



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

200206661

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**“APLICAÇÕES ANALÍTICAS DO ESTUDO DA REAÇÃO
QUIMILUMINESCENTE DE LUMINOL”**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

AUTOR: ERNESTO CORREA FERREIRA

ORIENTADORA: PROF^a DR^a ADRIANA VITORINO ROSSI

UNIDADE	OC
N.º C.D.	I/UNICAMP
F413a	
V.	47571
T.	837/02
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	06.02.02
N.º CPD	

CM00163106-1

CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
OTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

F413a Ferreira, Ernesto Correa
Aplicações analíticas do estudo da reação
quimiluminescente de luminol / Ernesto Correa
Ferreira. -- Campinas, SP: [s.n], 2001.

Orientadora: Adriana Vitorino Rossi.

Dissertação (mestrado) — Universidade
Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Quimiluminescência. 2. Análise cinética.
3. Vitamina C. I. Rossi, Adriana Vitorino.
II. Universidade de Estadual de Campinas,
Instituto de Química. III. Título.

“Se compreendêssemos melhor a morte, quem sabe, a vida seria mais justa.”

A meu irmão Domingos e a todos que nos
deixaram sem poder dizer Adeus.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, queria agradecer a todos os professores que ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, principalmente aos professores Dr. Jarbas J. R. Rohwedder e Dr. Francisco B. T. Pessine pelo apoio técnico e pessoal, e à professora Dr^a. Adriana Vitorino Rossi pela orientação, amizade e paciência destes últimos dois anos.

Intensamente, queria agradecer aos meus pais e a Viviane pelo amor, confiança, apoio e compreensão que me deram em todas as dificuldades que passamos juntos e separados durante estes anos.

Queria também agradecer a todas as pessoas que contribuíram para que este trabalho e nem sempre são lembrados, como os colegas de laboratório e, principalmente, aos amigos, que geralmente sem saber, são os principais responsáveis pelo desenvolvimento dos trabalhos científicos. Sem a compreensão e o apoio destas pessoas, qualquer etapa da vida é difícil de se realizar.

Fica aqui também o agradecimento à Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro e ao Instituto de Química e a UNICAMP pelo apoio acadêmico.

RESUMO

APLICAÇÕES ANALÍTICAS DO ESTUDO DA REAÇÃO QUIMILUMINESCENTE DE LUMINOL

Aluno: Ernesto Correa Ferreira

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Vitorino Rossi

Foram realizados estudos sobre a reação quimiluminescente de Luminol em meio alcalino e em presença de Cu(II) com H₂O₂ e sua possibilidade de aplicação analítica para determinar modificadores de velocidade da reação. Inicialmente, utilizando o sistema de detecção de um espectrofotômetro comercial, foram encontradas condições de reação que possibilitaram o monitoramento da quimiluminescência otimizada. Com este sistema, foram avaliados os efeitos modificadores de ácido ascórbico, Ni(II) e ácido úrico na reação quimiluminescente. Os resultados obtidos possibilitaram o desenvolvimento de proposta de método cinético analítico para determinação de ácido ascórbico e de ácido úrico, na faixa de $5,0 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, abrindo expectativas para determinação destas espécies em amostras reais. Paralelamente, foi montado o sistema de detecção constituído por uma fotomultiplicadora e um monocromador controlados por um microcomputador para medidas de quimiluminescência. Isto possibilitou o monitoramento da luminescência em intervalos de tempo menor (cerca de 6 ms) e em faixa de comprimento de onda mais estreita (± 1 nm). O método cinético para a determinação de agentes redutores com a técnica quimiluminescente foi aplicado com o sistema de medidas montado e os resultados foram comparados com os obtidos com espectrofotômetro. Além disso, o método proposto foi aplicado com sistema montado para analisar amostras reais de medicamentos contendo ácido ascórbico. Os resultados obtidos podem ser considerados aceitáveis em comparação com um método oficial, com desvios menores que 5 %.

ABSTRACT**“Analytical Applications of the Luminol Chemiluminescent Reaction”**

Ernesto Correa Ferreira and PhD. Adriana Vitorino Rossi

Studies of the chemiluminescent reaction of luminol in alkaline medium in the presence of Cu(II) with H₂O₂ and the possibility of analytical applications of this reaction to determine species that modified its kinetics were carried out. Firstly, analysis conditions were found to permit the scanning of the chemiluminescence and to optimize the reaction conditions using a commercial spectrophotometer. This system was utilized to evaluate the modifier effects of ascorbic acid, Ni(II) and uric acid in the chemiluminescence reaction. These results were used to develop the kinetic analytical method with the chemiluminescence technique to determine ascorbic acid and uric acid in the range of 5.0×10^{-5} to 6.0×10^{-4} mol L⁻¹, leading to expectations for the determination of these species in real samples. Simultaneously, a detector system was built, using a photomultiplier and a monochromator controlled by a microcomputer, to carry out measurements of the chemiluminescent signals at intervals of 6 ms and with selection of the wavelength (± 1 nm). The kinetic method to determine the reducing species with the chemiluminescent technique was applied with the home made detector system and the results were compared with the spectrophotometer results. In addition, the proposed analytical method with the home made detector system was applied for the analysis of real pharmaceutical samples containing ascorbic acid. The results were considered satisfactory when compared to the AOAC official method, with deviations of less than 5 %.

CURRÍCULO DO AUTOR

O candidato se formou em Bacharelado Tecnológico e Bacharelado em Química pela Universidade Estadual de Campinas em 1999. Durante a Graduação, realizou Iniciação Científica com projeto sobre análise cinética, contemplado com bolsa da FAPESP (proc:97/00862-8) e orientado pela Profª Drª Adriana V. Rossi de 1997 até 1999. Foi aprovado no Processo de Admissão do Mestrado da UNICAMP no início do ano 1999. Iniciou os estudos sobre a reação quimiluminescente de luminol orientado novamente pela Profª Drª Adriana V. Rossi e contemplado com bolsa da FAPESP (proc.:99/00022-5). Cursou os 36 créditos obrigatórios, tendo sido aprovado com o conceito máximo em todas as seguintes disciplinas: "Métodos Espectroquímicos de Análise" ministrada pelos professores Dr. João Carlos de Andrade, Dr. Marco Aurélio Zezzi e Drª. Maria Izabel Bueno; "Quimiometria em Química Analítica" ministrada pelo Prof. Dr. Ronei e "Métodos Cinéticos de Análise" ministrada pelos professores Drª Adriana V. Rossi e Dr. Matthieu Tubino. Realizou o Exame de Proficiência em Língua Estrangeira no 2º semestre de 2000, coordenado pelo Prof. Dr. Ivo Raimundo Jr, sendo aprovado. No dia 09 de janeiro de 2001, realizou Exame de Qualificação para dissertação de Mestrado com banca examinadora composta pelos Professores Dr. João Carlos de Andrade e Drª Maria Izabel Bueno, além da professora orientadora Drª Adriana V. Rossi, sendo aprovado sem restrições.

Durante o contínuo trabalho científico na Iniciação Científica e no Mestrado, participou e apresentou os seguintes trabalhos em forma de painel ou apresentação oral em eventos e congressos em conjunto com sua professora orientadora:

- "Sistema de Injeção Simultânea de Reagentes Líquidos para Monitoramento Cinético com Aplicações Analíticas", 20ª RA da SBQ, 1997;

- "Determinação de Vitamina C por Método Cinético de Análise", V Congresso Interno de Iniciação Científica, 1997;

- "Determinação de Vitamina C em Sucos e Polpas de Frutas através de Análise Cinética de Ácido Ascórbico", 21ª RA da SBQ, 1998;

- "Dosagem de Vitamina C em Suco de Acerola através de Titulação Espectrofotométrica", 22ª RA da SBQ, 1999;

- "Estudo Analítico do Ácido Ascórbico como Agente Modificador da Luminescência da Reação do Luminol com H_2O_2 em Meio Alcalino na Presença de Cu^{2+} ", 23ª RA da SBQ, 2000;

- "Sistema de medidas para monitoramento cinético de reações quimiluminescentes", 24ª RA da SBQ, 2001 (em conjunto com o Prof. Dr. Jarbas J. R. Rohwedder);

- "Determinação cinética de ácido ascórbico em medicamentos com técnica quimiluminescente", 24ª RA da SBQ, 2001.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	01
Capítulo 1: Métodos Cinéticos de Análise	03
1.1. Métodos Cinéticos de Análise	05
1.2. Desenvolvimento dos Métodos Cinéticos de Análise	06
1.3. Aplicação da Análise Cinética	11
1.3.1. Reações Catalisadas	11
1.3.2. Reações Não-Catalisadas	13
1.3.3. Métodos Integrais	15
1.3.4. Métodos Diferenciais	18
Capítulo 2: A Quimiluminescência do Luminol	21
2.1. A Quimiluminescência e a Bioluminescência	23
2.2. A Reação Quimiluminescente do Luminol	26
2.3. O Mecanismo da Reação Quimiluminescente de Luminol	27
2.4. Aplicações Analíticas da Quimiluminescência de Luminol	33
Capítulo 3: A Importância do Ácido Ascórbico	37
3.1. A Vitamina C (Ácido Ascórbico)	39
3.2. Histórico do Ácido Ascórbico	40
OBJETIVOS	45
Capítulo 4: Objetivos	47
4.1. Objetivos	49
PARTE EXPERIMENTAL	51
Capítulo 5: Reagentes e Equipamentos	53
5.1. Listagem de Reagentes e Equipamentos	55
5.2. Descrição das Soluções Utilizadas	56
5.2.1. Soluções de Luminol	56
5.2.2. Soluções de H ₂ O ₂	56
5.2.3. Soluções de Ácido Ascórbico	56
5.2.4. Soluções de Ácido Único	57
5.2.5. Solução de 2,6-Diclorofenolindofenol	57
Capítulo 6: Procedimentos	59
6.1. Monitoramento com Espectrofotômetro: Sistema 1	61
6.1.1. Descrição do Sistema 1	61
6.1.2. Procedimento	61
6.2. Monitoramento com Fotomultiplicadora: Sistema 2	62
6.2.1. Descrição do Sistema 2	62
6.2.2. Procedimento	67

6.3. Avaliação do Efeito Modificador de Metais de Transição e Agentes Redutores	67
6.4. Otimização do Monitoramento da Reação com Sistema 1	68
6.5. Otimização do Monitoramento da Reação com Sistema 2	69
6.6. Potencialidade Analítica do Efeito Modificador de Ácido Úrico	71
6.7. Potencialidade Analítica do Efeito Modificador de Ácido Ascórbico	71
6.8. Determinação de Ácido Ascórbico em Medicamentos	71
RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
Capítulo 7: Avaliação do Efeito Modificador de Metais de Transição, do pH e de Agentes Redutores	75
7.1. Interpretação do Mecanismo da Reação Quimiluminescente	77
7.2. Avaliação da Reação Quimiluminescente	80
7.3. Avaliação do Efeito Modificador de Metais de Transição e Agentes Redutores na Reação Quimiluminescente	82
7.3.1. Efeito Catalítico de Cu(II)	83
7.3.2. Efeito Inibidor de Ni(II) na Reação Quimiluminescente Catalisada por Cu(II)	84
7.3.3. Efeito Modificador de Agentes Redutores	85
7.3.4. Inibição pelo Ácido Ascórbico	86
7.3.5. Inibição pelo Ácido Úrico	88
7.4. Avaliação do Efeito do pH e da Composição do Tampão	92
Capítulo 8: Otimização das Condições de Monitoramento com o Sistema 1	95
8.1. Efeito da Variação da Concentração de H_2O_2	97
8.2. Efeito da Variação da Concentração de Luminol	99
8.3. Efeito da Variação da Concentração de Cu(II)	101
8.4. Efeito da Variação da Concentração de Carbonato no tampão	103
Capítulo 9: Otimização das Condições de Monitoramento com o Sistema 2	107
9.1. Efeito da Variação da Concentração de H_2O_2	109
9.2. Efeito da Variação da Concentração de Luminol	111
9.3. Efeito da Variação da Concentração de Cu(II)	112
9.4. Efeito da Variação da Concentração de Carbonato no Tampão	114
Capítulo 10: Potencialidade Analítica do Efeito Modificador do Ácido Úrico	117
10.1. Avaliação do Sistema 1 na Determinação de Ácido Úrico	119
10.2. Avaliação do Sistema 2 na Determinação de Ácido Úrico	123

Capítulo 11: Potencialidade Analítica do Efeito Modificador do Ácido Ascórbico.....	127
11.1. Avaliação do Sistema 1 na Determinação de Ácido Ascórbico	129
11.2. Avaliação do Sistema 2 na Determinação de Ácido Ascórbico	130
Capítulo 12: Determinação de Ácido Ascórbico em Medicamentos	135
12.1. Análise de Medicamentos contendo Ácido Ascórbico	137
12.2. Análise de Medicamentos pelo Método de Adição de Padrão	139
12.3. Avaliação do Método Cinético com Técnica Quimiluminescente	141
12.3.1. As Figuras de Mérito.....	141
12.3.2. Comparação do Método Cinético Quimiluminescente com Outros Métodos	144
CONCLUSÃO	147
Capítulo 13: Conclusão.....	149
PERSPECTIVAS.....	153
Capítulo 14: Perspectivas de Aplicação de Reações Quimiluminescentes	155
REFERÊNCIAS.....	159

LEGENDAS DE ABREVIATURAS E TERMOS

[AA]	Concentração de Ácido Ascórbico em mol L ⁻¹
AAS	<i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>
AOAC	<i>American Organization of Analytical Chemists</i>
[AU]	Concentração de Ácido Úrico em mol L ⁻¹
CEI	Comunidade de Estados Independentes (antiga URSS)
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
C _m	Limite de Detecção
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
cp	comprimidos
[Cu(II)]	Concentração de Cu(II)
D	Duração da Luminescência
d _{AOAC}	Desvio em comparação ao método da AOAC utilizado
DCFI	2,6-diclorofenolindofenol
DQ	Diazoquinona
E*	Produto eletronicamente excitado
EAA	Espectroscopia de Absorção Atômica
Eletro-QL	Método de Eletrogeração de Quimiluminescência
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i>
FIA-Reagente Imobilizado	Método por Injeção em Fluxo com Reagente Imobilizado
FIA-Ultrassom	Método por Injeção em Fluxo com Técnica de Ultrassom
Foto-QL	Método Fotoquimiluminescente
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
I _{max}	Intensidade de Emissão Máxima
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
I _x	Valor da intensidade de emissão no intervalo de tempo x
K _{parente}	Constante que agrupa todas as constantes do Monitoramento da Luminescência
LN	Luminol
[LN]	Concentração de Luminol em mol L ⁻¹
LL	Limite de Linearidade
LQ	Limite de Quantificação
M	Constante que relaciona as concentrações de M _R e M _O
M _O	Cátion Metálico Oxidado
M _R	Cátion Metálico Reduzido
P.A.	Reagente Puro para Análise
QL	Método Quimiluminescente
QL-cinética	Método Quimiluminescente Cinético
QL-estática	Método Quimiluminescente Termodinâmico ou Estático
R	Recobrimento
RAM	<i>Randomic Access Memory</i>
S	Sinal Analítico
S _m	Sinal Mínimo Medido
SBQ	Sociedade Brasileira de Química
tan α	Valor da tangente em um intervalo
URSS	<i>Union of Republics Socialists Soviets</i>
v	Velocidade da Reação
v ₁	Velocidade de reação entre 4 a 8 s
v _i	Velocidade Inicial da Reação
V _{foto}	Voltagem ou diferença de potencial aplicada na fotomultiplicadora
λ _e	Comprimento de Onda de Emissão Máxima

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Publicações de trabalhos sobre métodos cinéticos de análise desde 1945	07
Figura 2. Distribuição por país de origem das publicações sobre métodos cinéticos de análise de 1945 a 1990.....	08
Figura 3. Distribuição por país de origem das publicações sobre métodos cinéticos de análise de 1991 a 2000.....	09
Figura 4. Esquema de uma reação genérica catalisada.....	11
Figura 5. Esquema de reação em duas etapas para um ciclo catalítico, no qual (RC) representa uma espécie intermediária.....	12
Figura 6. Representação genérica de uma reação não-catalisada.....	13
Figura 7. (a) Ilustração da aplicação do método do tempo fixo em curvas cinéticas e as curvas analíticas obtidas em (b) reações catalisadas e (c) não catalisadas.....	16
Figura 8. (a) Ilustração da aplicação do método do tempo variável em curvas cinéticas e as curvas analíticas obtidas para (b) reações catalisadas e (c) não-catalisadas.....	17
Figura 9. (a) Ilustração da aplicação do método da velocidade inicial em curvas cinéticas genéricas e (b) curva analítica obtida para reações catalisadas ou não-catalisadas.....	19
Figura 10. (a) Ilustração da aplicação do método das tangentes em curvas cinéticas e (b) a curva analítica obtida para as reações catalisadas ou não-catalisadas	20
Figura 11. Exemplos de compostos que produzem quimiluminescência: (1) lofina, (2) luminol, (3) lucigenina, (4) isoluminol, (5) bis-(2,4,6-triclorofenil)-oxalato, (6) pirogalol, e (7) luciferina.....	23
Figura 12. Esquemas das reações de oxidação de (2) luminol e de (7) luciferina produzindo quimiluminescência.....	26
Figura 13. Estruturas de alguns intermediários da reação quimiluminescente: (8) diazoquinona, (9) ânion de H_2O_2 , (10) endo-peróxido possivelmente formado, (11) diânion do ácido ftálico letronicamente excitado, (12) diânion do ácido ftálico, (13) radical do luminol e (14) hidro-peróxido.....	28
Figura 14. Diagrama esquemático dos Orbitais Moleculares do sistema endo-peróxido – 3-amino-ftalato.....	29
Figura 15. Diagrama Esquemático de Correlação de Estados do endo-peróxido / ácido 3-aminoftálico (B) que relaciona a Energia do sistema com o rompimento da ligação dos átomos de O no intermediário (A).....	29
Figura 16. Etapas da reação quimiluminescente propostas por MERÉNYI e colaboradores em seus estudos e organizadas por XIAO e colaboradores (XIAO, et al, 2000). Os valores das constantes cinéticas obtidas (em $mol^{-1} L s$) são: $k_1 = 4 \times 10^6$; $k_2 = 2,3 \times 10^8$; $k_3 = 5 \times 10^8$; $k_4 = 5 \times 10^7$	30
Figura 17. Proposta de formação de radicais do H_2O_2 pela presença de Cu(II), sendo L a simbologia utilizada para um ligante do meio.....	31
Figura 18. Esquema ilustrando as aplicações da reação luminescente do luminol.....	33
Figura 19. Publicações sobre a reação quimiluminescente do luminol como aplicação analítica desde 1945.....	35
Figura 20. Publicações sobre aplicações analíticas da reação quimiluminescente do luminol divididas pelos países de origem.....	35
Figura 21. Aplicações analíticas da reação quimiluminescente do luminol divididas pelas técnicas utilizadas desde 1945.....	36

Figura 22. Esquema reacional da ação redutora de ácido ascórbico (15) e seus produtos formados: ácido dehidroascórbico (16) e ácido dicetugulônico (17).....	39
Figura 23. Distribuição das publicações sobre métodos de análise do ácido ascórbico desde 1945, de acordo com a técnica utilizada.....	41
Figura 24. Esquema do Sistema 1: (A) Sistema de injeção, (B) Espectrofotômetro e (C) Cella da reação.....	61
Figura 25. Perfil de emissão monitorado pelo Sistema 1 da reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em meio alcalino ($\text{pH}=10,4$) com H_2O_2 ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$). $T=25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$	62
Figura 26. Esquema do Sistema 2: (2A) fotomultiplicadora, (2B) monocromador, (2C) motor de passo, (2D) microcomputador, (2E) conversor corrente/potencial, multiplicador de sinal e controle do motor de passo, (2F) e (2G) fontes de alimentação do motor de passo e fotomultiplicadora, (2H) suporte da cela da reação e (2I) banho termostatizador.....	63
Figura 27. Diagrama esquemático do circuito conversor corrente/potencial. O <i>chip</i> utilizado foi um LF356. Os números 2 a 7 correspondem à pinagem do <i>chip</i>	63
Figura 28. Diagrama do circuito da fonte simétrica de 12 V (transistores utilizados MIC RC208, 7812 e 7912).....	64
Figura 29. Diagrama do circuito com função de controlar o passo do motor (transistores utilizados 336 TIP121).....	64
Figura 30. Ilustração do programa adaptado para o Sistema 2: (3A) comandos do monocromador, (3B) comandos de medidas e leituras, (3C) comandos gráficos, (3D) menu e (3E) área de plotagem.....	65
Figura 31. Espectro de emissão de uma lâmpada de Hg monitorado pelo Sistema 2. Resolução de 0,2 nm. $\Delta\lambda = 400$ a 600 nm. Ganho 1X. $V_{\text{foto}} = 800 \text{ V}$	66
Figura 32. Espectro de emissão de uma lâmpada de W monitorado pelo Sistema 2. Resolução de 3 nm. $\Delta\lambda = 400$ a 600 nm. Ganho 5X. $V_{\text{foto}} = 800 \text{ V}$	66
Figura 33. Perfil de emissão monitorado pelo Sistema 2 da reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em meio alcalino ($\text{pH}=10,3$) com H_2O_2 ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) utilizando o Sistema 2 ($V_{\text{foto}}=600 \text{ V}$; $\lambda=420\text{nm}$; ganho 1X; $T=25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$): (1) sinal analítico e (2) ruído.....	67
Figura 34. Perfis de emissão em função do tempo e do comprimento de onda monitorado (λ_e) da reação quimiluminescente do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$,) com H_2O_2 ($2,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em meio alcalino ($\text{pH} = 10,5$; $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $T=25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$) realizado pelo sistema montado (Ganho: 1X; $V_{\text{foto}} = 800 \text{ V}$).....	69
Figura 35. Perfis cinéticos de emissão da reação quimiluminescente do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($2,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}=10,5$) monitorados pelo sistema 2 variando a voltagem aplicada na fotomultiplicadora: (1) 500 V; (2) 600 V; (3) 700 V; (4) 800 V. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$	70
Figura 36. Esquema proposto por ALBERTIN et al (1998) para o mecanismo da reação luminescente do luminol com H_2O_2 em meio alcalino e em presença de um metal de transição como catalisador.....	77
Figura 37. Fotografia da quimiluminescência do luminol obtida experimentalmente.....	81

- Figura 38.** Perfis médios de emissão obtidos a partir da reação do luminol ($5,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) catalisada por Cu(II) ($1,14 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 9,6) e $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, com diversas soluções de H_2O_2 : (1) $0,222 \text{ mol L}^{-1}$; (2) $0,178 \text{ mol L}^{-1}$; (3) $0,134 \text{ mol L}^{-1}$; (4) $0,089 \text{ mol L}^{-1}$; (5) $0,044 \text{ mol L}^{-1}$.
Os monitoramentos foram realizados com o Sistema 1 82
- Figura 39.** Perfis médios de emissão da reação do luminol ($1,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH = 10,2) em diferentes concentrações de Cu(II), em mol L^{-1} : (1) $1,8 \times 10^{-4}$ e (2) $1,1 \times 10^{-3}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.
Os monitoramentos foram realizados com o Sistema 1 84
- Figura 40.** Perfis de emissão relativos obtidos pela reação do luminol ($7,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($0,134 \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH = 9,6) com adição de (1) Cu(II) ($7,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e (2) Cu(II) ($7,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e Ni(II) ($7,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. O monitoramento da luminescência foi realizado com o Sistema 1 85
- Figura 41.** Proposta da reação do ácido ascórbico com o H_2O_2 86
- Figura 42.** Proposta da reação do ácido ascórbico com o Cu(II) 86
- Figura 43.** Proposta da reação do ácido ascórbico com os intermediários do luminol 87
- Figura 44.** Perfis de emissão relativos obtidos pela reação do luminol ($7,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH = 9,6) e em presença de Cu(II) ($7,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($0,134 \text{ mol L}^{-1}$) (1) sem adição de ácido ascórbico e com adição de ácido ascórbico nas concentrações de (2) $8,1 \times 10^{-5}$ e (3) $8,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.
O monitoramento da luminescência foi realizado com o Sistema 1 87
- Figura 45.** Proposta da reação do ácido úrico com o H_2O_2 88
- Figura 46.** Proposta da reação do ácido úrico com o Cu(II) 89
- Figura 47.** Proposta da reação do ácido úrico com os intermediários do luminol 89
- Figura 48.** Perfis de emissão relativos obtidos pela reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH = 10,6) e em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) (1) sem adição de ácido úrico e com adição de ácido úrico nas concentrações de (2) $5,0 \times 10^{-5}$ e (3) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.
O monitoramento da luminescência foi realizado com o Sistema 1 90
- Figura 49.** Perfis de emissão relativos obtidos pela reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH = 10,6) e em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) com adição de ácido úrico nas concentrações de (1) $5,0 \times 10^{-5}$, (2) $1,0 \times 10^{-4}$ e (3) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.
Os monitoramentos da luminescência foram realizados com o Sistema 1 91
- Figura 50.** Perfis de emissão relativos obtidos pela reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH = 10,6) e em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) (1) sem adição de agente redutor, (2) com adição de ácido ascórbico na concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (3) com adição de ácido úrico na concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. O monitoramento da luminescência foi realizado com o Sistema 1 92
- Figura 51.** Perfis médios de emissão da reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato (pH = 10,46 e $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com diferentes padrões de H_2O_2 (mol L^{-1}): (1) $8,9 \times 10^{-3}$; (2) $1,3 \times 10^{-2}$; (3) $4,4 \times 10^{-2}$; e (4) $8,9 \times 10^{-2}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.
Dados obtidos com sistema 1 98

- Figura 52.** (A) Variação da $I_{\max}$ e a $[H_2O_2]$; (B) Variação de D com a $[H_2O_2]$; (C) Variação da tangente entre 4 a 8 s com a $[H_2O_2]$; obtidas pela reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de $Cu(II)$ ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($pH=10,46$ e $[CO_3^{2-}]=0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($T=25,0 \pm 0,1^\circ C$). Dados obtidos com Sistema 1 ... 99
- Figura 53.** Perfis relativos da reação de luminol em presença de $Cu(II)$ ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($pH = 10,48$, $[CO_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) variando a $[LN]$ (mol L^{-1}): (1) 1×10^{-3} ; (2) $2,0 \times 10^{-3}$; (3) $4,0 \times 10^{-3}$; (4) $6,0 \times 10^{-3}$; e (5) $1,0 \times 10^{-2}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ C$. Dados obtidos com Sistema 1 100
- Figura 54.** (A) Variação da $I_{\max}$ com a $[LN]$; (B) Variação de D com a $[LN]$; (C) Variação da velocidade de decaimento com a $[LN]$; a partir dos perfis relativos de emissão da reação de luminol em presença de $Cu(II)$ ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($pH = 10,48$, $[CO_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). $T = 25,0 \pm 0,1^\circ C$. Dados obtidos com Sistema 1 101
- Figura 55.** Perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de $Cu(II)$ e em tampão carbonato ($pH = 10,48$, $[CO_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) variando a $[Cu(II)]$ (mol L^{-1}): (1) $7,0 \times 10^{-5}$; (2) $1,8 \times 10^{-5}$; (3) $3,5 \times 10^{-5}$; e (4) $7,0 \times 10^{-4}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ C$. Dados obtidos com Sistema 1 102
- Figura 56.** (A) Variação da $I_{\max}$ com a $[Cu(II)]$; (B) Variação de D com a $[Cu(II)]$; (C) Variação de tangente inicial com a $[Cu(II)]$; obtidas a partir dos perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de $Cu(II)$ e em tampão carbonato ($pH = 10,48$, $[CO_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). $T = 25,0 \pm 0,1^\circ C$. Dados obtidos com Sistema 1 103
- Figura 57.** Perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de $Cu(II)$ ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($pH = 10,40$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) variando a $[CO_3^{2-}]$ (mol L^{-1}): (1) $9,0 \times 10^{-2}$; (2) 0,2; (3) 0,7; e (4) 1,1. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ C$. Dados obtidos com Sistema 1 104
- Figura 58.** (A) Variação de $I_{\max}$ com a $[CO_3^{2-}]$; (B) Variação de D com a $[CO_3^{2-}]$; (C) Variação da tangente inicial com a $[CO_3^{2-}]$; obtidas a partir dos perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de $Cu(II)$ ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($pH = 10,40$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). $T = 25,0 \pm 0,1^\circ C$. Dados obtidos com Sistema 1 105
- Figura 59.** Perfis médios de emissão da reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de $Cu(II)$ ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($pH=10,46$ e $[CO_3^{2-}]=0,184 \text{ mol L}^{-1}$) com diferentes padrões de H_2O_2 (mol L^{-1}): (1) $8,9 \times 10^{-3}$; (2) $1,3 \times 10^{-2}$; (3) $4,4 \times 10^{-2}$; e (4) $8,9 \times 10^{-2}$. $T=25,0 \pm 0,1^\circ C$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$) 109
- Figura 60.** (A) Variação entre a $I_{\max}$ obtida e a $[H_2O_2]$; (B) Variação entre D ($I=0,08$ unidades relativas) e a $[H_2O_2]$; (C) Variação da tangente entre 0,300 a 0,931 s e a $[H_2O_2]$; obtidas pelos perfis de emissão da reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de $Cu(II)$ ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($pH=10,46$ e $[CO_3^{2-}]=0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($T=25,0 \pm 0,1^\circ C$). Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$) 110
- Figura 61.** Perfis relativos de emissão da reação de luminol em presença de $Cu(II)$ e em tampão carbonato ($pH = 10,48$, $[CO_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) variando a $[LN]$ (mol L^{-1}): (1) 1×10^{-3} ; (2) $2,0 \times 10^{-3}$; (3) $4,0 \times 10^{-3}$; (4) $6,0 \times 10^{-3}$; e (5) $1,0 \times 10^{-2}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ C$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$) 111

- Figura 62.** (A) Variação de $I_{\max}$ com [LN]; (B) variação de D ($I=0,02$ unidades relativas) com [LN]; (C) variação da tangente entre 0,300 e 0,931 s; a partir dos perfis relativos de emissão da reação de luminol em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($\text{pH} = 10,48$, $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$)..... 112
- Figura 63.** Perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) e em tampão carbonato ($\text{pH} = 10,48$, $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) variando a [Cu(II)] (mol L^{-1}): (1) $7,0 \times 10^{-5}$; (2) $1,8 \times 10^{-4}$; (3) $3,5 \times 10^{-4}$; e (4) $7,0 \times 10^{-4}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$)..... 113
- Figura 64.** (A) Variação de $I_{\max}$ com a [Cu(II)]; (B) variação de D com a [Cu(II)]; (C) variação de $-\tan \alpha$ com a [Cu(II)]; obtidas a partir dos perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) e em tampão carbonato ($\text{pH} = 10,5$, $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$)..... 114
- Figura 65.** Perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($\text{pH} = 10,40$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) variando a $[\text{CO}_3^{2-}]$ (mol L^{-1}): (1) $9,0 \times 10^{-2}$; (2) 0,2; (3) 0,7; e (4) 1,1. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$)..... 115
- Figura 66.** (A) Variação de $I_{\max}$ com a $[\text{CO}_3^{2-}]$; (B) variação de D com a $[\text{CO}_3^{2-}]$; (C) variação de $-\tan \alpha$ com a $[\text{CO}_3^{2-}]$; obtidas a partir dos perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($\text{pH} = 10,40$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$)..... 116
- Figura 67.** Perfis relativos obtidos pela reação entre a solução de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($\text{pH} = 10,3$, $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) e soluções de H_2O_2 ($8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) contendo diferentes concentrações de ácido úrico, em mol L^{-1} : (1) 0; (2) $1,0 \times 10^{-5}$; (3) $1,0 \times 10^{-4}$; (4) $2,0 \times 10^{-4}$; (5) $3,0 \times 10^{-4}$ e (6) $5,0 \times 10^{-4}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Os monitoramentos foram realizados com o Sistema 1. 120
- Figura 68.** Curvas de calibração lineares obtidas pelo método do tempo fixo em (1) 12 s, (2) 18 s, (3) 22 s e (4) 25 s obtidas pelos perfis de emissão relativos da reação quimiluminescente ($[\text{LN}] = 2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e $\text{pH} = 10,31$). Equações obtidas: (1) $I_{12\text{s}} = 9,4 \times 10^{-2} + 5,13 \times 10^{-3} [\text{AU}]$, $r = 0,9961$; (2) $I_{18\text{s}} = 4,0 \times 10^{-2} + 3,97 \times 10^{-3} [\text{AU}]$, $r = 0,9947$; (3) $I_{22\text{s}} = 2,1 \times 10^{-2} + 3,57 \times 10^{-3} [\text{AU}]$, $r = 0,9939$; e (4) $I_{25\text{s}} = 1,1 \times 10^{-2} + 3,32 \times 10^{-3} [\text{AU}]$, $r = 0,9935$ 121
- Figura 69.** Curvas de calibração polinomiais obtidas pelo método das tangentes nos intervalos de (1) 10 s a 14 s e (2) 20 s a 25 s, obtidas pelos perfis de emissão relativos da reação quimiluminescente ($[\text{LN}] = 2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e $\text{pH} = 10,31$). Equações obtidas: (1) $Y = 1,64 \times 10^{-2} + 3,6 \times 10^{-4} [\text{AU}] - 2 \times 10^{-6} [\text{AU}]^2$, $r = 0,9955$; e (2) $Y = 3,64 \times 10^{-2} + 1,4 \times 10^{-4} [\text{AU}] - 1,0 \times 10^{-6} [\text{AU}]^2$, $r = 0,9990$ 121
- Figura 70.** Curva de calibração da D em função da concentração de ácido úrico obtida pelos perfis de emissão da reação quimiluminescente ($[\text{LN}] = 2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e $\text{pH} = 10,31$). Equação obtida: $D = 25 + 2,9 [\text{AU}] + 4,4 \times 10^{-2} [\text{AU}]^2$, $r = 0,9971$ 122

- Figura 71.** (A) Perfis relativos obtidos pela reação entre a solução de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($\text{pH}=10,1$, $[\text{CO}_3^{2-}]=0,2 \text{ mol L}^{-1}$) e soluções de H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) contendo diferentes concentrações de ácido úrico, em mol L^{-1} : (1) 0; (2) $5,0 \times 10^{-5}$, (3) $1,5 \times 10^{-4}$, (4) $3,0 \times 10^{-4}$, e (5) $6,0 \times 10^{-4}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Os monitoramentos foram realizados com o Sistema 2 ($\lambda_e=420 \text{ nm}$; 1X de Ganho; $V_{\text{foto}}=600\text{V}$).
- (B) Perfis relativos a partir do segundo máximo de intensidade..... 123
- Figura 72.** Curvas de calibração obtidas a partir da (1) I_{max} registrada e do método do tempo fixo em (2) 1,869 s, (3) 3,744 s e (4) 6,250 s dos perfis médios de emissão relativos obtidos pela reação quimiluminescente do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de ácido úrico. ($[\text{Cu(II)}]=1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; tampão carbonato, $\text{pH}=10,1$ e $[\text{CO}_3^{2-}]=0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; $\lambda_e=420 \text{ nm}$; 1X de Ganho; $V_{\text{foto}}=600\text{V}$). Os monitoramentos foram realizados com o Sistema 2. A tabela 7 apresenta as equações obtidas..... 124
- Figura 73.** Curva de calibração linear obtida a partir do método das tangentes no intervalo de 0,619 a 1,244 s dos perfis médios de emissão relativos obtidos pela reação quimiluminescente do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de ácido úrico ($[\text{Cu(II)}]=1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; tampão carbonato, $\text{pH}=10,1$ e $[\text{CO}_3^{2-}]=0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; $\lambda_e=420 \text{ nm}$; 1X de Ganho; $V_{\text{foto}}=600\text{V}$). Os monitoramentos foram realizados com o Sistema 2. Equação obtida - $\tan \alpha = 3,16 \times 10^{-2} - 3,6 \times 10^{-4} [\text{AU}]$, $r=0,9956$ 125
- Figura 74.** Perfis médios relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 10,0$) com H_2O_2 ($8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de ácido ascórbico, em mol L^{-1} : (1) 0; (2) $6,5 \times 10^{-5}$; (3) $1,3 \times 10^{-4}$; (4) $1,9 \times 10^{-4}$; (5) $3,2 \times 10^{-4}$; e (6) $4,5 \times 10^{-4}$. $T=25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 1..... 129
- Figura 75.** Curvas de calibração obtidas a partir do método do tempo fixo aplicado nos tempos de (1) 8s, (2) 12 s, (3) 15 s e (4) 25 s dos perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 10,0$) com H_2O_2 ($8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de ácido ascórbico. $T=25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 1. As equações obtidas estão apresentadas na tabela 9..... 130
- Figura 76.** Perfis médios relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 10,60$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de AA (mol L^{-1}): (1) $5,15 \times 10^{-5}$; (2) $1,03 \times 10^{-4}$; (3) $3,09 \times 10^{-4}$; (4) $5,15 \times 10^{-4}$; e (5) $6,18 \times 10^{-4}$. $T=25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e=420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}}=600 \text{ V}$)..... 131
- Figura 77.** Curva de calibração obtida pela relação entre a I_{max} com [AA] a partir dos perfis médios relativos da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 10,60$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de ácido ascórbico. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e=420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}}=600 \text{ V}$). Equação obtida: $I_{\text{max}} = 1,01 - 6,8 \times 10^{-3} [\text{AA}]$, $r=0,9956$ 131
- Figura 78.** Curvas de calibração obtidas a partir do método do tempo fixo em: (1) 0,619 s; (2) 1,869 s; (3) 3,119 s; e (4) 3,744 s. As equações lineares obtidas estão apresentadas na tabela 10, respectivamente. ($\lambda_e=420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}}=600 \text{ V}$; $[\text{LN}] = 2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH} = 10,60$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) 132

