopada com íons Cu^{2+} , pois o mesmo pode funcionar numa região de pH baixo. O mesmo não se pode dizer do sensor para ácido úrico baseado em membrana de EVA dopada com íons Fe^{3+} . Devido a baixa solubilidade do íon urato em pH ácido, o mesmo tem que ser usado em pH extremamente alcalino (pH 12). No entanto, a pequena estabilidade de compostos como ácido ascórbico, dopamina e hidroquinona em pH alcalino faz com que a interferência destes compostos no sensor para ácido úrico não seja séria. O maior problema deste tipo de sensores foi o longo tempo necessário para restauração dos mesmos, em geral, 10 a 15 min quando se utiliza oxigênio. Contudo, esta limitação foi superada utilizando peróxido de hidrogênio na restauração da atividade do eletrodo, permitindo que estes sensores pudessem ser empregados associados a técnicas dinâmicas de análise, como FIA e BIA.

Já a elaboração do sensor para uréia seguiu as tradicionais estratégias, utilizando a enzima urease imobilizada por oclusão ou ligação covalente com carbodimida sobre eletrodos sensíveis ao pH ou íons amônio. Enquanto a primeira estratégia de preparação do biossensor não se mostrou muito útil, o tempo de resposta era longo e o de vida era às vezes inferior a uma semana, a segunda alternativa mostrou-se bastante eficiente. Apesar deste último biossensor apresentar menor sensibilidade em relação ao anterior (declividade de $27 \text{ mV década}^{-1}$ vs. $57 \text{ mV década}^{-1}$), o mesmo apresentou uma rápida resposta, a qual é uma característica de maior relevância quando deseja-se aplicar este tipo de sensor em ambiente clínico, onde o número de análises de uréia por dia é elevado. A limitada seletividade deste biossensor em relação a íons Na^+ e K^+ pode ser contornada através de medidas

diferenciais, o que não foi realizado neste trabalho.

Os sensores propostos para ácido ascórbico, úrico e uréia foram testados na análise de amostras de interesse biológico, farmacêuticas ou clínicas. Os resultados em si podem ser considerados satisfatórios. A determinação de ácido ascórbico em amostras farmacêuticas apresentou desvios relativos inferiores a 10%, quando comparados com o método de referência. Já os demais sensores desenvolvidos neste projeto foram utilizados na determinação de ácido úrico e uréia em amostras de soro sanguíneo. O desvio relativo nas análises de urato foram negativos e da ordem de 70% em relação ao método de referência. Isto provavelmente pode ser explicado pela precipitação de parte do conteúdo de ácido úrico da amostra. Em geral, amostras de soro sanguíneo apresentam um pH próximo a neutralidade (pH 7), onde a solubilidade do ácido úrico é baixa. De qualquer modo, tais resultados podem ser corrigidos por um fator, levando em consideração as discrepâncias entre o método proposto neste projeto de pesquisa e o de referência. A análise de uréia em soro com o biossensor apresentou resultados mais significativos, com desvios relativos menores que 30%.

Um dos objetivos deste trabalho seria a determinação simultânea de ácido ascórbico, úrico e uréia utilizando os eletrodos desenvolvidos associados com um sistema de injeção em batelada (BIA). Infelizmente, isto não foi possível. O principal empecilho foi a grande discrepância entre o pH no qual os sensores para ácido ascórbico e úrico respondem. Além disto, o biossensor para uréia não pode ser empregado numa faixa de pH muito ácida nem muito alcalina, sob o risco de desnaturação da enzima urease e conseqüente perda de atividade do biossensor. Assim, o sistema multi-componente proposto foi testado em estado estacionário na determinação de potássio e cloreto em bebidas isotônicas. Os resultados obtidos foram bem promissores permitindo a análise em tempo real das amostras. É importante ressaltar, que o sistema multi-componente elaborado permite o uso de quatro eletrodos potenciométricos simultaneamente, sendo possível aumentar para até oito o número de eletrodos para análise pela adição de mais uma chave-analógica (ADG201), uma vez que a placa de aquisição tem ainda disponível quatro canais de saída digital. Além disto é possível usar o sistema proposto com o software implementado, em associação com técnicas dinâmicas de análise, como FIA e BIA.

Para finalizar, comentar-se-á brevemente o sistema BIA elaborado. A geometria do mesmo foi projetada com base nos conceitos descritos nos livros de engenharia^[10-12], sendo o aspecto teórico de formação do sinal, estudado com um sensor para pH. Com base nos estudos realizados, algumas considerações importantes podem ser ressaltadas sobre o efeito de alguns parâmetros, de construção e de análise, na resposta do sistema BIA. A distância do impulsor de agitação ao fundo do tanque é fundamental e deve ser mantida próximo ao chão. As chincanas também causam uma influência considerável na resposta do BIA, devendo ser utilizadas para eliminação de vórtices. A distância da ponteira ao detector deve ser mantida em torno de 2 mm e a vazão volumétrica de injeção da amostra tem de ser superior a $0,85 \text{ mL s}^{-1}$. Todos estes parâmetros afetam o sinal do sistema BIA, e estão diretamente relacionados com a espessura da camada hidrodinâmica e de difusão (região esta onde

ocorre os gradientes de concentração) formada, quando o líquido é injetado sobre a superfície do detector, em acordo com a teoria *wall-jet*^[13]. Assim, qualquer fator que modifique a espessura da camada hidrodinâmica e de difusão deve ser bem controlado para não causar dispersão no sinal. Fixando estes parâmetros, a resposta do sistema BIA-potenciométrico será somente dependente do volume de injeção e da concentração da amostra, além da velocidade de agitação do tanque. Esta última no entanto, não altera a magnitude do sinal, somente modifica o tempo de lavagem do eletrodo, isto é, quanto menor a velocidade de agitação do líquido onde está imerso o sensor, maior é o tempo necessário para o sinal retornar para linha base. Uma vez que o sistema BIA não pode ser empregado na determinação simultânea do ácido ascórbico, úrico e uréia, o mesmo foi testado na análise de vitamina C em amostras farmacêuticas com o sensor baseado em EVA/Cu²⁺. Para fins comparativos, um sistema FIA foi elaborado usando um sensor tubular. A principal virtude das técnicas dinâmicas de análise empregadas foi possibilitar a solução do problema de restauração da membrana EVA/Cu²⁺. A adição de peróxido de hidrogênio nos sistemas, permitiu que os íons Cu²⁺ na membrana de EVA, reduzidos pelo ácido ascórbico, fossem mais rapidamente restaurados. Além disto, a utilização dos sistemas FIA e BIA melhoraram a precisão das análises. Comparando os dois sistemas, FIA apresentou uma ligeira vantagem em relação ao BIA, pois apresentou uma melhor frequência analítica. Contudo, o sistema BIA apresentou um menor limite de detecção com um menor consumo de reagente.

Concluindo, as principais contribuições científicas referente a este trabalho foram os sensores desenvolvidos para ácido ascórbico e úrico baseados em membrana de EVA dopada com íons metálicos (Cu²⁺ ou Fe³⁺, respectivamente), os quais são simples, de fácil construção e baixo custo. Além disto, é possível com estes sensores, a determinação simultânea de espécies como dopamina, L-dopa, dentre outros neurotransmissores, além é claro do ácido ascórbico e úrico, somente com o simples ajuste de pH do meio. Contudo, não se deve esquecer que os estudos referentes ao projeto e aspectos teóricos de formação do sinal no sistema BIA podem contribuir para o desenvolvimento desta técnica.

5.2 O Futuro

No início da era de ouro da potenciometria, ela prometia o uso de ISE como ferramenta em análises clínicas *in situ*, usando microeletrodos e conjunto destes. Apesar desta idéia ser antiga ela ainda não se cumpriu por completo, embora exista muita pesquisa ativa nesta área^[14-17]. Vantagens como confiabilidade, robustez, seletividade e sensibilidade, faz dos ISE, uma importante metodologia que pode ser aplicada diretamente a ensaios clínicos e industriais.

Embora a potenciometria tenha completado mais de cem anos, muitos aspectos sobre o mecanismo de resposta dos ISE e principalmente, sobre a sua seletividade ainda não foram

inteiramente compreendidos. Isto é um incentivo para o desenvolvimento de novos modelos teóricos, provavelmente centrados, não nos aspectos termodinâmicos da equação de Nernst, mas na teoria dos capacitores. Além disto, o conceito de coeficiente de seletividade dos ISE, ainda não foi completamente elucidado, apesar do método do potencial-equivalente ter contribuído para isto. O problema ainda ocorre devido ao valor de K^{POT} não ser constante e depender das atividades dos íons primário e interferente utilizadas na medida do mesmo. Alguns pesquisadores têm sugerido para determinação dos coeficientes de seletividade dos ISE, o uso da teoria do planejamento experimental^[118], calibração multivariada^[119] e métodos matemáticos de ajuste de curva não-linear^[120]. Outras propostas para determinar o K^{POT} [21-23], se baseiam na teoria do potencial na fase-limite^[24] e consiste em obter as condições matemáticas necessárias para que o eletrodo responda nernstianamente para os íons primário e interferente. Alguns métodos mais recentes, utilizam algoritmos derivados da equação de Nickolsky-Eisenman onde a presença de vários íons interferentes e a resposta dos íons misturados ou o comportamento "real" do eletrodo são levados em consideração^[25,26].

Assim, estudos na direção das funções resposta-seletividade para os ISE, podem ser um novo caminho para a potenciometria, revitalizando esta metodologia.

Quanto ao sistema BIA, muito estudo ainda deve ser devotado para o seu aperfeiçoamento. O principal problema da técnica é a sua suscetibilidade ao sistema de injeção, onde é necessário um posicionamento constante do injetor e uma vazão volumétrica de injeção da amostra adequada, para a resposta reproduzível do detector. Contudo, não se pode dizer que o sistema BIA é inferior às demais técnicas existentes, (FIA e SIA). Vale lembrar, que a teoria de FIA já foi exaustivamente estudada^[27,28], o que permitiu os mais diversos tipos de implementação desta técnica, associada com as mais variadas metodologias analíticas. Tal idéia parece também ser adotada nos sistemas de análise por injeção sequencial (SIA).

De qualquer maneira, pode-se concluir que nenhuma das técnicas dinâmicas de análise existentes é insubstituível ou superior umas às outras. Atualmente, uma certa tendência é observada no campo das aplicações para estas técnicas. Em relação a SIA, sua enorme versatilidade e simplicidade acoplados com sua compatibilidade computacional, sugerem que esta técnica deverá receber maior atenção em trabalhos futuros, onde o sistema FIA correspondente seja muito complexo. Devido a sua grande compatibilidade computacional, SIA poderá ter uma maior aceitação no ambiente industrial podendo ser utilizado com maior eficiência no controle de processos. Quanto a FIA, devido ao seu vasto campo de aplicação, este continuará a ser implementado em nível acadêmico, principalmente nos estudos onde há necessidade de separação ou pré-concentração de amostra. Por outro lado, com o desenvolvimento de sensores e biossensores altamente seletivos, eletroquímicos ou ópticos, BIA poderá suplantar as outras duas técnicas nesta área devido à sua maior simplicidade. Contudo, por causa disto, isto é, a necessidade de uma superfície de detecção altamente reativa e seletiva, BIA apresenta uma limitada versatilidade, sugerindo que a mesma é uma técnica sem grandes perspectivas.

Neste caso, para poder-se extrair o máximo de potencialidade da técnica deve-se procurar a exata utilidade da mesma, onde a criatividade é o limite para contornar os problemas. Um exemplo interessante, são os estudos com os sistemas BIA miniaturizados de injeção em capilares^[29].