- Figura 79.** (A) Curva de calibração obtida pelo método das tangentes no intervalo de 0 a 0,619 s; e (B) curvas de calibração obtidas a partir do método das tangentes nos intervalos (1) de 1,869 s a 2,494s; (2) de 3,744 s a 4,369s; (3) de 4,994 s a 5,619 s; e (4) de 6,244s a 6,869 s. ($[\text{H}_2\text{O}_2]=4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{LN}]=2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Cu(II)}]=1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; pH=10,6).
As equações estão apresentadas na tabela 10 133
- Figura 80.** Perfis relativos de emissão das amostras: (1) amostra 1; (2) amostra 2; e (3) amostra 3.
As condições de monitoramento foram: ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{LN}] = 2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\lambda_e = 420 \text{ nm}$; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$; 1X Ganho; $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; pH = 10,6) 138
- Figura 81.** Perfis relativos de emissão do método da adição de padrão de ácido ascórbico (mol L^{-1}) à amostra 1: (1) 0; (2) $1,02 \times 10^{-4}$; (3) $2,04 \times 10^{-4}$; (4) $3,06 \times 10^{-4}$; e (5) $4,08 \times 10^{-4}$.
As condições de monitoramento foram: ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{LN}] = 2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\lambda = 420 \text{ nm}$; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$; 1X Ganho; $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; pH = 10,6) 140
- Figura 82.** Perfis relativos de emissão do método da adição de padrão de ácido ascórbico (mol L^{-1}) à amostra 2: (1) 0; (2) $1,04 \times 10^{-4}$; (3) $2,08 \times 10^{-4}$; e (4) $3,12 \times 10^{-4}$.
As condições de monitoramento foram: ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{LN}] = 2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\lambda_e = 420 \text{ nm}$; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$; 1X Ganho; $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; pH = 10,6) 140
- Figura 83.** Perfis relativos de emissão do método da adição de padrão de ácido ascórbico (mol L^{-1}) à amostra 3: (1) 0; (2) $1,07 \times 10^{-4}$; (3) $2,14 \times 10^{-4}$; e (4) $3,21 \times 10^{-4}$.
As condições de monitoramento foram: ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{LN}] = 2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\lambda = 420 \text{ nm}$; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$; 1X Ganho; $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; pH = 10,6) 140

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. λ_e da reação quimiluminescente do luminol para diferentes solventes.....	25
Tabela 2. Soluções de trabalho de luminol contendo diferentes concentrações de Cu(II) e Ni(II).....	68
Tabela 3. Soluções de trabalho de H ₂ O ₂ contendo diferentes concentrações de ácido ascórbico.....	68
Tabela 4. Condições e concentrações dos reagentes na otimização dos monitoramentos da reação quimiluminescente utilizando o Sistema 1. T = 25,0 ± 0,1 °C.....	69
Tabela 5. Condições e concentrações dos reagentes na otimização dos monitoramentos da reação quimiluminescente utilizando o Sistema 2. T = 25,0 ± 0,1 °C; V _{foto} = 600 V; Ganho: 1X. λ_e = 420 nm.....	70
Tabela 6. Concentrações utilizadas nas avaliações dos sistemas de detecção na determinação de ácido úrico pela técnica quimiluminescente.....	119
Tabela 7. Equações das curvas ilustradas na figura 72.....	124
Tabela 8. Equações das curvas ilustradas na figura 75. O símbolo r e I representam o coeficiente de correlação e a intensidade relativa em um intervalo, respectivamente.....	130
Tabela 9. Equações das curvas ilustradas na figura 78. Os símbolos r e I representam o coeficiente de correlação e o valor da intensidade relativa em um intervalo, respectivamente.....	132
Tabela 10. Equações das curvas ilustradas na figura 79. Os símbolos r e -tan α representam o coeficiente de correlação e o valor negativo da tangente em um intervalo, respectivamente.....	133
Tabela 11. Resultados da análise direta das amostras de medicamentos.....	139
Tabela 12. Resultados das análises dos medicamentos com a adição de padrão.....	141
Tabela 13. Alguns métodos analíticos para determinação de ácido ascórbico. Os símbolos c _m e s _r representam os valores de limite de detecção e desvio padrão relativo, respectivamente.....	144

INTRODUÇÃO

"[...] não há um princípio para as coisas e para as pessoas, tudo o que um dia começou tinha começado antes, a história desta folha de papel, tomemos o exemplo mais próximo das mãos, para ser verdadeira e completa, teria de ir remontando até os princípios do mundo, [...], e ainda assim duvidemos, que esses princípios princípios não foram, somente pontos de passagem, rampas de escorregamento, pobre a cabeça a nossa, sujeita a tais puxões, admirável cabeça, apesar de tudo, que por todas as razões é capaz de enlouquecer, menos por essa."

(do Livro "*A Jangada de Pedra*" de José Saramago, 1986)

CAPÍTULO 1:

MÉTODOS CINÉTICOS DE ANÁLISE

"[...] these methods have not yet found their way into widely known reference publications and textbooks and have not received their proper application in practice."

(trecho do livro "*Kinetics Methods of Analysis*" de K. B. Yatsimirskii, 1966)

1.1. Métodos Cinéticos de Análise:

Na química analítica moderna, há diversas técnicas e métodos baseados em medidas de mudanças físicas, químicas e físico-químicas de um sistema envolvendo uma reação química. Qualquer reação química apresenta uma velocidade finita e tende ao equilíbrio. Assim, há duas regiões distintas: a dinâmica (região cinética), na qual ocorre a variação na velocidade de reação, e a estática (região de equilíbrio), em que os processos envolvidos no sistema atingem o equilíbrio e a velocidade da reação é constante. Ambas as regiões apresentam grande potencial para aplicação analítica, sendo que os métodos clássicos de análise ou termodinâmicos, como gravimetria, volumetria e a maioria dos métodos instrumentais, são aplicados às reações quando estas se completam ou atingem o equilíbrio. Os métodos cinéticos são aqueles que apresentam a aquisição do sinal analítico durante a etapa dinâmica do processo antes que a reação atinja o equilíbrio (PEREZ-BENDITO & SILVA, 1988).

Os métodos cinéticos têm, como a principal vantagem em relação aos métodos clássicos, a possibilidade de desenvolver métodos analíticos com reações rápidas e lentas. Contudo, as aplicações e o desenvolvimento de métodos cinéticos inicialmente apresentaram algumas desvantagens em relação aos métodos clássicos, principalmente pela complexidade do tratamento dos dados experimentais. Atualmente, este aspecto deixou de ser um inconveniente para a aplicação e desenvolvimento de novos métodos cinéticos devido à popularização dos computadores (PEREZ-BENDITO & SILVA, 1988).

Os métodos cinéticos apresentam ainda outras vantagens, como não serem afetados por interferentes que se mantêm constantes durante as medidas, o menor tempo de análise e o baixo custo das técnicas utilizadas para as medidas. Além disso, as reações catalíticas e enzimáticas apresentam limites de detecção tão baixos quanto as técnicas mais sofisticadas e utilizadas comercialmente, como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (representada CLAE ou a sigla em inglês: *HPLC*[#]) e Espectroscopia de Absorção Atômica (representada por EAA ou pela sigla em inglês: *AAS*^{##}).

Porém, uma dificuldade da metodologia cinética de análise envolve a reprodutibilidade dos resultados que requerem o controle rigoroso das condições que afetam a velocidade das reações como: temperatura, pH, força iônica, solventes, pureza e o processo de adição e mistura de reagentes. Por exemplo, as reações devem ser monitoradas sob termostatização e a adição e a mistura de reagentes devem ser feitas

[#] *High Performance Liquid Chromatography*

^{##} *Atomic Absorption Spectroscopy*

com sistema para análise por injeção em fluxo (FIA, *Flow Injection Analysis*), ou sistema de injeção manual simultânea de reagentes ou sistema de mistura de fluxo interrompido (*Stopped Flow*). Esta última é a técnica mais adequada e popular para monitoramento de reações rápidas, na qual volumes iguais de reagentes são adicionados rápida e simultaneamente numa cela de reação e o fluxo de solução misturada é interrompido bruscamente e efetivamente para iniciar o monitoramento da reação (MOTTOLA, 1988).

Apesar de ser um tópico corrente e tradicional em disciplinas de Físico-química, Química Orgânica e Química Inorgânica, a cinética das reações nem sempre foi totalmente reconhecida em Química Analítica, principalmente pela intensa aplicação de métodos clássicos de análise (MOTTOLA, 1988). Uma sucinta descrição histórica sobre os métodos cinéticos é apresentada na sequência a fim de ilustrar origens e tendências atuais.

1.2. Desenvolvimento dos Métodos Cinéticos de Análise:

Os primeiros estudos analíticos com características cinéticas foram desenvolvidos a partir de reações catalíticas no século XIX. Nesta época, a análise catalítica foi classificada como uma subdivisão da microanálise. Esta classificação já era questionável naquela época, pois a análise catalítica podia ser também aplicada a macroamostras, com massa maior que 0,1g. Até então, a maioria dos pesquisadores tinha a cinética das reações como somente um inconveniente para a adequação dos métodos clássicos, por exemplo, na verificação de pontos finais de titulações para reações lentas cuja cinética não propiciava uma distinção nítida do ponto final (MOTTOLA, 1988).

O primeiro relato baseado na cinética das reações foi feito por GUYARD (1876), que descreveu o efeito catalítico do vanádio na reação do negro de anilina pelo íon clorato e propôs o uso da reação para determinar vanádio. Em 1885, WITZ & OSMOND descreveram um método semiquantitativo de determinar vanádio com esta reação. Apesar destes resultados promissores, os métodos cinéticos foram esquecidos pelos cientistas da época, possivelmente, pela intensa utilização dos métodos clássicos. Após 50 anos do trabalho de WITZ & OSMOND (1885), os métodos cinéticos foram retomados nos trabalhos de SANDELL & KOLTHOFF (1934), que propuseram o uso do efeito catalítico do iodeto na reação entre o Ce(IV) e o As(III) para determinação de iodeto. Na mesma década, SZEBELLEDY & AJTAI (1938) relataram os efeitos catalíticos do vanádio em outras reações, conseguindo determinar cerca de 0,6 ng deste metal

(SZEDELLEDY & AJTAI, 1939). Desde então, a cinética das reações assumiu um papel importante no desenvolvimento da Química Analítica. Durante as décadas de 50 a 70, século XX, o crescimento dos métodos cinéticos foi pequeno, já que as limitações da instrumentação da época e a relativa complexidade dos tratamentos dos dados cinéticos dificultaram a popularização da técnica.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento e o aprimoramento de novas técnicas de aquisição e tratamento de dados analíticos, conjuntamente com a necessidade de criar novos métodos mais sensíveis e seletivos, abriram o caminho para muitas outras técnicas analíticas, destacando-se, dentre outras, os métodos cinéticos de análise. O crescimento do número de publicações com esta técnica pode ser observado pela pesquisa realizada no banco de dados *Web of Science*[#], que revelou que desde 1945 até os dias de hoje, foram catalogados cerca de 1500 publicações (artigos, notas e resumos de encontros) sobre aplicações analíticas da cinética das reações nas obras contidas neste *site*. As palavras chaves utilizadas para a pesquisa foram: (*kinetic or kinetics*) and (*analysis or determination*).

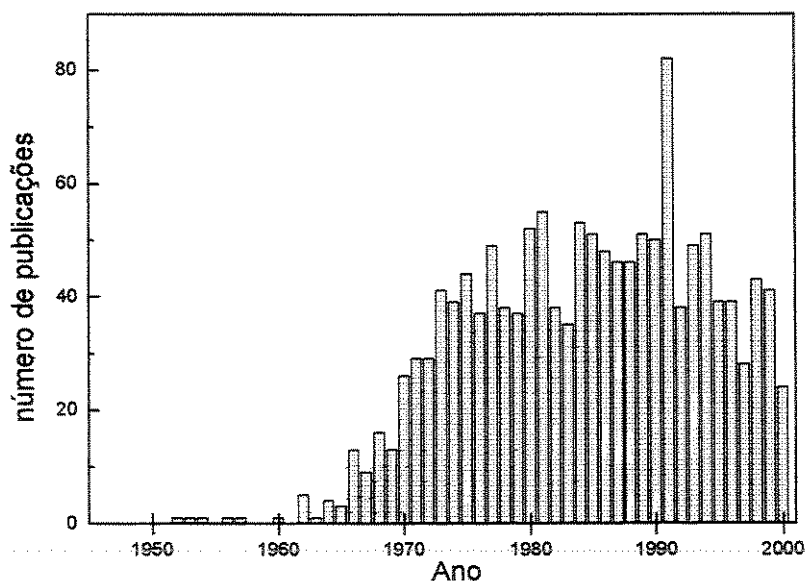


Figura 1. Publicações de trabalhos sobre métodos cinéticos de análise desde 1945.

Com o advento do microcomputador, várias análises catalíticas e não-catalíticas foram desenvolvidas e, na década de 80, os métodos cinéticos representaram expressiva

[#] A Web of Science é uma base de dados produzida pelo *Institute for Scientific Information*, com informações sobre artigos publicados, a partir de 1945, em mais de 8.400 periódicos especializados em todas as áreas do conhecimento (Ciências, Ciências Humanas e Sociais, Artes e Humanidades). Esta ferramenta de pesquisa está disponível à UNICAMP graças ao patrocínio da FAPESP e do CNPQ.

parcela das publicações científicas (MOTTOLA, 1988). O desenvolvimento das técnicas em fluxo de análise, como os métodos por injeção em fluxo e por fluxo contínuo e segmentado, decididamente influenciou o crescimento das aplicações dos métodos cinéticos em várias áreas de pesquisa, como em análises clínicas, durante as últimas décadas do século XX (PEREZ-BENDITO & SILVA, 1988). Avaliando-se a taxa de publicações anual, nota-se número crescente de 1945 a 2000. O crescimento das publicações aumentou bastante durante todos estes anos, chegando ao máximo em 1991, com mais de 80 trabalhos publicados. Desde os anos 70, cerca de 40 trabalhos vêm sendo publicados por ano.

Avaliando-se a pesquisa bibliográfica, pôde-se também realizar a distribuição geopolítica dos trabalhos publicados. Para melhor compreensão da influência política no desenvolvimento dos métodos cinéticos, a pesquisa foi separada em duas fases cronológicas:

- de 1945 a 1990, época da Guerra Fria entre os blocos socialistas (liderados pela antiga URSS) e capitalistas (liderados pelos EUA);
- de 1991 até os dias de hoje, época pós-guerra fria com a queda do Muro de Berlim e da antiga URSS.

A escolha das fases foi proposital para demonstrar a influência da disputa entre os blocos capitalista e socialista na primeira fase e a queda da hegemonia dos líderes dos blocos e ascensão de países que buscam o reconhecimento científico internacional.

A figura 2 representa a distribuição dos trabalhos publicados sobre análise cinética entre 1945 a 1990, de acordo com os países de origem da pesquisa.

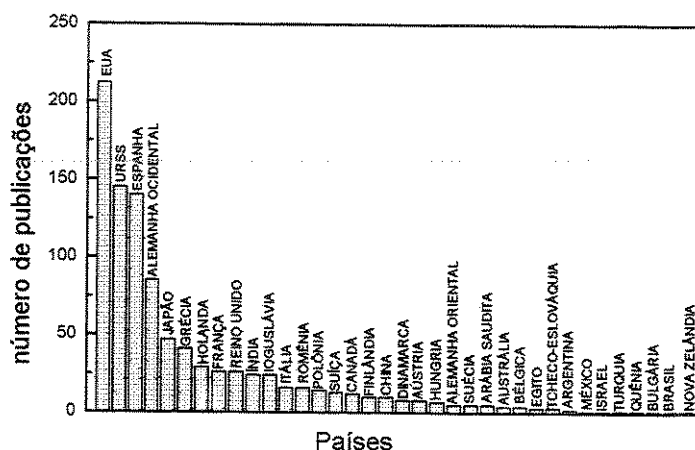


Figura 2. Distribuição por país de origem das publicações sobre métodos cinéticos de análise de 1945 a 1990.

mais utilizado em revistas internacionais continuou sendo o inglês, notando-se poucas publicações nos idiomas de origem dos periódicos, como os chineses.

Atualmente, os métodos cinéticos de análise vêm se destacando como uma opção analítica extremamente sensível e barata. Em comparação aos métodos clássicos, os métodos cinéticos de análise foram se tornando populares por sua simplicidade, precisão, menor tempo de análise, diminuição do número de interferentes e facilidade para a automação (PEREZ-BENDITO & SILVA, 1988). Além disso, quando estes métodos são associados às técnicas quimiométricas para tratamentos de dados, tornam-se ainda mais versáteis, simplificando até procedimentos de análise simultânea de misturas (XIE, BAEZA-BAEZA, RAMIS-RAMOS, 1996).

Desde 1945, o desenvolvimento das aplicações dos métodos cinéticos vem crescendo, acompanhando a ascensão tecnológica. Desde a última década do século XX, os métodos cinéticos de análise podem ser considerados uma área da Química Analítica reconhecidamente amadurecida por suas aplicações e pelo seu desenvolvimento. A partir dos novos avanços tecnológicos, como a robótica e técnicas mais sofisticadas de tratamento de dados, CROUCH (1993) indicou as novas tendências para os métodos cinéticos de análise, que podem ser assim resumidas:

- o aumento do uso da automação inteligente, ou seja, todas as condições de análise controladas por computador;
- o crescimento da utilização de dados multidimensionais;
- o desenvolvimento de técnicas sofisticadas de tratamento de dados;
- o progresso nos métodos de compensação de erros;
- as inovações dos procedimentos cinéticos com multicomponentes;
- a expansão das aplicações da determinação cinética;
- aplicação das aproximações cinéticas para os vários tipos de respostas dependentes do tempo.

Avaliando-se as tendências citadas, verificou-se que os novos rumos dos métodos cinéticos possivelmente são influenciados pelo avanço tecnológico e pela superação das dificuldades do método em relação a outros, no caso, a reprodutibilidade das condições e o tratamento dos dados adquiridos, principalmente dos dados multivariados.

O próximo item discute o tratamento matemático para a obtenção dos parâmetros cinéticos de análises que fundamentam os métodos cinéticos de análise.

1.3. Aplicação da Análise Cinética:

As aplicações da análise cinética podem ser divididas de acordo com o tipo de reação química envolvida. Assim, os métodos cinéticos podem ser classificados em métodos catalíticos e não-catalíticos (MOTTOLA, 1988 e PEREZ-BENDITO & SILVA, 1988).

1.3.1. Reações Catalisadas (MOTTOLA, 1988):

Para estabelecer uma relação matemática válida para a determinação analítica com reação catalítica, dois aspectos devem ser levados em conta:

1º: a reação não catalisada ocorre simultaneamente com a reação catalisada;

2º: a velocidade da reação catalisada pode ser considerada diretamente proporcional à concentração do catalisador.

Deve-se salientar que a proporcionalidade direta entre a concentração de catalisador e a velocidade da reação é melhor obedecida se condições da reação, como temperatura e mistura dos reagentes, além de outros parâmetros físico-químicos, forem mantidos constantes. Outro requisito importante é que a concentração dos reagentes, do catalisador e da espécie cuja mudança de concentração é monitorada, sejam ajustadas para que a reação seja de pseudo-primeira ordem.

Supondo estas aproximações, a reação pode ser descrita em termos gerais como:

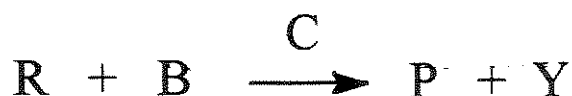


Figura 4. Esquema de uma reação genérica catalisada.

onde R e B são os reagentes (sendo R a espécie monitorada), P e Y são os produtos e C é o catalisador. Pode-se, então escrever uma expressão geral da velocidade da reação como:

$$-\frac{d[R]}{dt} = k_a[R] + k_c[R][C]_0 = [R](k_a + k_c[C]_0) \quad (1)$$

onde k_a é a constante de velocidade da reação não catalisada, k_c é a constante de velocidade da reação catalisada, $[C]_0$ é a concentração inicial de catalisador e $[R]$ é a concentração do reagente, cuja concentração é monitorada.

Para simplificar o sistema estudado, pode-se utilizar um esquema de uma reação de duas etapas e desenvolver um modelo matemático para explicar a relação direta ou aproximadamente direta entre a velocidade da reação e a concentração do catalisador.

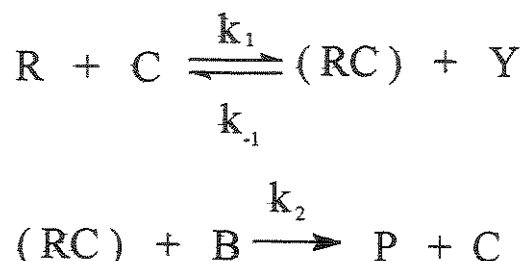


Figura 5. Esquema de reação em duas etapas para um ciclo catalítico, no qual (RC) representa uma espécie intermediária.

Este mecanismo simplificado para o ciclo catalítico leva em conta duas condições: uma etapa de pré-equilíbrio (1º esquema de equação da figura 5) e uma etapa estacionária (2º esquema de equação da figura 5).

Seja, por exemplo, o caso de $k_{-1} \ll k_1$ e $k_2 \ll k_1$, a etapa estacionária é determinante da velocidade da reação e tem-se uma condição de pré-equilíbrio. Assim, a concentração do intermediário (RC) pode ser obtida pela seguinte equação:

$$[RC] = K[C] \frac{[R]}{[Y]} \quad (2)$$

onde $K = k_{-1} / k_1$

Sendo a concentração inicial de catalisador, $[C]_0$, e de reagente, $[R]_0$, como concentrações em equilíbrio em $t = 0$, então em qualquer tempo t :

$$[R] = [R]_0 - [(RC)] \quad (3)$$

$$[C] = [C]_0 - [(RC)] \quad (4)$$

Em métodos catalíticos, a concentração de catalisador é bem menor que a do reagente ($[R]_0 \gg [C]_0$). Com estas considerações e rearranjos, a partir da equação 2, chega-se a:

$$[(RC)] = \frac{K[C]_0[R]_0}{K[R]_0 + [Y]} \quad (5)$$

Se $[Y] \ll K [R]_0$, o que ocorre geralmente nas reações catalíticas, pois $[C]_0$ é pequeno, e $[B]$ é constante (no início da reação, por exemplo), então:

$$v = -\frac{d[R]}{dt} = k'_2 [C]_0 \quad (6)$$

com $k'_2 = k_2 [B]$. Esta relação 6 reflete a proporcionalidade direta entre a concentração do catalisador e a velocidade da reação.

Raciocínio análogo pode ser feito para o caso de $k_2 \gg k_1 \gg k_{-1}$, ou seja, a etapa estacionária torna-se determinante da velocidade da reação e a concentração do intermediário torna-se constante e pequena.

$$\frac{d[(RC)]}{dt} = 0 \quad (7)$$

Neste caso, a equação da velocidade da reação torna-se:

$$v = k_1 [R][C] - k_{-1} [(RC)][Y] \quad (8)$$

Após todas as considerações, chega-se da mesma forma a equação 6. Isto demonstra novamente a proporcionalidade direta da velocidade da reação com a concentração do catalisador.

1.3.2. Reações Não-Catalisadas (PEREZ-BENDITO & SILVA, 1988):

No caso dos métodos não-catalíticos, a reação pode ser simplificada em termos gerais como:



Figura 6. Representação genérica de uma reação não-catalisada.

Para iniciar um desenvolvimento matemático válido, supõe-se que a velocidade de reação direta seja muito maior que da reação inversa e que possa ser comparada com o aparecimento do produto (P) ou desaparecimento dos reagentes (A ou B).

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} \quad (9)$$

Contudo, a velocidade da reação também é proporcional as concentrações de todas as espécies participantes da reação (no caso, [A] e [B]). Se a variação na concentração de um dos produtos, $d[P] / dt$, for medida, então:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k[A][B] \quad (10)$$

onde k é a constante de velocidade da reação.

Se um grande excesso de um dos reagentes está presente, então sua variação de concentração pode ser considerada insignificante e o parâmetro de concentração relacionado com um dos reagentes da equação 10 pode ser incluído com a constante de velocidade em uma constante aparente, k' ou k'' :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k'[A] \quad (11)$$

ou

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k''[B] \quad (12)$$

sendo $k' = k[B]$ e $k'' = k[A]$.

Na equação 11, pode-se considerar que a reação é de *pseudo-primeira ordem* em relação a A. Na equação 12, a reação é de *pseudo-primeira ordem* em relação a B.

Assim, o monitoramento cinético do produto, P, é diretamente proporcional à concentração de um dos reagentes, levando em conta que a propriedade física ou química do sistema que está sendo monitorada é proporcional à variação da concentração de P, $d[P] / dt$, ou seja, a velocidade da reação.

As relações encontradas entre a velocidade da reação, v , para as reações catalisadas (equação 6) e não-catalisadas (equações 11 e 12) fundamentam os métodos matemáticos integrais e diferenciais utilizados para encontrar os parâmetros cinéticos para a construção das curvas analíticas pelos métodos cinéticos.

1.3.3. Métodos Integrais (MOTTOLA, 1988):

Os métodos integrais têm seus fundamentos na aquisição dos parâmetros cinéticos diretamente a partir da integralização das curvas cinéticas em intervalos finitos. Os principais métodos integrais são o do tempo fixo e o do tempo variável.

Pelo método do tempo fixo, são obtidos os valores da propriedade medida num dado intervalo e estes valores são relacionados com a concentração da espécie de interesse.

Para as reações catalíticas, pode-se provar matematicamente esta relação rearranjando a equação 1 (página 9), integrando-a em um intervalo de tempo ($\Delta t = t_2 - t_1$) e em uma faixa de concentração ($\Delta[R] = [R]_2 - [R]_1$). Chega-se a seguinte relação entre os parâmetros cinéticos e a concentração da espécie de interesse:

$$\ln \frac{[R]_1}{[R]_2} = (k_a + k_c [C]_0) \Delta t \quad (13)$$

lembrando que R representa o reagente e C é o catalisador.

Supondo que $\ln [R]_1 / [R]_2 = \Delta^*[R] = R_1 - R_2$, pode-se relacionar a concentração do catalisador inicial com $\Delta^*[R]$ e a Δt :

$$[C]_0 = \frac{\Delta^*[R]}{k_c \Delta t} - \frac{k_a}{k_c} \quad (14)$$

A partir desta equação, pode-se relacionar a concentração inicial do catalisador, $[C]_0$, com a variação de concentração da espécie monitorada, $\Delta^*[R]$, para um intervalo de tempo, Δt , constante. Obtém-se, assim, uma proporcionalidade direta entre a concentração do analito e o valor da propriedade física ou química monitorada. Esta relação fundamenta o método integral do tempo fixo.

Por outro lado, o método do tempo fixo pode ser demonstrado matematicamente para as reações não-catalisadas de primeira ordem (ou pseudo-primeira ordem). A partir da integração das equações 11 e 12 em um tempo finito ($\Delta t = t_2 - t_1$) e em uma faixa de concentração da espécie de interesse ($\Delta[A] = [A] - [A]_t$) chega-se a:

$$\ln[A] = \ln[A]_t + k' \Delta t \quad (15)$$

A última equação mostra que a concentração da espécie de interesse em um tempo t, $[A]_t$, está relacionada com a variação do tempo e a concentração inicial da

espécie de interesse, $[A]_0$. Novamente, se o intervalo de tempo for constante para todos os monitoramentos, $\ln [A]_t$ ou a propriedade física ou química que se relaciona diretamente ou indiretamente com este parâmetro será proporcional a $\ln [A]$. Para reações de segunda ou diferentes ordens, a equação 15 muda de acordo com o resultado da integral da equação de velocidade.

Para ilustração do método do tempo fixo, apresentam-se, na figura 7, curvas cinéticas genéricas (a) e as curvas analíticas obtidas para as reações catalisadas (b) e não-catalisadas de pseudo-primeira ordem (c). A propriedade monitorada, Y , é medida em diferentes concentrações iniciais de catalisador, $[C]$, no caso de reações catalisadas ou em diferentes concentrações iniciais de reagente, $[A]$, no caso de reações não-catalisadas. Por exemplo, escolhe-se o tempo fixo em 10 s para as medidas de Y , que podem ser obtidas nas curvas cinéticas para cada concentração do analito, o catalisador C para as reações catalisadas ou o reagente ou produto A para as reações não-catalisadas. A correlação de Y ou $\ln Y$ é representada nas curvas analíticas para as reações catalisadas e não-catalisadas, respectivamente. As retas nestes gráficos (b) e (c) representam a correlação linear entre os parâmetros cinéticos com as concentrações dos analitos, que, portanto, podem ser quantificadas.

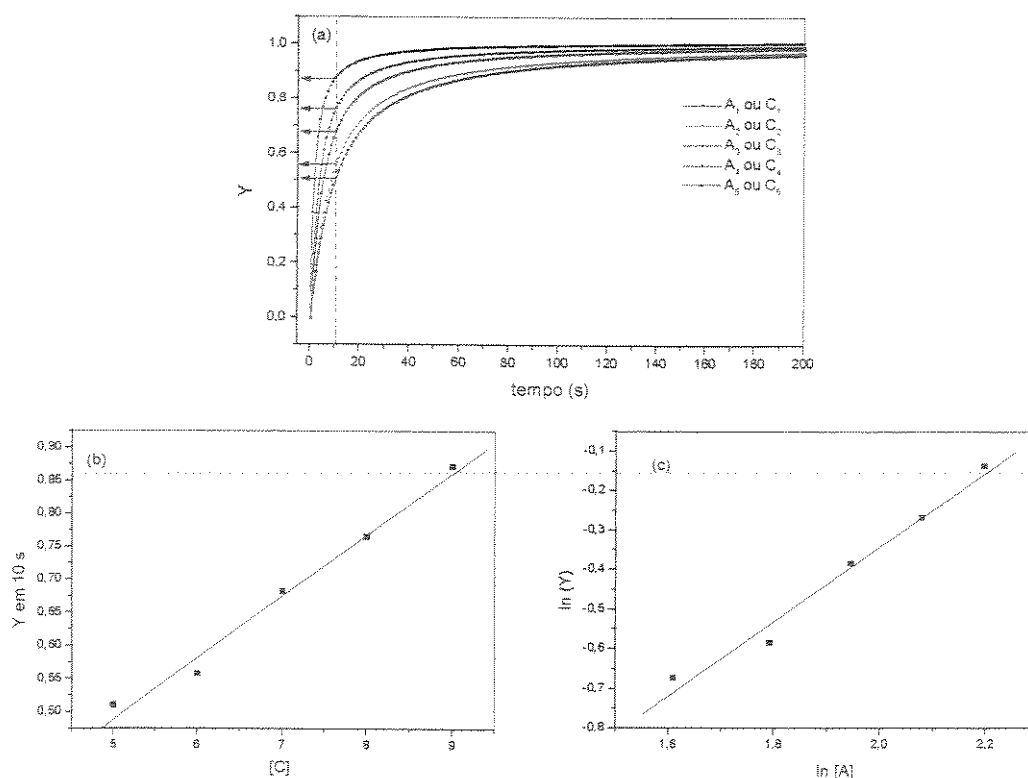


Figura 7. (a) Ilustração da aplicação do método do tempo fixo em curvas cinéticas e as curvas analíticas obtidas em (b) reações catalisadas e (c) não catalisadas.

Pelo método do tempo variável, os parâmetros cinéticos são obtidos pelo cálculo dos valores de tempo que correspondem ao intervalo para que a concentração da espécie monitorada chegue a um valor fixo.

Para as reações catalíticas, a equação 14 também pode ser usada para demonstrar matematicamente esta relação. A partir desta equação, a concentração da espécie de interesse, $[C]_0$, pode ser diretamente relacionada com o inverso do intervalo de tempo, $1 / \Delta t$, quando o valor de $\Delta^*[R]$ for constante.

Da mesma forma, para as reações não-catalisadas de primeira ordem, utilizando a equação 15 pode-se provar matematicamente a relação do método do tempo variável, pois fixando-se um valor de $\ln [A]_t$, o intervalo de tempo para se chegar a este valor, Δt , será proporcional ao $\ln [A]$.

A figura 8 ilustra a aplicação do método do tempo variável, apresentando curvas cinéticas genéricas (a) e as curvas analíticas obtidas para as reações catalisadas (b) e não-catalisadas (c). Por exemplo, escolhendo-se um valor fixo de Y , de 0,8 unidades, as curvas analíticas relacionam $1 / \Delta t$ dos padrões com a $[C]$ (b) e os valores de Δt com o $\ln [A]$ (c). As retas nestes gráficos (b) e (c) representam a correlação linear entre os parâmetros cinéticos com as concentrações dos analitos, que, portanto, também podem ser quantificadas desta forma.

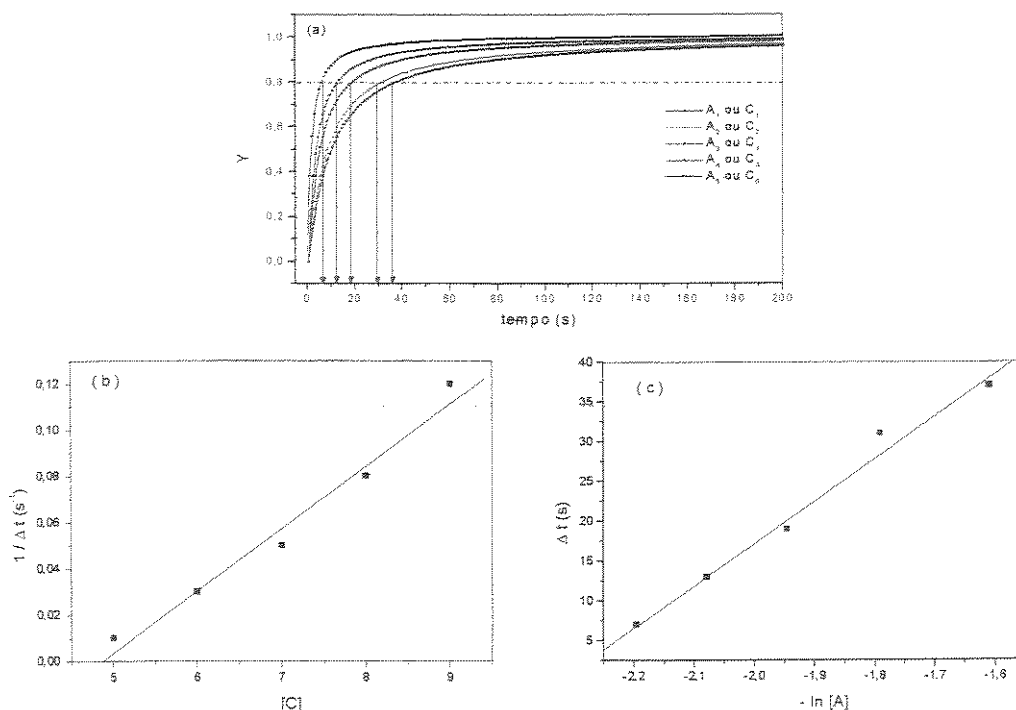


Figura 8. (a) Ilustração da aplicação do método do tempo variável em curvas cinéticas e as curvas analíticas obtidas para (b) reações catalisadas e (c) não-catalisadas.