Em geral, o futuro não parece muito promissor para nenhuma das técnicas dinâmicas de análise citadas. A estagnação acadêmica de FIA, e os poucos artigos científicos de SIA e BIA, indicam que a continuidade da pesquisa nesta área não é mais prioritária. Métodos estatísticos de calibração multivariada, sistemas de miniaturização de instrumentação e sensores, química combinatorial e computacional, com possibilidades de simulação, parecem ser a direção futura no aperfeiçoamento das técnicas e metodologias existentes. Além disto, a tendência atual é a busca para os produtos descartáveis, de baixo custo e produção em larga escala. Contudo, o futuro em qualquer campo de aplicação é incerto, uma vez que o processo de desenvolvimento científico e tecnológico é muito dinâmico. Por vezes um método ou teoria passa esquecido no tempo, ressurgindo anos depois de forma intensa.

Referências

- [1] RŮŽIČKA, J.; "The Seventies - Golden Age for Ion Selective Electrodes", *J. Chem. Educ.* **74**, 167-170, 1997.
- [2] LEMKE, U.; CAMMANN, K.; KOTTER, C.; SUNDERMEIER, C.; KNOLL, M.; "Multisensor Array for pH, K⁺, Na⁺ and Ca²⁺ Measurements Based on Coated-Film Electrodes", *Sensors and Actuators B* **7**, 488-491, 1992.
- [3] FORSTER, R. J.; REGAN, F.; DIAMOND, D.; "Modeling of Potentiometric Electrode Arrays for Multicomponent Analysis", *Anal. Chem.* **63**, 876-882, 1991.
- [4] DIMITRAKOPOULOS, T.; ALEXANDER, P. W.; HIBBERT, D. B.; "Serial Array of ISEs for Use in a Portable Battery-powered Flow Injection Analyzer", *Electroanal.* **8**, 438-442, 1996.
- [5] TSE, Y.; JANDA, P.; LEVER, A. B. P.; "Electrode with Electrochemically Deposited N,N',N'',N'''-Tetramethyltetra-3,4-pyridinoporphyrazino-cobalt(I) for Detection of Sulfide Ion", *Anal. Chem.* **66**, 384-390, 1994.
- [6] LI, J.; PANG, X.; YU, R.; "Substituted Cobalt Phthalocyanine Complexes as Carriers for Nitrite-Sensitive Electrodes", *Anal. Chim. Acta* **297**, 437-442, 1994.
- [7] LI, J.; SHEN, G.; YU, R.; "Reversible Potentiometric Ascorbic Acid Solid-State Membrane Sensor Based on 4,4',4'',4'''-Tetra-*tert*-butylphthalocyanine Cobalt (II)", *Analyst* **120**, 2259-2263, 1995.
- [8] JANDA, P.; WEBER, J.; DUNSCH, L.; LEVER, A. B. P.; "Detection of Ascorbic Acid Using a Carbon Fiber Microelectrode Coated with Cobalt Tetramethylpyridoporphyrazine", *Anal. Chem.* **68**, 960-965, 1996.
- [9] LI, J.; HU, M.; YU, R.; "Pressed Pellet Solid Potentiometric Sensor for Ascorbic Acid Based on Derivatives of Cobalt (II) Phthalocyanine Doped with Iodine", *Sensors and Actuators B* **30**, 65-69, 1996.
- [10] McCABE, W. L.; SMITH, J. C.; Operaciones Básicas De Ingeniería Química, Editorial Reverté, S. A.: Barcelona, p. 251-287, 1981.
- [11] BRODKEY, R. S.; HERSHEY, H. C.; Transport Phenomena - A Unified Approach, McGraw-Hill, Inc.: New York, p. 359-398, 1988.
- [12] PERRY, R. H.; CHILTON, C. H.; Manual de Engenharia Química, 5ª edição, Ed. Guanabara Dois S. A.: Rio

de Janeiro, p.19-3 a 19-12, 1973.

- [13] GLAUERT, M. B.; "The Wall Jet", *J. Fluid Mech.* **1**, 625-643, 1956.
- [14] KNOLL, M.; CAMMANN, K.; DUMSCHAT, C.; ESHOLD, J.; SUNDERMEIER, C.; "Micromachined Ion-Selective Electrodes with Polymer Matrix Membranes", *Sensors Actuators B21*, 71-76, 1994.
- [15] DUMSCHAT, C.; BORCHARDT, M.; DIEKMANN, C.; CAMMANN, K.; KNOLL, M.; "Potentiometric Test Strip", *Sensors Actuators B24*, 279-281, 1995.
- [16] BORCHARDT, M.; DUMSCHAT, C.; CAMMANN, K.; KNOLL, M.; "Disposable Ion-Selective Electrodes", *Sensors Actuators B25*, 721-723, 1995.
- [17] LYNCH, A.; DIAMOND, D.; LEMOINE, P.; McLAUGHLIN, J.; LEADER, M.; "Solid-State Ion-Selective Electrode Arrays", *Electroanal.* **10**, 1096-1100, 1998.
- [18] PARCZEWSKI, A.; MADEJ, A.; "A New Method of Determination of the Selectivity of an Ion-Selective Electrode Based on Theory of Design of Experiments", *Chemia Anal.* **27**, 133-136, 1982.
- [19] DIAMOND, D.; FORSTER, R. J.; "Robust Estimation of Selectivity Coefficients Using Multivariate Calibration of Ion-Selective Arrays", *Anal. Chim. Acta* **276**, 75-86, 1993.
- [20] KANE, P.; DIAMOND, D.; "Determination of Ion-Selective Electrode Characteristics by Non-Linear Curve Fitting", *Talanta* **44**, 1847-1858, 1997.
- [21] BAKKER, E.; MERUVA, R. K.; PRETSCH, E.; MEYERHOFF, M. E.; "Selectivity of Polymer Membrane-Based Ion-Selective Electrodes: Self-Consistent Model Describing the Potentiometric Response in Mixed Ion Solutions of Different Charge", *Anal. Chem.* **66**, 3021-3030, 1994.
- [22] BAKKER, E.; "Determination of Unbiased Selectivity Coefficients of Neutral Carrier-Based Cation-Selective Electrodes", *Anal. Chem.* **69**, 1061-1069, 1997.
- [23] NÄGELE, M.; BAKKER, E.; PRETSCH, E.; "General Description of the Simultaneous Response of Potentiometric Ionophore-Based Sensors to Ions of Different Charge", *Anal. Chem.* **71**, 1041-1048, 1999.
- [24] KARPFEN, F. M.; RANGLES, J. E. B.; "Ionic Equilibria and Phase-Boundary Potentials in Oil-Water Systems", *Trans. Faraday Soc.* **49**, 823-831, 1953.
- [25] ZHANG, W.; FAKLER, A.; DEMUTH, C.; SPICHIGER, U. E.; "Comparison of Different Methods for Determining the Selectivity Coefficient Using a Magnesium-Selective Electrode", *Anal. Chim. Acta* **375**, 211-222, 1998.
- [26] DEYHIMI, F.; "A Method for the Determination of Potentiometric Selectivity Coefficients of Ion Selective Electrodes in the Presence of Several Interfering Ions", *Talanta* **50**, 1129-1134, 1999.
- [27] RŮŽIČKA, J.; HANSEN, E. H.; Flow Injection Analysis, John Wiley & Sons, New York, 2nd edition, 1988.
- [28] VALCARCEL, M.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; Flow Injection Analysis - Principles and Applications, Horwood, Chichester, 1987.
- [29] BACKOFEN, U.; HOFFMANN, W.; MATYSIK, F. M.; "Capillary Batch Injection Analysis: A Novel Approach for Analyzing Nanoliter Samples", *Anal. Chim. Acta* **362**, 213-220, 1998.

Apêndice

1

Estabilidade do Ácido Ascórbico

A1.1 Efeito do pH $\times$ O₂ $\times$ Temperatura $\times$ Tempo

Os fatores que influenciam significativamente a decomposição das soluções aquosas de ácido ascórbico preparadas para uma análise são o pH, o oxigênio e a temperatura (Tabela A1.1). No caso, ocorre uma forte interação entre estes fatores (Fig. A1.1), indicando que os mesmos contribuem em conjunto nesta decomposição. Na temperatura de 10 °C, pode ser observado que as soluções são estáveis, não importando a presença de oxigênio, porém, a 25 °C elas só são estáveis na ausência do mesmo, mostrando que a cinética de decomposição pelo O₂ é lenta a baixa temperatura. Em relação ao pH, valores em torno de 5,6, na presença de oxigênio e temperatura de 25°C, provoca uma decomposição cerca de 10% maior do que em pH 5,0 nas mesmas condições (30 min: 8% e 18%; 60 min: 14% e 24% de ácido ascórbico decomposto, respectivamente em pH 5,0 e 5,6). Isto indica que a decomposição do ácido ascórbico pelo O₂ deve ser catalisada por álcalis.

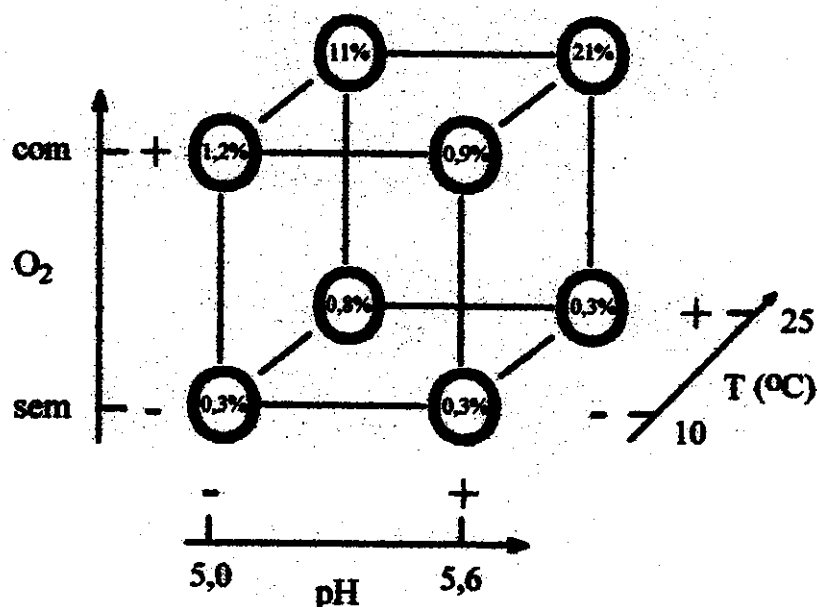


Fig. A1.1 Diagrama representativo mostrando o grau de decomposição de soluções aquosas de ácido ascórbico $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ como função do pH, O₂ e temperatura. Monitorado a 265 nm.

Tabela A1.1 Resultados obtidos na análise do planejamento fatorial 2^4 para o estudo da estabilidade das soluções aquosas de ácido ascórbico (2×10^{-4} mol L⁻¹).

	Efeito	Estimativa do Efeito
	Médio	$6,3 \pm 1,0$
Principais	O ₂	$6,5 \pm 1,2^*$
	T	$6,5 \pm 1,2$
	pH	$2,6 \pm 1,2$
	t	$1,6 \pm 1,2$
Interação de Dois Fatores	O ₂ × T	$6,5 \pm 1,2$
	pH × T	$2,6 \pm 1,2$
	pH × O ₂	$2,6 \pm 1,2$
	t × T	$1,6 \pm 1,2$
	O ₂ × t	$1,6 \pm 1,2$
	pH × t	$0,1 \pm 1,2$
Interação de Três Fatores	pH × O ₂ × T	$2,6 \pm 1,2$
	O ₂ × t × T	$1,6 \pm 1,2$
	pH × t × T	$0,1 \pm 1,2$
	pH × O ₂ × t	$0,1 \pm 1,2$
Interação de Quatro Fatores	pH × O ₂ × t × T	$0,1 \pm 1,2$

*Nível de significância nos resultados para uma confiabilidade de 95% ($t_{16} = 2,12$). É dado por: $(2,12 \times ep)$, onde ep é o erro padrão ($ep = \sqrt{V(efeito)}$) e V é a variância, $(V(efeito) = (4 / N)s^2)$; N é o número de experimentos realizados, contando as replicatas (no caso $N=23$) e s é a estimativa do desvio padrão ($s^2 = (v_1s_1^2 + \dots + v_gs_g^2) / (v_1 + \dots + v_g)^{-1}$). v_g são os graus de liberdade, sendo igual ao número de replicatas (n_g) - 1.