1.3.4. Métodos Diferenciais (PEREZ-BENDITO & SILVA, 1988):

Os métodos diferenciais têm seu fundamento nos cálculos de velocidade da reação através do cálculo das derivadas de alguns intervalos escolhidos das curvas cinéticas. Os principais métodos diferenciais são o da velocidade inicial e o das tangentes.

O método da velocidade inicial compreende nos cálculos da velocidade dos primeiros pontos das curvas cinéticas e na relação destes parâmetros cinéticos com as concentrações da espécie de interesse. Para as reações catalíticas, pode-se encontrar a relação matemática que descreve a proporcionalidade do parâmetro cinético e a concentração da espécie de interesse, a partir da equação 1 (página 9). Como a reação está no início, as concentrações da espécie monitorada, $[R]$, e a espécie de interesse, $[C]$, diferem muito pouco das concentrações iniciais e podem ser consideradas constantes, ou seja, tem-se as condições de uma reação de pseudo-zero ordem:

$$-\frac{d[R]}{dt} = [R]_0(k_a + k_c[C]_0) \quad (16)$$

Supondo que neste intervalo pequeno de tempo, o valor da tangente deste intervalo pode ser considerado a velocidade da reação. Chega-se assim a uma relação entre o valores da tangente, $-\tan \alpha$, com a concentração inicial da espécie de interesse, $[C]_0$:

$$-\frac{d[R]}{dt} = -\tan \alpha \approx \frac{\Delta R}{\Delta t} = [R]_0(k_a + k_c[C]_0) \quad (17)$$

Para as reações não catalíticas, pode-se encontrar a relação matemática para este método a partir das equações 9 e 10 (páginas 11 e 12). No início, a reação apresenta condições de pseudo-zero ordem e, portanto, os valores de concentração dos reagentes, $[A]$ e $[B]$, não diferem significativamente dos valores iniciais:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = k[A][B] \quad (18)$$

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \tan \alpha \approx \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = k[A]_0[B]_0 \quad (19)$$

Se a concentração de um dos reagentes for mantida constante, por exemplo, a $[B]$, o valor da tangente do intervalo inicial é diretamente proporcional a concentração inicial da espécie de interesse, $[A]_0$:

$$\tan \alpha \approx \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = -\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = -\frac{\Delta[B]}{\Delta t} = k'[A]_0 \quad (20)$$

sendo $k' = k[B]_0$.

A figura 9 ilustra a aplicação do método da velocidade inicial em curvas cinéticas genéricas (a) e a curva analítica obtida para as reações catalisadas e não-catalisadas (b). Escolhendo-se um intervalo inicial fixo, por exemplo, nos 3 s iniciais, a curva analítica relaciona os valores da inclinação ou a velocidade inicial, v_i , dos padrões com a $[C]$ ou com a $[A]$ (b). A reta neste gráfico (b) representa a correlação linear entre os parâmetros cinéticos com as concentrações dos analitos, que, portanto, podem ser quantificadas.

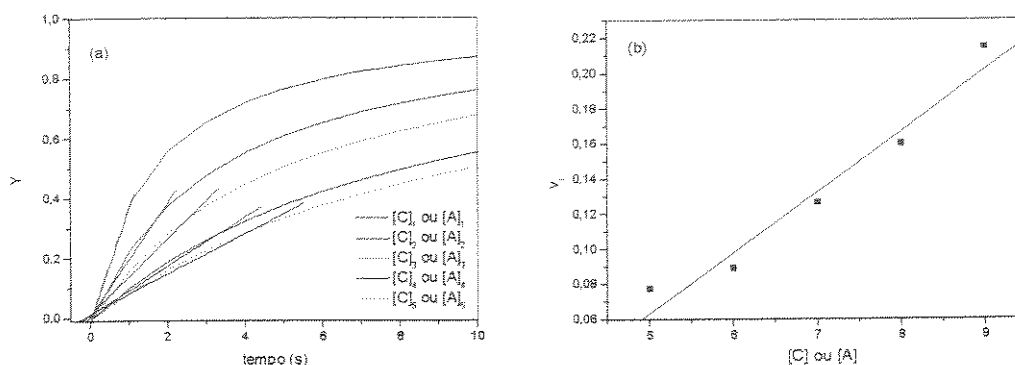


Figura 9. (a) Ilustração da aplicação do método da velocidade inicial em curvas cinéticas genéricas e (b) curva analítica obtida para reações catalisadas ou não-catalisadas.

Em ambos os métodos catalíticos e não catalíticos, é recomendável utilizar pontos das curvas cinéticas no intervalo inicial, quando 98 % dos reagentes ainda não foram convertidos em produto, para que as condições de pseudo-zero ordem sejam obedecidas e as relações matemáticas descritas sejam verdadeiras. O método da velocidade inicial tem como vantagem a não interferência da reação inversa (dos produtos para os reagentes) e de outras reações laterais porque a reação, inicialmente, é considerada de pseudo-zero ordem.

O método diferencial das tangentes representa a relação entre valores de tangente em um intervalo fixo das curvas cinéticas com as concentrações da espécie de interesse. Este método fundamenta-se na proporcionalidade da velocidade de reação com as concentrações dos reagentes durante a cinética da reação. Deve-se também considerar que o valor da tangente pode representar a velocidade da reação em qualquer intervalo

de tempo. Assim, pode-se construir curvas analíticas relacionando os valores das tangentes com as concentrações da espécie de interesse tanto para reações catalíticas quanto não-catalíticas.

A figura 10 ilustra a aplicação do método das tangentes em curvas cinéticas genéricas (a) e a curva analítica obtida para as reações catalisadas e não-catalisadas (b). Escolhendo-se um intervalo fixo, por exemplo, de 10 a 21 s, a curva analítica relaciona os valores da tangente, $\tan \alpha$, dos padrões com a $[C]$ ou com a $[A]$ (b). A reta neste gráfico (b) representa a correlação linear entre os parâmetros cinéticos com as concentrações dos analitos, que, portanto, podem ser quantificadas.

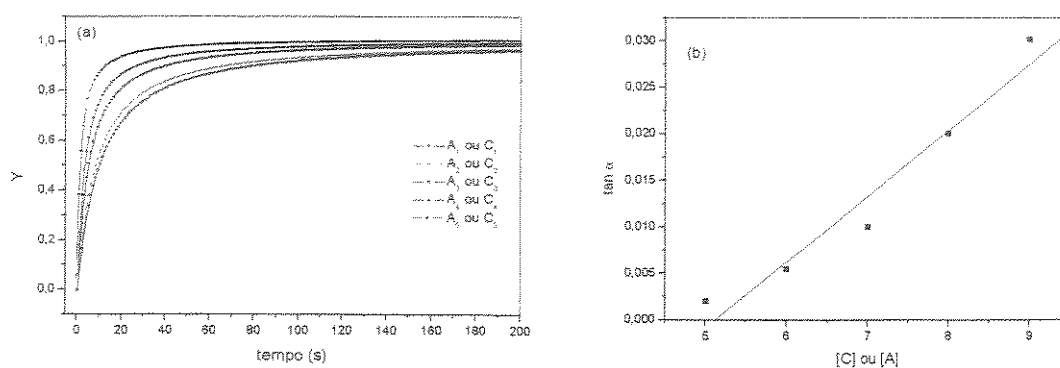


Figura 10. (a) Ilustração da aplicação do método das tangentes em curvas cinéticas e (b) a curva analítica obtida para as reações catalisadas ou não-catalisadas.

As desvantagens deste método são a possível interferência da reação inversa em intervalos próximos ao equilíbrio e as possíveis relações não-lineares encontradas entre os valores da tangente com as concentrações da espécie de interesse quando as ordens de reação são diferentes de 1.

CAPÍTULO 2: A QUIMILUMINESCÊNCIA DO LUMINOL

“[...] a boiguaçu toda já era uma luzerna, um clarão sem chamas, já era um fogaréu azulado, de luz amarela e triste e fria, saída dos olhos, que fora guardada neles, quando ainda estavam vivos...”

(trecho do conto “A Mboitatá” do Livro *Lendas do Sul* de J. Simões Lopes Neto, 1949)

2.1. A Quimiluminescência e a Bioluminescência:

A precisão e a sensibilidade das análises estão intimamente ligadas ao sistema reacional e aos instrumentos empregados. Por isso, cada vez mais, os pesquisadores têm procurado novos sistemas e tentado otimizar sistemas clássicos para aumentar a sensibilidade e a precisão dos métodos analíticos propostos. Com esta idéia, novas áreas de pesquisa para análise estão sendo estudadas, destacando-se, dentre outras, a quimiluminescência e a bioluminescência.

A quimiluminescência é a produção de radiação eletromagnética (ultravioleta, ultravioleta-visível ou infravermelho) por uma reação química. A bioluminescência é a produção da radiação por reações químicas realizadas por organismos vivos ou sistemas químicos derivados destes (ALBERTIN et al, 1998).

Desde a antiguidade, fenômenos de emissão de luz, como a quimiluminescência, eram descritos, mas, por muito tempo foram associados a mitos ou fantasmas. Em 1669, Brandt, a partir da destilação exaustiva de uréia, produziu fósforo que, devido a sua oxidação pelo O₂ do ar, produzia quimiluminescência (ALBERTIN et al, 1998). Em 1887, RADZISZEWSKI sintetizou a lofina, 2,4,5-trifenilimidazol (composto 1 da figura 11), que foi o primeiro composto sintético a produzir luminescência. A partir destes resultados, em 1888, WIEDEMANN conseguiu distinguir a quimiluminescência da incandescência, definindo-a como "a emissão de luz que ocorre junto a processos químicos". Além destes compostos, outras substâncias, como luminol, lucigenina, isoluminol, bis-(2,4,6-triclorofenil)-oxalato, pirogalol e luciferina (ALBERTIN et al, 1998 e ROBARDS & WORSFOLD, 1992) também têm a propriedade de produzir quimiluminescência e suas estruturas são apresentadas na figura 11.

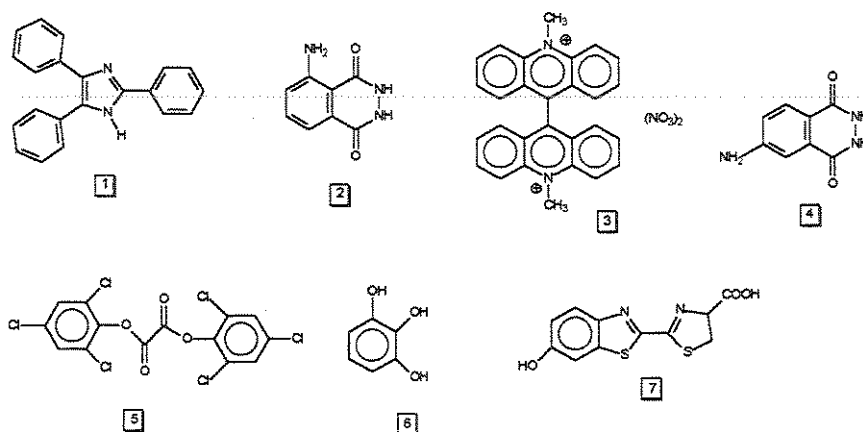


Figura 11. Exemplos de compostos que produzem quimiluminescência: (1) lofina, (2) luminol, (3) lucigenina, (4) isoluminol, (5) bis-(2,4,6-triclorofenil)-oxalato, (6) pirogalol, e (7) luciferina.

A primeira reação quimiluminescente estudada mecanisticamente foi a oxidação do luminol com o H_2O_2 em meio alcalino, por ALBRECHT em 1928. Contudo, os mecanismos envolvidos na formação de estados eletronicamente excitados, na maioria das reações quimiluminescentes, ainda não estão bem esclarecidos e continuam sendo objeto de pesquisas recentes (ALBERTIN et al, 1998, MOTTOLA, 1988 e ROBARDS & WORSFOLD, 1992) que serão discutidos no item 2.2.

As principais características das reações quimiluminescentes visando aplicação analítica são os excelentes limites de detecção que podem ser atingidos e a simplicidade da instrumentação necessária para a coleta do sinal analítico (ROBARDS & WORSFOLD, 1992). Além disso, as reações bioluminescentes apresentam especificidade.

A elevada sensibilidade que as técnicas analíticas baseadas nestas reações apresenta está ligada a vários fatores, principalmente pela ausência da necessidade de uma fonte de radiação, que diminui ou elimina os espalhamentos Raman e Rayleigh e o ruído associado com este tipo de instrumento (ROBARDS & WORSFOLD, 1992). Isto possibilita a utilização de maiores diferenças de potencial nas fotomultiplicadoras (detectores usualmente utilizados) aumentando a razão sinal / ruído e a sensibilidade. Limites de detecção na ordem de fento moles (10^{-15} moles) não são incomuns nas técnicas de quimiluminescência e em alguns sistemas enzimáticos já foram detectadas cerca de 120 moléculas de analito (ROBARDS & WORSFOLD, 1992).

Além do substrato, as condições da reação têm um efeito significativo no progresso da reação quimiluminescente. O tempo de reação e a duração da quimiluminescência variam de períodos muito pequenos ($t < 1\text{s}$) até muito longos (cerca de 1 dia). A mudança de parâmetros, como pH, mistura dos reagentes, temperatura, concentrações de espécies reacionais ou interferentes, podem modificar totalmente a emissão podendo até extingui-la (ROBARDS & WORSFOLD, 1992).

A intensidade da emissão é dependente da velocidade de reação, da eficiência da geração de moléculas em um estado excitado (expresso pela eficiência quântica) e do fluoróforo [#] (substância que produz a emissão). A eficiência quântica da reação é o produto das eficiências das etapas de excitação e emissão e seus valores variam de 10^{-15} a valores próximos de 1, quando no caso da bioluminescência (ALBERTIN et al, 1998 e CAMPBELL, 1988).

[#]O termo fluoróforo foi traduzido da palavra inglesa "fluorophore". Semelhantemente à palavra "chromophore", traduzida como cromóforo.

A cor e a intensidade de emissão são também influenciadas pela polaridade do solvente, pela temperatura do sistema e por outros processos físicos secundários de supressão da emissão da molécula no estado excitado (ROBARDS & WORSFOLD, 1992). Por exemplo, no caso da reação quimiluminescente do luminol, a tabela 1 apresenta a mudança dos comprimentos de onda com emissão máxima, λ_e , pelos diferentes solventes (GUNDERMANN & MCCAPRA, 1987):

Tabela 1. λ_e da reação quimiluminescente do luminol para diferentes solventes.

Solvente	λ_e (nm)
Água	431
Dimetilsulfóxido	502
Dimetilformamida	499
Acetonitrila	500
Tetrahidrofurano	496

Como a intensidade de emissão é dependente da velocidade da reação, seu monitoramento pode ser utilizado como princípio para a quantificação de qualquer espécie cuja concentração influencie na velocidade da reação (ROBARDS & WORSFOLD, 1992).

As reações quimiluminescentes podem ocorrer tanto em fase gasosa como também nas fases sólidas e líquidas. As principais reações em fase gasosa já estudadas são aquelas que ocorrem entre o ozônio e óxidos de nitrogênio, utilizadas na determinação de ozônio na atmosfera (KELLNER et al, 1998). Em cromatografia gasosa, vários sistemas baseados em reações quimiluminescentes já foram citados para a detecção de compostos contendo N e S. Porém, segundo WORSFOLD (1992), o meio que mostra maior potencial para a aplicação analítica é a fase líquida, tanto em meio aquoso como não-aquoso.

As reações quimiluminescentes em fase líquida mais utilizadas em análise são a oxidação do luminol (2) em meio alcalino (ROBARDS & WORSFOLD, 1992) e a oxidação da luciferina (7), um dos compostos responsáveis pela luz do vaga-lume, em presença de ATP para a determinação de biomassa e como forma de detecção em vários imunoensaios (WORSFOLD, 1992).

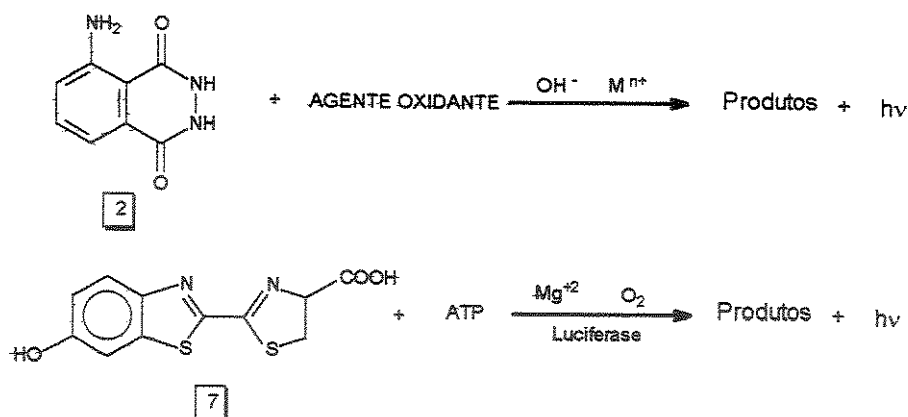


Figura 12. Esquemas das reações de oxidação de (2) luminol e de (7) luciferina produzindo quimiluminescência.

Em solução, a quimiluminescência pode ser usada em várias aplicações analíticas para determinação de íons metálicos, ânions inorgânicos, biomoléculas, substâncias carcinogênicas e drogas em diferentes matrizes ambientais e clínicas (ROBARDS & WORSFOLD, 1992). Uma das reações quimiluminescentes mais utilizadas na determinação de metais de transição é a oxidação do luminol em meio alcalino (MOTTOLA, 1988 e ROBARDS & WORSFOLD, 1992).

2.2. A Reação Quimiluminescente do Luminol:

A reação de oxidação do luminol é uma das mais estudadas e clássicas reações quimiluminescentes. O mecanismo desta reação é considerado um dos mais complicados e, mesmo sendo uma reação clássica, ainda não foram totalmente elucidados os caminhos exatos e seus intermediários da reação (GUNDERMANN & MCCAPRA, 1987). Porém, as aplicações analíticas desta reação têm se mostrado bastante versáteis (GUNDERMANN & MCCAPRA, 1987). As análises de metais de transição, que catalisam a reação e de outros modificadores da reação estão se disseminando e cada vez mais sendo utilizadas em conjunto com técnicas de injeção em fluxo, métodos de separação e técnicas enzimáticas.

O mecanismo das reações envolvidas em metodologia analítica é um importante fator para a exatidão dos resultados. Porém, em alguns casos, este é difícil de se interpretar ou impossível de ser desvendado através dos recursos atuais devido à complexidade. Assim, as aplicações analíticas destas reações dependem de estudos qualitativos e aproximações pertinentes (observações experimentais e teóricas) sobre o

mecanismo da reação para encontrar parâmetros que estabeleçam alguma relação entre as espécies de interesse e o sinal analítico. A reação luminescente do luminol com H_2O_2 é um destes sistemas.

Vários pesquisadores já citaram alguns caminhos possíveis da reação do luminol com alguns agentes oxidantes, como O_2 e H_2O_2 . Também foram determinados alguns possíveis intermediários (GUNDERMANN & MCCAPRA, 1987). Além disso, estudos realizados com outras reações quimiluminescentes (por exemplo, com dioxetanos) têm mostrado novos caminhos e idéias sobre o mecanismo de quimiluminescência (GUNDERMANN & MCCAPRA, 1987).

Dada a complexidade da reação, é pertinente destacar algumas recentes descobertas sobre os intermediários e as etapas da reação quimiluminescente do luminol.

2.3. O Mecanismo da Reação Quimiluminescente de Luminol:

Durante o século XX, o luminol (2) originou vários estudos sobre suas propriedades termodinâmicas e cinéticas, começando pela famosa publicação de ALBRECHT em 1928. Vários autores propuseram possíveis caminhos mecanísticos para a reação, porém ainda não foi encontrado um mecanismo consensual abrangendo todos intermediários e etapas da reação. Algumas etapas da reação quimiluminescente já foram quase completamente estabelecidas. Isto se deve à soma de novas descobertas que aconteceram nas últimas décadas, pelas comparações com outros sistemas quimiluminescentes e pelas novas técnicas de medida mais sensíveis e com menor tempo de resposta.

Na década de 80, MERÉNYI e colaboradores (ERIKSEN, LIND, MERÉNYI, 1981, LIND, MERÉNYI, ERIKSEN, 1983, MERÉNYI, LIND, ERIKSEN, 1984, 1986, 1990, e LJUNGGREN, MERÉNYI, LIND, 1983) realizaram grandes avanços na descoberta de algumas etapas do mecanismo da reação utilizando a técnica de radiólise e modelos computacionais. Verificaram e confirmaram alguns intermediários, como a diazoquinona (8), o ânion de H_2O_2 (9) e a produção da luminescência pelo ânion do ácido 3-aminoftálico (12), através da reação com o radical $\text{ClO}_2^\bullet$ formado pela radiólise do dióxido de cloro (ERIKSEN, LIND, MERÉNYI, 1981). Além disso, estudos realizados com radicais $\text{N}_3^\bullet$ e $\text{CO}_3^{\bullet-}$ apresentaram novos possíveis intermediários na formação e decomposição do endo-peróxido (10), como o radical de luminol (13) e o hidro-peróxido (14), apresentados na figura 13 (MERÉNYI, LIND, ERIKSEN, 1984).

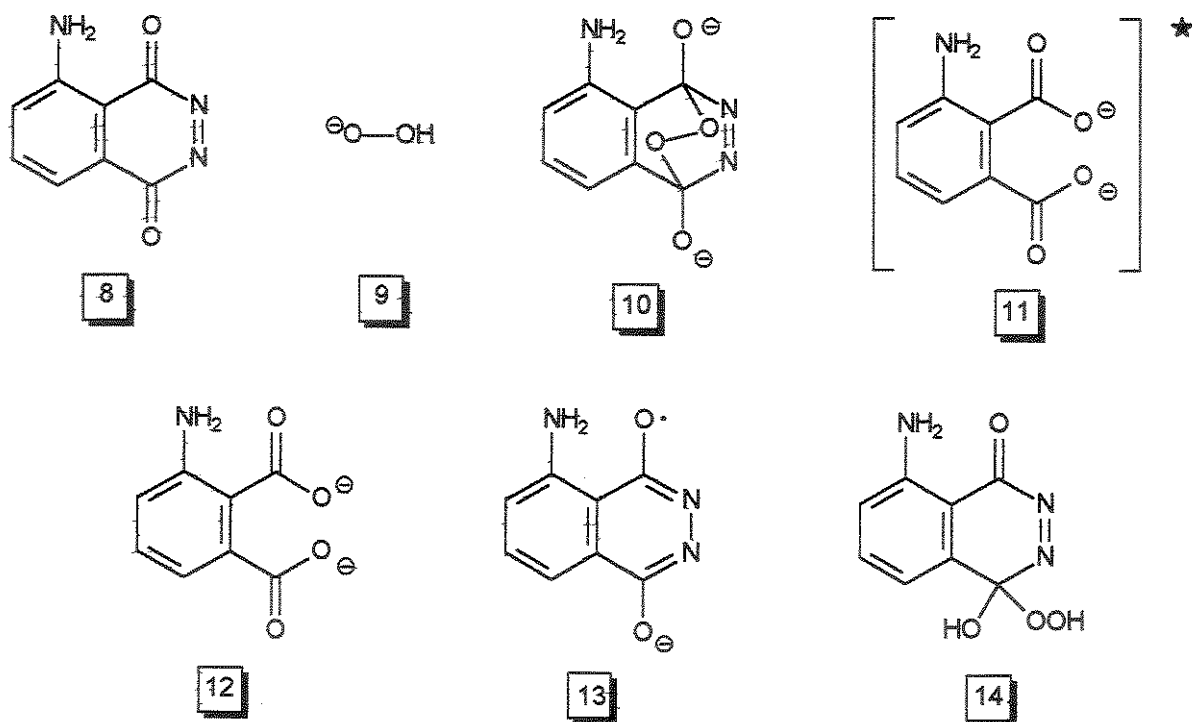


Figura 13. Estruturas de alguns intermediários da reação quimiluminescente: (8) diazoquinona, (9) ânion de H_2O_2 , (10) endo-peróxido possivelmente formado, (11) diânion do ácido ftálico eletronicamente excitado, (12) diânion do ácido ftálico, (13) radical do luminol e (14) hidro-peróxido.

Alguns parâmetros físico-químicos, como constantes de velocidade e dependência do pH reacional, e estudos sobre a participação de outras espécies (carbonatos e brometos) no aumento da luminescência também foram discutidos a fim de justificar as propostas de mecanismo (MERÈNYI, G., LIND, J., ERIKSEN, T. E., 1984, 1986, 1990). Além disso, a confirmação e decomposição do intermediário endo-peróxido (10) foram analisadas por modelos computacionais (LJUNGGREN, S., MERÈNYI, G., LIND, J., 1983).

Qualitativamente, é possível que a produção de luminescência pela reação de oxidação de luminol (2) esteja ligada à formação do produto eletronicamente excitado e, possivelmente, à proporção de moléculas de endo-peróxido (10), que se decompõe para formar este produto excitado. Segundo a proposta de MICHL (1977), a decomposição de endo-peróxido (10) ocorre quando a ligação σ entre os dois átomos de O se rompe, podendo ou não formar o produto excitado. No caso do produto excitado, possivelmente, não existe tempo suficiente para os elétrons se distribuírem entre os novos orbitais, deixando o novo orbital LUMO ainda preenchido, como ilustrado na figura 14.

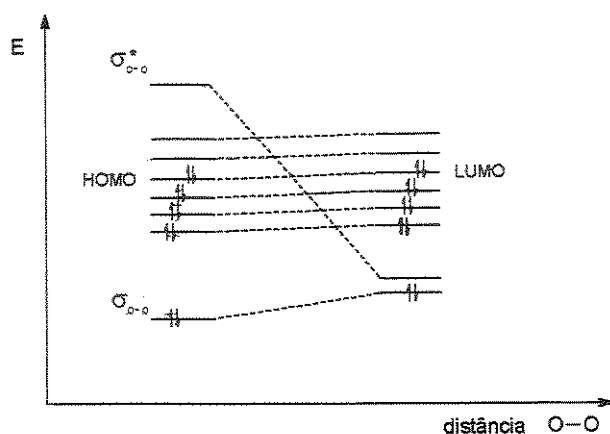


Figura 14. Diagrama esquemático dos Orbitais Moleculares do sistema endo-peróxido – 3-amino-ftalato.

Esta teoria mostra que os caminhos de formação do produto excitado e não excitado possuem, em algum momento, energias semelhantes, podendo, então, haver um “cruzamento” entre os caminhos, o que levaria à formação do produto excitado (conforme ilustrado na figura 15).

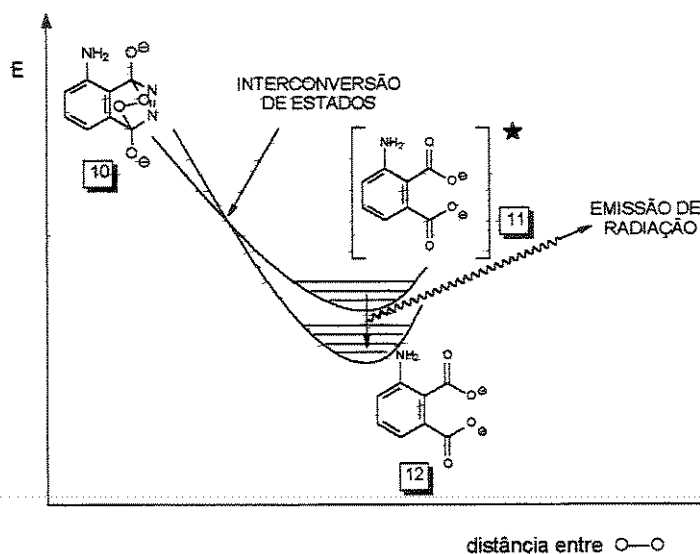


Figura 15. Diagrama esquemático de correlação de estados do endo-peróxido / ácido 3-aminofáltico que relaciona a energia do sistema com o rompimento da ligação dos átomos de O no intermediário.

Porém, a formação do intermediário endo-peróxido (10) ainda não foi provada. Uma vez que haja sua formação, presume-se que este intermediário se decomponha rapidamente, o que explicaria o fato de ainda não ter sido detectado.

Todos estes estudos possibilitaram descobertas de alguns detalhes mecanísticos que, eventualmente, poderão ser a “chave” para o entendimento mais apurado deste mecanismo. Estas propostas foram adaptadas e aplicadas por XIAO e colaboradores (XIAO et al, 2000) no estudo da determinação de Cr(III) pela reação quimiluminescente do luminol com H_2O_2 em meio alcalino.

Algumas etapas propostas para o mecanismo por estes trabalhos estão organizadas segundo XIAO e colaboradores (XIAO et al, 2000) e são apresentados na figura 16.

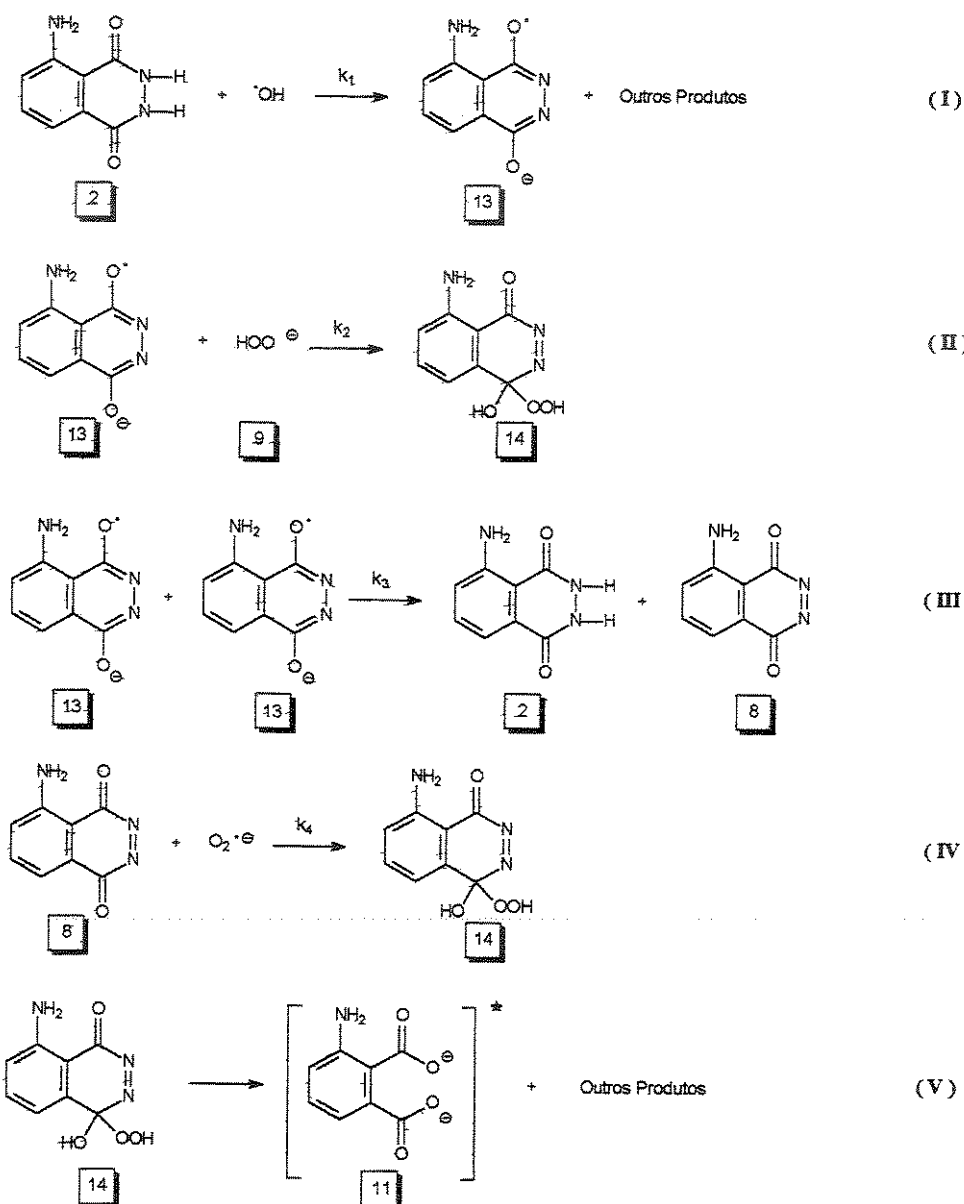


Figura 16. Etapas da reação quimiluminescente propostas por MERÉNYI e colaboradores em seus estudos e organizadas por XIAO e colaboradores (XIAO et al, 2000). Os valores das constantes cinéticas obtidas (em $\text{mol}^{-1} \text{L s}$) são: $k_1 = 4 \times 10^6$; $k_2 = 2,3 \times 10^8$; $k_3 = 5 \times 10^8$; $k_4 = 5 \times 10^7$.

As etapas propostas indicam que as principais espécies intermediárias para a produção de luminescência são o radical do luminol (13) e o intermediário hidro-peróxido (14).

A espécie intermediária (13), formada a partir de sua reação com radicais $^{\bullet}\text{OH}$ (etapa I), é responsável pela formação do hidro-peróxido (etapa II) e pela formação do intermediário diazoquinona (8) (etapa III), que posteriormente pode formar o hidro-peróxido (14) na etapa IV.

O hidro-peróxido (14) é produzido diretamente e indiretamente pelo radical do luminol (13) nas etapas I e IV e sua decomposição na etapa V é a responsável pela produção de 3-amino-ftalato (11) e outros produtos que poderão luminescer.

Não existem ainda estudos mecanísticos conclusivos sobre o efeito da presença de metais de transição na reação quimiluminescente. Porém, o efeito destes metais pode estar ligado: (i) à produção de radicais do H_2O_2 presentes nas etapas I e IV (SALEM, SALEM, GEMEAY, 1993 e ZHOU, 1998); (ii) à catálise da formação do hidro-peróxido (3) à etapa II; e/ou (iii) à catálise da etapa V (XIAO et al, 2000).

Baseados em estudos de complexos de metais com ânion do H_2O_2 (SALEM, SALEM, GEMEAY, 1993 e ZHOU, 1998), a decomposição radicalar de H_2O_2 por metais de transição pode ser explicada por uma proposta que relaciona seu papel na catálise da reação quimiluminescente, como apresentado na figura 17.

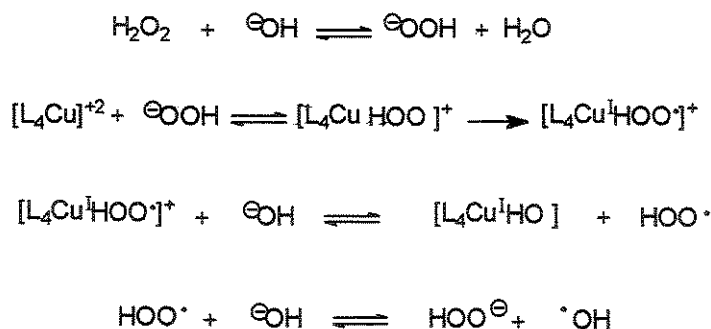


Figura 17. Proposta de formação de radicais do H_2O_2 pela presença de Cu(II), sendo L a simbologia utilizada para um ligante do meio.

O aumento na concentração de $^{\bullet}\text{OH}$ aumenta a concentração do radical de luminol (13) formado na etapa I e, conseqüentemente, aumenta a concentração de hidro-peróxido (14), responsável pela quimiluminescência na etapa V.

A hipótese do efeito dos metais estar relacionado com a etapa II pode também explicar a catálise da reação quimiluminescente, uma vez que aumenta a concentração

de hidro-peróxido (14, etapa IV) e, conseqüentemente, a velocidade de quimiluminescência.

Por último, a hipótese (iii) em que o metal catalisa a decomposição de hidro-peróxido (14) está ligada ao fato de serem observados complexos coloridos em vários sistemas metal-hidroperóxidos (SALEM, SALEM, GEMEAY, 1993 e ZHOU, 1998), o que, possivelmente, indica sua formação.