É importante mencionar que, evidentemente o tempo de armazenagem da solução aquosa de ácido ascórbico também influenciará na sua decomposição, contudo para os níveis escolhidos de 30 e 60 min isto não foi muito pronunciado, indicando que a cinética é lenta na ausência de catalisadores, como íons metálicos ou o pH.

A1.2 Efeito da Radiação Eletromagnética

A Fig. A1.2 apresenta o efeito da radiação eletromagnética na decomposição das soluções aquosas de ácido ascórbico em pH abaixo de dois (2).

A radiação UV catalisa a decomposição das soluções fortemente ácidas ($\text{pH} < 2$) de ácido ascórbico onde a degradação é cerca de 10% em 1 hora para uma concentração de $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Este efeito pode ser atenuado com a utilização de recipientes de vidro de borossilicato que absorvem na faixa de comprimento de onda do UV. É importante ressaltar que as soluções de ácido ascórbico preparadas em pH baixo ($\text{pH} < 2$) são bastante estáveis pelo menos num período de 1 hora, indicando que a espécie molecular do ácido ascórbico é mais estável que a dissociada, isto é, o íon ascorbato.

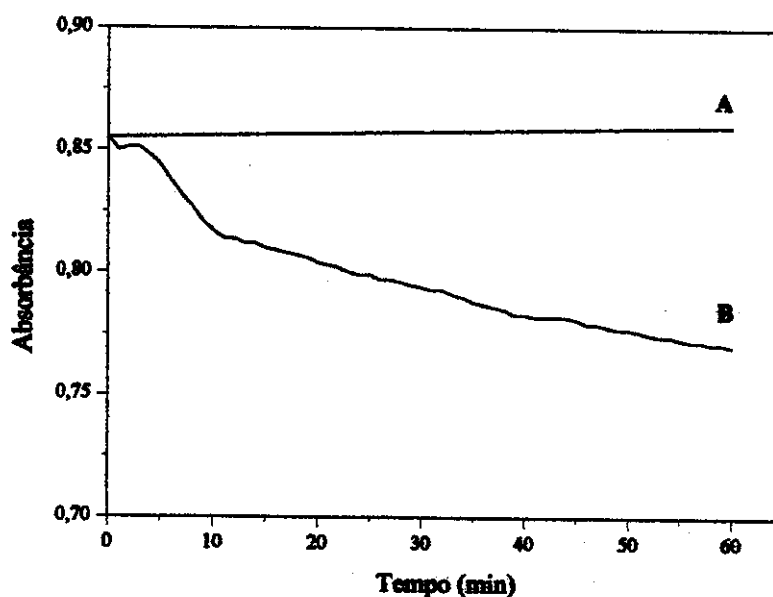


Fig. A1.2 Efeito da radiação eletromagnética na decomposição das soluções aquosas fortemente ácidas de ácido ascórbico $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Temperatura, 25°C . A. Exposição à radiação ambiente; B. Exposição à radiação UV. Monitorado a 243 nm.

A1.3 Efeito do Congelamento das Soluções

Soluções fortemente ácidas e concentradas de ácido ascórbico, quando armazenadas congeladas apresentam uma boa estabilidade. Nestas condições elas não se decompõem significativamente num período de trinta (30) dias (Fig. A1.3).

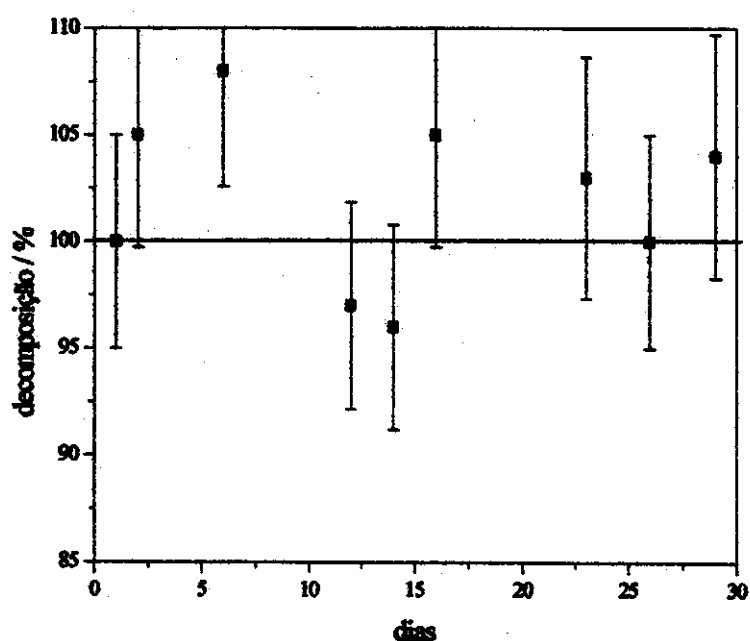


Fig. A1.3 Estabilidade das soluções aquosas de ácido ascórbico quando armazenadas congeladas. Concentração: $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, pH < 2.

Assim, pode-se concluir pelos estudos de estabilidade, que a melhor maneira de preparar os padrões e amostras de soluções aquosas de ácido ascórbico é em pH baixo (pH < 2), com água deionizada e no momento da análise.

Apêndice

2

Especificações Técnicas dos CI

A2.1 Placa de Aquisição ACL-8111^[1]

- ***Entrada Analógica (A/D):***

- Conversor: B.B. ADS574, aproximação sucessiva;
- Canais de entrada: 8 *single-ended*;
- Resolução: 12-bit;
- Ganho do Amplificador: 1, 2, 4, 8, 16 (Programável por Software);
- Faixa de entrada bipolar (Controlada por Software): $\pm 5V$; $\pm 2,5V$; $\pm 1,25V$; $\pm 0,625V$ e $\pm 0,3125V$;
- Tempo de conversão: 25 μs ;
- Proteção de sobrevoltagem: Contínua $\pm 30V$ no máximo;
- Acurácia: 0,015% de leitura ± 1 Bit LSB;
- Impedância de entrada: 10 M Ω ;
- Modo trigger: Por software, passo interno, pulso externo;
- Dados diretos: 25 KHz (máximo);

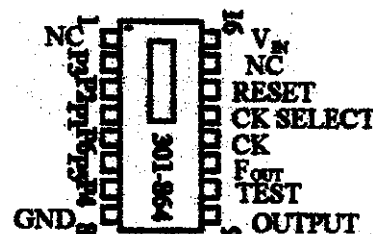
- ***Saída Analógica (D/A):***

- Canal de saída: 2 "*double-buffered*" saída analógica;
- Resolução: 12 Bit;
- Faixa de saída:
 - Referência Interna: (unipolar) 0~5V ou 0~10V
 - Referência Externa: (unipolar) max. +10V ou -10V
- Conversor: B.B. DAC7548 ou equivalente;
- Tempo estabelecido: 30 μs ;
- Linearidade: $\pm 1/2$ bit LSB;
- Corrente de saída: $\pm 5mA$ max.

- **Digital I/O (DIO):**
 - Canal: 16 TTL compatível, entrada e saída;
 - Voltagem de entrada:
 - Baixa: Min. 0V; max. 0,8V;
 - Alta: Min. $\pm 2,0$ V;
 - Carga de entrada:
 - Baixa: +0,5V@-0,2 mA max.;
 - Alta: +2,7V@+20 mA max.
 - Voltagem de saída:
 - Baixa: Min. 0V; max. 0,4V;
 - Alta: Min. $\pm 2,4$ V;
- **Contador programável:**
 - CI: 8253;
 - Passo A/D: 32-bit timer (dois contadores de 16-bit) com 2 MHz de base de tempo;
 - Passo de Saída: 0,00046 Hz ~0,5 Mhz.
- **Especificações gerais:**
 - I/O Endereço base: Localizado nos 16 consecutivos endereços;
 - Interrupção IRQ: IRQ2, ..., IRQ7 (programável por software);
 - Conector: DB 37 pinos;
 - Temperatura de operação: 0 ~50 °C;
 - Temperatura de Estocagem: 20~80 °C;
 - Umidade: 5 ~95%;
 - Consumo de energia: +5V@ 500 mA max.;
 - +12V@40 mA max.;
 - 12V@ 20 mA max.;
- **Dimensão:** 160 mm de comprimento×124 mm de largura.

A2.2 Oscilador 301-864⁽²⁾

- Um único cristal de quartzo providencia 57 diferentes frequências;
- Faixa de frequência de 0,005 Hz à 1 MHz ;
- Baixo consumo de energia;
- TTL compatível



VISTA DE TOPO

Tabela A2.1 Frequências de saída do oscilador 301-864. Unidade, Hertz (Hz).

Conjunto de programação dos terminais		P4	0	0	0	0	1	1	1	1
		P5	0	0	1	1	0	0	1	1
		P6	0	1	0	1	0	1	0	1
P1	P2	P3								
0	0	0	1M	100K	10K	1K	100	10	1	0,1
0	0	1	100K	10K	1K	100	10	1	0,1	0,01
0	0	1	500K	50K	5K	500	50	5	0,5	0,05
0	1	1	333,3K	33,3K	3,3K	333,3	33,3	3,3	0,33	0,033
1	0	0	250K	25K	2,5K	250	25	2,5	0,25	0,025
1	0	1	200K	20K	2K	200	20	2	0,2	0,02
1	1	0	166,6K	16,6K	1,6K	166,6	16,6	1,66	0,16	0,016
1	1	1	83,3K	8,3K	833,3	83,3	8,3	0,83	0,083	0,01

OUT: Frequência de saída de pulso retangular fornecida pelos terminais programados.

TEST: Estando este terminal em HI, multiplica a frequência de saída programada por 1000;

F_{OUT}: Frequência base fornecida pelo cristal interno;

CK: Clock externo de entrada;

CKSEL: Seleção do Clock. Estando este terminal em HI o divisor do contador de frequência utiliza o clock externo.

RESET: Estando este terminal em LO, apaga todos os contadores e coloca os conjuntos de saída em nível baixo.

A2.3 Chave Analógica ADG201^[3]

- V_{IN} para GND: -0,3 V, +V;
- $\pm V$ para GND: $\pm 0,3$ V, ± 17 V;

- Temperatura de operação:

AP: -55~+125 °C;

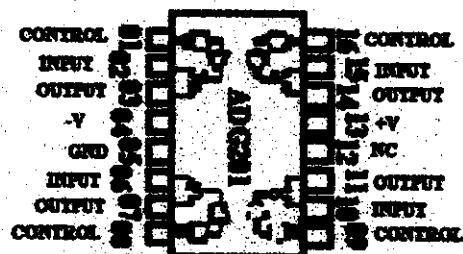
BP: -25~+85 °C;

CJ: 0~+70 °C;

- Dissipação de energia:

16 terminais, Cerâmica: 900 mW;

16 terminais, Plástico: 470 mW;



VISTA DE TOPO

Referências

- [1] Manual Multi-Function Data Acquisition Card, ADLink Technology Inc., 1995.
- [2] Catalog R. S. Components Ltd., p. 5027, 1984
- [3] CMOS Switches & Multiplexers, Vol 1, 16-33.

Apêndice

3

Software de Controle em VISUAL BASIC

A3.1 Código do Arquivo *.frm (Form1)

'Endereço da Interface ACL-8111, o default I/O address é 220-22F em Hexadecimal (vide Manual Multi-Function Data Acquisition Card), pg 9 e 17.

```
Const counter0% = 544 '220 Hexadecimal = Base + 0
Read/Write
Const counter1% = 545 '221 Hexadecimal = Base + 1
Read/Write
Const Counter2% = 546 '222 Hexadecimal = Base + 2
Read/Write
Const CounterControl% = 547 '223 Hexadecimal = Base + 3
Read: not used/Write
Const ByteLSB% = 548 '224 Hexadecimal = Base + 4
Read: A/D low byte/Write D/A low byte (LSB: Least Significant Bit)
Const ByteMSB% = 549 '225 Hexadecimal = Base + 5
Read: A/D high byte/Write D/A high byte (MSB: Most Significant Bit)
Const DigitalInputLSB% = 550 '226 Hexadecimal = Base + 6
Read: DI low byte/Write: not used
Const DigitalInputMSB% = 551 '227 Hexadecimal = Base + 7
Read: DI high byte/Write: not used
Const ClearInterrupt% = 552 '228 Hexadecimal = Base + 8
Read: not used/Write: Clear Interrupt Request
Const GainControl% = 553 '229 Hexadecimal = Base + 9
Read: not used/Write: Gain Control
Const MultScanControl% = 554 '22A Hexadecimal = Base + 10
Read: not used/Write: Multiplexer Scan Control
Const InterruptControl% = 555 '22B Hexadecimal = Base + 11
Read: not used/Write: Mode Control
Const ADTrigger% = 556 '22C Hexadecimal = Base + 12
Read: not used/Write: Software A/D trigger
'O Controle do agitador pelo cristal oscilador estão nos 7 dígitos LSB da interface no canal OUT
Const DigitalOutputLSB% = 557 '22D Hexadecimal = Base + 13
Read: not used/Write: DO low byte
'O Controle da chave analógica ADG201 está nos 4 dígitos
```

MSB da interface no canal OUT

```
Const DigitalOutputMSB% = 558 '22E Hexadecimal = Base + 14
Read: not used/Write: DO high byte
```

```
Public Sub Form_Load()
ChDir "c:\windows\"
Open "analysis.ini" For Input As #1
Do While Not EOF(1)
For n = 1 To NumberVariable
Line Input #1, FileName
Text1(n).Text = FileName
Next n
Loop
Close #1
```

'Calibração

'Os comandos a seguir foram definidos na Private Declare Function e Sub, e são comandos da linguagem BASIC (vide Manual Multi-Function Data Acquisition Card), pg 35-37.

'Seleciona o canal 0 de entrada analógica

```
OUT MultScanControl%, 0 'Canal 0 é LSB, pg 19 (Data Acquisition Card)
```

'Seleciona ganho da placa de aquisição, isto é, qual a faixa máxima de potencial de leitura

```
OUT GainControl%, 2 'Ganho x4, +/- 1.25 V, pg 20 (Data Acquisition Card)
```

'Seleciona mode trigger por software

```
OUT ADTrigger%, 1
```

'Coloca a saída digital MSB da placa de aquisição em estado alto

```
OUT DigitalOutputMSB%, 15 'O valor 15 (2^3+2^2+2^1+2^0), levanta os 4 primeiros bits da saída MSB da placa de aquisição para 4,5 V, onde estão conectados os 4 control da chave analógica.
```

'Apresentação Default da Interface Gráfica do Programa de Aquisição

```
mmuFileNew.Enabled = False
mmuFileOpen.Enabled = True
mmuFileSave.Enabled = False
mmuFileExit.Enabled = True
mmuEdit.Enabled = False
mmuOption.Enabled = True
mmuControl.Enabled = False
mmuHelp.Enabled = True
SampTime% = Text1(1).Text
Duration% = Text1(2).Text
Period# = Text1(3).Text
Average% = Text1(4).Text
Emin% = Text1(5).Text
Emax% = Text1(6).Text
Temperature% = Text1(7).Text 'É só apresentação, não é
                              controlado pela placa de aquisição
StirrerRate% = Text1(8).Text
InjDist% = Text1(9).Text 'É só apresentação, não é
                           controlado pela placa de aquisição
InjVol# = Text1(10).Text 'É só apresentação, não é
                           controlado pela placa de aquisição
FlowRate# = Text1(11).Text 'É só apresentação, não é
                             controlado pela placa de aquisição
Text4.Text = "Electrode(A)"
Text5.Text = "Electrode(B)"
Text6.Text = "Electrode(C)"
Text7.Text = "Electrode(D)"
Frame1.Caption = Text4.Text
Frame2.Caption = Text5.Text
Frame3.Caption = Text6.Text
Frame4.Caption = Text7.Text
```

```
For n = 0 To 3
    Option1(n).Value = False
    Label31(n) = Text1(2)
    Label32(n) = Text1(5)
    Label34(n) = Text1(6)
    Picture1(n).Cls
    Text2(n).Text = ""
Next n
```

```
Text3.Text = ""
Check1.Enabled = True
Check2.Enabled = True
Check3.Enabled = True
```

```
Check4.Enabled = True
Check1.Value = 0
Check2.Value = 0
Check3.Value = 0
Check4.Value = 0
```

```
SSCommand2.Enabled = True
SSCommand6.Enabled = False
SSCommand7.Enabled = False
SSCommand8.Enabled = False
```

```
Option5.Enabled = False
Option6.Enabled = False
Option5.Value = False
Option6.Value = False
```

```
SpinButton1.Enabled = False 'Controle do Tempo de
                              Amostragem
SpinButton2.Enabled = False 'Controle de Duração da
                              análise
SpinButton3.Enabled = False 'Controle do Período de
                              aquisição
SpinButton4.Enabled = False 'Controle da média de pontos
                              de cada leitura do A/D
SpinButton5.Enabled = False 'Controle do Potencial
                              mínimo
SpinButton6.Enabled = False 'Controle do Potencial
                              máximo
SpinButton7.Enabled = False 'Apresentação da
                              Temperatura de análise
SpinButton8.Enabled = False 'Controle da Velocidade de
                              Agitação
```

```
Combo1.Enabled = False 'Apresentação da Velocidade
                          de Injeção
Combo1.Clear
VelocidadeInjecao(0) = "High/1.0"
VelocidadeInjecao(1) = "Medium/0.8"
VelocidadeInjecao(2) = "Low/0.6"
```

```
For m = 0 To 2
    Combo1.AddItem VelocidadeInjecao(m)
Next m
```

```
Combo1.ListIndex = 0
SpinButton9.Enabled = False 'Apresentação da distância
                              do injetor ao sensor
```

```
SpinButton10.Enabled = False 'Apresentação do volume
de injeção
SpinButton11.Enabled = False 'Apresentação da vazão da
bomba peristáltica
End Sub
```

```
Private Sub mnuFileNew_Click()
    MenuNew
End Sub
```

```
Private Sub SSCommand1_Click()
    MenuNew
End Sub
```

```
Private Sub mnuFileOpen_Click()
    MenuOpen
End Sub
```

```
Private Sub SSCommand2_Click()
    MenuOpen
End Sub
```

```
Private Sub mnuFileSave_Click()
    MenuSave
End Sub
```

```
Private Sub SSCommand3_Click()
    MenuSave
End Sub
```

```
Private Sub mnuFileExit_Click()
    response = MsgBox("Did you already save the
Analysis?", MB_YESNO + MB_ICONQUESTION +
MB_DEFBUTTON2, "Message")
    If response = IDNO Then MenuSave
End
End Sub
```

```
Private Sub mnuEditCopy_Click()
    MenuCopy
End Sub
```

```
Private Sub SSCommand4_Click()
    MenuCopy
End Sub
```

```
Private Sub Picture1_Click(Index As Integer) 'Habilita a
Picture para ser copiada para o Clipboard
```

```
Form1.mnuEditCopy.Enabled = True
SSCommand4.Enabled = True
mnuEdit.Enabled = True
End Sub
```

```
Public Sub MenuNew()
    response = MsgBox("Do you have a dead certainty that to
want a new Analysis?", MB_YESNO +
MB_ICONQUESTION+MB_DEFBUTTON2, "Message")
    If response = IDNO Then Exit Sub
    'Clear todas as variáveis
    For n = 1 To NumberVariavel Step 1 'NumberVariavel,
    é o número de variáveis do programa
        Text1(n).Text = ""
    Next n
    'Nome da variável inicial da barra do título:Untitled"
    FileName = "UNTITLED"
    Form1.Caption = "Potentiometric Analysis: " +
    FileName
    Form_Load
End Sub
```

```
Public Sub MenuOpen()
    'Rotina para a detectar o botão Cancel
    On Error GoTo CancelErro
    'Filtro default
    CommonDialog1.Filter = "POT Files (*.pot)*.pot"
    'Mostra a caixa de diálogo
    CommonDialog1.ShowOpen
    FileName = CommonDialog1.FileName
    FileName = UCase(FileName)
    'Evita abrir o arquivo já existente
    If "Potentiometric Analysis: " + FileName =
    Form1.Caption Then
        response = MsgBox("File already Open!", 0 + 48,
"Message")
        Exit Sub
    End If
```

```
'Chama o procedimento AbrirFile
AbrirFile (FileName)
Check1.Value = Cheque1
Check2.Value = Cheque2
Check3.Value = Cheque3
Check4.Value = Cheque4
Option5.Value = Valor5
Option6.Value = Valor6
Text4.Text = Text04
```

```

Text5.Text = Texto5
Text6.Text = Texto6
Text7.Text = Texto7
Text1(1).Text = Amostragem
Text1(2).Text = Duracao
Text1(3).Text = Período
Text1(4).Text = Média
Text1(5).Text = PotencialMin
Text1(6).Text = PotencialMax
Text1(7).Text = Temperatura
Text1(8).Text = VelocidadeAgitacao
Combo1.Text = VelocidadeInjecao(0)
Text1(9).Text = InjetorDistancia
Text1(10).Text = VolumeInjecao
Text1(11).Text = Vazao
Frame1.Caption = Text4.Text
Frame2.Caption = Text5.Text
Frame3.Caption = Text6.Text
Frame4.Caption = Text7.Text

For n = 0 To 3
    Label31(n) = Text1(2)
    Label32(n) = Text1(5)
    Label34(n) = Text1(6)
    Picture1(n).Scale (Tmin, PotencialMax)-(Duracao * 60,
PotencialMin) 'O fator 60 converte para segundos
    Picture1(n).Cls
Next n

For j = 1 To Contador% - 1
    Picture1(0).Line (TempoA(j - 1), PotencialA(j - 1))-
(TempoA(j), PotencialA(j))
Next j

For j = 1 To Contador% - 1
    Picture1(1).Line (TempoB(j - 1), PotencialB(j - 1))-
(TempoB(j), PotencialB(j))
Next j

For j = 1 To Contador% - 1
    Picture1(2).Line (TempoC(j - 1), PotencialC(j - 1))-
(TempoC(j), PotencialC(j))
Next j

For j = 1 To Contador% - 1
    Picture1(3).Line (TempoD(j - 1), PotencialD(j - 1))-
(TempoD(j), PotencialD(j))
Next j

```

```

CancelError: Exit Sub 'Usuário pressionou o botão Cancel
End Sub

Public Sub MenuSave()
Dim Arquivo, extensao As String
'Rotina para a detectar o botão Cancel
On Error GoTo CancelError
'Conjunto de Filtros, especifica a extensão dos arquivos a
serem apresentados na caixa de diálogo do programa
CommonDialog1.Filter = "POT Files (*.pot)*.pot|ASC
Files(*.dat)*.dat"
'Especifica o Filtro default
CommonDialog1.FilterIndex = 1
'Mostra a caixa de diálogo
CommonDialog1.ShowSave
'Apresenta o nome do arquivo
Arquivo = CommonDialog1.FileName
'Estabelece a extensão que o arquivo foi salvo
extensao = Right(Arquivo, 3)
'Apresenta o nome do arquivo com o diretório ou lugar em
que foi salvo
FileName = CommonDialog1.FileName
If extensao = ".pot" Then FecharFilePOT (FileName) Else
FecharFileASC (FileName)
'Usuário pressionou o botão Cancel
CancelError: Exit Sub
End Sub

Public Sub MenuCopy()
Clipboard.Clear
Clipboard.SetData Screen.ActiveControl.Picture
mnuEdit.Enabled = False
mnuCopy.Enabled = False
End Sub

Private Sub mnuOptionCalibration_Click()
response = MsgBox("This procedure can to take some
seconds. Please wait!", 0 + 48, "Message")
Form1.MousePointer = 11
Calibracao
NumeroCiclos_ms = Format$(Factor#, "#0.00")
response = MsgBox("This computer run " &
NumeroCiclos_ms & " cycles/ms", 0 + 48, "Message")
Form1.MousePointer = 0
End Sub

Private Sub Check1_Click()
Option5.Enabled = True