A presença de íons CO_3^{2-} e Br^- na reação proporciona o aumento da luminescência observada, pois estas espécies participam do mecanismo proposto. A reação entre os radicais $^{\bullet}\text{OH}$ e o luminol (2) (etapa I) pode apresentar outros produtos além do radical do luminol (13). Os radicais $^{\bullet}\text{OH}$ podem reagir com luminol (2) nas posições do anel aromático e não produzir o hidro-peróxido (14) e a quimiluminescência. Na presença dos íons CO_3^{2-} e Br^- , os radicais $^{\bullet}\text{OH}$ são convertidos a radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ou $\text{Br}^{\bullet}$ que reagem seletivamente com o luminol (2) produzindo o radical do luminol (13) e favorecendo a produção de luminescência (XIAO et al, 2000). Entretanto, outros pesquisadores (KLOPF & NIEMAN, 1983) encontraram resultados adversos sobre o efeito do carbonato na reação quimiluminescente, ao contrário da maioria das publicações e dos resultados obtidos neste trabalho.

O que parece ser de opinião comum é que, dependendo do sistema utilizado para o monitoramento (forma de adição e mistura de reagentes e sistema de detecção) e da procedência e tempo de utilização dos reagentes, os resultados quantitativos e, às vezes, qualitativos podem variar (XIAO et al, 2000). Geralmente, esta variação de resultados está ligada à velocidade de resposta do sistema de detecção e na forma de preparação e mistura dos reagentes, já que existem vários fatores cinéticos que estabelecem as concentrações das espécies responsáveis pela intensidade e duração da quimiluminescência.

Apesar das grandes dificuldades para descobrir o mecanismo mais provável, a reação quimiluminescente do luminol apresenta uma grande potencialidade para o desenvolvimento de novos métodos analíticos. Este comportamento pode ser verificado pelo grande número de trabalhos analíticos publicados durante este último século, conforme apresentado na sequência.

2.4. Aplicações Analíticas da Quimiluminescência de Luminol:

As aplicações da reação quimiluminescente de luminol em Química Analítica podem ser divididas em 2 principais grupos: em aplicações diretas e aplicações indiretas (como forma de detecção de diversas técnicas), conforme ilustra o esquema da figura 18.

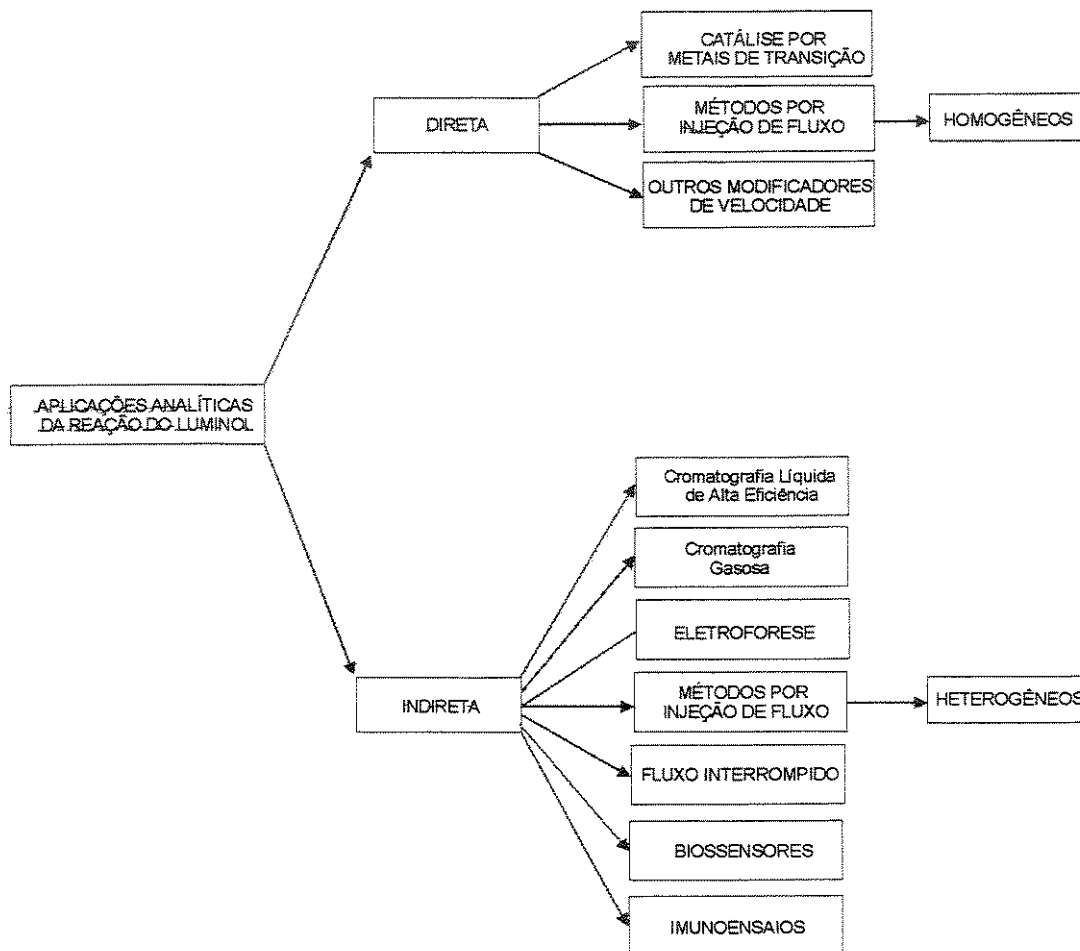


Figura 18. Esquema ilustrando as aplicações da reação luminescente do luminol.

Nas aplicações diretas, a espécie de interesse atua na reação do luminol, como, por exemplo, na determinação de catalisadores ou inibidores da luminescência. Já nas aplicações indiretas, a reação de luminol é utilizada como forma de detecção de outras reações ou de técnicas, como na detecção de alguns métodos de separação e imunoensaios.

Dentre as aplicações indiretas, destacam-se a utilização da reação na determinação de H_2O_2 produzido pela oxidação da espécie de interesse pela enzima presente e os biossensores. Estas técnicas, além de serem bastante sensíveis, são muito seletivas e, geralmente, empregam a enzima imobilizada em fase sólida. Com estas

técnicas foram já analisados vários substratos de enzimas oxidases, como amino-ácidos (PREUSCHOFF et al, 1993), metanol (SEKINE et al, 1993), açúcares e DNA (CI et al ^b, 1993).

Nas aplicações diretas, as determinações catalíticas (metais de transição) e as determinações de inibidores (compostos orgânicos e metais de transição) destacam-se em técnicas bastante precisas e com baixos limites de detecção.

Os metais de transição apresentam efeitos catalíticos na reação de oxidação do luminol, porém, em alguns casos, a mistura de alguns cátions inibe a reação. Este comportamento já foi descrito por GUNDERMANN & MCCAPRA (1987) e KAMIDATE e colaboradores (KAMIDATE et al, 1993), para misturas de Cu(II) com Ni(II), Mn(II), Th, V, Zr, Cr(III) e Co(II) na reação quimiluminescente do luminol. Mais de 30 íons metálicos inibem ou catalisam esta reação, sendo que o limite de detecção para alguns deles chega a 10^{-11} moles. Como exemplo de metais já determinados pelo seu efeito catalítico ou inibidor com esta reação têm-se Ni(II), Th, Ti, As, Al(III), Sn(II), Pb(II), Bi(III), Cr(III), Fe(II), Fe(III), Os(III), Co(II), Cu(II), Zn(II), Pd(II), Ag(I), Au(III), Hg(II), Ce(IV), U(VI), Sb (III), Zr (IV), V(III), Mn(II), e Cd(II) (ROBARDS & WORSFOLD, 1992).

Contudo, a determinação de compostos orgânicos que inibem a luminescência da reação é, possivelmente, a aplicação mais promissora. Muitos já foram os compostos determinados como glicose (LEBEDEVA & UGAROVA, 1995), ácido láctico (BUSCH & POLSTER, 1992), creatinina (PETERSSON, HANSEN, RUZICKA, 1986), colesterol livre (KUBO & TORIBA, 1997), cortisona (KUBO & TORIBA, 1997), ácido ascórbico (KUBO & TORIBA, 1997 e ALWARTHAN, 1993), prometazina (ALWARTHAN, AL-TAMRAH, AKEL, 1993), cisteína (VINAS, GARCIA, GIL, 1993 e KAMIDATE, KUNIYA, WATANABE, 1993), catecolaminas (HUANG, ZHANG, ZHANG, 1998), paracetamol (ALAPONT, ZAMORA, CALATAYUD, 1999), ácido 3,4-hidroxibenzóico (CUI et al, 1999), glutathione (KAMIDATE, KUNIYA, WATANABE, 1993), ácido tartárico (GAIKWAD, SILVA, PEREZ-BENDITO, 1994), ácidos fenólicos (DIAZ & GARCIA, 1994), captropil (XINRONG et al, 1995), ácido úrico (FENG, HUANG, ZHANG, 1997), ácido tânico (CUI et al, 1998), dentre outros.

Além disso, a análise de misturas de metais ou de compostos orgânicos através desta reação, com obtenção de dados multidimensionais é considerada uma ferramenta analítica versátil, precisa e sensível (KAMIDATE, KUNIYA, WATANABE, 1993), que merece ser mais estudada.

Estatisticamente, pode-se verificar o crescimento atual do número de aplicações analíticas do luminol, como apresentado na figura 19. Estas informações foram obtidas em pesquisa realizada na Web of Science com as seguintes palavras chaves: *luminol and (determination or analysis)*.

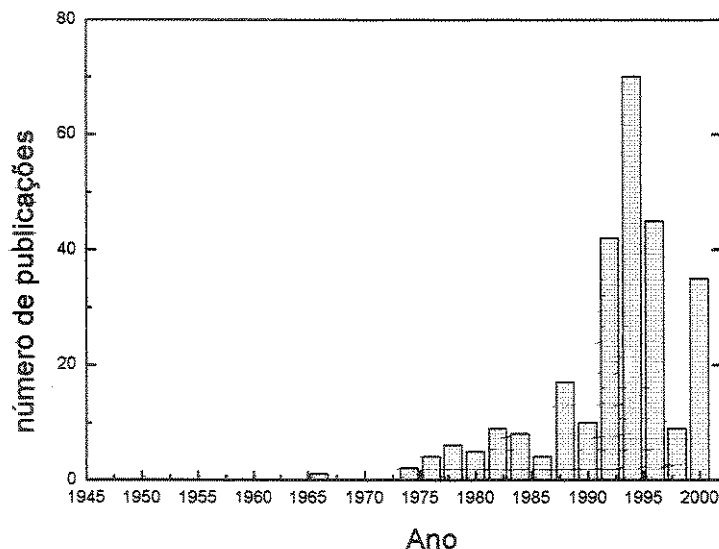


Figura 19. Publicações sobre a reação quimiluminescente do luminol como aplicação analítica desde 1945.

Com base nesta pesquisa, pode-se notar que os países que mais contribuíram com trabalhos analíticos sobre o luminol foram Japão, EUA, China, Espanha e Alemanha, como ilustrado na figura 20. A maioria dos trabalhos foi publicada em inglês.

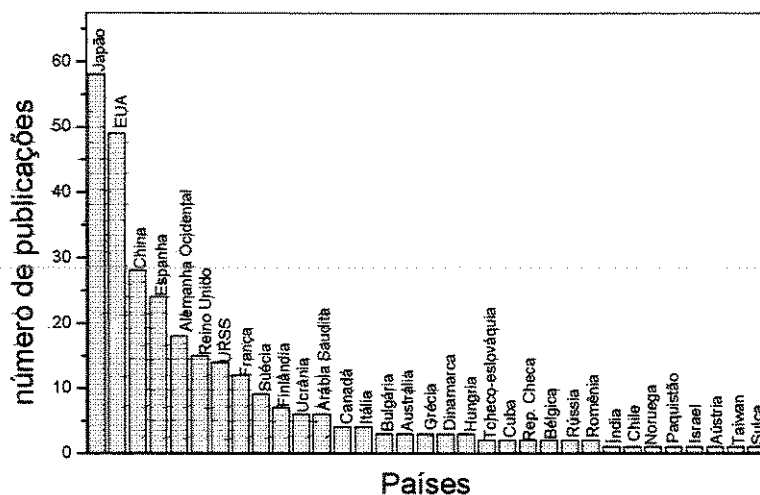


Figura 20. Publicações sobre aplicações analíticas da reação quimiluminescente do luminol divididas pelos países de origem.

A técnica quimiluminescente já foi aplicada a várias técnicas consagradas, como em métodos de separação e em métodos por injeção em fluxo. Avaliando-se as

publicações destacadas pela pesquisa bibliográfica realizada, verificou-se que as técnicas que mais utilizam a quimiluminescência do luminol são os métodos por injeção em fluxo (FIA e FIA com reagente imobilizado), os métodos de separação (CLAE, CL, CG e Eletroforese) e os métodos de imunoensaios. Dos trabalhos encontrados sobre o luminol, deve ser salientado que apenas 6% envolvem métodos cinéticos. Outras técnicas que podem ser destacadas são o monitoramento estático da quimiluminescência, os biossensores e a eletroquimiluminescência, como ilustrado na figura 21.

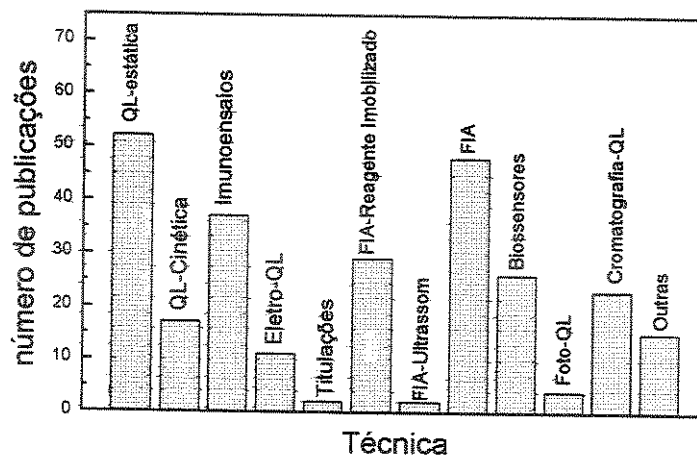


Figura 21. Aplicações analíticas da reação quimiluminescente do luminol divididas pelas técnicas utilizadas desde 1945. A sigla QL representa a palavra quimiluminescência.

Outro aspecto investigado na pesquisa bibliográfica foi o tipo de matriz e o analito estudado. Verificou-se que a maioria dos métodos encontrados aplica-se a amostras de fluídos biológicos, como tecidos humanos e de animais, além de excreções (urina) e sangue (plasma e soro sanguíneo). Isto indica que, na maioria dos casos, os analitos orgânicos, como glicose (LEBEDEVA & UGAROVA, 1995), ácido úrico (FENG, HUANG, ZHANG, 1997), dentre outros, são os mais estudados por esta reação.

A partir destas informações, verificou-se que a técnica quimiluminescente do luminol apresenta aplicabilidade reconhecida para análise de vários tipos de analitos (ambientais e biológicos) empregando-se a maioria das técnicas analíticas já consagradas. Contudo, notou-se também a pequena quantidade de publicações utilizando os métodos cinéticos de análise e a quase inexistência de pesquisadores do Brasil trabalhando em estudos de métodos analíticos com a técnica quimiluminescente. Estes aspectos devem justificar o presente trabalho de aplicação cinético-analítica da reação do luminol.

CAPÍTULO 3:

A IMPORTÂNCIA DO ÁCIDO ASCÓRBICO COMO ANALITO

"We were all hearty seamen, no colds did we fear"
And We have from all sickness entirely kept clear
Thanks be to the Captain, he has proved so good
Amongst all the Islands to give us fresh food."

(Canção do marujo T. Perry do navio capitânia do Capitão Cook, 1780)

"Having the right molecules in the right amounts in the right place in the human body at the right time is a necessary condition for good health."

Linus Pauling (1901-1994)

3.1. A vitamina C (Ácido Ascórbico):

O ácido ascórbico, também denominado ácido L-ascórbico ou Vitamina C, é uma substância derivada dos carboidratos (DE LEENHEER, LAMBERT, DE RUYTER, 1985). Está presente em mecanismos essenciais para os organismos vivos, como a respiração mitocondrial, a formação do colágeno e a ativação do sistema linfático, dentre outros. Poucos animais, como alguns primatas, porquinho da Índia, certos morcegos herbívoros, certas aves da família *Passeriforme* e alguns peixes, além do homem, não apresentam a enzima L-gulono- γ -lactona oxidase em seus organismos e não podem sintetizar o seu próprio ácido ascórbico (MACHLIN, 1991). Por isso, devem obtê-lo através de alimentos vegetais frescos. Sua deficiência, doença chamada de “escorbuto”, provoca lesões nos tecidos conjuntivos (pele, gengivas, lábios) pela inibição da produção de colágeno, provocando hemorragias que podem ser fatais.

O ácido L-ascórbico (15) é um sólido cristalino que se degenera pouco na presença de ar, porém em soluções aquosas e em temperaturas superiores a 35° C, entra em equilíbrio rapidamente com o ácido dehidroascórbico (16), transformando-se irreversivelmente na sua forma hidratada, o ácido dicetogulônico (17):

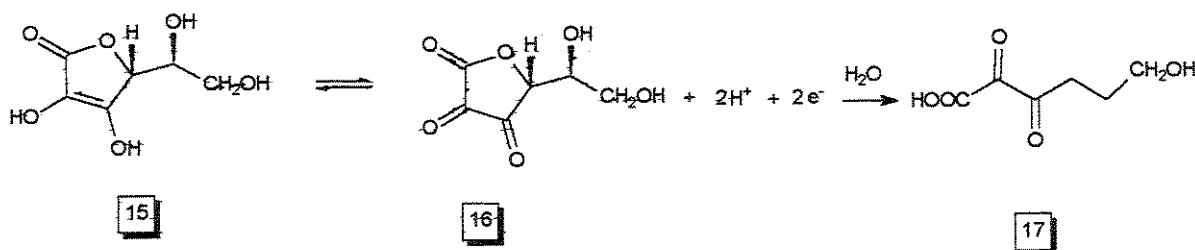


Figura 22. Esquema reacional da ação redutora de ácido ascórbico (15) e seus produtos formados: ácido dehidroascórbico (16) e ácido dicetogulônico (17).

As principais fontes de vitamina C são frutas e legumes frescos, como laranja, o limão, a acerola e o pimentão verde, entre outros.

Além de ser encontrado em alimentos frescos e industrializados, o ácido ascórbico, ultimamente, tem sido utilizado na fabricação de remédios, cosméticos e produtos vitamínicos. Mesmo ainda não tendo sido totalmente comprovadas suas ações benéficas, seu consumo tornou-se popular, levando vários cientistas a debater opiniões contrárias sobre sua utilização, sua ação anti-radicalar e o possível efeito no rejuvenescimento dos tecidos e órgãos. A despeito disso, seu uso é largamente difundido, justificando o empenho de vários cientistas na pesquisa sobre o ácido ascórbico (DAVIES, AUSTIN, PARTRIDGE, 1991).

3.2. Histórico do Ácido Ascórbico:

O ácido ascórbico teve papel importante no desenvolvimento da humanidade bem antes de sua descoberta. O escorbuto, doença caracterizada pela deficiência desta vitamina, esteve presente em toda grande expansão militar e marítima da Antiguidade devido à alimentação pouco nutritiva e sem vegetais frescos dos soldados e marinheiros (DAVIES, AUSTIN, PARTRIDGE, 1991). Na idade Média, os extensos invernos europeus também fizeram suas vítimas pelo longo período sem consumo de alimentos frescos. Somente no século XVIII, médicos e capitães britânicos observaram que a alimentação com frutas cítricas impedia o aparecimento do escorbuto e começaram a utilizar o suco de limão como remédio contra esta doença (DAVIES, AUSTIN, PARTRIDGE, 1991). No final do século XIX, o ácido ascórbico foi reconhecido como uma das vitaminas, substâncias essenciais para o bom funcionamento do organismo humano, sendo chamada de fator antiescorbuto ou Vitamina C (MACHLIN, 1991).

Em 1928, SZENT-GYÖRGYI isolou o ácido ascórbico a partir das glândulas adrenais e, com colaboração de SVIRBELY (SVIRBELY & SZENT-GYÖRGYI, 1932), caracterizou sua fórmula empírica como $C_6H_8O_6$. Ao mesmo tempo, KING e WAUGH (1932) isolaram o ácido ascórbico a partir do suco de limão. Em 1933, HIRST e HAWORTH estabeleceram a estrutura do ácido ascórbico e REICHSTEIN e colaboradores, (REICHSTEIN, GRÜSSNER, OPPENHAUER, 1933) publicaram a síntese do ácido L-ascórbico e do ácido D-ascórbico. Atualmente, esta síntese fundamenta a produção industrial do ácido ascórbico.

Desde então, vários estudos sobre o ácido ascórbico vêm sendo publicados, porém ainda há dúvidas sobre suas ações benéficas nos metabolismos de organismos vivos.

Em química analítica, o ácido ascórbico sempre representou interesse científico para os pesquisadores desde sua caracterização. No início da década de 80, houve um grande aumento nas publicações envolvendo métodos de análise de ácido ascórbico, conforme se observou em um cuidadoso levantamento bibliográfico realizado na forma de pesquisa no *Web of Science*[#]. Desde 1945, foram encontradas cerca de 553 publicações sobre métodos de análise de ácido ascórbico, sendo que 66% destas envolvem métodos termodinâmicos, 26% métodos de separação e apenas 8 % envolvem métodos cinéticos. As principais técnicas utilizadas foram Espectrofotometria, Potenciometria e HPLC, como

[#] As palavras chaves utilizadas foram: (ascorbic acid or Vitamin C) and (determination or analysis).

ilustrado na figura 23. A maioria dos métodos de determinação de ácido ascórbico foi aplicada em alimentos (47%). Também foram encontrados trabalhos envolvendo a análise de ácido ascórbico em materiais biológicos (33%) e em medicamentos (20%).

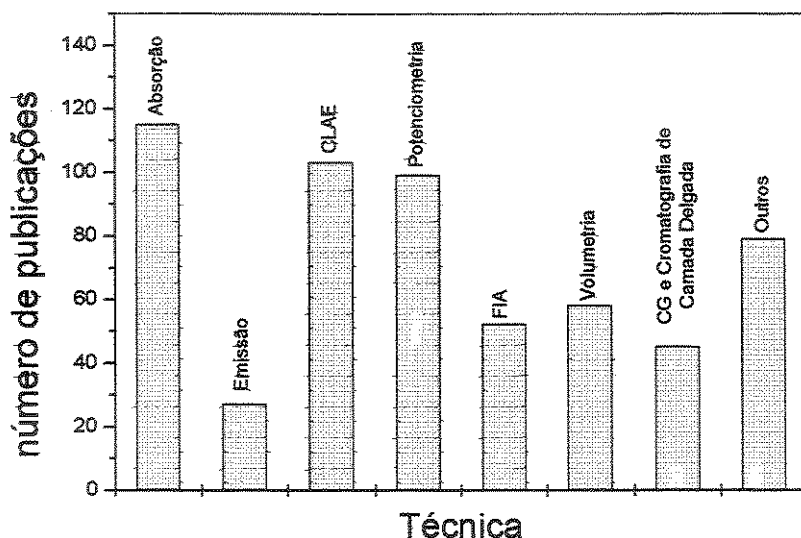


Figura 23. Distribuição das publicações sobre métodos de análise do ácido ascórbico desde 1945, de acordo com a técnica utilizada.

Os métodos para determinação de ácido ascórbico mais usados em rotina são os métodos volumétricos. Destes destacam-se titulação com 2,6-diclorofenolindofenol, DCFI, um dos métodos oficiais da AOAC[#] (1995), titulação iodométrica (BACCAN et al, 1979 e ARYA, MAHAJAN, JAIN, 2000), titulação com iodato (iodimetria, método aconselhado pelo INSTITUTO ADOLF LUTZ e ARYA, MAHAJAN, JAIN, 2000), titulação com tetraclorobenzoquinona (ARYA, MAHAJAN, JAIN, 2000), titulação com cloramina -T (ARYA, MAHAJAN, JAIN, 2000) e titulação com N-bromosuccinamida (ARYA, MAHAJAN, JAIN, 2000), dentre outras. Estes métodos apresentam um fácil procedimento e baixo custo. Porém, são aplicáveis para concentrações maiores que $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,9 \text{ mg mL}^{-1}$) e quantidade considerável de amostra.

Em casos de amostras com concentrações baixas de ácido ascórbico e análises de rotina com um grande número de amostras, os métodos instrumentais são uma alternativa bastante utilizada. Destacam-se os métodos fluorimétricos, os métodos de separação, principalmente CLAE, os métodos eletroquímicos, os métodos espectrofotométricos e os métodos por injeção em fluxo.

[#] American Organization of Analytical Chemists.

Vários métodos fluorimétricos são descritos na literatura (ARYA, MAHAJAN, JAIN, 2000) para a determinação de ácido ascórbico. O método de análise mais utilizado é a determinação fluorimétrica do ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico recomendado pela AOAC (1995). Esta técnica é muito específica e baseia-se na reação da *o*-fenilenediamina com os grupos hidroxil *cis* do ácido ascórbico e do ácido dehidroascórbico para formar um derivado da quinoxalina fluorescente, que também é o princípio de outros métodos fluorimétricos (ARYA, MAHAJAN, JAIN, 2000).

A cromatografia líquida de alta eficiência, com detectores de UV ou eletroquímicos, é, no momento, a técnica mais usada para análise de ácido ascórbico em alimentos e em matrizes biológicas, como plasma sanguíneo (ARYA, MAHAJAN, JAIN, 2000). Esta técnica é mais rápida e sensível que a maioria dos métodos volumétricos e fluorimétricos citados anteriormente, porém apresenta um custo mais alto.

Métodos eletroquímicos são mais numerosos que os métodos cromatográficos e apresentam um custo menor e uma boa sensibilidade. Como, em geral, envolvem procedimento simples, proporcionam uma alternativa atraente para controle de ácido ascórbico em alimentos dietéticos (ESTEVE et al, 1995). Alguns dos métodos eletroquímicos utilizam detectores bastante sensíveis e específicos, como eletrodos de microdisco (FARRINGTON, JAGOTA, SLATER, 1994 e ARYA, MAHAJAN, JAIN, 2000), elétrodos tubulares (FERNANDES et al, 2000 e ARYA, MAHAJAN, JAIN, 2000) e biossensores (KULYS & D'COSTA, 1991, FATIBELLO & VIEIRA, 2000 e ARYA, MAHAJAN, JAIN, 2000).

Os métodos espectrofotométricos para determinação de ácido ascórbico são, sem dúvida, os mais numerosos em publicações. Geralmente, envolvem reações de oxirredução do ácido ascórbico com complexos metálicos ou compostos orgânicos. Somente uma pequena parcela dos métodos com medidas espectrofotométricas é representada por métodos cinéticos de análise. Nesses métodos cinéticos, geralmente, o efeito redutor do ácido ascórbico é aplicado para decomposição catalítica de algum reagente colorido. Assim, baixos limites de detecção são atingidos e os métodos são adequados para dosagem de ácido ascórbico em sangue, chás e urina (ARYA, MAHAJAN, JAIN, 2000). Porém, para amostras coloridas, os métodos se tornam ineficientes, pois pode sofrer interferência pela cor da amostra. E, no caso de formação de complexos, há aumento de tempo de análise por pré-tratamento da amostra (ARYA, MAHAJAN, JAIN, 2000).

Os métodos por injeção em fluxo também são bastante representativos. Segundo YEBRA-BIURRUN (2000), a maioria destes métodos é baseada na detecção

espectrofotométrica, 39,4 %, e na eletroquímica, 38,3%, seguidos pela detecção quimiluminescente, 15,9%, e fluorimétrica, 6,4%.

Atualmente, métodos quimiluminescentes estão sendo largamente aplicados para a análise de ácido ascórbico pelo seu efeito modificador na quimiluminescência (ARYA, MAHAJAN, JAIN, 2000). Este efeito é bastante sensível, porém é pouco seletivo e, portanto, problemas de interferência são notados (ARYA, MAHAJAN, JAIN, 2000).

OBJETIVOS

CAPÍTULO 4: OBJETIVOS

4.1. Objetivos:

Este trabalho foi executado visando desenvolver as seguintes propostas:

- otimizar as concentrações dos reagentes para monitorar a quimiluminescência;
- avaliar os desempenhos dos sistemas de medidas da luminescência utilizados;
- verificar os efeitos modificadores de íons de cátions metálicos (Cu(II) e Ni(II)) na reação quimiluminescente;
- verificar os efeitos modificadores de agentes redutores (ácido ascórbico e ácido úrico) na reação do luminol;
- avaliar a aplicabilidade analítica da reação quimiluminescente visando a determinação destes modificadores;
- otimizar as condições de monitoramento da reação quimiluminescente visando a aplicabilidade analítica dos efeitos modificadores;
- desenvolver um método cinético com a técnica quimiluminescente para a determinação de agentes redutores;
- aplicar o método desenvolvido na dosagem de ácido ascórbico em medicamentos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

PARTE EXPERIMENTAL

"Não há saber superior ou inferior, mas um só, que brota da experimentação."

Leonardo da Vinci (1452-1519)

CAPÍTULO 5: REAGENTES E EQUIPAMENTOS

5.1. Listagem dos Reagentes e Equipamentos:

- Água Deionizada por deionizador de resina de troca iônica Milli Q Plus, Millipore;
- Ácido Ascórbico P.A., Merck e Vertex;
- Ácido Úrico P.A., Vertex;
- Amostras de Medicamentos contendo Ácido Ascórbico: (1) Cewin® comprimidos; (2) Cewin® efervescente; e (3) Cebion® efervescente;
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ P.A., Lafan Química Fina Ltda;
- 2,6-Diclorofenolindofenol, Vertex;
- Dimetilsulfóxido P.A., Vertex;
- Etanol Recuperado, Planta Piloto do IQ-UNICAMP;
- $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ P.A., Vertex;
- Luminol (5-amino-2,3-di-hidroftolazina-1,4-diona) P.A., Sigma-Aldrich;
- Na_2CO_3 P.A., Nuclear;
- NaHCO_3 P.A., Cromatos Produtos Químicos;
- NaOH P.A., Vertex;
- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ P.A., Vertex;
- Solução de H_2O_2 31%, Merck;

- Balança Analítica AE 200, Mettler;
- Banho Termostatizador ESB-11 Tempette TE8D, Techne;
- Celas de Acrílico de 1,0 cm de caminho ótico, Fish Co.;
- Espectrofotômetro Ultrospec 2000, Pharmacia Biotec;
- Fotomultiplicadora 6256 S, EMI;
- Microcomputador Intel Pentium 100MHz com 32 MB de RAM;
- Monocromador UV-visível 2871, Jarrel-Ash;
- Motor de passo Astrosyn, Minibeta & Co. Ltd.;
- pHmetro digital pH300, Analyser, com eletrodo de vidro combinado;
- Pipetador Automático de 1,00-5,00 mL, Labsystems;
- Placa de interface analógica digital PCL-711 S, PC-Multilab;
- Sistema de Injeção Simultânea (ROSSI & FERREIRA, 1997).

5.2. Descrição das Soluções Utilizadas:

Todas soluções foram preparadas com os materiais descritos no item 5.1. As massas dos sólidos foram medidas em balança analítica. Nos casos necessários, as soluções foram padronizadas segundo procedimentos recomendados (BACCAN et al, 1979 e JEFFERY et al, 1992). As soluções de luminol, H_2O_2 , ácido ascórbico, ácido úrico e cortisona foram preparadas em frascos âmbar para evitar decomposição pela ação da luz. Todas as soluções eram renovadas diariamente devido à baixa estabilidade das soluções.

5.2.1. Soluções de Luminol:

As soluções de luminol ($5,7 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}) foram preparadas pela dissolução de massa adequada deste sólido em tampão (pH = 9,6 – 10,8) e pela adição de volume adequado de solução estoque de CuSO_4 ($3,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}) e / ou de solução estoque de NiCl_2 ($8,3 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}).

O tampão carbonato foi preparado pela dissolução de 0,4 g de Na_2CO_3 , 1,2 g de NaHCO_3 e 0,025 g de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ em 100,0 mL de água deionizada ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2$ mol L^{-1}). O tampão borato ($\text{KCl} / \text{H}_3\text{BO}_3 - \text{NaOH}$) foi preparado segundo procedimento de ASSUMPÇÃO & MORITA (1968). As soluções estoque de Cu(II) e Ni(II) foram preparadas pela dissolução de massa adequada em água deionizada.

Os valores de pH das soluções de luminol foram verificados em pHmetro com eletrodo de vidro combinado.

5.2.2. Soluções de H_2O_2 :

As soluções de H_2O_2 (0,089 e $8,9 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}) foram preparadas a partir das diluições adequadas da solução estoque de H_2O_2 (0,89 mol L^{-1}), que foi obtida pela diluição de 5,00 mL de solução de H_2O_2 (31%, Merck) em 100,0 mL de água deionizada.

5.2.3. Soluções de Ácido Ascórbico:

As soluções de ácido ascórbico ($5,0 \times 10^{-5}$ a $7,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) foram preparadas por diluições adequadas das soluções estoques ($1,0 \times 10^{-3}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) de ácido ascórbico e pela adição de volume adequado de solução estoque de H_2O_2 (0,89 mol L^{-1}) em água deionizada. A solução estoque de ácido ascórbico foi preparada pela dissolução da massa adequada do sólido em água deionizada.

As soluções de trabalho para a análise foram diluídas em tampão carbonato com adição de padrão de ácido ascórbico.

As soluções das amostras foram preparadas a partir da maceração de cerca de 1,5 g de amostras (amostra 1: 2 cp; amostra 2: 1 cp; e amostra 3: 1 cp) e dissolução de massa adequada em tampão carbonato para preparação de solução estoque com concentração de ácido ascórbico com cerca de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A solução de trabalho contendo as amostras foi preparada seguindo o procedimento realizado para os padrões.

5.2.4. Soluções de Ácido Úrico:

As soluções de ácido úrico ($5,0 \times 10^{-5}$ a $7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas pela diluição adequada da solução estoque ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) de ácido úrico e pela adição de volume adequado de solução estoque de H_2O_2 ($0,89 \text{ mol L}^{-1}$). A solução estoque de ácido úrico foi preparada pela dissolução do sólido em 5,00 mL de solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ completando o volume de 100,0 mL com água deionizada.

5.2.5. Solução de 2,6-Diclorofenolindofenol:

A solução de 2,6-diclorofenolindofenol, DCFI, ($4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada pela dissolução de cerca de 2,0 g de 2,6-diclorofenolindofenol em 1,000 L de água deionizada. A solução foi filtrada e padronizada pela titulação com cerca de 50 mg de ácido ascórbico P.A. em 50,0 mL de solução de ácido oxálico, $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$, 1%, m / V. O aparecimento da cor rosa-claro por mais de 30 s caracterizou o final da titulação ou ponto de viragem (AOAC, 1995).

A solução de $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 1 % foi preparada pela diluição da massa adequada de $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em 500,0 mL de água destilada.

CAPÍTULO 6: PROCEDIMENTOS

6.1. Monitoramento com Espectrofotômetro: Sistema 1.

6.1.1. Descrição do Sistema 1:

O Sistema 1 é ilustrado na figura 24. Este sistema é constituído de um espectrofotômetro comercial, **1A**, utilizado como sistema de detecção e cujas fontes de radiação (lâmpadas de W e D₂) foram bloqueadas. O suporte de cela do espectrofotômetro, **1B**, e as soluções foram termostatizadas com um banho termostatizador em 25,0±0,1 °C. A mistura e a adição dos reagentes foram realizados por um sistema de injeção simultânea, **1C**, (ROSSI & FERREIRA, 1997). O sistema de injeção simultânea foi utilizado para iniciar a reação pela adição da solução de H₂O₂ por uma das seringas, sendo a outra mantida inoperante. A mistura reacional era mantida em cela aberta de acrílico com caminho ótico de 1,0 cm para monitoramento da luminescência.

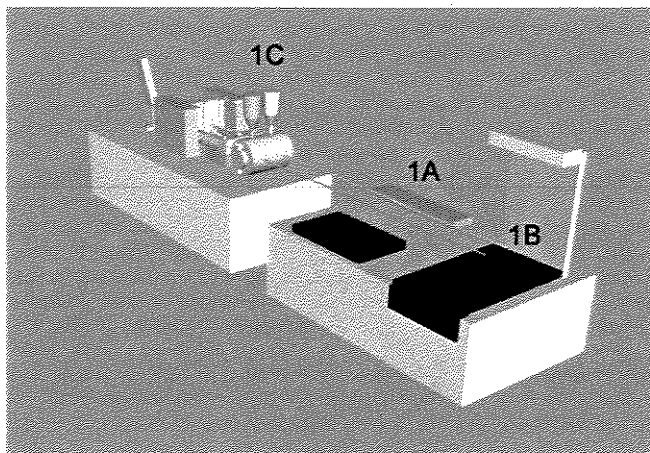


Figura 24. Esquema do Sistema 1: (A) Sistema de injeção, (B) Espectrofotômetro e (C) Cella da reação.

6.1.2. Procedimento:

Para a realização das medidas, eram adicionados 2,00 mL de solução de luminol na cela de acrílico colocada no espectrofotômetro, o qual era fechado e, pelas entradas do tubos para termostatização do suporte de cela, era introduzido um tubo de polietileno do sistema de injeção com a solução de H₂O₂. Antes da adição de H₂O₂, iniciava-se o registro dos dados, com intervalo de 1s entre cada medida durante períodos de até 3 min, dependendo da duração da luminescência, o que variava de acordo com as concentrações dos reagentes. Como a luminescência era medida diretamente no detector

do instrumento, não havia seleção de λ da emissão. Os experimentos foram realizados pelo menos em triplicatas. A figura 25 apresenta um sinal típico obtido pelo Sistema 1.

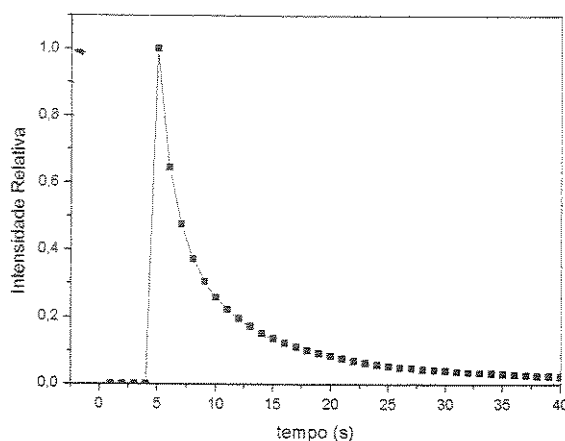


Figura 25. Perfil de emissão monitorado pelo Sistema 1 da reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em meio alcalino ($\text{pH}=10,4$) com H_2O_2 ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$). $T=25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

6.2. Monitoramento com Fotomultiplicadora: Sistema 2.

Em colaboração com o Prof. Dr. Jarbas J. R. Rowhedder, foi realizada a montagem do sistema descrito na sequência com alguns dispositivos cedidos sob empréstimo pelo Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine

6.2.1. Descrição do Sistema 2:

O Sistema 2 é apresentado na figura 26. Este sistema é constituído de uma fotomultiplicadora, **2A**, conectada com um monocromador UV-visível, **2B**, cuja seleção de comprimento de onda é realizado por um motor de passo, **2C**. Tanto o sinal gerado na fotomultiplicadora como o motor de passo do monocromador são controlados por uma placa de interface analógica digital acoplada a um microcomputador, **2D**. A caixa controladora **2E** apresenta um circuito para a conversão do sinal da fotomultiplicadora, uma fonte simétrica de 12 V, utilizada para alimentar o circuito conversor, e um circuito controlador do motor de passo. Além disso, o Sistema 2 apresenta também duas fontes variáveis de alimentação para motor de passo de 0-24 V, **2F**, e da fotomultiplicadora de 0-3000 V, **2G**. O sistema apresenta um suporte de cela termostaticado, **2H**, manufaturado nas oficinas mecânicas do Instituto de Química da UNICAMP. A termostatização é realizada com circulação de água do banho termostaticador, **2I**.

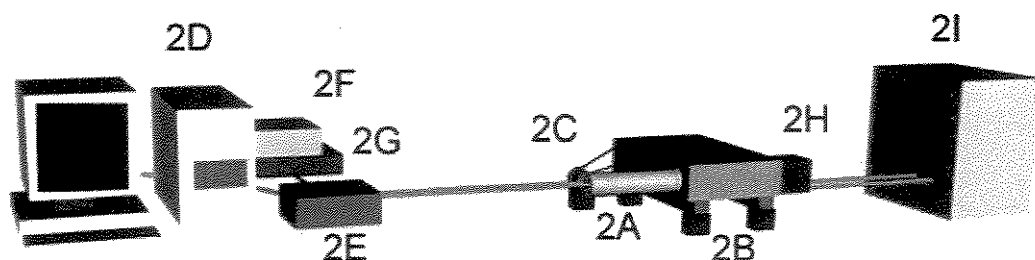


Figura 26. Esquema do Sistema 2: (2A) fotomultiplicadora, (2B) monocromador, (2C) motor de passo, (2D) microcomputador, (2E) conversor corrente/potencial, multiplicador de sinal e controle do motor de passo, (2F) e (2G) fontes de alimentação do motor de passo e fotomultiplicadora, (2H) suporte da célula da reação e (2I) banho termostatzador.

Os circuitos confeccionados para a montagem do Sistema 2 estão apresentados nas figuras 27 a 29.

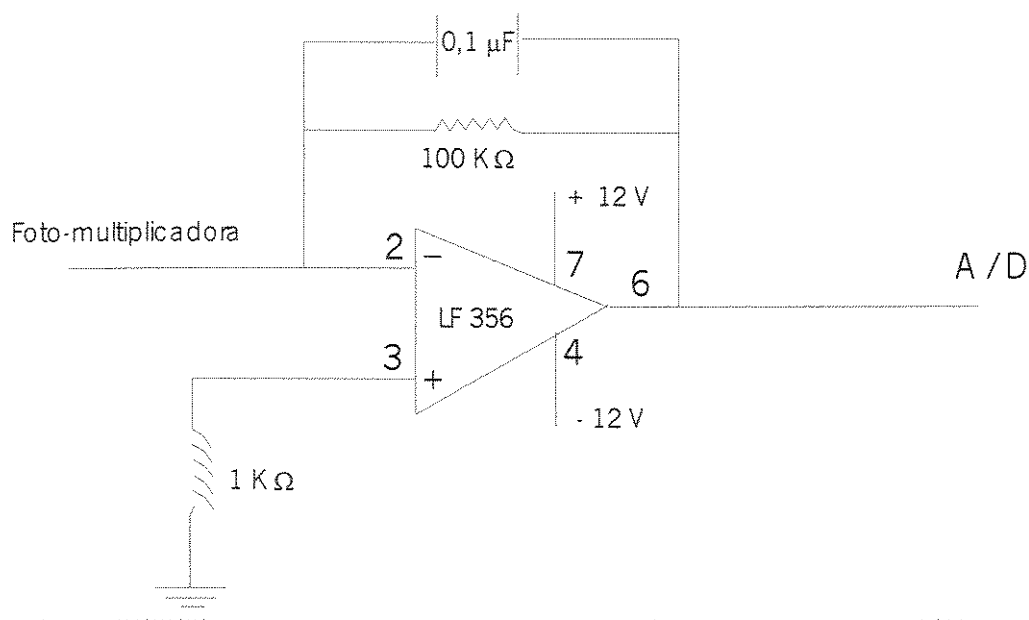


Figura 27. Diagrama esquemático do circuito conversor corrente/potencial. O amplificador operacional utilizado foi um LF356. Os números 2 a 7 correspondem à pinagem do amplificador operacional.

O circuito conversor é constituído de um amplificador operacional (LF356) ligado em conjunto a resistores e um capacitor cerâmico, alimentado por uma fonte de 12 V simétrica, esquematizada na figura 28.

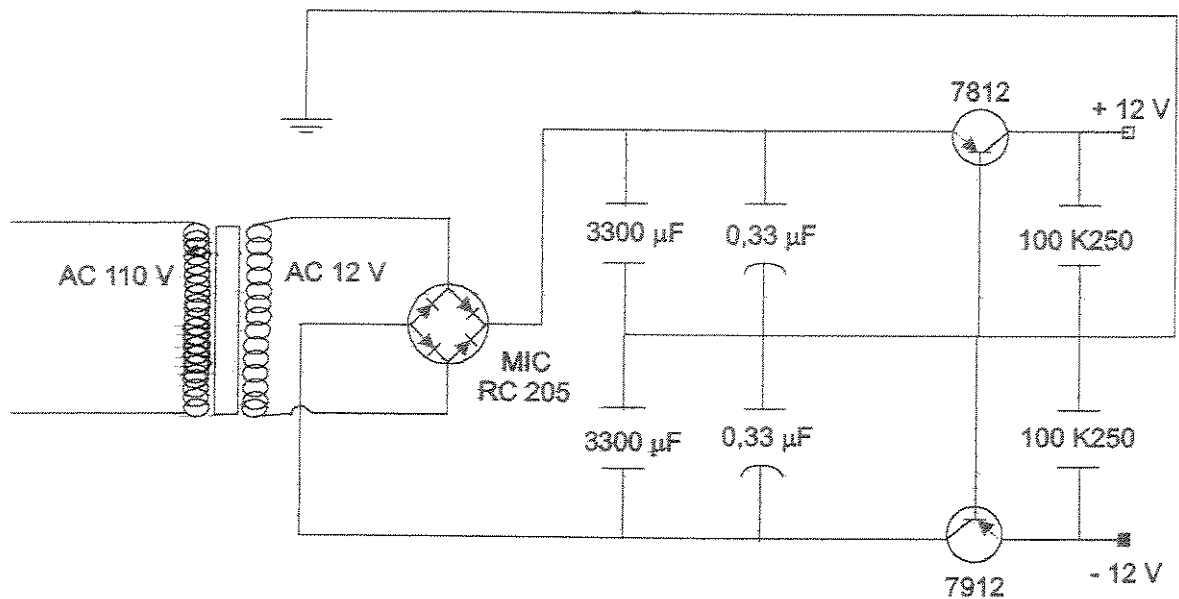


Figura 28. Diagrama do circuito da fonte simétrica de 12 V (transistores utilizados MIC RC208, 7812 e 7912).

O controle do motor de passo era realizado por circuito com 4 transistores tipo chave, conforme ilustra o diagrama na figura 29 acoplado a interface A/D e ao motor de passo.

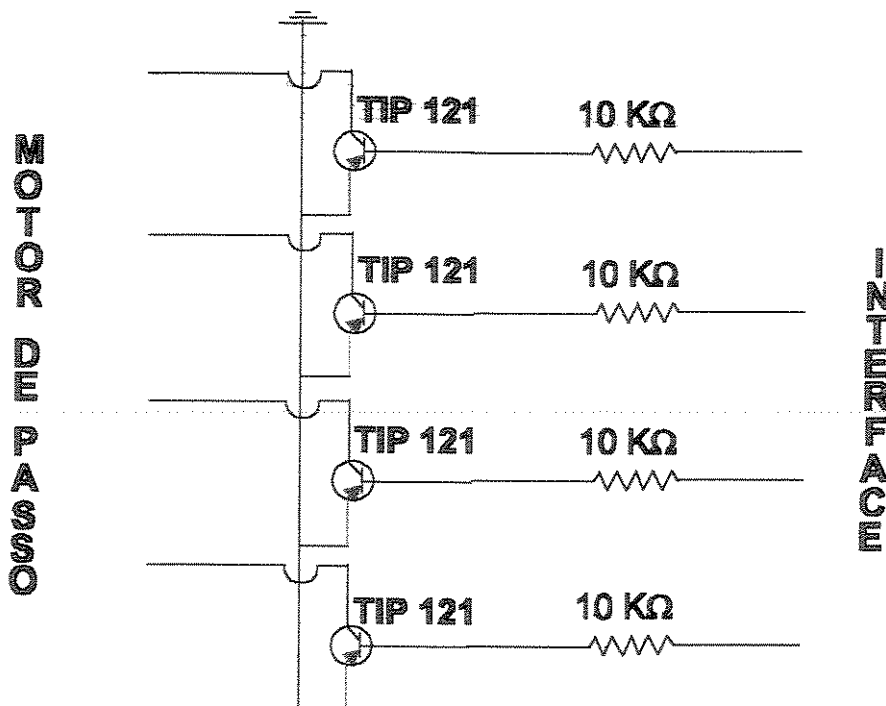


Figura 29. Diagrama do circuito com função de controlar o passo do motor (transistores utilizados 336 TIP121).

Como a radiação emitida passa por um monocromador, o sistema 2 possibilita o monitoramento em uma faixa mais estreita de comprimento de onda, ± 1 nm. Além disso, a fotomultiplicadora tornou este sistema mais sensível e com maior velocidade de resposta, cerca de 6 ms de intervalo entre cada ponto.

O programa utilizado para aquisição dos dados experimentais é uma adaptação de outro programa desenvolvido pelo Prof. Dr. Jarbas J. R. Rowhedder. A apresentação visual do programa ao usuário está ilustrada na figura 30. Há comandos de controle do monocromador, **3A**, comandos de medidas de espectros de emissão e luminescência em função do tempo, **3B**, comandos da área gráfica, **3C**, menu, **3D**, e a área de plotagem, **3E**.

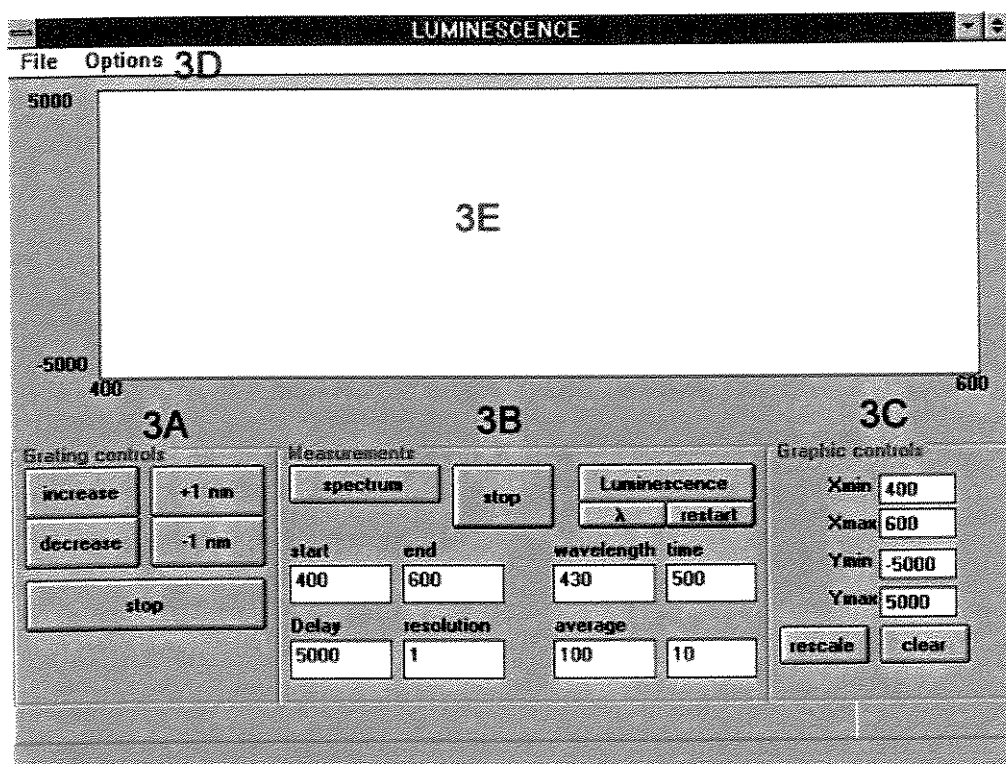


Figura 30. Ilustração do programa adaptado para o Sistema 2: (**3A**) comandos do monocromador, (**3B**) comandos de medidas e leituras, (**3C**) comandos gráficos, (**3D**) menu e (**3E**) área de plotagem.

O Sistema 2 possibilita monitoramentos de espectros de emissão utilizando os comandos *spectrum*, no quadro *measurements*, **3B**, com opções de ajuste de comprimento de onda inicial e final, resolução e velocidade de varredura. Foram obtidos espectros de emissão de lâmpadas de Hg e W, ilustrados na figuras 31 e 32, com o intuito de avaliar os desempenhos do monocromador e da fotomultiplicadora.

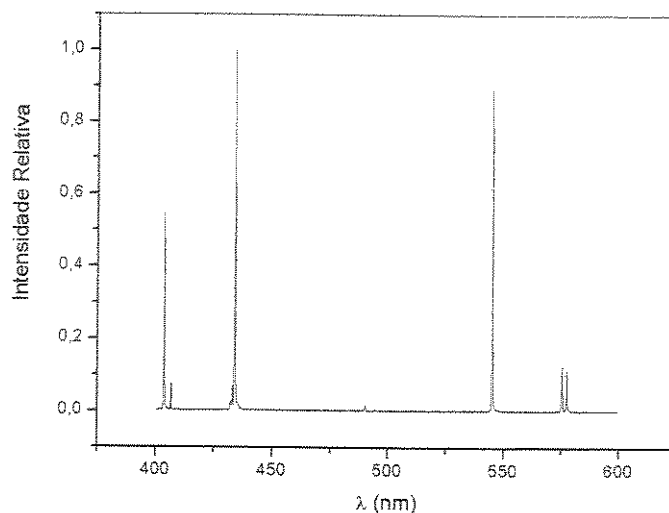


Figura 31. Espectro de emissão de uma lâmpada de Hg monitorado pelo Sistema 2. Resolução de 0,2 nm. $\Delta\lambda = 400$ a 600 nm. Ganho 1X. $V_{\text{foto}} = 800$ V.

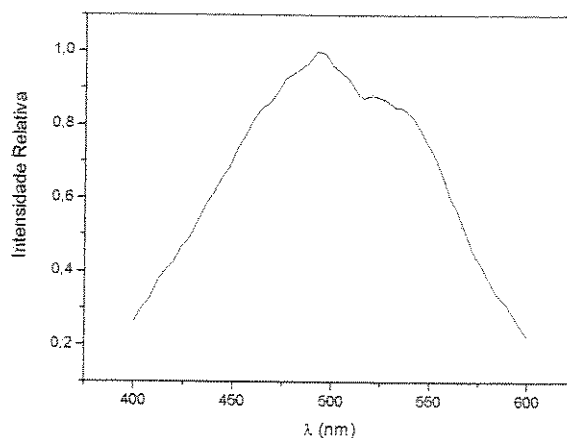


Figura 32. Espectro de emissão de uma lâmpada de W monitorado pelo Sistema 2. Resolução de 3 nm. $\Delta\lambda = 400$ a 600 nm. Ganho 5X. $V_{\text{foto}} = 800$ V.

A principal utilização do Sistema 2 foi para as medidas de quimiluminescência da reação do luminol. Para isso, os comandos *Luminescence*, λ e *restart*, lado direito de 3B, controlavam o monitoramento cinético, a troca de comprimento de onda de monitoramento e retorno ao comprimento de onda inicial, respectivamente. Abaixo destes comandos, as opções de monitoramento podiam ser escolhidas, como, por exemplo, o número de pontos obtidos (*time*), o número de leituras de cada ponto (*average*) e o comprimento de onda de monitoramento (*wavelength*).

6.2.2. Procedimento:

O monitoramento da quimiluminescência com Sistema 2 foi análogo ao do Sistema 1. Obviamente, alguns aspectos controlados neste sistema, como comprimento de onda de monitoramento, sensibilidade e a velocidade de resposta, possibilitaram um desempenho diferente ao do Sistema 1. A maior sensibilidade e a maior velocidade de resposta da fotomultiplicadora contribuem para baixar os limites de detecção do método e registrar maior número de pontos num dado intervalo de tempo.

A figura 33 apresenta um perfil cinético e o ruído do sinal típicos obtidos pelo monitoramento da quimiluminescência pelo Sistema 2.

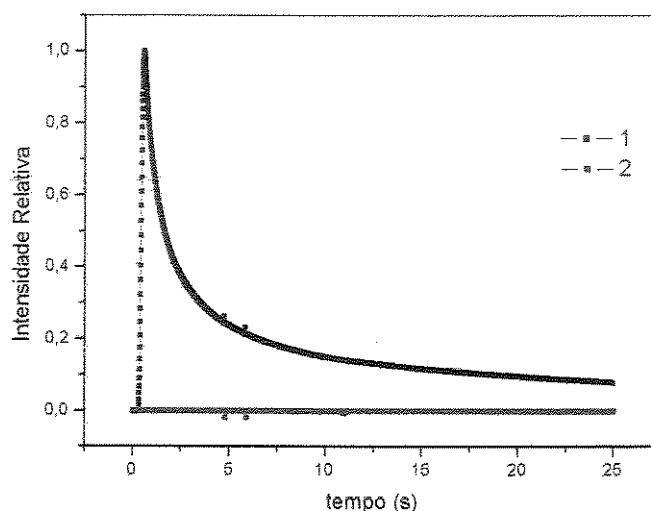


Figura 33. Perfil de emissão monitorado pelo Sistema 2 da reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em meio alcalino (pH=10,3) com H_2O_2 ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) utilizando o Sistema 2 ($V_{\text{foto}}=600 \text{ V}$; $\lambda=420\text{nm}$; ganho 1X; $T=25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$): (1) sinal analítico e (2) ruído.

Com os Sistemas 1 e 2, iniciou-se a avaliação dos efeitos das espécies presentes modificadoras de velocidade da reação quimiluminescente do luminol. A partir dos dados obtidos, realizou-se o desenvolvimento de um método cinético-analítico visando a dosagem destes agentes redutores.

6.3. Avaliação do Efeito Modificador de Metais de Transição e Agentes Redutores:

Para verificar o efeito modificador dos metais de transição, escolheram-se dois íons de metais de transição para o estudo: Cu(II) e Ni(II). Foram preparadas soluções de trabalho de luminol ($7,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, pH = 9,6, em tampão carbonato) contendo diferentes

concentrações de Cu(II) e Ni(II), como ilustra a tabela 2. Os monitoramentos foram realizados com o Sistema 1.

Tabela 2. Soluções de trabalho de luminol contendo diferentes concentrações de Cu(II) e Ni(II).

Solução	[Cu(II)] / 10^{-4} mol L ⁻¹	[Ni(II)] / 10^{-4} mol L ⁻¹
A	-	8,3
B	8,0	-
C	7,3	0,73
D	7,3	-

Para verificar o efeito modificador de agentes redutores, escolheu-se o ácido ascórbico, AA, como espécie de estudo. Foram preparadas soluções de trabalho de H₂O₂ contendo ácido ascórbico como se descreve na tabela 3:

Tabela 3. Soluções de trabalho de H₂O₂ contendo diferentes concentrações de ácido ascórbico.

Solução	[H ₂ O ₂] / mol L ⁻¹	[AA] / 10^{-4} mol L ⁻¹
1	0,089	-
2	0,134	-
3	0,089	0,81
4	0,089	8,1
5	0,134	0,81
6	0,134	8,1

6.4. Otimização do Monitoramento da Reação com Sistema 1:

Foi realizado um planejamento univariado para otimizar as concentrações de luminol, H₂O₂, Cu(II) e CO₃²⁻ para o monitoramento da quimiluminescência. As faixas de concentrações foram escolhidas de acordo com as concentrações já utilizadas. As condições de temperatura, de mistura e adição de reagentes e o valor de pH foram mantidos constantes. Os dados foram avaliados levando em conta a intensidade de emissão máxima, $I_{\max}$, a duração da luminescência, D , e a velocidade da reação, calculada pelo valor da tangente em um intervalo fixo de tempo.

Foram realizados monitoramentos da reação quimiluminescente em diferentes concentrações dos reagentes para otimizar as condições de monitoramento. A tabela 4 apresenta as concentrações dos reagentes na otimização de cada espécie estudada:

Tabela 4. Condições e concentrações dos reagentes na otimização dos monitoramentos da reação quimiluminescente utilizando o Sistema 1. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Espécie Estudada	Faixa de Concentração mol L^{-1}	Outros Reagentes mol L^{-1}			
		$[\text{H}_2\text{O}_2]$	$[\text{LN}]^*$	$[\text{Cu(II)}]$	$[\text{CO}_3^{2-}]$
H_2O_2	$8,9 \times 10^{-3}$ a $8,9 \times 10^{-2}$	-	$2,3 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-4}$	0,2
luminol	$1,0 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-2}$	$4,4 \times 10^{-2}$	-	$1,8 \times 10^{-4}$	0,2
Cu(II)	$7,0 \times 10^{-5}$ a $7,0 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-3}$	-	0,2
CO_3^{2-}	$9,0 \times 10^{-2}$ a 1,1	$4,4 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-4}$	-

* $[\text{LN}]$ representa a concentração de luminol em mol L^{-1} .

As condições otimizadas dos reagentes para o Sistema 1 estavam entre $4,4 \times 10^{-2}$ a $8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, entre $2,0 \times 10^{-3}$ a $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, entre $1,0 \times 10^{-4}$ a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e entre 0,2 a $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ para H_2O_2 , luminol, Cu(II) e CO_3^{2-} , respectivamente.

6.5. Otimização do Monitoramento da Reação com Sistema 2:

Foi realizado o planejamento análogo ao Sistema 1 utilizando-se os mesmos parâmetros de avaliação: I_{max} , D e velocidade da reação.

Inicialmente, foram realizados monitoramentos em diferentes comprimentos de onda de emissão, λ_e , e com diferentes potências aplicadas na fotomultiplicadora, V_{foto} .

O estudo sobre a variação de λ_e , cujos resultados são ilustrados na figura 34, indicou que em 420 nm eram registradas as intensidades máximas. Portanto, esse comprimento de onda passou a ser utilizado nas medidas.

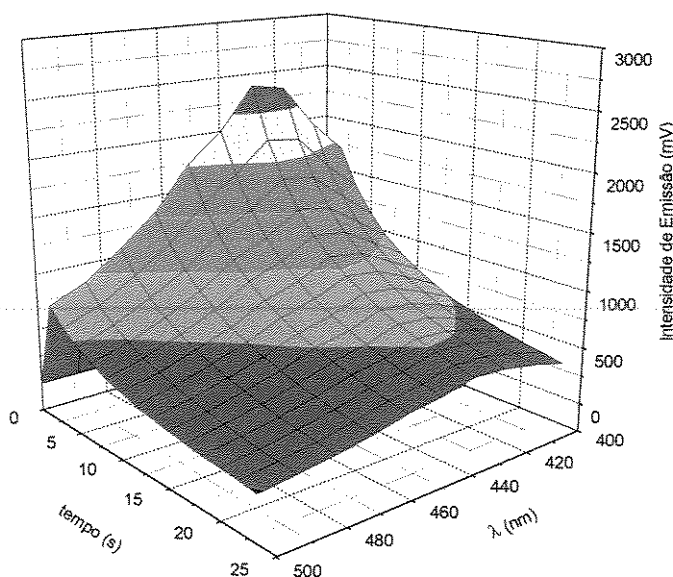


Figura 34. Perfis de emissão em função do tempo e do comprimento de onda monitorado (λ) da reação quimiluminescente do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($2,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em meio alcalino ($\text{pH} = 10,5$; $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$) realizado pelo sistema montado (Ganho: 1X; $V_{\text{foto}} = 800 \text{ V}$).

O estudo do efeito da variação de V_{foto} na luminescência mostrou que o aumento no potencial aumenta a sensibilidade da fotomultiplicadora, ou seja, aumenta o sinal de intensidade registrado, conforme ilustra figura 35. Para que a intensidade de emissão fosse adequada para as medidas nas concentrações estudadas, a V_{foto} escolhida foi de 600 V.

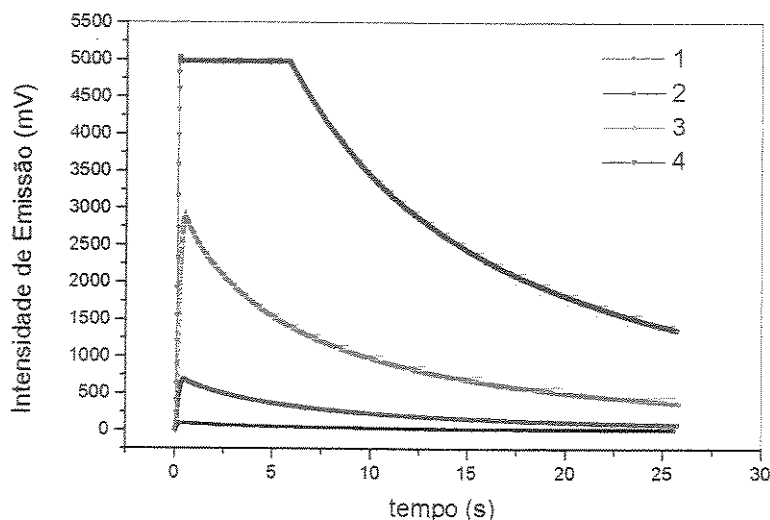


Figura 35. Perfis cinéticos de emissão da reação quimiluminescente do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($2,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}=10,5$) monitorados pelo sistema 2 variando a voltagem aplicada na fotomultiplicadora: (1) 500 V; (2) 600 V; (3) 700 V; (4) 800 V. $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

A partir do estabelecimento das condições instrumentais, foram realizados monitoramentos da reação quimiluminescente em diferentes concentrações dos reagentes: H_2O_2 , luminol, Cu(II) e Carbonatos, para otimizar suas condições de monitoramento. A tabela 5 apresenta as concentrações dos reagentes na otimização de cada espécie estudada:

Tabela 5. Condições e concentrações dos reagentes na otimização dos monitoramentos da reação quimiluminescente utilizando o Sistema 2. $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$; Ganho: 1X. $\lambda_e = 420 \text{ nm}$.

Espécie Estudada	Faixa de Concentração mol L^{-1}	Outros Reagentes mol L^{-1}			
		$[\text{H}_2\text{O}_2]$	$[\text{LN}]^*$	$[\text{Cu(II)}]$	$[\text{CO}_3^{2-}]$
H_2O_2	$8,9 \times 10^{-3}$ a $8,9 \times 10^{-2}$	-	$2,3 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-4}$	0,2
luminol	$1,0 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-2}$	$4,4 \times 10^{-2}$	-	$1,8 \times 10^{-4}$	0,2
Cu(II)	$7,0 \times 10^{-5}$ a $7,0 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-3}$	-	0,2
CO_3^{2-}	$9,0 \times 10^{-2}$ a 1,1	$4,4 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-4}$	-

* $[\text{LN}]$ representa a concentração de luminol em mol L^{-1} .

As condições otimizadas dos reagentes para o Sistema 2 estavam entre $4,4 \times 10^{-2}$ a $8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $2,0 \times 10^{-3}$ a $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $1,0 \times 10^{-4}$ a $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e 0,2 a 0,4 mol L^{-1} para H_2O_2 , luminol, Cu(II) e CO_3^{2-} , respectivamente.

6.6. Potencialidade Analítica do Efeito Modificador de Ácido Úrico:

Foram realizados monitoramentos da reação quimiluminescente variando a concentração de ácido úrico entre $5,0 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As soluções de trabalho foram termostatizadas. Os monitoramentos foram realizados de acordo com os procedimentos descritos para cada sistema de detecção. As concentrações dos reagentes utilizadas foram aquelas estabelecidas na otimização das condições para os dois sistemas, descritas nos itens 5.2.4 e 5.2.5.

Os parâmetros cinéticos foram calculados pelos métodos do tempo fixo e das tangentes em diversos intervalos de tempo. Além disso, os perfis de emissão foram normalizados pela intensidade máxima registrada, I_{max} , para cada monitoramento. Os novos parâmetros cinéticos foram calculados pelos mesmos métodos matemáticos.

6.7. Potencialidade Analítica do Efeito Modificador de Ácido Ascórbico:

Foram realizados monitoramentos da reação quimiluminescente variando a concentração de ácido ascórbico entre $5,0 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os monitoramentos foram realizados de acordo com os procedimentos descritos para cada sistema de detecção. As concentrações dos reagentes utilizadas foram aquelas estabelecidas na otimização das condições para os dois sistemas, descritas nos itens 5.2.4 e 5.2.5.

Analogamente à análise de ácido úrico, os parâmetros cinéticos para a análise de ácido ascórbico foram calculados pelos métodos do tempo fixo e das tangentes em diversos intervalos de tempo. Além disso, os perfis de emissão foram normalizados pela intensidade máxima registrada, I_{max} , para cada monitoramento. Os novos parâmetros cinéticos foram calculados pelos mesmos métodos matemáticos.

6.8. Determinação de Ácido Ascórbico em Medicamentos:

O método cinético desenvolvido foi testado para a dosagem de ácido ascórbico em medicamentos: um comprimido não efervescente e dois tabletes efervescentes.

Foram dissolvidas massas adequadas das amostras em tampão carbonato, $\text{pH} = 10,5$, e diluídas em concentração propícia para a análise de acordo com o valor

nominal da amostra para ser monitorada na concentração de $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($4 \times 10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$). As soluções de trabalho foram preparadas de acordo com as soluções de trabalho dos padrões, item 5.2.3. As medidas foram realizadas com o Sistema 2. A forma de adição e mistura dos reagentes e a temperatura do sistema foram mantidas constantes.

Tendo em vista os resultados obtidos pela análise direta das amostras, foram realizados experimentos segundo o método de adição de padrão. Às soluções de trabalho das amostras, foram adicionadas quantidades conhecidas de solução estoque de ácido ascórbico, $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. As concentrações dos padrões adicionados foram, em mol L^{-1} : (1) 0; (2) $1,0 \times 10^{-4}$; (3) $2,0 \times 10^{-4}$; (4) $4,0 \times 10^{-4}$; e (5) $5,0 \times 10^{-4}$. Paralelamente, realizaram-se as análises dos padrões sem a adição da amostra, para verificação dos coeficientes lineares das curvas de calibração. A construção das curvas de calibração dos padrões é necessária, pois a grande maioria das curvas não apresenta coeficiente linear igual a zero.

Os resultados obtidos na dosagem de ácido ascórbico em medicamentos pelo método proposto foram comparados com os do método volumétrico oficial da AOAC (1995). Este método consistia na titulação com 2,6-diclorofenolindofenol de cor azul (meio neutro) de alíquotas com cerca de 50 mg de ácido ascórbico em 50,0 mL de solução 1% de $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$. O titulante age como indicador, uma vez que seu excesso em meio ácido tem cor rosa claro. A permanência de cerca de 15 s da coloração rósea indica o ponto de viragem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

“Se não há nenhuma informação em contrário, parta da suposição mais simples e leve adiante as consequências.”

John Dalton (1766-1844)

CAPÍTULO 7:

AVALIAÇÃO DO EFEITO MODIFICADOR DE METAIS DE TRANSIÇÃO, DO pH E DE AGENTES REDUTORES

“Nenhuma investigação humana pode ser considerada verdadeira ciência se não passar pela demonstração matemática.”

Leonardo da Vinci (1452-1519)

“É um erro capital teorizar antes de ter os dados, começa-se a distorcer os fatos para adaptá-los às teorias, em vez de fazer com que se adaptem aos fatos.”