```

```
Option6.Enabled = True
```

```
mnuOption = True
```

```
End Sub
```

```
Private Sub Check2_Click()
```

```
    If Check1.Value = False Then
```

```
        Beep
```

```
        Check2.Value = False
```

```
    End If
```

```
End Sub
```

```
Private Sub Check3_Click()
```

```
    If Check1.Value = False Or Check2.Value = False Then
```

```
        Beep
```

```
        Check3.Value = False
```

```
    End If
```

```
End Sub
```

```
Private Sub Check4_Click()
```

```
    If Check1.Value = False Or Check2.Value = False Or  
    Check3.Value = False Then
```

```
        Beep
```

```
        Check4.Value = False
```

```
    End If
```

```
End Sub
```

```
Private Sub mnuOptionInjectionManual_Click() 'Seleciona  
a injeção como sequencial pelo Menu
```

```
    SeleccionaInjecaoManual
```

```
    Option5.Value = True
```

```
End Sub
```

```
Private Sub Option5_Click() 'Seleciona a injeção como  
sequencial pelo comando de opção
```

```
    SeleccionaInjecaoManual
```

```
End Sub
```

```
Public Sub SeleccionaInjecaoManual()
```

```
    EscolhaEletrodo
```

```
    Option6.Enabled = False
```

```
    mnuOptionInjectionAutomatic.Enabled = False
```

```
    HabilitaComandos
```

```
End Sub
```

```
Private Sub mnuOptionInjectionAutomatic_Click()
```

```
'Seleciona a injeção como automática pelo Menu
```

```
    SeleccionaInjecaoAutomatic
```

```
    Option6.Value = True
```

```
End Sub
```

```
Private Sub Option6_Click() 'Seleciona a injeção como  
automática pelo comando de opção
```

```
    SeleccionaInjecaoAutomatic
```

```
End Sub
```

```
Public Sub SeleccionaInjecaoAutomatic()
```

```
    EscolhaEletrodo
```

```
    Option5.Enabled = False
```

```
    mnuOptionInjectionManual.Enabled = False
```

```
    HabilitaComandos
```

```
End Sub
```

```
Public Sub EscolhaEletrodo()
```

```
    Select Case Value = 0
```

```
        Case Check1.Value = 1 And Check2.Value = 0 And  
        Check3.Value = 0 And Check4.Value = 0
```

```
            NumberElectrodeInicial% = 0
```

```
            NumberElectrodeFinal% = 0
```

```
        Case Check1.Value = 1 And Check2.Value = 1 And  
        Check3.Value = 0 And Check4.Value = 0
```

```
            NumberElectrodeInicial% = 0
```

```
            NumberElectrodeFinal% = 1
```

```
        Case Check1.Value = 1 And Check2.Value = 1 And  
        Check3.Value = 1 And Check4.Value = 0
```

```
            NumberElectrodeInicial% = 0
```

```
            NumberElectrodeFinal% = 2
```

```
        Case Check1.Value = 1 And Check2.Value = 1 And  
        Check3.Value = 1 And Check4.Value = 1
```

```
            NumberElectrodeInicial% = 0
```

```
            NumberElectrodeFinal% = 3
```

```
    End Select
```

```
End Sub
```

```
Public Sub HabilitaComandos() 'no Menu
```

```
    mnuFileNew.Enabled = True 'Habilita o New Analysis
```

```
    mnuFileOpen.Enabled = False
```

```
    mnuControl.Enabled = True 'Habilita o Control
```

```
    SSCommand1.Enabled = True 'Habilita o New Analysis  
no botão de comando
```

```
    SSCommand2.Enabled = False
```

```
    SSCommand6.Enabled = True 'Habilita o comando de  
partir análise
```

```
    SSCommand7.Enabled = True 'Habilita o comando de  
pause análise, mantendo o agitador funcionando
```

```
    SSCommand8.Enabled = True 'Habilita o comando de  
parar completamente a análise
```

```
SpinButton1.Enabled = True 'Habilita o tempo de amostragem
```

```
SpinButton2.Enabled = True 'Habilita a duração da análise
```

```
SpinButton3.Enabled = True 'Habilita o período de aquisição
```

```
SpinButton4.Enabled = True 'Habilita a média de pontos entre cada leitura do A/D
```

```
SpinButton5.Enabled = True 'Habilita a escala mínima de potencial o valor de distância injetor-eletrodo no BIA, apenas para apresentação, não tem função na Interface de aquisição
```

```
SpinButton6.Enabled = True 'Habilita a escala máxima de potencial
```

```
SpinButton7.Enabled = True 'Habilita a temperatura de análise
```

```
SpinButton8.Enabled = True 'Habilita a velocidade de agitação
```

```
Combo1.Enabled = True 'Habilita a escolha da velocidade de injeção
```

```
SpinButton9.Enabled = True 'Habilita a distância do injetor ao sensor
```

```
SpinButton10.Enabled = True 'Habilita o volume de injeção
```

```
SpinButton11.Enabled = True 'Habilita a vazão da bomba peristáltica
```

```
End Sub
```

```
Private Sub Text4_Change()  
Frame1.Caption = Text4.Text  
End Sub
```

```
Private Sub Text5_Change()  
Frame2.Caption = Text5.Text  
End Sub
```

```
Private Sub Text6_Change()  
Frame3.Caption = Text6.Text  
End Sub
```

```
Private Sub Text7_Change()  
Frame4.Caption = Text7.Text  
End Sub
```

```
Private Sub mnuGo_Click() 'Comando para partir a análise pelo Menu  
GoAnalysis  
End Sub
```

```
Private Sub SSCommand6_Click() 'Comando para partir a análise pelo botão 3D
```

```
GoAnalysis  
End Sub
```

```
Public Sub GoAnalysis() 'Rotina de aquisição de dados  
mnuOption.Enabled = False 'Desabilita o Menu Opções  
mnuControlDataAcquisitionGo.Enabled = False 'Desabilita o partir análise no Menu Control
```

```
SSCommand6.Enabled = False 'Desabilita o comando de partir análise
```

```
SpinButton1.Enabled = False 'Desabilita o tempo de amostragem
```

```
SpinButton2.Enabled = False 'Desabilita a duração da análise
```

```
SpinButton3.Enabled = False 'Desabilita o período de aquisição
```

```
SpinButton4.Enabled = False 'Desabilita a média de pontos entre cada leitura do A/D
```

```
Combo1.Enabled = False 'Desabilita a escolha da velocidade de injeção
```

```
SpinButton5.Enabled = False 'Desabilita a escala mínima de potencial o valor de distância injetor-eletrodo no BIA, apenas para apresentação;
```

```
SpinButton6.Enabled = False 'Desabilita a escala máxima de potencial
```

```
SpinButton7.Enabled = False 'Desabilita a temperatura de análise
```

```
SpinButton8.Enabled = False 'Desabilita a velocidade de agitação
```

```
SpinButton9.Enabled = False 'Desabilita a distância do injetor ao sensor
```

```
SpinButton10.Enabled = False 'Desabilita o volume de injeção
```

```
SpinButton11.Enabled = False 'Desabilita a vazão da bomba peristáltica
```

```
For n = 0 To 3
```

```
Picture1(n).Scale (Tmin, Emax%)-(Duration% * 60, Emin%) 'O fator 60 converte para segundos
```

```
Picture1(n).Cls
```

```
Next n
```

```
Check1.Enabled = False
```

```
Check2.Enabled = False
```

```
Check3.Enabled = False
```

```
Check4.Enabled = False
```

```
SelecionarAgitador
```



```

StirrerRate% = Format$(StirrerRate%, "#0")
OUT DigitalOutputLSB%, StirrerRate% 'Aciona o
agitador
LimpaArquivoBackup 'Subrotina do module1 para limpar
o arquivo de backup
Cont% = 0
TempoInicial = Timer
Temporizador% = 0
'Número de pontos de leitura a serem realizados pela placa
de aquisição Duration%*60
While Temporizador% < Duration% * 60 'O fator 60 é
para transformar a duração da análise em segundos
DoEvents
    If SSCommand7.Enabled = False Or
    SSCommand8.Enabled = False Or
    mnuControlDataAcquisitionPause.Checked = True Or
    mnuControlDataAcquisitionStop.Checked = True Then Exit
    Sub
For NumberElectrode% = NumberElectrodeInicial% To
NumberElectrodeFinal%
    Option1(NumberElectrode%).Enabled = True
    OUT DigitalOutputMSB%, (15 - 2 ^
NumberElectrode%) 'A chave analógica lê os eletrodos que
estão em estado baixo (Potencial no Control =0), por isto o
valor 15 para levantar três eletrodos sucessivamente
    Option1(NumberElectrode%).Value = True 'Indica
quais eletrodos estão habilitados para leitura de seu
potencial, na sequência A, B, C e D
    SSPanel1.BackColor = &HFF00& 'Apresenta cor
verde disponibilizando a injeção
    SSPanel1.Caption = "ACQUISITION ENABLED"
    SomaPotencial# = 0
For m = 1 To Average% 'Para cada ponto de leitura da placa
de aquisição é obtido uma média definida pelo usuário
    ValorPotencial# = 0
    OUT MultScanControl%, 0
    'Início de conversão
    OUT ADTrigger%, 0 'Verifica o final da conversão
(DRDY). Quando zero o final de conversão está completo.
Como é o 5 bit do A/D high byte que determina o fim de
conversão temos 2^4 igual a 16 (vide Manual Multi-Function
Data Acquisition Card), pg 18.
    While (HighByte% And 16) > 0
        HighByte% = INP(ByteMSB%)
    Wend
    'tempoleitura = Timer

```

```

' While Timer - tempoleitura < CicloCorrigido_60Hz:
Wend

```

```

For j = 1 To 15: Next j 'Atrase as medidas para corrigir
ruído de 60 Hz

```

```

HighByte% = INP(ByteMSB%)

```

```

LowByte% = INP(ByteLSB%)

```

Esta é uma placa de aquisição de 12 Bits, num Slot de 8Bits, então é lido primeiro os 8 Low byte data e depois os 4 High byte data,

'então para converter o valor obtido em decimal, é necessário adicionar o valor do ByteLSB ao do ByteMSB*256, p.q. $2^8=256$.