Sherlock Holmes (no livro, *A Scandal in Bohemia* de Conan Doyle, 1891)

7.1. Interpretação do Mecanismo da Reação Quimiluminescente:

A reação do luminol com H_2O_2 em meio alcalino e catalisada por metais de transição não tem seu mecanismo totalmente elucidado. Alguns intermediários já foram determinados e foram apresentados no Capítulo 2. Entre as várias possibilidades de mecanismo propostas, foi escolhido o mecanismo segundo ALBERTIN e colaboradores (ALBERTIN et al, 1998), ilustrado na figura 36, para desenvolver o estudo analítico:

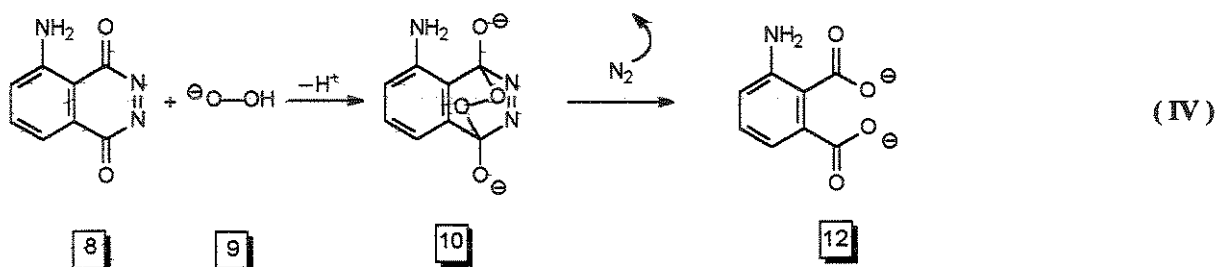
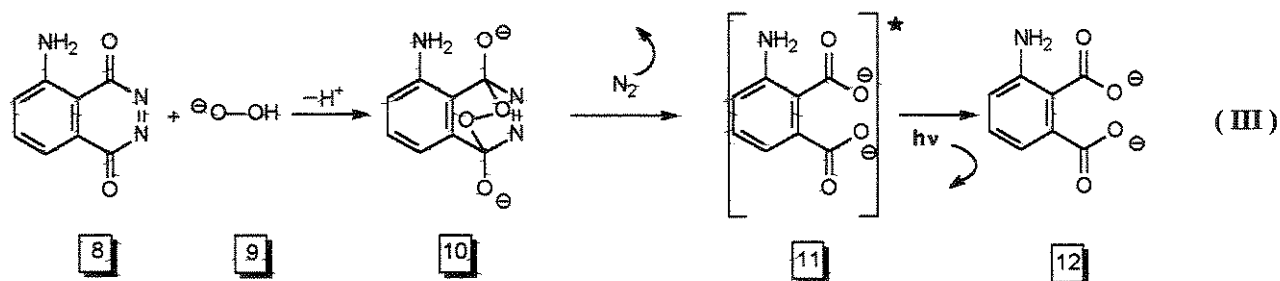
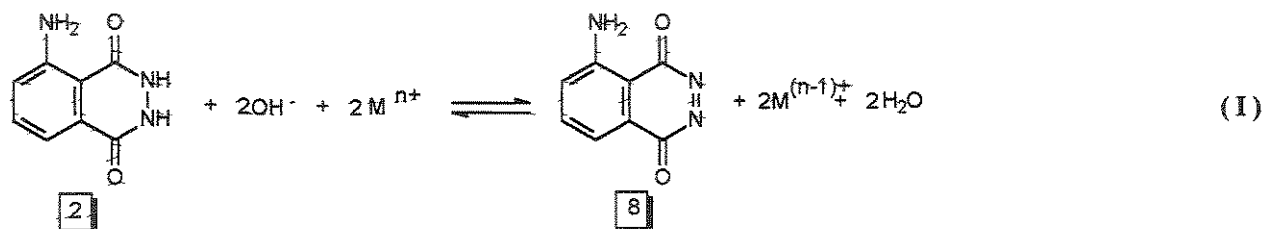


Figura 36. Esquema proposto por ALBERTIN et al (1998) para o mecanismo da reação luminescente do luminol com H_2O_2 em meio alcalino e em presença de um metal de transição como catalisador.

Para facilitar a discussão, a proposta foi dividida em 4 etapas:

(I) a formação do primeiro intermediário (diazquinona, (8)) pela ação do catalisador (ion de metal de transição) no luminol (2);

(II) a formação do ânion do H_2O_2 (9) pela ação da hidroxila;

(III) a reação do ânion de H_2O_2 (9) com a diazoquinona (8) formando o endo-peróxido (10), que produz a quimiluminescência passando pelo intermediário (11) ou passando diretamente para o produto final, 3-aminoftalato (12), sem produzir a quimiluminescência.

(IV) a reação do ânion de H_2O_2 com a diazoquinona formando o endo-peróxido (10), que não produz a quimiluminescência e gera diretamente o produto final, 3-aminoftalato (12).

As etapas (I) e (II) mostram dois equilíbrios que provavelmente são as etapas mais importantes do ponto de vista analítico, além da etapa de luminescência, etapa (III). Estas etapas determinam as concentrações das espécies que formam o intermediário responsável pela luminescência na etapa (III) e serão responsáveis pela duração e intensidade de emissão. Isto torna possível a utilização deste sistema em aplicação analítica para determinar, além dos reagentes diretamente envolvidos, qualquer espécie que altere estes dois equilíbrios, modificando a cinética da reação.

As etapas (III) e (IV) mostram as duas alternativas possíveis para o final da reação em meio aquoso: a produção de luminescência pelo intermediário eletronicamente excitado e a formação do produto final sem a produção de luminescência, respectivamente.

Evidentemente, existem outros fatores que influenciam o caminho mais favorável da reação, como pH, temperatura, composição do solvente, tipo de íon metálico usado como catalisador e outras características do sistema. Entretanto, estes fatores podem ser mantidos constantes, não influenciando nos resultados.

Matematicamente, pode-se relacionar as espécies envolvidas, supondo as etapas ilustradas na figura 36. Na etapa (I), existe um equilíbrio que pode ser representado pela seguinte expressão:

$$K_1 = \frac{[DQ][M_R]^2}{[LN][M_O]^2[OH^-]^2} \quad (21)$$

onde $[DQ]$ representa a concentração de diazoquinona (8), $[M_R]$ a concentração de espécie reduzida do metal, $[LN]$ a concentração de luminol e $[M_O]$ a concentração da espécie oxidada do metal.

Como não ocorre consumo de catalisador, M_O , pode-se considerar a razão entre as concentrações das formas oxidada e reduzida do cátion como um valor constante M . Substituindo $M = M_R / M_O$ na equação 21, chega-se a

$$K_1 = \frac{[DQ]}{M^2 [LN] [OH^-]^2} \quad (22)$$

Rearranjando:

$$[DQ] = M^2 K_1 [LN] [OH^-]^2 \quad (23)$$

Na etapa (II), também existe um equilíbrio e que pode ser expresso por:

$$K_2 = \frac{[HOO^-]}{[HO^-] [H_2O_2]} \quad (24)$$

Rearranjando:

$$[HOO^-] = K_2 [OH^-] [H_2O_2] \quad (25)$$

Associando a velocidade de decaimento da espécie excitada, E^* (11), com a duração da luminescência ($- dL / dt$), pode-se propor o desenvolvimento matemático apresentado a seguir, onde S representa o sinal monitorado:

$$S = -\frac{dL}{dt} = \frac{d[E^*]}{dt} = k_3 [E^*] \quad (26)$$

A formação da espécie excitada (11) pode ser relacionada com as concentrações do ânion de H_2O_2 e da diazoquinona (8), supondo que a conversão do endo-peróxido (10) a 3-aminofalato seja muito mais rápida que a formação de 10. Desta forma, tem-se:

$$S = \frac{d[E^*]}{dt} = k[DQ][HOO^-] \quad (27)$$

Substituindo as equações 23 e 25 na equação 27, tem-se:

$$S = kK_1K_2M^2[H_2O_2][LN][OH^-]^3 \quad (28)$$

Sendo

$$k_{aparente} = kK_1K_2M^2 \quad (29)$$

A equação 28 se resume em:

$$S = k_{aparente}[H_2O_2][LN][OH^-]^3 \quad (30)$$

Enfim, a equação 30 associa a velocidade de decaimento da luminescência com as concentrações de H_2O_2 , luminol e o pH da reação. Isto pode possibilitar a determinação de uma das espécies pelo controle das demais. Além disso, pode-se determinar também espécies que interagem com as espécies da reação, modificando a velocidade e podendo ser determinadas por esta mudança. Exemplos destas espécies são os agentes redutores, como o ácido ascórbico e o ácido úrico. A atuação destas espécies na reação quimiluminescente é discutida no próximo item.

7.2. Avaliação da Reação Quimiluminescente:

Nesta etapa, foram estudadas condições envolvendo concentrações de reagentes, meio reacional e pH para iniciar o estudo da reação quimiluminescente do luminol. Os primeiros testes da reação quimiluminescente foram realizados com a mistura de volumes iguais de soluções de luminol ($2,4 \times 10^{-3}$ a $4,8 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) e H_2O_2 (0,04 a 0,4 mol L⁻¹) em meio alcalino (NaOH 0,1 mol L⁻¹), sem adição de metais de transição. Nestas condições, não foi observada a luminescência. A adição de soluções de Cu(II) ($1,5 \times 10^{-2}$ a $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) ao meio reacional também não produziu luminescência (KUBO & TORIBA, 1997). Extensivos testes foram realizados, mas não foram encontradas condições para que a luminescência fosse observada visualmente. Partindo-se de informações da literatura consultada (PETERSON, HANSEN, RUZICKA, 1986, e

WORSFOLD, 1992), foram testados novos procedimentos. A partir do procedimento descrito por ALBERTIN e colaboradores (ALBERTIN et al, 1998), a luminescência foi observada visualmente. Neste trabalho, as concentrações de luminol, H_2O_2 e Cu^{2+} são de $5,6 \times 10^{-4}$, 0,2 e $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, em tampão carbonato com $\text{pH} = 9,6$. A radiação emitida tem a coloração azul e por alguns instantes emitia uma intensidade forte, diminuindo com o tempo até sua extinção. A figura 37 ilustra a quimiluminescência do luminol em fotografia realizada no laboratório.

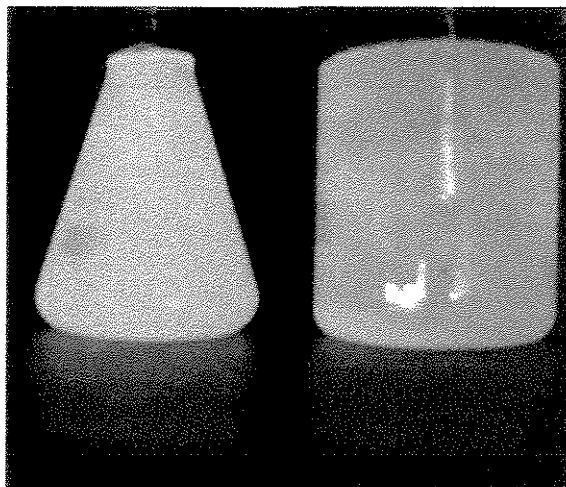


Figura 37. Fotografia da quimiluminescência do luminol obtida experimentalmente.

A partir destas condições, foram realizados monitoramentos da reação quimiluminescente com o Sistema 1, visando avaliar a luminescência produzida. Foram preparados 5 padrões de H_2O_2 variando a concentração entre $8,9 \times 10^{-2}$ a $0,22 \text{ mol L}^{-1}$. As concentrações da solução de luminol e de Cu(II) tiveram suas concentrações mantidas constantes e foram preparadas com tampão carbonato, em $\text{pH} = 9,6$, e em temperatura de $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Foi observado que concentrações maiores de H_2O_2 , aumentavam a velocidade da reação e diminuía a duração da luminescência. Pela proposta matemática desenvolvida para avaliar os efeitos das espécies envolvidas na reação, os resultados obtidos condizem com a perspectiva de aumento de velocidade. A diminuição da duração da luminescência também é descrita na equação 30, pois a variação do sinal analítico, S , está relacionada com a variação da luminescência em função do tempo, $-dL / dt$. Os perfis de emissão obtidos com seus respectivos desvios padrões da média das triplicatas estão ilustrados na figura 38.

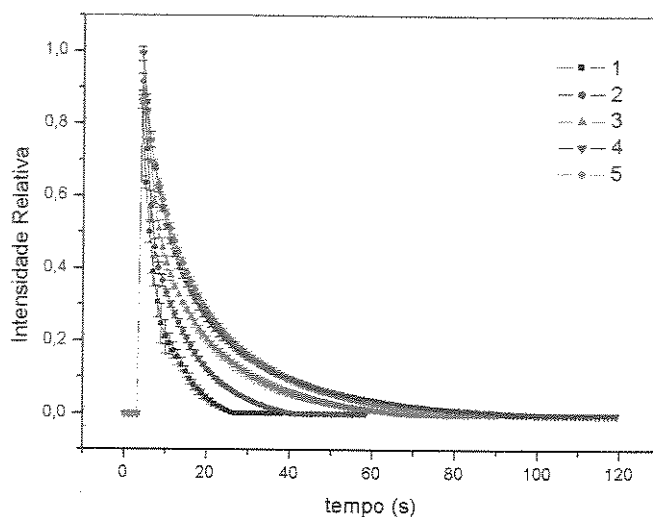


Figura 38. Perfis médios de emissão obtidos a partir da reação do luminol ($5,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) catalisada por Cu(II) ($1,14 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 9,6) e $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, com diversas soluções de H_2O_2 : (1) $0,222 \text{ mol L}^{-1}$; (2) $0,178 \text{ mol L}^{-1}$; (3) $0,134 \text{ mol L}^{-1}$; (4) $0,089 \text{ mol L}^{-1}$; (5) $0,044 \text{ mol L}^{-1}$. Os monitoramentos foram realizados com o Sistema 1.

Estes primeiros resultados indicaram que o Sistema 1 podia ser utilizado para monitorar a luminescência. E, possivelmente, as condições de reação também poderiam ser utilizadas para verificar os efeitos de outros modificadores de velocidade, como íons de metais de transição e agentes redutores. Assim, foram realizados experimentos para avaliar os efeitos destas espécies na luminescência, como apresentado no próximo item.

7.3. Avaliação do Efeito Modificador de Metais de Transição e Agentes Redutores na Reação Quimiluminescente:

Um grande marco no desenvolvimento de métodos analíticos baseados na modificação da velocidade de reações catalíticas é a determinação de espécies orgânicas (MOTTOLA, 1988). A modificação na velocidade permite baixar limites de detecção e aumentar a sensibilidade das análises para espécies que participam diretamente do ciclo catalítico (MOTTOLA, 1988).

A determinação de agentes redutores orgânicos empregando a reação de quimiluminescência do luminol com H_2O_2 já foi citada na literatura. Por exemplo, a glicose (PETERSON, HANSEN, RUZICKA, 1986 e KUBO & TORIBA, 1997), o ácido úrico (PETERSON, HANSEN, RUZICKA, 1986 e BUSCH & POLSTER, 1992), o ácido ascórbico (KUBO & TORIBA, 1997), o ácido láctico (PETERSON, HANSEN, RUZICKA,

1986 e BUSCH & POLSTER, 1992), a creatinina e o colesterol (PETERSON, HANSEN, RUZICKA, 1986), dentre outros, são alguns dos agentes redutores determinados. Assim, supõe-se que agentes redutores devem apresentar efeitos modificadores na velocidade de reação e se propõe o estudo destes efeitos para aplicação na determinação destas espécies.

Além de agentes redutores, os cátions de metais de transição também modificam a velocidade da reação de quimiluminescência do luminol, como demonstram vários autores (MOTTOLA, 1988 e ROBARDS & WORSFOLD, 1992).

Considerando-se estas informações, estudou-se o efeito destas espécies na modificação da velocidade da reação.

Para avaliar quantitativamente os efeitos modificadores, foram considerados alguns parâmetros analíticos como a intensidade máxima registrada, $I_{\max}$, a duração da luminescência, D , e as velocidades da reação em 4 a 8 s, v_1 , a partir dos perfis de emissão obtidos.

7.3.1. Efeito Catalítico de Cu(II) :

A reação de oxidação do luminol em meio aquoso requer um catalisador. Geralmente, cátions e complexos de metais de transição são utilizados para iniciar a reação. O efeito catalítico de vários metais de transição na reação quimiluminescente já foi largamente utilizado para suas determinações. Exemplos mais comuns dos cátions ou complexos metálicos utilizados na catálise desta reação são Co(II), Cu(II), Fe(III), Mn(III) e Cr(III) (ROBARDS & WORSFOLD, 1992). A atuação destes metais no mecanismo da reação é a principal etapa não elucidada do mecanismo. Possivelmente, a razão da dificuldade de esclarecimento do seu papel na reação é a possibilidade de reagir simultaneamente em várias etapas e com várias espécies responsáveis pela quimiluminescência.

Embora não esteja elucidado, o efeito modificador do Cu(II) é reconhecidamente catalítico, ou seja, o aumento de sua concentração aumenta a velocidade da reação quimiluminescente. Este comportamento fica demonstrado pela equação 28, onde a constante M representa a presença do catalisador.

Para ilustrar o efeito catalítico do Cu(II), a figura 39 apresenta os perfis de emissão de monitoramento da reação quimiluminescente do luminol, $1,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com H_2O_2 , $8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes concentrações de Cu(II): (1) $1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (2) $1,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

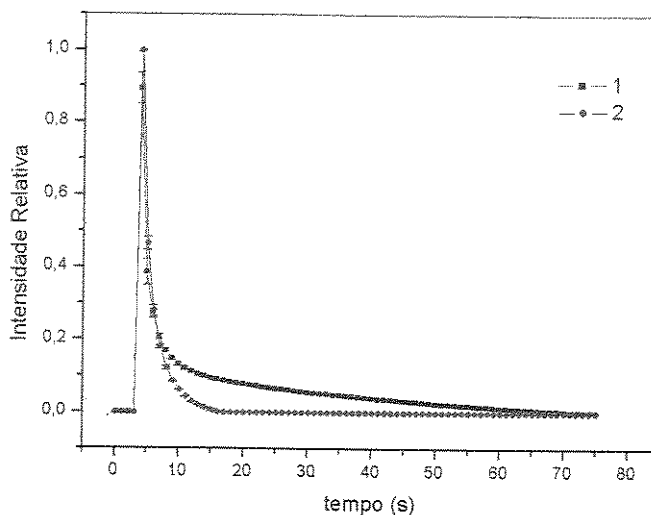


Figura 39. Perfis médios de emissão da reação do luminol ($1,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 10,2$) em diferentes concentrações de Cu(II) , em mol L^{-1} : (1) $1,8 \times 10^{-4}$ e (2) $1,1 \times 10^{-3}$. $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$. Os monitoramentos foram realizados com o Sistema 1.

Avaliando-se os perfis de emissão, os dois padrões apresentam uma diferença de I_{max} de 11%, uma diferença de D de 60 s e uma diferença de v_1 de 20 %.

7.3.2. Efeito Inibidor de Ni(II) na Reação Quimiluminescente Catalisada por Cu(II) :

Analogamente ao efeito catalítico do Cu(II) , esperava-se que o Ni(II) apresentasse o mesmo efeito na reação quimiluminescente do luminol.

Porém, monitorando-se a reação do luminol ($7,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Ni(II) ($8,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) não foi observada a quimiluminescência esperada nem evidências da reação.

Avaliando-se os perfis de emissão de misturas de Cu(II) e Ni(II) nestas condições de análise, verificou-se que as reações contendo os dois cátions metálicos apresentaram maior duração de luminescência que reações contendo somente o Cu(II) , ou seja, menor velocidade de reação.

Este efeito modificador do Ni(II) na reação quimiluminescente do luminol catalisada por Cu(II) também foi notado por KAMIDATE e colaboradores (KAMIDATE et al, 1993) com outros metais além do Ni(II) , como, por exemplo, o Mn(II) , Co(II) e Cr(III) . A diminuição significativa de velocidade da reação, aumentando a duração da luminescência pela presença de Ni(II) pode indicar que sua presença possivelmente afete

a "disponibilidade" do Cu(II) em solução. Uma suposta hipótese para explicar este fato é ocorrer algum tipo de modificação na estruturação da solução aquosa dos íons. Essa hipótese, ainda sem confirmação experimental, é baseada nas mudanças observadas do comportamento cinético de cátions em solução, associadas com diferenças de interação com moléculas de água em solução (ROSSI & TUBINO, 1996 e ROSSI, DAVANZO, TUBINO, 1996).

A figura 40 ilustra os perfis de emissão obtidos e os desvios padrões das triplicatas das reações de luminol ($7,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) contendo (1) $7,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Cu(II) e (2) $7,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Cu(II) e $7,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de Ni(II) com solução de H_2O_2 na concentração de $0,134 \text{ mol L}^{-1}$.

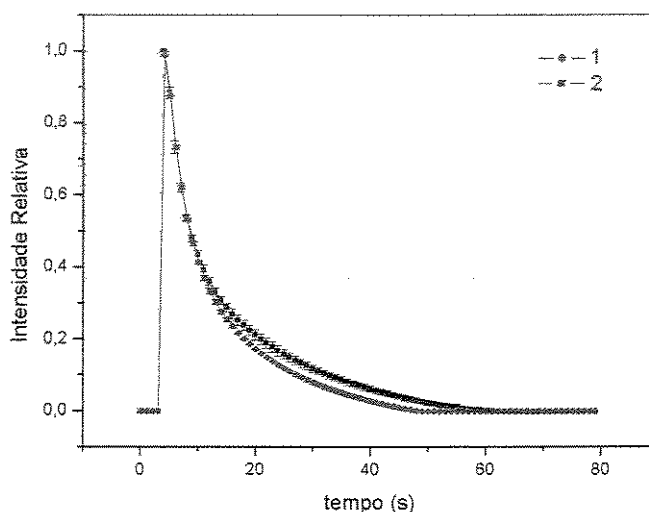


Figura 40. Perfis de emissão relativos obtidos pela reação do luminol ($7,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($0,134 \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 9,6$) com adição de (1) Cu(II) ($7,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e (2) Cu(II) ($7,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e Ni(II) ($7,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$. O monitoramento da luminescência foi realizado com o Sistema 1.

Avaliando-se os perfis de emissão, os dois padrões apresentaram uma diferença na D de 11 s e uma diferença de v_1 de 2%. A diferença de I_{max} não foi significativa entre os padrões.

7.3.3. Efeito Modificador de Agentes Redutores:

O efeito modificador de agentes redutores é possivelmente a inibição da reação quimiluminescente. Em vista de suas características, podem ser supostas três possíveis interações de agentes redutores com os reagentes da reação luminescente: a redução do

H_2O_2 , a redução do catalisador e a possível ação anti-radicalar aos intermediários radiculares do luminol. Os agentes redutores escolhidos para estudar este efeito inibidor foram ácido ascórbico e ácido úrico.

7.3.4. Inibição pelo Ácido Ascórbico:

O ácido ascórbico reage com o H_2O_2 por sua ação redutora, como ilustra a figura 41, diminuindo a concentração de H_2O_2 e, conseqüentemente, diminuindo a velocidade da reação. A diminuição da velocidade aumenta a duração da luminescência, pois favorece a etapa de formação do intermediário eletronicamente excitado (etapa III na figura 36).

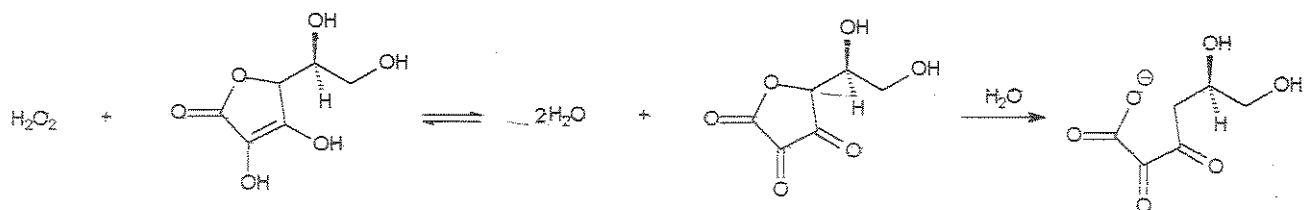


Figura 41. Proposta da reação do ácido ascórbico com o H_2O_2 .

Além de reduzir o H_2O_2 , o ácido ascórbico pode reagir também com Cu(II) levando-o a Cu(I) , o que diminui a concentração de diazoquinona (8) e, conseqüentemente, a velocidade da reação, conforme apresentado na figura 42.

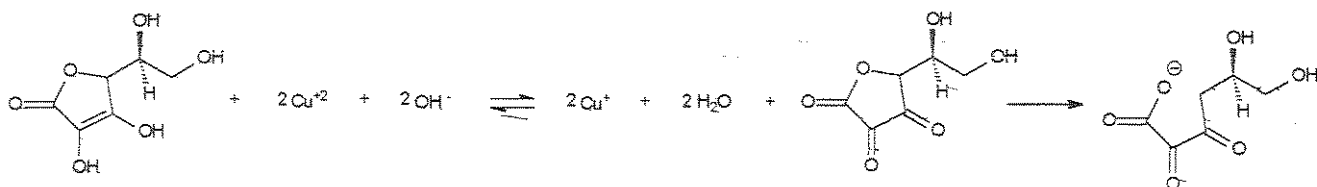


Figura 42. Proposta da reação do ácido ascórbico com o Cu(II) .

Por sua ação anti-radicalar, pode-se supor que o ácido ascórbico reage também com a diazoquinona (8), possivelmente em sua forma radicalar, como ilustrado na figura 43. As diminuições de concentração de diazoquinona e / ou de outros intermediários radiculares do luminol baixam a velocidade da reação e aumentam a duração da quimiluminescência.

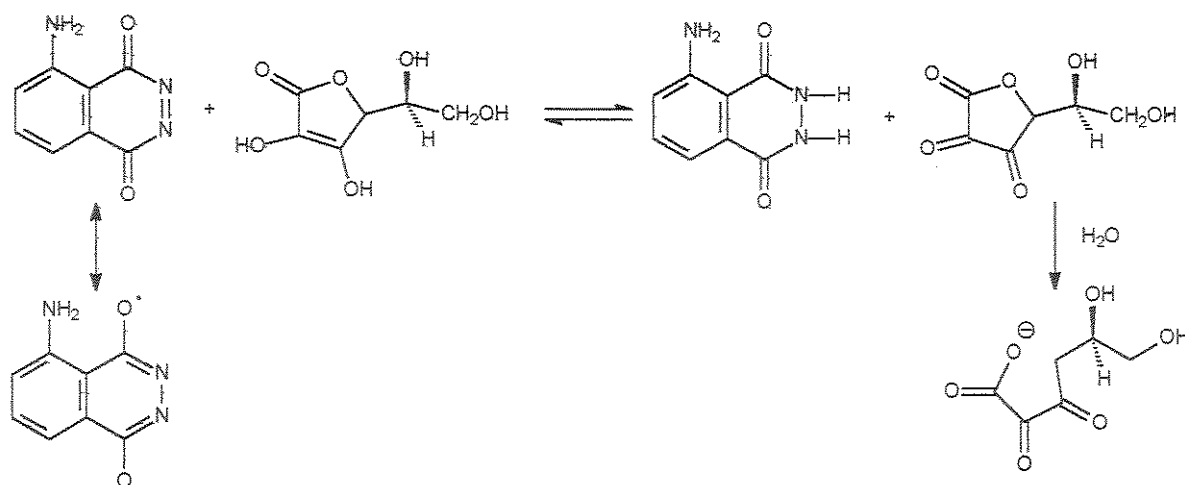


Figura 43. Proposta da reação do ácido ascórbico com os intermediários do luminol.

Avaliando-se a presença de ácido ascórbico na reação, verificou-se que a duração da luminescência aumentava como o aumento da concentração de ácido ascórbico, [AA]. Além disso, as soluções contendo maior [AA] apresentavam velocidades de reação menores. A figura 44 ilustra os perfis de emissão relativos das misturas, obtidos com o Sistema 1: (1) na ausência de ácido ascórbico, (2) com ácido ascórbico em concentração mais baixa, $8,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, e (3) e em concentração mais alta, $8,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

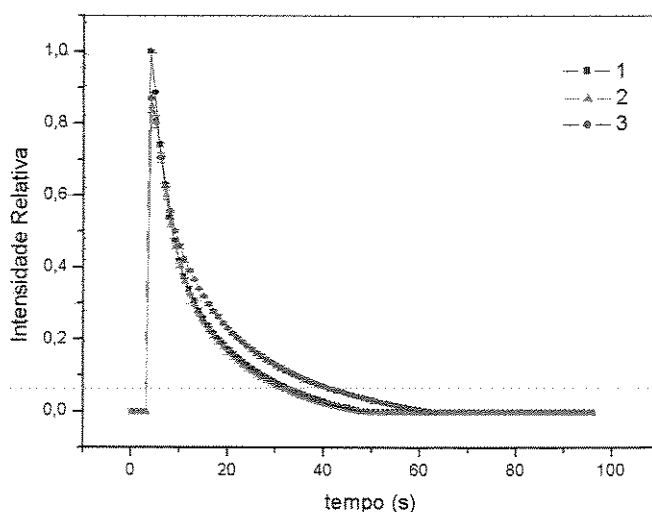


Figura 44. Perfis de emissão relativos obtidos pela reação do luminol ($7,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 9,6$) e em presença de Cu(II) ($7,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($0,134 \text{ mol L}^{-1}$) (1) sem adição de ácido ascórbico e com adição de ácido ascórbico nas concentrações de (2) $8,1 \times 10^{-5}$ e (3) $8,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$. O monitoramento da luminescência foi realizado com o Sistema 1.

As diferenças de duração das reações na presença de ácido ascórbico ($8,1 \times 10^{-5}$ e $8,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em relação à reação sem sua presença foram de 1 s e 16 s, respectivamente. As quedas em velocidade destes monitoramentos foram de 27% e 31%, respectivamente.

Dependendo do procedimento adotado e da forma de detecção, as informações registradas sobre a reação quimiluminescente podem levar a resultados diferentes. Por exemplo, as formas de preparação, de adição e de mistura dos reagentes e a forma de detecção da luminescência podem modificar o registro do sinal. Diferentes observações do fenômeno podem levar a conclusões diferentes sobre a participação de algumas espécies na reação (XIAO et al, 2000).

7.3.5. Inibição pelo Ácido Úrico:

A atuação do ácido úrico, e possivelmente, de outros agentes redutores pode ser análoga à ação inibidora do ácido ascórbico. Pode-se supor que este comportamento deve-se também à ação redutora e anti-radicalar do ácido úrico semelhantemente àquele apresentado pelo ácido ascórbico. Baseado em informações da literatura (VOET & VOET, 1995), apresentam-se as seguintes propostas para a ação do ácido úrico na reação luminescente.

Pela sua ação redutora, o ácido úrico reage com o H₂O₂ do sistema, como ilustra a figura 45. Consequentemente, diminui a velocidade da reação. A diminuição da velocidade aumenta a duração de luminescência, pois favorece a etapa de formação do intermediário eletronicamente excitado (etapa III na figura 36).

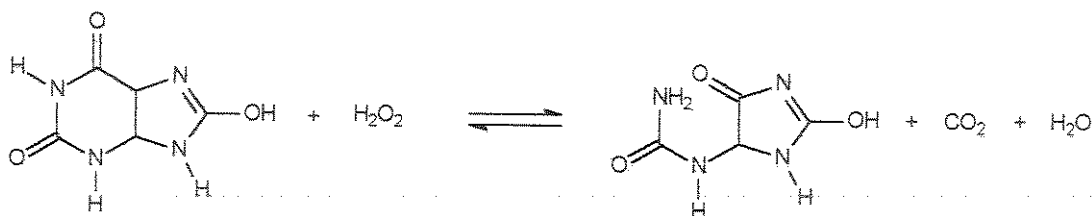


Figura 45. Proposta da reação do ácido úrico com o H₂O₂.

Além do H₂O₂, o ácido úrico pode reagir também com Cu(II) levando-o a Cu(I), diminuindo a concentração do catalisador e a velocidade da reação (conforme apresentado na figura 46).

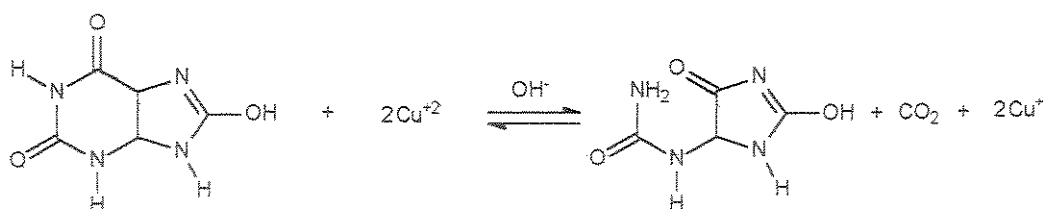


Figura 46. Proposta da reação do ácido úrico com o Cu(II).

Pela sua ação anti-radicalar, o ácido úrico reage com a diazoquinona (8) formada na etapa I da figura 36, diminuindo a velocidade da reação, aumentando a duração da luminescência e diminuindo a intensidade máxima dos monitoramentos.

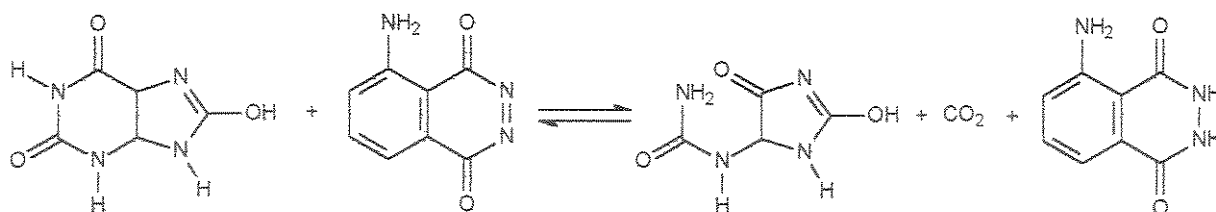


Figura 47. Proposta da reação do ácido úrico com os intermediários do luminol.

Avaliando-se a presença de ácido úrico na reação, verificou-se que a duração da luminescência aumentava como o aumento da concentração de ácido úrico, [AU]. As soluções contendo maior [AU] apresentavam velocidades de reação menores.

Além disso, com o ácido úrico, foi observado um comportamento diferente dos perfis de emissão na presença de ácido ascórbico. Os perfis obtidos dos padrões com maior concentração de ácido úrico apresentaram dois máximos de intensidade de emissão. A figura 48 ilustra os perfis de emissão obtidos (1) na ausência de ácido úrico, (2) com ácido úrico em concentração mais baixa, $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, e (3) e em concentração mais alta, $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

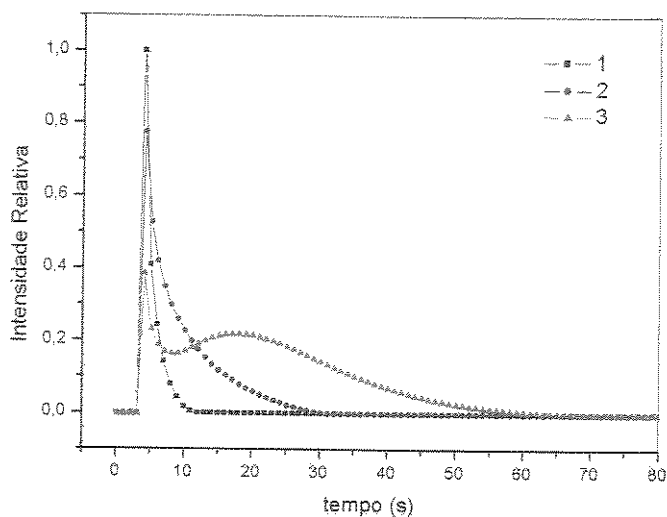


Figura 48. Perfis de emissão relativos obtidos pela reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 10,6$) e em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) (1) sem adição de ácido úrico e com adição de ácido úrico nas concentrações de (2) $5,0 \times 10^{-5}$ e (3) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$. O monitoramento da luminescência foi realizado com o Sistema 1.

As diferenças de duração são de 19 s e 44 s e as diferenças de velocidade de decaimento de emissão são de 65% e 99% entre as reações na ausência de ácido úrico e os padrões de ácido úrico com concentração menor e maior, respectivamente.

A obtenção de dois máximos nos perfis de emissão na presença de ácido úrico provavelmente decorre do O_2 formado na decomposição de H_2O_2 por reações paralelas à reação quimiluminescente.

A reação de oxidação do luminol pelo O_2 , possivelmente, ocorre no início da luminescência, já que para os padrões de maior concentração de ácido úrico, $[\text{AU}]$, o primeiro máximo diminuía e a duração aumentava. Isto pode indicar que o primeiro máximo de emissão é realmente devido à presença de O_2 , uma vez que aumentando sua concentração, ou seja, aumentando a decomposição do H_2O_2 pela maior $[\text{AU}]$, aumenta-se a velocidade de reação, diminuindo a duração do primeiro máximo.

A formação de O_2 no meio depende da concentração do agente redutor. Este comportamento depende da velocidade de reação deste redutor com o H_2O_2 . Assim, para reações na presença de ácido ascórbico, este comportamento é esperado para concentrações maiores.

A figura 49 apresenta os perfis de emissão de padrões de ácido úrico nas concentrações de (1) $5,0 \times 10^{-5}$, (2) $1,0 \times 10^{-4}$ e (3) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para ilustrar o aumento da duração e o aumento da velocidade de decaimento de emissão do máximo relacionado com a presença de O_2 .