'Como a placa é de 12 Bits, o valor mais alto que ela assume é 2^{12} (4096), no caso do ganho estipulado como +/- 1,25 V o valor +1,25 V vale 4095, o valor zero de potencial vale 2047,

'e o valor -1,25 V zero bytes. Então a escala total 2,5 V assume 4095 bytes (Por causa que é de zero até 4095 = 4096), cujo fator de correção será 2500 mV/4096 igual a 0,61035.

```

ValorPotencial# = ((LowByte% + (HighByte% *
256)) - 2047) * 0.6105

```

```

FormatoNumero = Format$(ValorPotencial#, "#0.#0")

```

```

SomaPotencial# = (SomaPotencial# + ValorPotencial#)

```

```

Next m

```

```

PotencialMedio(Cont%) = SomaPotencial# / Average%

```

```

Tempo(Cont%) = Timer - TempoInicial

```

```

Temporizador% = Tempo(Cont%)

```

```

Text3.Text = Format$(Tempo(Cont%) / 60, "#0.#0")

```

```

Select Case Value = False

```

```

Case Option1(0).Value = True

```

```

PlotElectrodeA

```

```

Case Option1(1).Value = True

```

```

PlotElectrodeB

```

```

Case Option1(2).Value = True

```

```

PlotElectrodeC

```

```

Case Option1(3).Value = True

```

```

PlotElectrodeD

```

```

End Select

```

```

TempoFinal_0 = Timer

```

```

While Timer - TempoFinal_0 < Period# /
(NumberElectrode% + 1): Wend 'Tempo de espera entre as
leitur

```

```

If mnuOptionInjectionAutomatic.Checked = True Or
Option6.Value = True Then

```

```

TempoFinal_1 = Timer

```

```

Beep

```

```

While Timer - TempoFinal_1 < SempTime% Para
e aquisição de dados para nova amostragem
    DoEvents
    OUT DigitalOutputMSB%, 15
    SSPanel1.BackColor = &HFF& 'Apresenta
cor vermelha indisponibilizando a injeção
    SSPanel1.Caption = "ACQUISITION DISABLED"
    Wend
End If
Next NumberElectrode%
Wend
PararAquisicao
End Sub

```

```

Public Sub PlotElectrodeA()
    ContElectrodeA% = Cont%
    TempoElectrodeA(ContElectrodeA%) = Tempo(Cont%)
    PotencialElectrodeA(ContElectrodeA%) =
PotencialMedio(Cont%)
    Text2(0).Text =
Format$(PotencialElectrodeA(ContElectrodeA%), "##0.##0")
    If ContElectrodeA% > 1 Then
        Picture1(0).Line
(TempoElectrodeA(ContElectrodeA% - 1),
PotencialElectrodeA(ContElectrodeA% - 1))-
(TempoElectrodeA(ContElectrodeA%),
PotencialElectrodeA(ContElectrodeA%))
    End If
    If Check1.Value = 1 And Check2.Value = 0 And
Check3.Value = 0 And Check4.Value = 0 Then
        Cont% = Cont% + 1
        Backup
    End If
End Sub

```

```

Public Sub PlotElectrodeB()
    ContElectrodeB% = Cont%
    TempoElectrodeB(ContElectrodeB%) = Tempo(Cont%)
    PotencialElectrodeB(ContElectrodeB%) =
PotencialMedio(Cont%)
    Text2(1).Text =
Format$(PotencialElectrodeB(ContElectrodeB%), "##0.##0")
    If ContElectrodeB% > 1 Then
        Picture1(1).Line
(TempoElectrodeB(ContElectrodeB% - 1),
PotencialElectrodeB(ContElectrodeB% - 1))-
(TempoElectrodeB(ContElectrodeB%),
PotencialElectrodeB(ContElectrodeB%))
    End If

```

```

End If
    If Check1.Value = 1 And Check2.Value = 1 And
Check3.Value = 0 And Check4.Value = 0 Then
        Cont% = Cont% + 1
        Backup
    End If
End Sub

```

```

Public Sub PlotElectrodeC()
    ContElectrodeC% = Cont%
    TempoElectrodeC(ContElectrodeC%) = Tempo(Cont%)
    PotencialElectrodeC(ContElectrodeC%) =
PotencialMedio(Cont%)
    Text2(2).Text =
Format$(PotencialElectrodeC(ContElectrodeC%), "##0.##0")
    If ContElectrodeC% > 1 Then
        Picture1(2).Line
(TempoElectrodeC(ContElectrodeC% - 1),
PotencialElectrodeC(ContElectrodeC% - 1))-
(TempoElectrodeC(ContElectrodeC%),
PotencialElectrodeC(ContElectrodeC%))
    End If
    If Check1.Value = 1 And Check2.Value = 1 And
Check3.Value = 1 And Check4.Value = 0 Then
        Cont% = Cont% + 1
        Backup
    End If
End Sub

```

```

Public Sub PlotElectrodeD()
    ContElectrodeD% = Cont%
    TempoElectrodeD(ContElectrodeD%) = Tempo(Cont%)
    PotencialElectrodeD(ContElectrodeD%) =
PotencialMedio(Cont%)
    Text2(3).Text =
Format$(PotencialElectrodeD(ContElectrodeD%), "##0.##0")
    If ContElectrodeD% > 1 Then
        Picture1(3).Line
(TempoElectrodeD(ContElectrodeD% - 1),
PotencialElectrodeD(ContElectrodeD% - 1))-
(TempoElectrodeD(ContElectrodeD%),
PotencialElectrodeD(ContElectrodeD%))
    End If
    If Check1.Value = 1 And Check2.Value = 1 And
Check3.Value = 1 And Check4.Value = 1 Then
        Cont% = Cont% + 1
        Backup
    End If
End Sub

```

```

End If
End Sub

Private Sub mnuControlDataAcquisitionPause_Click()
    Pause Aquisição, mantendo agitador acionado, pelo Menu
    TempoFinal_1 = Timer
    Beep
    While Timer - TempoFinal_1 < SampTime% 'Para
a aquisição de dados para nova amostragem
        DoEvents
        OUT DigitalOutputMSB%, 15
        SSPanel1.BackColor = &HFF& 'Apresenta
cor vermelha indisponibilizando a injeção
        SSPanel1.Caption = "ACQUISITION DISABLED"
    Wend
End Sub

Private Sub SSCommand7_Click() 'Pause Aquisição,
mantendo agitador acionado, pelo botão
    TempoFinal_1 = Timer
    Beep
    While Timer - TempoFinal_1 < SampTime% 'Para
a aquisição de dados para nova amostragem
        DoEvents
        OUT DigitalOutputMSB%, 15
        SSPanel1.BackColor = &HFF& 'Apresenta
cor vermelha indisponibilizando a injeção
        SSPanel1.Caption = "ACQUISITION DISABLED"
    Wend
End Sub

Private Sub mnuControlDataAcquisitionStop_Click()
    Para Aquisição completamente, pelo Menu
    PararAquisicao
    mnuControlDataAcquisitionStop.Enabled = False
    SSCommand8.Enabled = False
    OUT DigitalOutputLSB%, 0
End Sub

Private Sub SSCommand8_Click() 'Para Aquisição
completamente, pelo botão
    PararAquisicao
    mnuControlDataAcquisitionStop.Enabled = False
    SSCommand8.Enabled = False
    OUT DigitalOutputLSB%, 0
End Sub

Public Sub PararAquisicao() 'Rotina de parar a Aquisição
de dados
    OUT DigitalOutputMSB%, 15
    'Transferência de valores para variáveis a fim de salvar o
arquivo em formato *.bia
    Valor5 = Option5.Value
    Valor6 = Option6.Value
    Texto4 = Text4.Text
    Texto5 = Text5.Text
    Texto6 = Text6.Text
    Texto7 = Text7.Text
    Cheque1 = Check1.Value
    Cheque2 = Check2.Value
    Cheque3 = Check3.Value
    Cheque4 = Check4.Value
    For n = 0 To 3
        Option1(n).Enabled = False
    Next n
    SSPanel1.Caption = "ACQUISITION DISABLED"
    SSPanel1.BackColor = &HFF& 'Apresenta cor
vermelha indisponibilizando a injeção
    mnuFileNew.Enabled = True
    mnuFileOpen.Enabled = False
    mnuFileSave.Enabled = True
    mnuControlDataAcquisitionPause.Enabled = False
    SSCommand1.Enabled = True
    SSCommand2.Enabled = False
    SSCommand3.Enabled = True
    SSCommand6.Enabled = True
    SSCommand7.Enabled = False
    SSCommand9.Enabled = True
    Option5.Enabled = False
    Option6.Enabled = False
    SpinButton1.Enabled = False 'Controle do Tempo de
Amostragem
    SpinButton2.Enabled = False 'Controle de Duração da
análise
    SpinButton3.Enabled = False 'Controle do Período de
aquisição
    SpinButton4.Enabled = False 'Controle da média de
pontos de cada leitura de A/D
    SpinButton5.Enabled = False 'Controle de Potencial
mínimo
    SpinButton6.Enabled = False 'Controle de Potencial
máximo
    SpinButton7.Enabled = False 'Desabilita a temperatura
de análise
    SpinButton8.Enabled = False 'Desabilita a velocidade de
agitação
    Combo1.Enabled = False 'Apresentação da Velocidade de

```

Injeção

```

Combo1.Text = VelocidadeInjecao(0)
SpinButton9.Enabled = False 'Desabilita a distância do
injetor ao sensor
SpinButton10.Enabled = False 'Desabilita o volume de
injeção
SpinButton11.Enabled = False 'Desabilita a vazão da
bomba peristáltica
End Sub

```

'Controle do Tempo de Amostragem

```

Private Sub SpinButton1_SpinDown()
    SampTime% = Val(Text1(1).Text)
    SampTime% = SampTime% - 5
    If SampTime% < 5 Then
        SampTime% = 5
        Beep
    End If
    Text1(1).Text = SampTime%
End Sub

```

```

Private Sub SpinButton1_SpinUp()
    SampTime% = Val(Text1(1).Text)
    SampTime% = SampTime% + 5
    If SampTime% > 120 Then
        SampTime% = 120
        Beep
    End If
    Text1(1).Text = SampTime%
End Sub

```

'Controle da duração (tempo máximo) de análise

```

Private Sub SpinButton2_SpinDown()
    Duration% = Val(Text1(2).Text)
    Duration% = Duration% - 5
    If Duration% < 10 Or Duration% = 10 Then
        Duration% = 10
        Beep
    End If
    Text1(2).Text = Duration%
    For n = 0 To 3
        Label31(n) = Duration%
    Next n
End Sub

```

Private Sub SpinButton2_SpinUp()

```

    Duration% = Val(Text1(2).Text)
    Duration% = Duration% + 5
    If Duration% > 120 Then

```

```

        Duration% = 120

```

```

        Beep

```

```

    End If

```

```

    Text1(2).Text = Duration%

```

```

    For n = 0 To 3

```

```

        Label31(n) = Duration%

```

```

    Next n

```

```

End Sub

```

'Controle do Período de aquisição

```

Private Sub SpinButton3_SpinDown()
    Period# = Val(Text1(3).Text)
    Period# = Period# - 0.01
    If Period# < 0.1 Then
        Period# = 0.1
        Beep
    End If
    Text1(3).Text = Period#
End Sub

```

Private Sub SpinButton3_SpinUp()

```

    Period# = Val(Text1(3).Text)
    Period# = Period# + 0.01
    If Period# > 1 Then
        Period# = 1
        Beep
    End If
    Text1(3).Text = Period#
End Sub

```

'Controle da média de pontos entre cada leitura do A/D

```

Private Sub SpinButton4_SpinDown()
    Average% = Val(Text1(4).Text)
    Average% = Average% - 5
    If Average% < 5 Then
        Average% = 5
        Beep
    End If
    Text1(4).Text = Average%
End Sub

```

Private Sub SpinButton4_SpinUp()

```

    Average% = Val(Text1(4).Text)
    Average% = Average% + 5
    If Average% > 100 Then
        Average% = 100
        Beep
    End If

```

```

Text1(4).Text = Average%
End Sub

'Controle do Potencial mínimo

Private Sub SpinButton5_SpinDown()
    Emin% = Val(Text1(5).Text)
    Emin% = Emin% - 50
    If Emin% < -1250 Then
        Emin% = -1250
        Beep
    End If
    Text1(5).Text = Emin%
    For n = 0 To 3
        Label32(n) = Emin%
    Next n
End Sub

Private Sub SpinButton5_SpinUp()
    Emin% = Val(Text1(5).Text)
    Emin% = Emin% + 50
    If Emin% > 0 Then
        Emin% = 0
        Beep
    End If
    Text1(5).Text = Emin%
    For n = 0 To 3
        Label32(n) = Emin%
    Next n
End Sub

'Controle do Potencial máximo
Private Sub SpinButton6_SpinDown()
    Emax% = Val(Text1(6).Text)
    Emax% = Emax% - 50
    If Emax% < 0 Or Emax% = 0 Then
        Emax% = 50
        Beep
    End If
    Text1(6).Text = Emax%
    For n = 0 To 3
        Label34(n) = Emax%
    Next n
End Sub

Private Sub SpinButton6_SpinUp()
    Emax% = Val(Text1(6).Text)
    Emax% = Emax% + 50
    If Emax% > 1250 Then
        Emax% = 1250
        Beep
    End If
    Text1(6).Text = Emax%
    For n = 0 To 3
        Label34(n) = Emax%
    Next n
End Sub

'Apresentação da Temperatura de análise
Private Sub SpinButton7_SpinDown()
    Temperature% = Val(Text1(7).Text)
    Temperature% = Temperature% - 1
    If Temperature% < -5 Then
        Temperature% = -5
        Beep
    End If
    Text1(7).Text = Temperature%
End Sub

Private Sub SpinButton7_SpinUp()
    Temperature% = Val(Text1(7).Text)
    Temperature% = Temperature% + 1
    If Temperature% > 50 Then
        Temperature% = 50
        Beep
    End If
    Text1(7).Text = Temperature%
End Sub

'Controle da Velocidade de Agitação
Private Sub SpinButton8_SpinDown()
    StirrerRate% = Val(Text1(8).Text)
    StirrerRate% = StirrerRate% - 100
    If StirrerRate% < 100 Or StirrerRate% = 100 Then
        StirrerRate% = 100
        Beep
    End If
    Text1(8).Text = StirrerRate%
End Sub

Private Sub SpinButton8_SpinUp()
    StirrerRate% = Val(Text1(8).Text)
    StirrerRate% = StirrerRate% + 100
    If StirrerRate% > 800 Then
        StirrerRate% = 800
        Beep
    End If
    Text1(8).Text = StirrerRate%
End Sub

```

```
Private Sub Combo1_Click()
    Combo1.Text = VelocidadeInjecao(Combo1.ListIndex)
    If Combo1.Text = "Medium" Then
        VelocidadeInjecao(0) = "Medium"
        VelocidadeInjecao(1) = "High"
    End If
    If Combo1.Text = "Low" Then
        VelocidadeInjecao(0) = "Low"
        VelocidadeInjecao(2) = "High"
    End If
End Sub
```

'Apresentação da distância do injetor ao sensor

```
Private Sub SpinButton9_SpinDown()
    InjDist% = Val(Text1(9).Text)
    InjDist% = InjDist% - 1
    If InjDist% < 0 Then
        InjDist% = 0
        Beep
    End If
    Text1(9).Text = InjDist%
End Sub
```

```
Private Sub SpinButton9_SpinUp()
    InjDist% = Val(Text1(9).Text)
    InjDist% = InjDist% + 1
    If InjDist% > 10 Then
        InjDist% = 10
        Beep
    End If
    Text1(9).Text = InjDist%
End Sub
```

'Apresentação do volume de injeção

```
Private Sub SpinButton10_SpinDown()
    InjVol# = Val(Text1(10).Text)
    InjVol# = InjVol# - 0.005
    If InjVol# < 0.005 Then
        InjVol# = 0.005
        Beep
    End If
    Text1(10).Text = InjVol#
End Sub
```

```
Private Sub SpinButton10_SpinUp()
    InjVol# = Val(Text1(10).Text)
    InjVol# = InjVol# + 0.005
```

```
    If InjVol# > 1 Then
        InjVol# = 1
        Beep
    End If
    Text1(10).Text = InjVol#
End Sub
```

'Apresentação da vazão da bomba peristáltica

```
Private Sub SpinButton11_SpinDown()
    FlowRate# = Val(Text1(11).Text)
    FlowRate# = FlowRate# - 0.1
    If FlowRate# < 0.5 Then
        FlowRate# = 0.5
        Beep
    End If
    Text1(11).Text = FlowRate#
End Sub
```

```
Private Sub SpinButton11_SpinUp()
    FlowRate# = Val(Text1(11).Text)
    FlowRate# = FlowRate# + 0.1
    If FlowRate# > 5 Then
        FlowRate# = 5
        Beep
    End If
    Text1(11).Text = FlowRate#
End Sub
```

Public Sub SelecionarAghador()

```
    Select Case Text1(8).Text = StirrerRate%
        Case StirrerRate% > 650
            StirrerRate% = (StirrerRate% - 1933.3) / -16.6
            response = MsgBox("Select the Knob at 65!", 0 + 48,
"Message")
            Case StirrerRate% > 350 And StirrerRate% < 650
                StirrerRate% = (StirrerRate% - 1733.3) / -16.6
                response = MsgBox("Select the Knob at 60!", 0 + 48,
"Message")
            Case StirrerRate% > 150 And StirrerRate% < 350
                StirrerRate% = (StirrerRate% - 1533.3) / -16.6
                response = MsgBox("Select the Knob at 50!", 0 + 48,
"Message")
            Case StirrerRate% < 150
                StirrerRate% = (StirrerRate% - 1433.3) / -16.6
                response = MsgBox("Select the Knob at 40!", 0 + 48,
"Message")
    End Select
End Sub
```

A3.2 Código do Arquivo *.bas (Module 1)

```

Global Const Tmin = 0, NumberVariavel = 11
Global Const MB_YESNO = 4, MB_ICONQUESTION = 32,
IDNO = 7, MB_DEFBUTTON2 = 256
Global FileName As String ' Esta variável contém
informações para abrir e fechar arquivos.
Global Factor#, CicloCorrigido_60Hz#, Ciclo_1#
Global Tempo(8000), PotencialMedio(8000) As Double
Global TempoElectrodeA(8000), TempoElectrodeB(8000),
TempoElectrodeC(8000), TempoElectrodeD(8000) As
Double
Global PotencialElectrodeA(8000),
PotencialElectrodeB(8000), PotencialElectrodeC(8000),
PotencialElectrodeD(8000) As Double
Global SampTime%, Duration%, Period#, Average%,
Emin%, Emax%, Temperature%
Global StirrerRate%, InjDist%, InjVol#, FlowRate#
Global Cont%, Contador%, ContElectrodeA%,
ContElectrodeB%, ContElectrodeC%, ContElectrodeD%
Global NumberElectrode%, NumberElectrodeInicial%,
NumberElectrodeFinal%, Temporizador%, SomaPotencial#,
ValorPotencial#
Global Valor5, Valor6, Texto4, Texto5, Texto6, Texto7,
Cheque1, Cheque2, Cheque3, Cheque4 As String
Global Amostragem, Duracao, Periodo, Media,
PotencialMin, PotencialMax, Temperatura As String
Global VelocidadeAgitacao, InjetorDistancia,
VolumInjecao, Vazao As String
Global VelocidadeInjecao(3) As String
Global Temporiza, TempoA(8000), TempoB(8000),
TempoC(8000), TempoD(8000), PotencialA(8000),
PotencialB(8000), PotencialC(8000), PotencialD(8000) As
String
Declaração da biblioteca DLL para acionar os comandos de
entrada (inp) e saída (out) de dados:
TNP é para ler uma porta de entrada (input port) vide Manual
Multi-Function Data Acquisition Card), pg 36
Declare Inp and Out for port I/O
Public Declare Function INP Lib "inpout32.dll" _
Alias "Inp32" (ByVal PortAddress As Integer) As Integer
'OUT é para escrever numa porta de saída (output port) vide
Manual Multi-Function Data Acquisition Card), pg 36
Public Declare Sub OUT Lib "inpout32.dll" _
Alias "Out32" (ByVal PortAddress As Integer, ByVal Value
As Integer)
Public Sub AbrirFile(FileName As String)
Form1.Caption = "Potentiometric Analysis: " & FileName

```

```

Open FileName For Input As #2
Line Input #2, Valor5
Line Input #2, Valor6
Line Input #2, Texto4
Line Input #2, Texto5
Line Input #2, Texto6
Line Input #2, Texto7
Line Input #2, Cheque1
Line Input #2, Cheque2
Line Input #2, Cheque3
Line Input #2, Cheque4
Line Input #2, Amostragem
Line Input #2, Duracao
Line Input #2, Periodo
Line Input #2, Media
Line Input #2, PotencialMin
Line Input #2, PotencialMax
Line Input #2, Temperatura
Line Input #2, VelocidadeAgitacao
Line Input #2, VelocidadeInjecao(0)
Line Input #2, InjetorDistancia
Line Input #2, VolumInjecao
Line Input #2, Vazao
Contador% = 0
Do While Not EOF(2)
    Input #2, TempoA(Contador%),
PotencialA(Contador%), TempoB(Contador%),
PotencialB(Contador%), TempoC(Contador%),
PotencialC(Contador%), TempoD(Contador%),
PotencialD(Contador%)
    Contador% = Contador% + 1
Loop
Close #2
End Sub
Public Sub FecharFilePOT(FileName As String)
If Dir(FileName) <> "" Then
    response = MsgBox("Overwrite existing file?",
MB_YESNO + MB_ICONQUESTION +
MB_DEFBUTTON2, "Message")
If response = IDNO Then Exit Sub
End If
Open FileName For Output As #2

'Salva os parâmetros de execução da análise
Print #2, Valor5
Print #2, Valor6

```

```

Print #2, Texto4
Print #2, Texto5
Print #2, Texto6
Print #2, Texto7
Print #2, Cheque1
Print #2, Cheque2
Print #2, Cheque3
Print #2, Cheque4
Print #2, SampTime%
Print #2, Duration%
Print #2, Period#
Print #2, Average%
Print #2, Emin%
Print #2, Emax
Print #2, Temperature%
Print #2, StirrerRate%
Print #2, VelocidadeInjecao(0)
Print #2, InjDist%
Print #2, InjVol#
Print #2, FlowRate#
'Salva os dados de aquisição
For j = 0 To Cont% - 1
    Write #2, TempoElectrodeA(j),
PotencialElectrodeA(j), TempoElectrodeB(j),
PotencialElectrodeB(j), TempoElectrodeC(j),
PotencialElectrodeC(j), TempoElectrodeD(j),
PotencialElectrodeD(j)
Next j
Close #2
FileName = UCase(FileName)
Form1.Caption = "Potentiometric Analysis: " +
FileName
End Sub
Public Sub FecharFileASC(FileName As String)
If Dir(FileName) <> "" Then
    response = MsgBox("Overwrite existing file?",
MB_YESNO + MB_ICONQUESTION +
MB_DEFBUTTON2, "Message")
If response = IDNO Then Exit Sub
End If
Open FileName For Output As #3
'Esta rotina deverá salvar somente os dados de aquisição
For n = 0 To Cont% - 1
    Print #3, TempoElectrodeA(n), PotencialElectrodeA(n),
TempoElectrodeB(n), PotencialElectrodeB(n),
TempoElectrodeC(n), PotencialElectrodeC(n),
TempoElectrodeD(n), PotencialElectrodeD(n)
Next n

```

```

Close #3
FileName = UCase(FileName)
Form1.Caption = "Potentiometric Analysis: " +
FileName
End Sub
Public Sub LimpaArquivoBackup()
NomeArquivo = "Backup"
FileBackup = NomeArquivo & ".bk1"
Open FileBackup For Output As #4
Print #4, ""
Close #4
End Sub
Public Sub Backup()
NomeArquivo = "Backup"
FileBackup = NomeArquivo & ".bk1"
Open FileBackup For Append As #4
Print #4, TempoElectrodeA(ContElectrodeA%),
PotencialElectrodeA(ContElectrodeA%),
TempoElectrodeB(ContElectrodeB%),
PotencialElectrodeB(ContElectrodeB%),
TempoElectrodeC(ContElectrodeC%),
PotencialElectrodeC(ContElectrodeC%),
TempoElectrodeD(ContElectrodeD%),
PotencialElectrodeD(ContElectrodeD%)
Close #4
End Sub
Public Sub Calibracao()
t# = Timer
test:
    Te# = Timer
    If Te# = t# Then GoTo test
    For j = 1 To 300000
        Next
    Te# = Timer - Te#
    n# = (2 / Te#) * 300000
    A# = Timer
cal:
    t# = Timer
    If t# = A# Then GoTo cal
    For j = 1 To n#
        Next
    t# = Timer - t#
    Factor# = n# / (t# * 1000)
    Ciclo_1# = 1 / Factor
    CicloCorrigido_60Hz# = Ciclo_1# * 16.6
End Sub

```


A3.3 Avaliação e Desempenho do Sistema Multi-Componente

A Fig. A3.1 mostra a interface gráfica do software em VISUAL BASIC, onde é controlado a velocidade do motor de agitação, a seleção e comutação dos eletrodos e aquisição de dados, bem como o sinal de padrões e amostras obtido para a determinação simultânea de cloreto e potássio em bebidas isotônicas usado para avaliar o sistema. Foi observado que não houve significativa diferença entre os valores de potencial adquiridos pela placa de aquisição e o apresentado no "display" do pH/Analizador de Ions. A diferença foi sempre inferior a 3 mV.