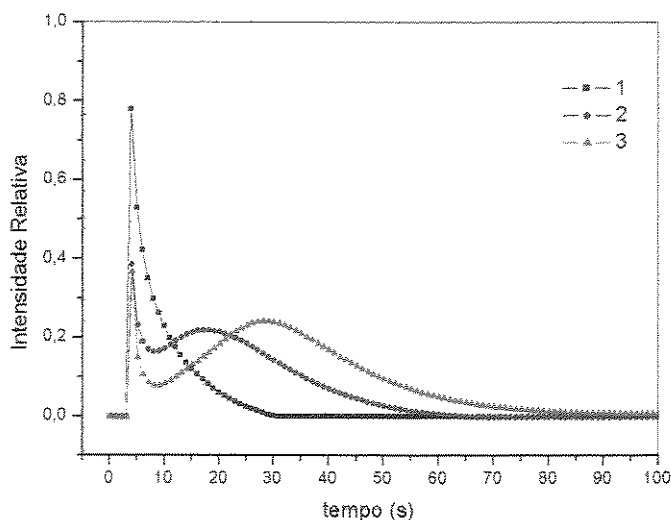


Figura 49. Perfis de emissão relativos obtidos pela reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 10,6$) e em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) com adição de ácido úrico nas concentrações de (1) $5,0 \times 10^{-5}$, (2) $1,0 \times 10^{-4}$ e (3) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$. Os monitoramentos da luminescência foram realizados com o Sistema 1.

Os sistemas de detecção e a forma de adição e mistura de reagentes utilizados não proporcionam condições para detectar o O_2 normalmente dissolvido em meio aquoso. Somente quando há um excesso de O_2 dissolvido no meio, proveniente da decomposição do H_2O_2 , há o registro de dois máximos de emissão, como foi apresentado na figura 49. Já em técnicas de adição contínua de reagentes e técnica de fluxo interrompido, a quimiluminescência da reação do O_2 normalmente dissolvido com luminol pode ser detectada pela diferente forma de mistura dos reagentes (CEPAS, SILVA, PÉREZ-BENDITO, 1994).

O efeito inibidor do ácido úrico é mais significativo que o efeito inibidor do ácido ascórbico. A figura 50 ilustra os efeitos inibidores dos dois agentes redutores na mesma concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

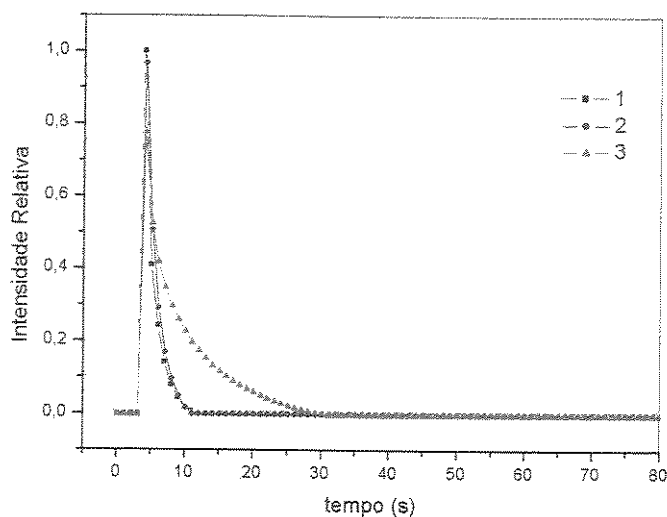


Figura 50. Perfis de emissão relativos obtidos pela reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 10,6$) e em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) (1) sem adição de agente redutor, (2) com adição de ácido ascórbico na concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (3) com adição de ácido úrico na concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$. O monitoramento da luminescência foi realizado com o Sistema 1.

As diferenças de duração são de 1 s e 19 s e as diferenças de velocidade de decaimento são de 50% e 65% entre as reações na ausência de ácido úrico e os padrões de ácido ascórbico e ácido úrico, respectivamente.

7.4. Avaliação do Efeito do pH e da Composição do Tampão:

A reação quimiluminescente do luminol deve ser realizada em meio alcalino devido à solubilidade do luminol. Além disso, a concentração de OH^- pode modificar a velocidade da reação, pois participa do mecanismo nas etapas I e II da figura 36. Dependendo das condições de monitoramento, a quimiluminescência pode ser detectada entre pH 8 e 12 (ROBARDS, WORSFOLD, 1992, CI et al^a, 1993, CEPAS, SILVA, PÉREZ-BENDITO, 1994, CARRETERO et al, 2000 e XIAO et al, 2000).

Neste trabalho, os monitoramentos foram realizados com pH entre 9,6 a 11,0. Comparando-se os perfis de emissão obtidos, verificou-se que o aumento no valor de pH levava ao aumento da velocidade de reação. Este comportamento era esperado já que a concentração de OH^- aumenta a velocidade de acordo com a equação 30. Porém, o aumento na velocidade da reação diminui a duração da luminescência e pode tornar inviável o monitoramento devido ao pequeno número de pontos registrados.

A composição dos tampões utilizados também varia dependendo das condições de monitoramento. Os principais tampões utilizados foram tampão carbonato (CEPAS, SILVA, PÉREZ-BENDITO, 1994, ALBERTIN et al, 1998, WHEATLEY, SARIAHMETOGLU, ÇAKICI, 2000, CARRETERO et al, 2000 e XIAO et al, 2000), $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ (CI et al ^a, 1993, LI, LI, TONG, 1999), $\text{NH}_3 - \text{NH}_4^+$ (PALAROAN, BERGATIN JR., SEVILLA III, 2000 e XIAO et al, 2000) e tampão de Carmody (KAMIDATE, TANI, WATANABE, 1998) , dentre outros.

Neste trabalho, foram testadas duas composições de tampão: tampão carbonato e o tampão borato (ASSUMPÇÃO & MORITA, 1968). Porém, nas reações em tampão borato, não se observou a luminescência. Segundo XIAO e colaboradores (XIAO et al, 2000), os íons CO_3^{2-} participam do mecanismo da reação, aumentando a probabilidade de ocorrer a luminescência. Por isso, nas mesmas condições, o tampão borato não seria eficaz para a produção da luminescência.

CAPÍTULO 8:

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MONITORAMENTO COM O SISTEMA 1

A partir dos estudos de ALBERTIN e colaboradores (ALBERTIN et al, 1998), foram encontradas condições iniciais de monitoramento para realizar os estudos sobre os efeitos dos modificadores. Para aperfeiçoar o método proposto para determinação de agentes redutores, foi necessário encontrar condições otimizadas realizando estudos univariados das concentrações das principais espécies envolvidas na reação quimiluminescente.

Assim, foram realizados novos experimentos de otimização das concentrações das espécies envolvidas para o desenvolvimento do método cinético para determinação dos agentes redutores estudados. Nestes experimentos, foram abordados os efeitos da luminescência pela variação da concentração de H_2O_2 , da concentração de luminol, [LN], da concentração de Cu(II) e da concentração de carbonatos.

Os experimentos foram realizados utilizando os dois sistemas de detecção. O Sistema 1 é apresentado neste capítulo e o Sistema 2 será apresentado no capítulo 9.

Para estabelecer as concentrações otimizadas, alguns parâmetros como a intensidade máxima obtida, I_{max} , a duração de luminescência, D , e a velocidade da reação, $-\tan \alpha$, calculada pela tangente em alguns intervalos de tempo, foram relacionados com as concentrações das espécies estudadas. Estas relações foram avaliadas a fim de se encontrarem faixas de concentração com variações lineares dos parâmetros, uma vez que o método analítico proposto é indireto, ou seja, envolve as concentrações das espécies envolvidas na quimiluminescência.

8.1. Efeito da Variação da Concentração de H_2O_2 :

Realizaram-se estudos relacionando a concentração de H_2O_2 , $[\text{H}_2\text{O}_2]$, com a luminescência na faixa de $8,9 \times 10^{-3}$ a $8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando-se o Sistema 1.

Segundo a relação encontrada entre as espécies envolvidas e o sinal analítico pela equação 30, a velocidade de decaimento da luminescência é diretamente proporcional à $[\text{H}_2\text{O}_2]$. Sendo assim, deve-se esperar que o aumento de $[\text{H}_2\text{O}_2]$ diminua a duração da luminescência e aumente a velocidade de decaimento da luminescência.

Os resultados obtidos pelo monitoramento da luminescência variando-se a $[\text{H}_2\text{O}_2]$ mostraram o esperado. O aumento na $[\text{H}_2\text{O}_2]$ diminuiu a duração e aumentou a velocidade de decaimento, como ilustrado nos perfis de emissão monitorados pelo Sistema 1 apresentados na figura 51.

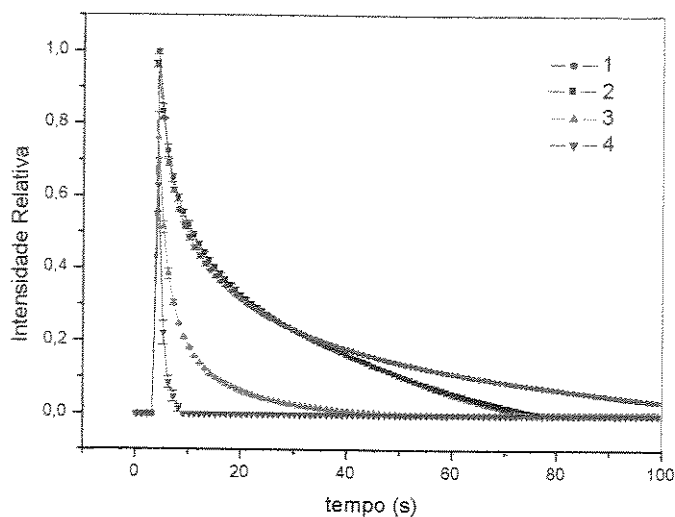


Figura 51. Perfis médios de emissão da reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($\text{pH}=10,46$ e $[\text{CO}_3^{2-}]=0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com diferentes padrões de H_2O_2 (mol L^{-1}): (1) $8,9 \times 10^{-3}$; (2) $1,3 \times 10^{-2}$; (3) $4,4 \times 10^{-2}$; e (4) $8,9 \times 10^{-2}$. $T=25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com sistema 1.

O primeiro aspecto a ser avaliado foi a I_{max} . Verificou-se que à medida que $[\text{H}_2\text{O}_2]$ aumenta, ocorre a diminuição da intensidade registrada, como ilustrado na figura 52 A.

Da mesma forma, a duração da luminescência, D , foi avaliada com a variação de $[\text{H}_2\text{O}_2]$. Verificou-se que o comportamento esperado foi observado, ou seja, o aumento de $[\text{H}_2\text{O}_2]$ diminui D , como ilustrado na figura 52 B.

A velocidade da reação ou tangente entre 4 a 8 s, - $\tan \alpha$, foi relacionada com $[\text{H}_2\text{O}_2]$, como ilustra a figura 52 C. Possivelmente, os pontos obtidos indicam que a partir de $1,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a equação 30 é obedecida, ou seja, o aumento de $[\text{H}_2\text{O}_2]$ aumenta a velocidade da quimiluminescência.

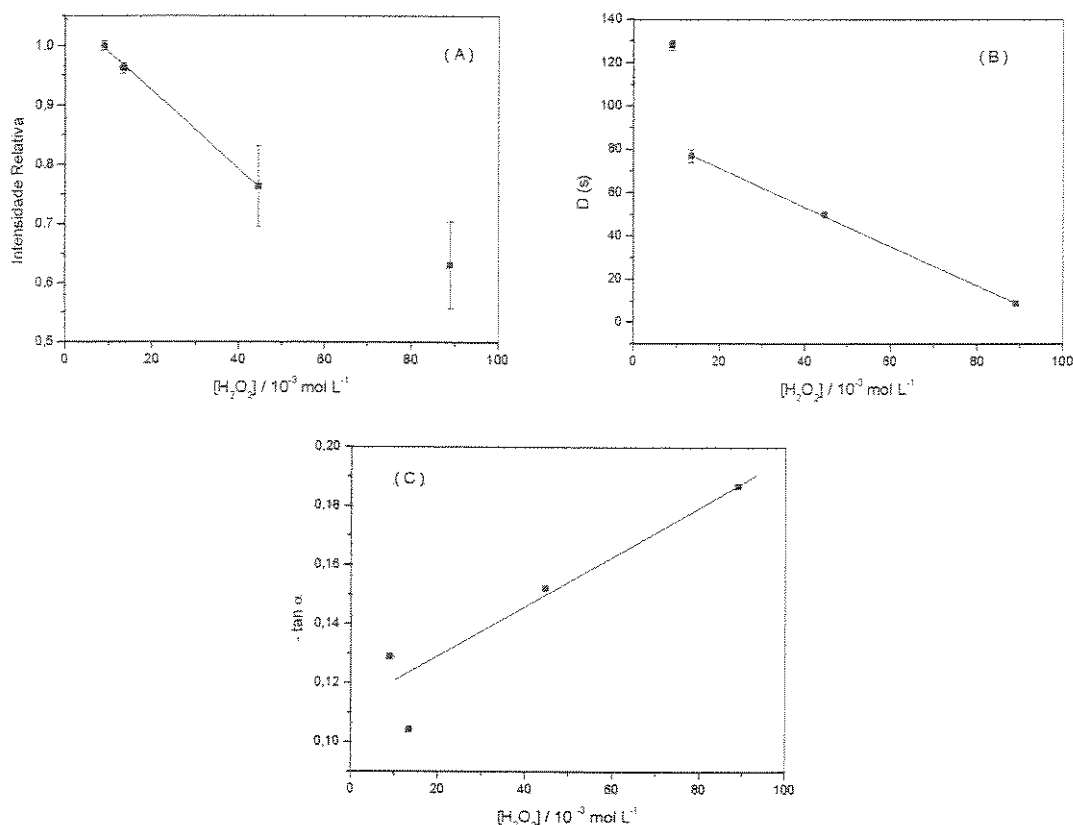


Figura 52. (A) Variação da $I_{\max}$ e a $[H_2O_2]$; (B) Variação de D com a $[H_2O_2]$; (C) Variação da tangente entre 4 a 8 s com a $[H_2O_2]$; obtidas pela reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($\text{pH}=10,46$ e $[\text{CO}_3^{2-}]=0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($T=25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$). Dados obtidos com Sistema 1.

A partir destes dados, verificou-se tendência linear entre os pontos obtidos na faixa de $8,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para todos os parâmetros avaliados. Descartando-se a concentração menor de H_2O_2 , cuja D é maior que 2 min, a concentração otimizada estaria entre $4,4 \times 10^{-2}$ a $8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Assim, as concentrações de $4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e de $8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foram utilizadas para os estudos de otimização e avaliação da potencialidade analítica da técnica para determinar agentes redutores com o Sistema 1.

8.2. Efeito da Variação da Concentração de Luminol:

Segundo a equação 30 proposta, a luminescência é diretamente proporcional à concentração de luminol, $[\text{LN}]$. Espera-se, então, que o aumento da $[\text{LN}]$ aumente a velocidade de decaimento e diminua a duração da luminescência, D . Porém, D está condicionada ao número de moléculas excitadas produzidas pela reação e o aumento na $[\text{LN}]$ aumenta a quantidade de luminol disponível para a reação quimiluminescente. Por

isso, ao contrário do H_2O_2 , espera-se que o aumento de $[\text{LN}]$ aumente a duração da luminescência. A faixa de $[\text{LN}]$ de trabalho escolhida foi de $1,0 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 53 e mostram o efeito esperado na luminescência pela variação de $[\text{LN}]$.

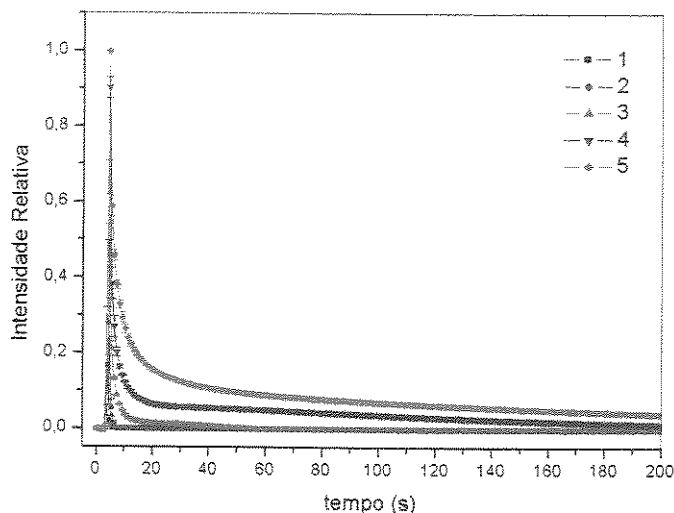


Figura 53. Perfis relativos da reação de luminol em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($\text{pH} = 10,48$, $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) variando a $[\text{LN}]$ (mol L^{-1}): (1) 1×10^{-3} ; (2) $2,0 \times 10^{-3}$; (3) $4,0 \times 10^{-3}$; (4) $6,0 \times 10^{-3}$; e (5) $1,0 \times 10^{-2}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 1.

Verificou-se que o aumento em $[\text{LN}]$ resulta no aumento da I_{max} , como ilustra a figura 54 A.

Avaliando-se D em relação com $[\text{LN}]$, verificou-se que o aumento de $[\text{LN}]$ aumentou a D registrada, como ilustra a figura 54 B.

Avaliando-se o efeito de $[\text{LN}]$ na velocidade do decaimento, $-\tan \alpha$, observou-se que há um aumento na velocidade com o aumento de $[\text{LN}]$, como ilustra a figura 54 C.

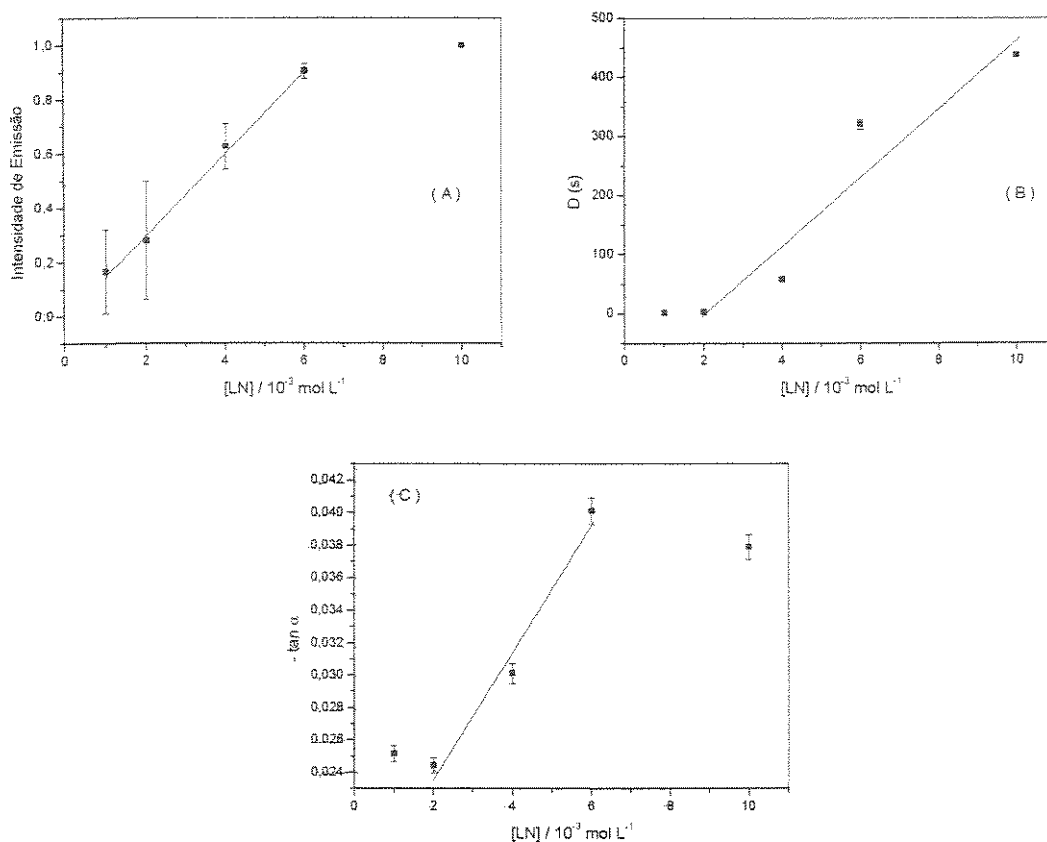


Figura 54. (A) Variação da $I_{\max}$ com a $[LN]$; (B) Variação de D com a $[LN]$; (C) Variação da velocidade de decaimento com a $[LN]$; a partir dos perfis relativos de emissão da reação de luminol em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($\text{pH} = 10,48$, $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 1.

Os resultados obtidos indicaram sempre tendências lineares entre os pontos obtidos na faixa de $2,0 \times 10^{-3}$ a $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para todos os parâmetros estudados. Optou-se por se fixar a concentração de luminol em $2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para os próximos estudos, uma vez que esta concentração já estava sendo utilizada.

8.3. Efeito da Variação da Concentração de Cu(II) :

O efeito da variação da concentração de Cu(II) , $[\text{Cu(II)}]$, na luminescência também é previsto pela equação 30 pelo valor M agrupado na constante aparente, k_{APARENTE} . Segundo esta relação, $[\text{Cu(II)}]$ é diretamente proporcional à velocidade de decaimento da emissão ou ao sinal analítico S . Por isso, espera-se que o aumento em $[\text{Cu(II)}]$ aumente a

velocidade de decaimento e diminua D . A faixa de $[\text{Cu(II)}]$ de trabalho escolhida foi de $7,0 \times 10^{-5}$ a $7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Os perfis de emissão relativos monitorados pelo Sistema 1 estão apresentados na figura 55.

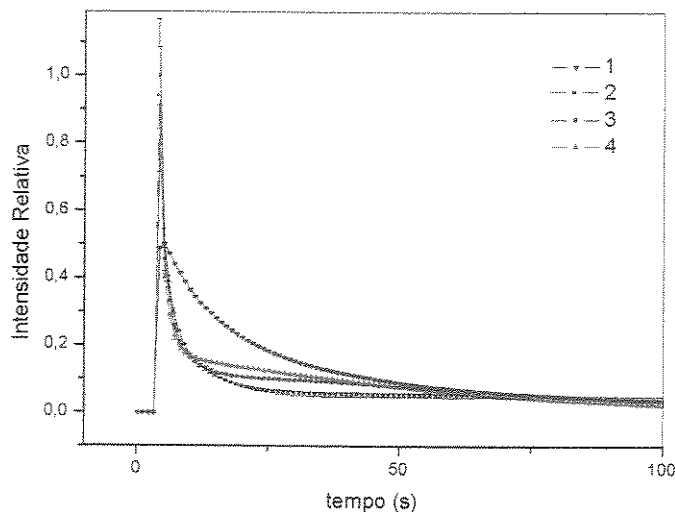


Figura 55. Perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) e em tampão carbonato ($\text{pH} = 10,48$, $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) variando a $[\text{Cu(II)}]$ (mol L^{-1}): (1) $7,0 \times 10^{-5}$; (2) $1,8 \times 10^{-4}$; (3) $3,5 \times 10^{-4}$; e (4) $7,0 \times 10^{-4}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 1.

Relacionando-se I_{max} com a variação de $[\text{Cu(II)}]$, verificou-se que o aumento de $[\text{Cu(II)}]$ leva ao aumento de I_{max} até a concentração de $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, como ilustrado na figura 56 A.

O aumento de $[\text{Cu(II)}]$ diminui D , como esperado e ilustrado na figura 56 B.

Avaliando-se a velocidade de decaimento com $[\text{Cu(II)}]$, verificou-se que o aumento de $[\text{Cu(II)}]$ leva a um grande aumento na velocidade até a concentração de $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, como ilustrado na figura 56 C.

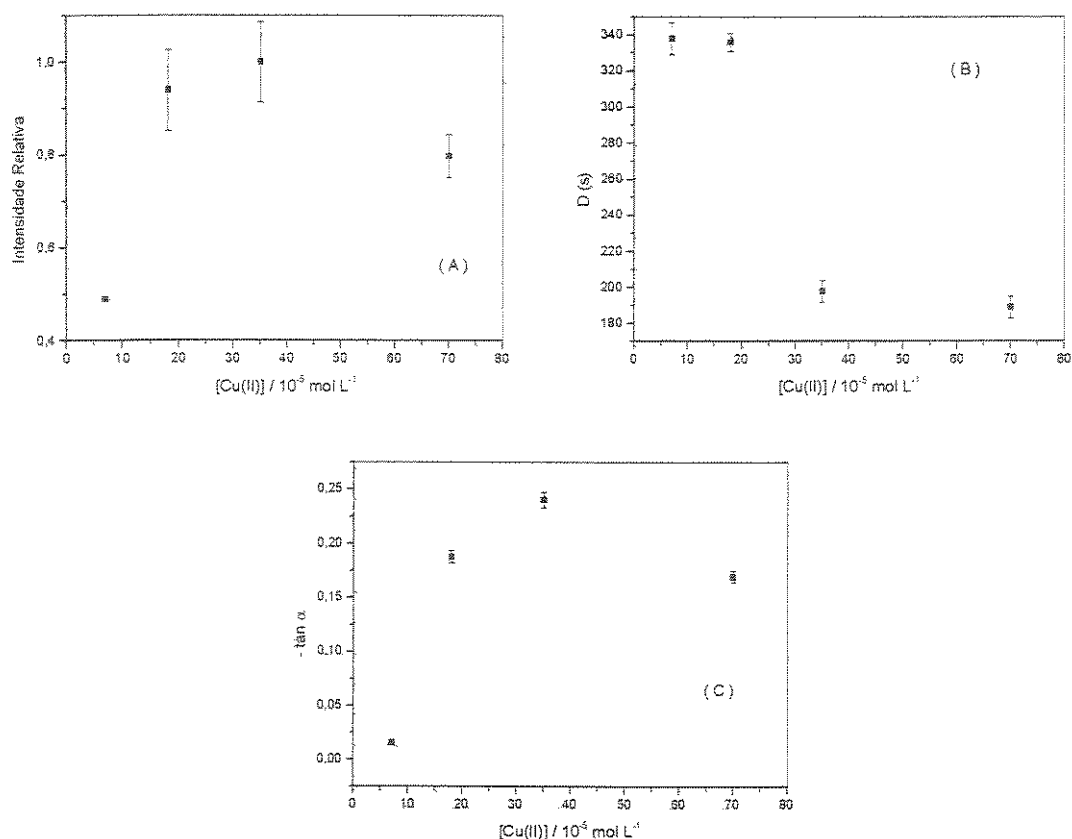


Figura 56. (A) Variação da $I_{\max}$ com a $[Cu(II)]$; (B) Variação de D com a $[Cu(II)]$; (C) Variação de tangente inicial com a $[Cu(II)]$; obtidas a partir dos perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de $Cu(II)$ e em tampão carbonato ($pH = 10,48$, $[CO_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). $T = 25,0 \pm 0,1^\circ C$. Dados obtidos com Sistema 1.

Avaliando-se os resultados obtidos, verificou-se que o modelo proposto é obedecido até a concentração de $Cu(II)$ de $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ou seja, a velocidade da reação aumenta até este limite. Embora, os parâmetros cinéticos não evidenciem tendências lineares com a variação de $[Cu(II)]$, a concentração otimizada deve estar na faixa de $7,0 \times 10^{-5}$ a $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Optou-se por se fixar a concentração de $Cu(II)$ em $1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

8.4. Efeito da Variação da Concentração de Carbonato no tampão:

Uma das espécies cujo efeito na velocidade da reação ainda não tinha sido estudado era o carbonato. Segundo XIAO e colaboradores (XIAO et al, 2000), sua presença aumenta a probabilidade de ocorrer a luminescência, pois participa do mecanismo da reação e aumenta a quantidade formada de radicais do luminol. Além

disso, na tentativa de mudar o tampão carbonato por borato, mais usualmente utilizado, a luminescência não foi observada, o que indicou que CO_3^{2-} é uma das espécies envolvidas no processo que gera a luminescência. Portanto, foram realizados experimentos para encontrar uma concentração adequada de carbonato. A faixa de concentração de CO_3^{2-} , $[\text{CO}_3^{2-}]$, escolhida foi de $9,0 \times 10^{-2}$ a $1,1 \text{ mol L}^{-1}$. Alguns perfis de emissão relativos monitorados pelo Sistema 1 estão apresentados na figura 57.

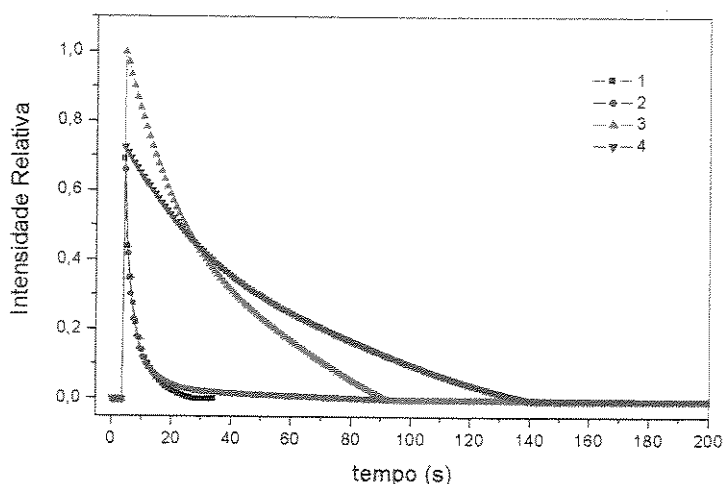


Figura 57. Perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($\text{pH} = 10,40$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) variando a $[\text{CO}_3^{2-}]$ (mol L^{-1}): (1) $9,0 \times 10^{-2}$; (2) 0,2; (3) 0,7; e (4) 1,1. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 1.

Avaliando-se I_{max} registrada com a variação de $[\text{CO}_3^{2-}]$, verificou-se que de 0,2 até $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ existe um grande aumento de I_{max} , como ilustra a figura 58 A.

O aumento de $[\text{CO}_3^{2-}]$ leva ao aumento de D , conforme o esperado e ilustrado na figura 58 B.

Porém, a velocidade de decaimento diminui com o aumento em $[\text{CO}_3^{2-}]$ a partir da concentração $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (conforme a figura 58 C), possivelmente devido à essa concentração superar a concentração de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Os íons carbonato podem começar a interferir na reação entre os radicais $^{\circ}\text{OH}$ com os radicais de luminol que formam os intermediários responsáveis pela quimiluminescência.

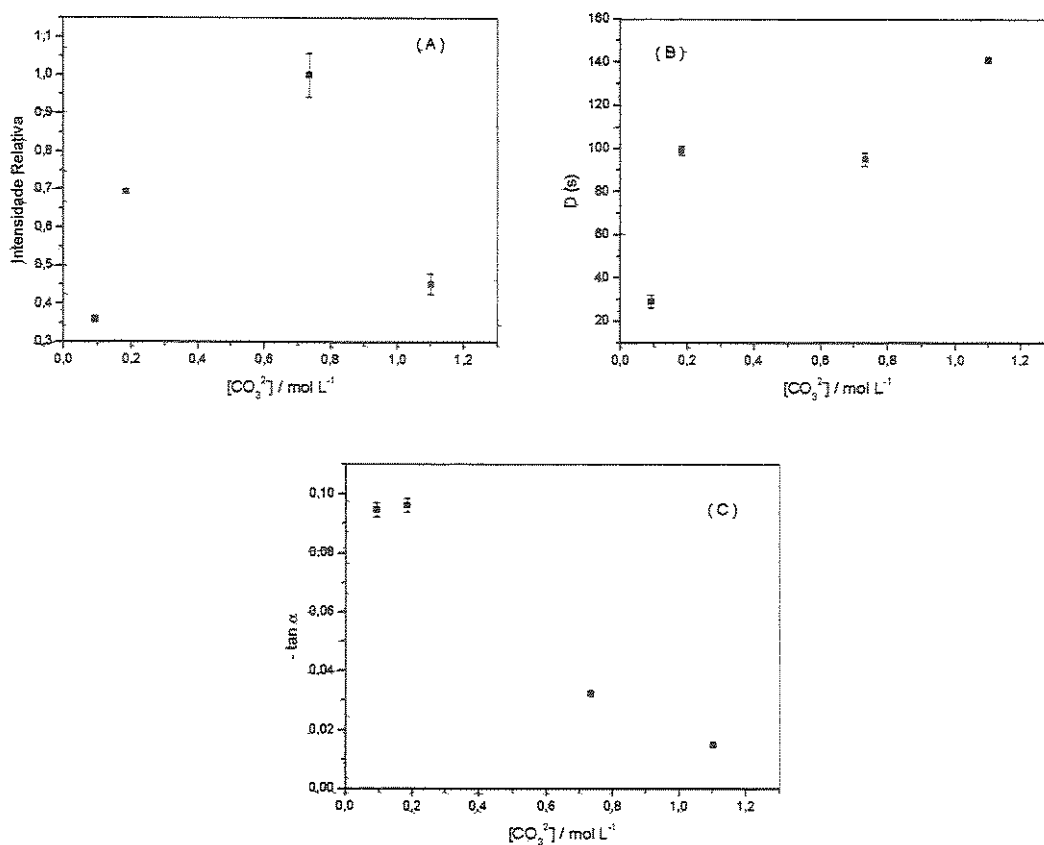


Figura 58. (A) Variação de $I_{\max}$ com a $[\text{CO}_3^{2-}]$; (B) Variação de D com a $[\text{CO}_3^{2-}]$; (C) Variação da tangente inicial com a $[\text{CO}_3^{2-}]$; obtidas a partir dos perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($\text{pH} = 10,40$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 1.

Os resultados obtidos pelas relações entre os parâmetros com $[\text{CO}_3^{2-}]$ não evidenciam tendências lineares. Porém, notou-se que a concentração $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ apresentou a melhor relação entre D e $-\tan \alpha$, ou seja, mesmo não apresentando a maior $I_{\max}$, apresentou D menor que 2 min e o maior $-\tan \alpha$. Por isso, optou-se por se fixar a concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de CO_3^{2-} para monitorar a reação quimiluminescente com o Sistema 1.

CAPÍTULO 9:

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MONITORAMENTO COM O SISTEMA 2

Analogamente aos experimentos de otimização do Sistema 1, foram realizados monitoramentos da reação quimiluminescente com o Sistema 2, visando otimizar as concentrações dos reagentes, H_2O_2 , luminol, Cu(II) e CO_3^{2-} , para desenvolver um método analítico para determinação de agentes redutores. As faixas de concentração estudadas por este sistema de detecção foram iguais às avaliadas pelo Sistema 1, apresentadas no último capítulo. Algumas características do Sistema 2, como a possibilidade de seleção o comprimento de onda para as medidas e a voltagem aplicada na fotomultiplicadora foram estudadas e apresentadas nos capítulo 6. Este estudo indicou 420 nm como comprimento de onda de emissão máxima, λ_e , que passou a ser usado nas medidas, com 600 V aplicados na fotomultiplicadora, V_{foto} .

Como para o Sistema 1, a variação da quimiluminescência com as concentrações dos reagentes foi avaliada de acordo com os parâmetros de I_{max} , D e velocidade da quimiluminescência, $-\tan \alpha$, calculada pelo valor da tangente no intervalo de 0,300 s a 0,931 s.

9.1. Efeito da Variação da Concentração de H_2O_2 :

Pelo monitoramento anterior, verificou-se que a velocidade de decaimento da quimiluminescência aumenta com o aumento da $[\text{H}_2\text{O}_2]$. Utilizando o Sistema 2, foram realizados experimentos para otimizar a $[\text{H}_2\text{O}_2]$ na faixa de $8,9 \times 10^{-3}$ a $8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Os perfis de emissão relativos obtidos estão apresentados na figura 59.

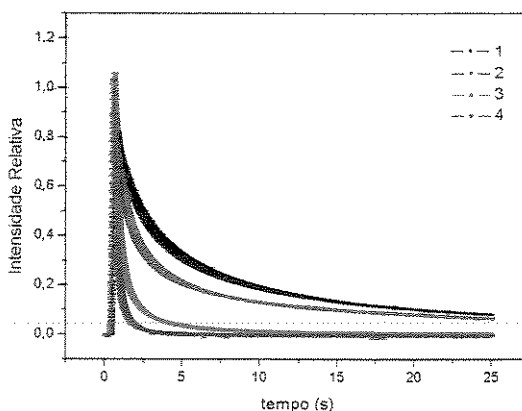


Figura 59. Perfis médios de emissão da reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($\text{pH}=10,46$ e $[\text{CO}_3^{2-}]=0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com diferentes padrões de H_2O_2 (mol L^{-1}): (1) $8,9 \times 10^{-3}$; (2) $1,3 \times 10^{-2}$; (3) $4,4 \times 10^{-2}$; e (4) $8,9 \times 10^{-2}$. $T=25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e=420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}}=600 \text{ V}$).