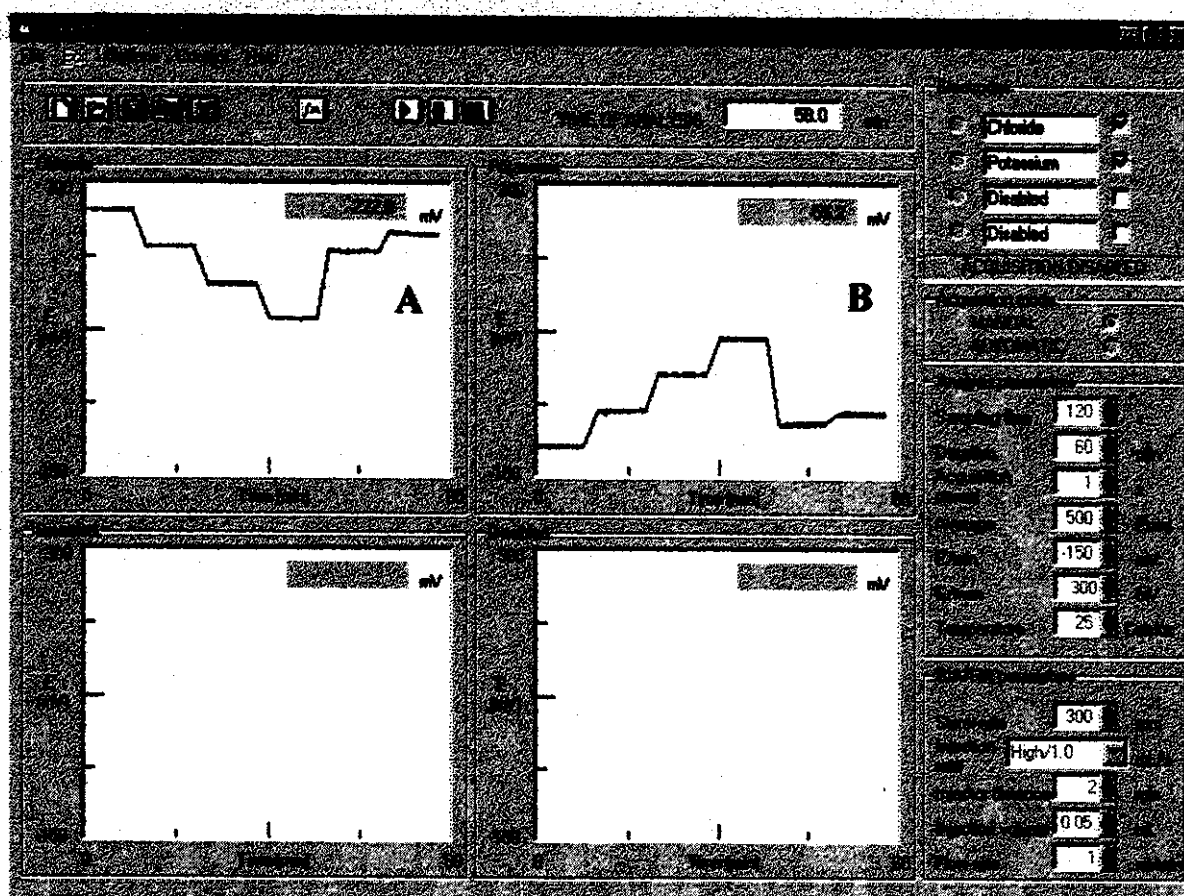


Fig. A3.1 Interface gráfica do software elaborado em VISUAL BASIC para controle do sistema multi-componente, bem como os sinais potenciométricos obtidos para as medidas de padrões e amostras de cloreto (A) e potássio (B) com eletrodos ion-seletivo. Concentração dos padrões (mol L^{-1}) e amostras (diluídas 10 vezes) da esquerda para direita: $1,0 \times 10^{-4}$; $1,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-2}$; $1,0 \times 10^{-1}$; #1; #2. Velocidade de agitação: 300 rpm.

A regressão linear obtida com os eletrodos de cloreto e potássio para a faixa de calibração ($1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) foram, respectivamente:

$$\Delta E = (32 \pm 1) + (56,3 \pm 0,5)p[Cl^-] \quad (A3.1)$$

onde $r = 0,99991$; $EDPR = 1,22$; $N = 4$.

$$\Delta E = (118 \pm 2) - (56,1 \pm 0,8)p[K^+] \quad (A3.2)$$

onde $r = 0,9998$; $EDPR = 1,79$; $N = 4$.

Os resultados obtidos na determinação de cloreto e potássio em bebidas isotônicas usando o sistema multi-elementar potenciométrico proposto e o método de referência estão listados na Tabela A3.1. Não houve significativa diferença entre o método de referência e o proposto, considerando o erro estimado nas determinações. As amostras contêm vários compostos em suas formulações, como açúcares, vitaminas (C e E), proteínas e lipídios, porém nenhuma interferência foi observada.

Naturalmente, o uso do sistema multi-componente com conjunto de eletrodos ion-seletivo permite uma melhora no tempo de análise, apesar das leituras do conversor A/D serem realizadas seqüencialmente. Isto ocorre devido ao ganho de tempo na mudança para uma nova leitura de outra solução padrão, levando em consideração o tempo requerido para realizar as medidas potenciométricas individualmente.

É importante lembrar que o sistema multi-componente elaborado permite o uso de quatro eletrodos simultaneamente, sendo possível aumentar para até oito o número de eletrodos para análise pela adição de mais uma chave-analógica (ADG201), uma vez que a placa de aquisição tem ainda disponível quatro canais de saída digital. Além disto é possível usar o sistema proposto com o software implementado, em associação com técnicas dinâmicas, como FIA e BIA.

Tabela A3.1 Resultados obtidos na determinação simultânea de cloreto e potássio em bebidas isotônicas usando um conjunto de eletrodos ion-seletivo com o sistema multi-componente proposto.

Amostras	Titulação Potenciométrica (mg Cl ⁻ /100 mL)	Fotometria de Chama (mg K ⁺ /100 mL)	Conjunto de eletrodos ion-seletivo (mg /100 mL)	
			Cloreto	Potássio
#1	(47,5±0,5) ^a	(15±2) ^b	(45±3) ^b	(17±2) ^b
#2	(10,4 ±0,4) ^a	(31±3) ^b	11,2±0,9 ^b	(34±4) ^b

^a Estimativa do desvio padrão para a média de duas determinações.

^b Estimado por propagação de erro.

Apêndice

4

Funções Estatísticas

A4.1 Estimativa do Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo^[1]

$$EDP = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}} \quad (A4.1)$$

$$EDP_r = \frac{\sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}}}{\bar{x}} \times 100 \quad (A4.2)$$

OBS: A estimativa do desvio padrão corresponde a um nível de confiança de 68%.

A4.2 Método dos Mínimos Quadrados^[1]

A4.2.1 Estimativa do Desvio Padrão da Reta

$$EDPR = \sqrt{\frac{\left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right] - \frac{\left[\sum (xy) - \frac{(\sum x) \times (\sum y)}{n} \right]^2}{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right]}}{n-2}} \quad (A4.3)$$

A4.2.2 Coeficiente de Correlação da Reta

$$r = \sqrt{\frac{\left[\sum (xy) - \frac{(\sum x) \times (\sum y)}{n} \right]^2}{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right] \times \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]}} \quad (A4.4)$$

A4.2.3 Coeficiente Angular da Reta e a Estimativa do seu Desvio Padrão

$$a = \frac{\left[\sum (xy) - \frac{(\sum x) \times (\sum y)}{n} \right]}{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right]} \quad (\text{A4.5})$$

$$EDPa = \frac{EDP}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2}} \quad (\text{A4.6})$$

A4.2.4 Coeficiente Linear da Reta e a Estimativa do seu Desvio Padrão

$$b = \bar{y} - a \times \bar{x} \quad (\text{A4.7})$$

$$EDPb = EDP \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x - \bar{x})^2}} \quad (\text{A4.8})$$

A4.3 Propagação de Erro em Cálculos Aritméticos^[2]

A4.3.1 Adição ou Subtração

$$y = a + b - c \quad \therefore \quad s_y = \sqrt{s_a^2 + s_b^2 + s_c^2 \dots} \quad (\text{A4.9})$$

A4.3.2 Multiplicação ou Divisão

$$y = a \times b / c \quad \therefore \quad \frac{s_y}{y} = \sqrt{\frac{s_a^2}{a^2} + \frac{s_b^2}{b^2} + \frac{s_c^2}{c^2} \dots} \quad (\text{A4.10})$$

A4.3.3 Exponenciação

$$y = a^x \quad \therefore \quad \frac{s_y}{y} = x \frac{s_a}{a} \quad (\text{A4.11})$$

A4.3.4 Logaritmo

$$y = \log_{10} a \quad \therefore \quad s_y = 0,434 \frac{s_a}{a} \quad (\text{A4.12})$$

A4.4 Planejamento Fatorial^[1,3]

A4.4.1 Cálculo do Efeito Principal (A ou B ou C)

$$EP = \bar{y}_+ - \bar{y}_- \quad (\text{A4.13})$$

*A, B e C são as variáveis estudadas.

A4.4.2 Cálculo do Efeito de Interação ($A \times B$ ou $B \times C$ ou $A \times B \times C$)*

$$EI = \bar{y}_+ - \bar{y}_- \quad (\text{A4.14})$$

*A, B e C são as variáveis estudadas.

A4.4.3 Estimativa da Variância do Experimento

$$V_{Exp} = \frac{v_1 \times s_1^2 + v_2 \times s_2^2 + \dots + v_g \times s_g^2}{v_1 + v_2 + \dots + v_g} \quad (\text{A4.15})$$

onde, g é o conjunto das condições experimentais;

s_g é a estimativa do desvio padrão entre as replicatas;

$v_i = n_i - 1$ é o grau de liberdade, sendo n_i o número de replicatas.

A4.4.4 Estimativa da Variância do Efeito

$$V_{Efeito} = \frac{4}{N} \times V_{Exp} \quad (\text{A4.16})$$

onde, N é o número total de experimentos feitos, incluindo as replicatas.

A4.4.5 Cálculo do Erro Padrão do Efeito

$$ep = \sqrt{V_{Efeito}} \quad (\text{A4.17})$$

Referências

- [1] BOX, G.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S.; Statistics for Experimenters - An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building, John Wiley & Sons, 1978.
- [2] SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; Fundaments of Analytical Chemistry, Seventh Edition, Saunders College Publishing: Philadelphia, 1996.
- [3] MONTGOMERY, D. C. Design and Analysis of Experiments, Third edition, John Wiley & Sons, INC: New York 1991.