Diferente aos resultados do Sistema 1, notou-se que, na faixa de $8,9 \times 10^{-3}$ a $4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, o aumento em $[\text{H}_2\text{O}_2]$ levava ao aumento de I_{max} , como ilustrado na figura 60 A.

Essa diferença na relação de $[H_2O_2]$ com I_{max} pode estar ligada à velocidade de resposta dos dois sistemas. O Sistema 1 apresenta um intervalo de leituras de 1 s enquanto o Sistema 2 apresenta um intervalo bem menor, cerca de 6 ms. Pode-se supor que a velocidade de resposta do Sistema 1 não permite registrar o máximo de emissão. Já o Sistema 2, com maior velocidade de resposta, possibilita registrar os instantes iniciais da luminescência e por isso a relação obtida é diferente da obtida pelo Sistema 1.

A duração da luminescência apresentou o comportamento similar ao apresentado no Sistema 1, como ilustra a figura 60 B. A diferença de velocidade de resposta dos dois sistemas não afeta o valor de D registrada, uma vez que esta dura mais do que 1 s.

Os pontos da figura 60 B representam o tempo no qual o perfil de emissão atinge a intensidade relativa de 0,08 unidades. Este procedimento foi necessário pois alguns perfis de emissão ultrapassaram o intervalo de medidas de 25 s.

A relação entre a velocidade ou a tangente entre 0,300 e 0,931 s com $[H_2O_2]$ está ilustrada na figura 60 C. Há um aumento da velocidade de decaimento da intensidade com o aumento de $[H_2O_2]$, análogo aos resultados com o Sistema 1.

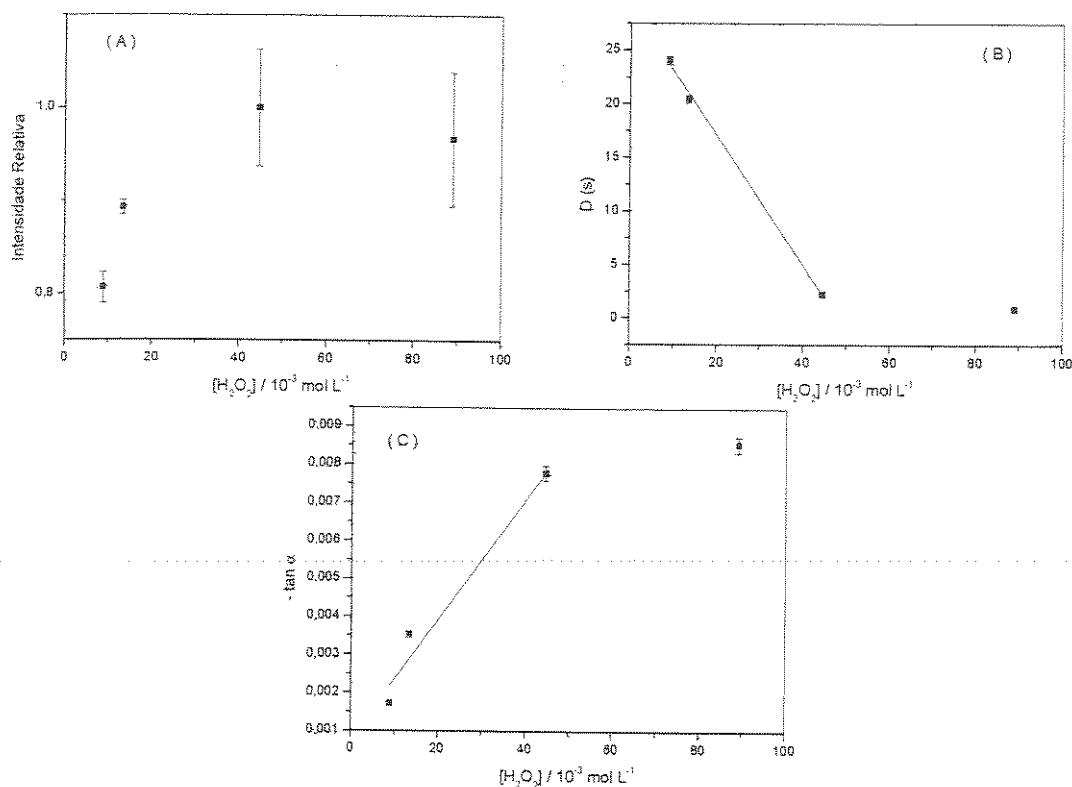


Figura 60. (A) Variação entre I_{max} obtida e a $[H_2O_2]$; (B) Variação entre D ($I=0,08$ unidades relativas) e a $[H_2O_2]$; (C) Variação da tangente entre 0,300 a 0,931 s e a $[H_2O_2]$; obtidas pelos perfis de emissão da reação do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de $Cu(II)$ ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão carbonato ($pH=10,46$ e $[CO_3^{2-}]=0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($T=25,0 \pm 0,1^\circ C$). Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_a = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{foto} = 600 \text{ V}$).

As relações entre D e $-\tan \alpha$ e $[H_2O_2]$ apresentaram tendências lineares entre as concentrações de $8,9 \times 10^{-3}$ e $4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Por outro lado, a relação entre $I_{\max}$ e $[H_2O_2]$ não evidencia uma linearidade entre os pontos. Seguindo o mesmo raciocínio da otimização para o Sistema 1, $[H_2O_2]$ escolhida para o Sistema 2 foi de $4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em função da duração de emissão e pela maior intensidade de luminescência.

9.2. Efeito da Variação da Concentração de Luminol:

Analogamente aos resultados obtidos com o Sistema 1, o efeito da variação da $[LN]$ na quimiluminescência é o aumento da velocidade de decaimento e o aumento da duração da luminescência. Os perfis relativos dos monitoramentos com este sistema estão ilustrados na figura 61.

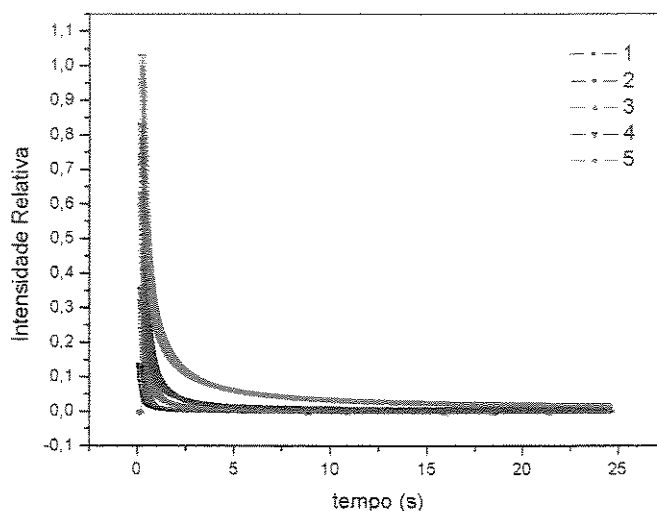


Figura 61. Perfis relativos de emissão da reação de luminol em presença de $Cu(II)$ e em tampão carbonato ($pH = 10,48$, $[CO_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) variando a $[LN]$ (mol L^{-1}): (1) 1×10^{-3} ; (2) $2,0 \times 10^{-3}$; (3) $4,0 \times 10^{-3}$; (4) $6,0 \times 10^{-3}$; e (5) $1,0 \times 10^{-2}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ C$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$).

O aumento em $[LN]$ levou ao aumento de $I_{\max}$, como ilustra a figura 62 A. Este comportamento, também observado com o Sistema 1, é esperado porque o aumento em $[LN]$ aumenta a probabilidade de ocorrer a luminescência. Isto também explica o aumento da duração de emissão com o aumento de $[LN]$, como ilustrado na figura 62 B. A duração foi considerada como intervalo gasto para os perfis de emissão atingirem 0,02 unidades de intensidade de emissão.

O aumento de $[LN]$ também aumenta a velocidade de decaimento. Este comportamento foi descrito pela equação 30 proposta, a qual relaciona diretamente $[LN]$ com S , e está ilustrado na figura 62 C.

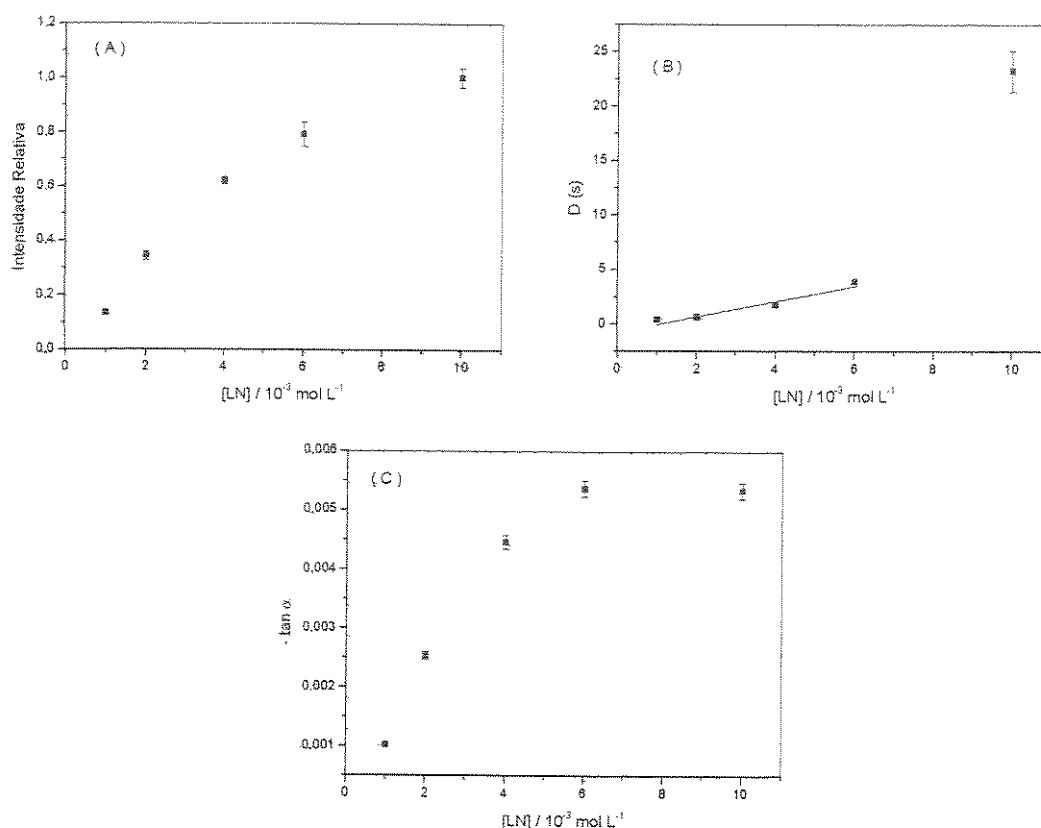


Figura 62. (A) Variação de $I_{\max}$ com $[LN]$; (B) variação de D ($I=0.02$ unidades relativas) com $[LN]$; (C) variação da tangente entre 0,300 e 0,931 s; a partir dos perfis relativos de emissão da reação de luminol em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($\text{pH} = 10,48$, $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$).

Analogamente aos resultados obtidos pelo Sistema 1, estes resultados mostraram que $[LN]$ otimizada está entre $2,0 \times 10^{-3}$ e $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pois nesta faixa de concentração a relação entre os parâmetros estudados e a $[LN]$ é crescente. Assim, optou-se por manter a concentração de $2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para os estudos subsequentes.

9.3. Efeito da Variação da Concentração de Cu(II) :

O cátion Cu(II) exerce um efeito catalítico sobre a reação de oxidação do luminol. Assim, é de esperar que o aumento de sua concentração aumente a velocidade da reação. Utilizando o Sistema 1 como forma de detecção, o efeito da presença de Cu(II) na

equação 30 proposta foi confirmada. Para o Sistema 2, foram avaliados os mesmos critérios obtendo resultados semelhantes. Os perfis de emissão relativos estão apresentados na figura 63. Os comportamentos de $I_{\max}$, de D e de $-\tan \alpha$ em função da concentração de Cu(II) são ilustrados na figura 64 e são também similares aos obtidos com o Sistema 1.

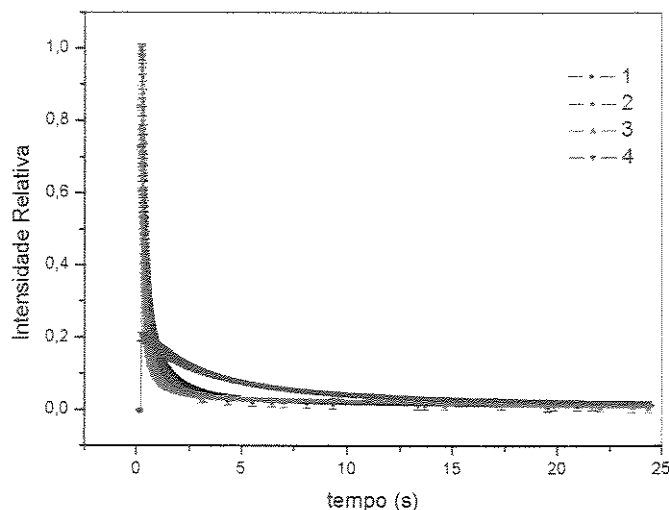


Figura 63. Perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) e em tampão carbonato ($\text{pH} = 10,48$, $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) variando a $[\text{Cu(II)}]$ (mol L^{-1}): (1) $7,0 \times 10^{-5}$; (2) $1,8 \times 10^{-4}$; (3) $3,5 \times 10^{-4}$; e (4) $7,0 \times 10^{-4}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$).

Até a concentração de $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, o aumento em $[\text{Cu(II)}]$ aumenta $I_{\max}$ registrada. Este efeito da variação de $[\text{Cu(II)}]$ em $I_{\max}$ está ilustrada na figura 64 A.

Ao contrário do efeito do luminol, a relação dos pontos obtidos entre D e $[\text{Cu(II)}]$ apresentou um decréscimo exponencial, ilustrada pela curva da figura 64 B.

Analogamente aos estudos da variação de $I_{\max}$, a $-\tan \alpha$ também apresentou um acréscimo com o aumento de $[\text{Cu(II)}]$ até a concentração $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, como ilustrado na figura 64 C.

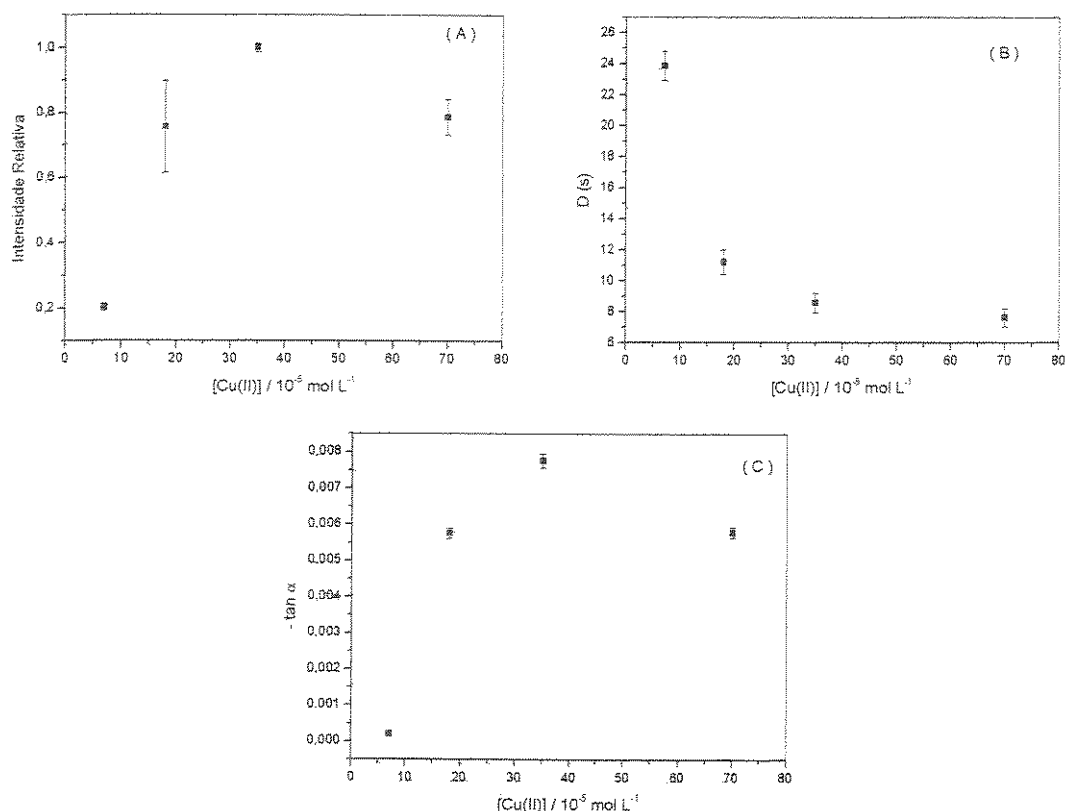


Figura 64. (A) Variação de $I_{\max}$ com a $[Cu(II)]$; (B) variação de D com a $[Cu(II)]$; (C) variação de $-\tan \alpha$ com a $[Cu(II)]$; obtidas a partir dos perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de $Cu(II)$ e em tampão carbonato ($\text{pH} = 10,5$, $[CO_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420\text{nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$).

Pelos resultados obtidos, na faixa de concentração de $Cu(II)$ entre $7,0 \times 10^{-5}$ a $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ pareceu ser obedecida a proposta da equação 30. Assim, optou-se por se fixar $[Cu(II)]$ em $1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

9.4. Efeito da Variação da Concentração de Carbonato no Tampão:

A presença de CO_3^{2-} ou Br^- na reação do luminol aumenta a intensidade de luminescência produzida devido à contribuição destas espécies na reação. Possivelmente, estas espécies reagem com radicais produzidos pela decomposição do H_2O_2 , formando novos radicais os quais favorecem o caminho da luminescência (XIAO et al, 2000). O efeito da presença de CO_3^{2-} foi estudado pelo Sistema 1, notando-se que o aumento de $[CO_3^{2-}]$ gerava um aumento da duração da luminescência.

Com o Sistema 2, alguns resultados foram semelhantes aos obtidos pelo monitoramento utilizando o Sistema 1. Os perfis de emissão relativos estão apresentados na figura 65.

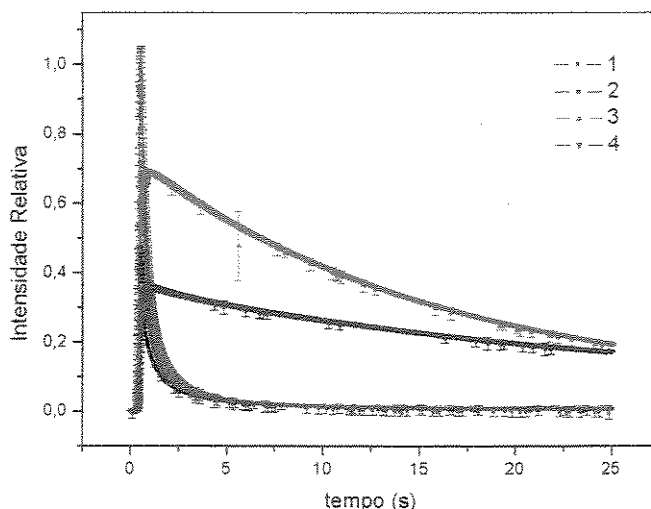


Figura 65. Perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato (pH = 10,40) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) variando a $[\text{CO}_3^{2-}]$ (mol L^{-1}): (1) $9,0 \times 10^{-2}$; (2) 0,2; (3) 0,7; e (4) 1,1. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$).

A variação de I_{max} com $[\text{CO}_3^{2-}]$ apresentou resultados diferentes se comparados com os do Sistema 1. A maior I_{max} foi obtida na concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e a partir desta concentração a I_{max} decaiu bastante, como ilustra a figura 66 A.

Avaliando-se a duração, D , com a variação de $[\text{CO}_3^{2-}]$, verificou-se que o aumento em $[\text{CO}_3^{2-}]$ leva a um aumento em D , como também observado no Sistema 1. Os valores de D foram obtidos pelos tempos que levavam os monitoramentos para chegarem na intensidade de 0,02 unidades relativas. A figura 66 B ilustra a variação de D com $[\text{CO}_3^{2-}]$.

Avaliando-se a velocidade de decaimento, $-\tan \alpha$, verificou-se o comportamento análogo aos resultados do Sistema 1. A velocidade de decaimento aumenta com o aumento em $[\text{CO}_3^{2-}]$ até $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e decai bruscamente nas demais concentrações, conforme ilustra a figura 66 C.

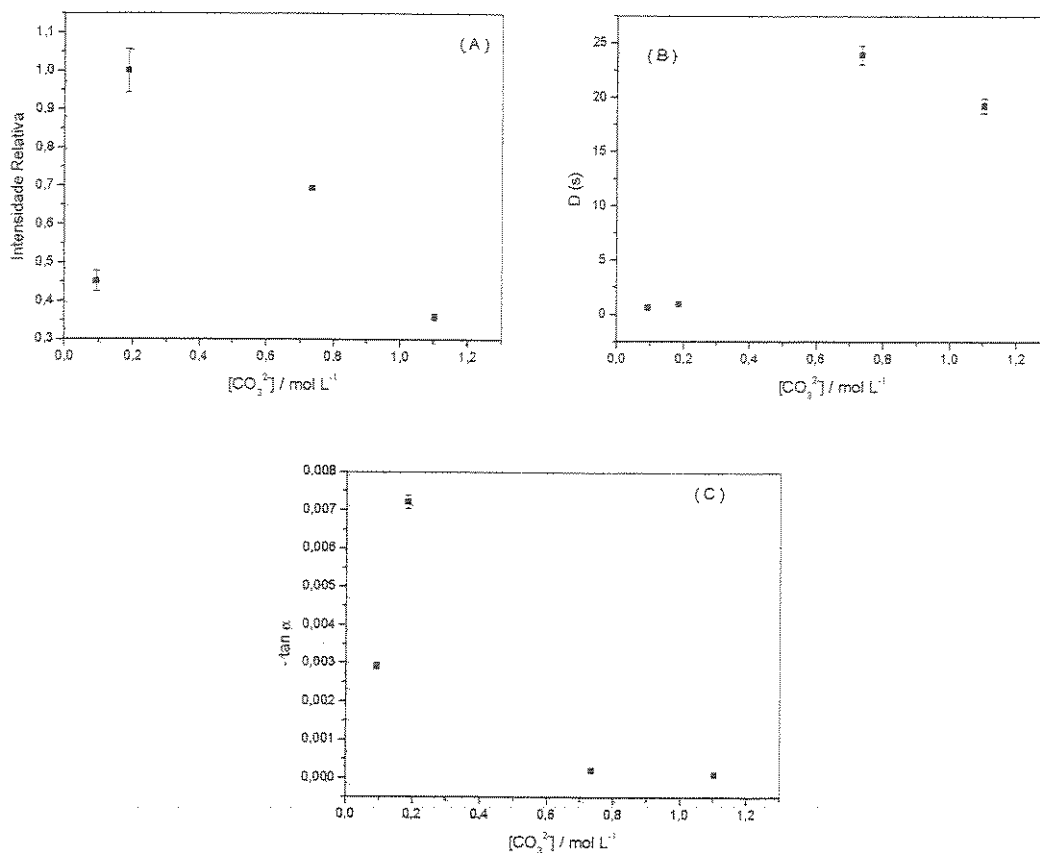


Figura 66. (A) Variação de $I_{\max}$ com a $[\text{CO}_3^{2-}]$; (B) variação de *D* com a $[\text{CO}_3^{2-}]$; (C) variação de $-\tan \alpha$ com a $[\text{CO}_3^{2-}]$; obtidas a partir dos perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato (pH = 10,40) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600\text{V}$).

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que $I_{\max}$ e $-\tan \alpha$ decaem bruscamente a partir de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Por isso, optou-se por se fixar o valor de $[\text{CO}_3^{2-}]$ em $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

Os resultados apresentados pelos dois sistemas de detecção confirmam o que seria esperado. Porém, a diferença entre as velocidades de resposta dos dois sistemas levou a diferentes resultados nos estudos das variações de $I_{\max}$ com as variações das concentrações das espécies.

CAPÍTULO 10:

POTENCIALIDADE ANALÍTICA DO EFEITO MODIFICADOR DO ÁCIDO ÚRICO

O estudo da viabilidade da determinação de ácido úrico foi realizado empregando-se sua propriedade inibidora na reação quimiluminescente do luminol. Como apresentado no Capítulo 7, pode-se supor que o ácido úrico tem a possibilidade de interação com todos os reagentes do sistema através da sua ação redutora e anti-radicalar.

Para monitorar a quimiluminescência foram utilizados os dois sistemas descritos. As concentrações utilizadas dos reagentes, H_2O_2 , luminol, Cu(II) e CO_3^{2-} , foram as estabelecidas nos Capítulos 8 e 9 e ilustradas novamente na tabela 6:

Tabela 6. Concentrações utilizadas nas avaliações dos sistemas de detecção na determinação de ácido úrico pela técnica quimiluminescente.

Reagentes	Sistema 1 (mol L ⁻¹)	Sistema 2 (mol L ⁻¹)
[H ₂ O ₂]	8,9x10 ⁻²	4,4x10 ⁻²
[LN]	2,3x10 ⁻³	2,3x10 ⁻³
[Cu(II)]	1,8x10 ⁻⁴	1,8x10 ⁻⁴
[CO ₃ ²⁻]	0,2	0,2

Foram realizados monitoramentos utilizando os dois sistemas de detecção a fim de avaliar qual deles seria o mais adequado para desenvolver o método analítico para determinação de agentes redutores.

10.1. Avaliação do Sistema 1 na Determinação de Ácido Úrico:

Segundo os resultados experimentais apresentados no Capítulo 7, o decaimento da luminescência, S , é inversamente proporcional à concentração de ácido úrico, $[AU]$. Este comportamento, possivelmente, indica que a quimiluminescência monitorada em diferentes $[AU]$ pode ser usada como técnica indireta de análise. Além disso, a utilização de parâmetros cinéticos, ou seja, o desenvolvimento de um método cinético de análise pode aumentar a precisão da técnica quimiluminescente para determinação de ácido úrico ou qualquer outro modificador de velocidade presente. Isto se baseia no fato que os métodos termodinâmicos utilizam somente um ponto como parâmetro analítico e os

métodos cinéticos, ao contrário, utilizam um conjunto de pontos que podem diminuir o desvio entre as medidas.

Foram realizados monitoramentos de soluções de H_2O_2 contendo diferentes concentrações de ácido úrico (10^{-5} mol L^{-1}), (1) 0; (2) $1,0 \times 10^{-5}$; (3) $1,0 \times 10^{-4}$; (4) 2×10^{-4} ; (5) 3×10^{-4} e (6) $5,0 \times 10^{-4}$, visando avaliar a potencialidade da técnica para desenvolver um método analítico. A figura 67 apresenta os perfis de emissão relativos:

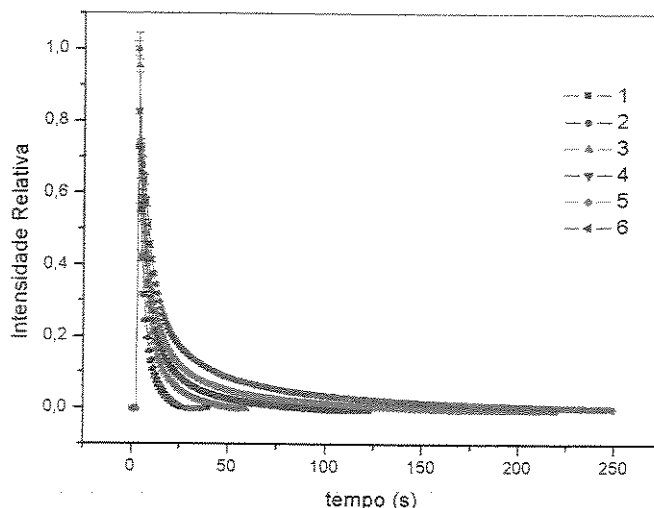


Figura 67. Perfis relativos obtidos pela reação entre a solução de luminol ($2,3 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}) na presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) em tampão carbonato ($\text{pH}=10,3$, $[\text{CO}_3^{2-}]=0,2$ mol L^{-1}) e soluções de H_2O_2 ($8,9 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}) contendo diferentes concentrações de ácido úrico, em mol L^{-1} : (1) 0; (2) $1,0 \times 10^{-5}$, (3) $1,0 \times 10^{-4}$, (4) $2,0 \times 10^{-4}$, (5) $3,0 \times 10^{-4}$ e (6) $5,0 \times 10^{-4}$. $T = 25,0 \pm 0,1$ °C. Os monitoramentos foram realizados com o Sistema 1.

Os métodos matemáticos escolhidos para tratar os perfis de emissão foram o método integral do tempo fixo e o método diferencial das tangentes. Os perfis relativos foram tratados pelo método de tempo fixo em 12, 18, 22 e 25 s e pelo método das tangentes entre 5 e 8 s, 10 e 14 s e 20 e 25 s. As figuras 68 a 69 ilustram os resultados obtidos.

Pelo método do tempo fixo, foram obtidas curvas analíticas lineares e polinomiais em todos os intervalos estudados sobre toda a faixa de concentração estudada. A figura 68 ilustra as curvas de calibração obtidas.

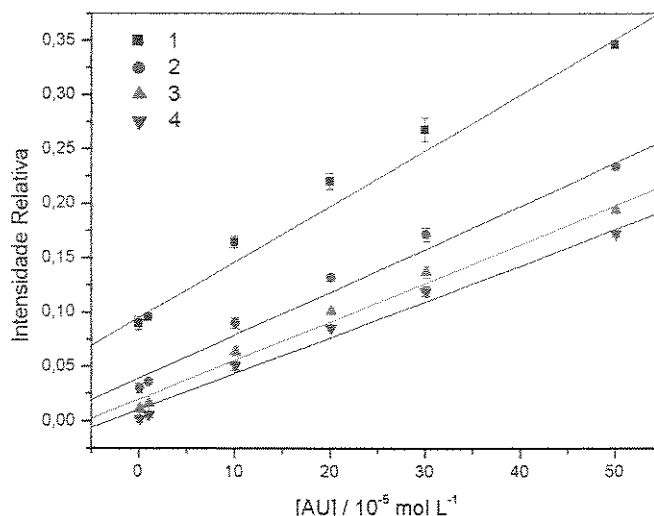


Figura 68. Curvas de calibração lineares obtidas pelo método do tempo fixo em (1) 12 s, (2) 18 s, (3) 22 s e (4) 25 s obtidas pelos perfis de emissão relativos da reação quimiluminescente ($[LN]=2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[Cu(II)]=1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[H_2O_2]=8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $T=25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$ e $pH=10,31$). Equações obtidas: (1) $I_{12s} = 9,4 \times 10^{-2} + 5,13 \times 10^{-3} [AU]$, $r = 0,9961$; (2) $I_{18s} = 4,0 \times 10^{-2} + 3,97 \times 10^{-3} [AU]$, $r = 0,9947$; (3) $I_{22s} = 2,1 \times 10^{-2} + 3,57 \times 10^{-3} [AU]$, $r = 0,9939$; e (4) $I_{25s} = 1,1 \times 10^{-2} + 3,32 \times 10^{-3} [AU]$, $r = 0,9935$.

Os resultados obtidos pelo método das tangentes nos intervalos de 10 a 14 s e 20 a 25 s apresentaram relações polinomiais de 2º grau ilustrados nas curvas da figura 69. No intervalo de 4 a 8 s, não houve correlação adequada entre os pontos para construir uma curva de calibração.

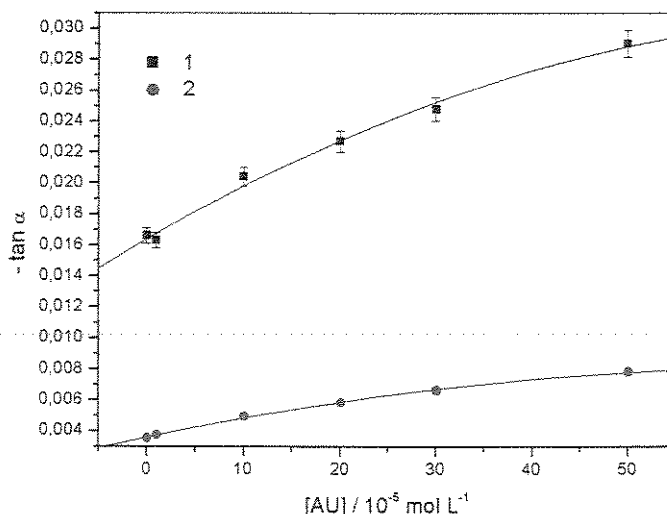


Figura 69. Curvas de calibração polinomiais obtidas pelo método das tangentes nos intervalos de (1) 10 s a 14 s e (2) 20 s a 25 s, obtidas pelos perfis de emissão relativos da reação quimiluminescente ($[LN]=2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $[Cu(II)]=1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[H_2O_2]=8,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $T=25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$ e $pH=10,31$). Equações obtidas: (1) $Y = 1,64 \times 10^{-2} + 3,6 \times 10^{-4} [AU] - 2 \times 10^{-6} [AU]^2$, $r=0,9955$; e (2) $Y = 3,64 \times 10^{-2} + 1,4 \times 10^{-4} [AU] - 1,0 \times 10^{-6} [AU]^2$, $r = 0,9990$.

Visando obter novas relações entre a concentração de ácido úrico e os parâmetros cinéticos, os monitoramentos foram normalizados com a maior intensidade de emissão para cada perfil de emissão. Foram aplicados a estes perfis normalizados os métodos do tempo fixo e das tangentes nos mesmos tempos e intervalos. Os resultados foram bastante similares não melhorando os resultados já obtidos. Por isso, optou-se por suprimir esse cálculo, que aparentemente só prolonga o procedimento geral.

Os parâmetros $I_{\max}$ e D também foram relacionados com a concentração de ácido úrico. A distribuição entre os pontos obtidos pela relação entre a intensidade máxima e a concentração de ácido úrico não apresentou uma correlação definida. Já pela relação com a duração da luminescência, a distribuição dos pontos apresentou caráter polinomial, como ilustra a figura 70.

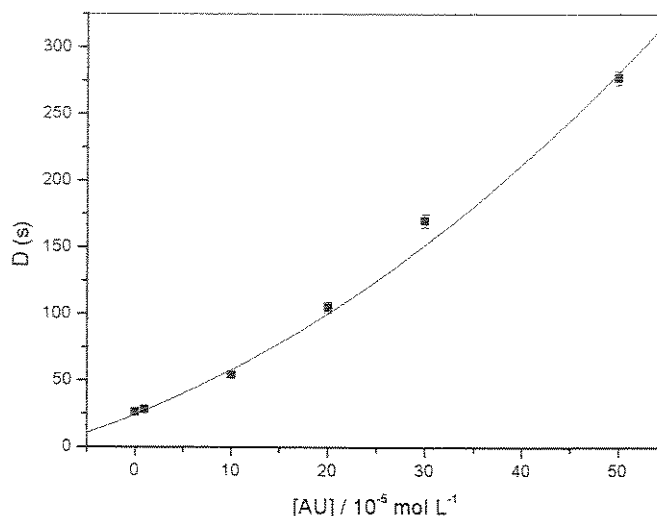


Figura 70. Curva de calibração da D em função da concentração de ácido úrico obtida pelos perfis de emissão da reação quimiluminescente ($[LN]=2,3 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, $[Cu(II)]=1,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, $[H_2O_2]=8,9 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, $T = 25,0 \pm 0,1$ °C e $pH = 10,31$). Equação obtida: $D = 25 + 2,9 [AU] + 4,4 \times 10^{-2} [AU]^2$, $r=0,9971$.

Foram encontradas relações entre a $[AU]$ e os parâmetros analíticos escolhidos que resultaram curvas analíticas lineares e polinomiais com coeficientes de correlação adequados para fins analíticos. As curvas de calibração obtidas pelo método do tempo fixo foram mais adequadas para a aplicação analítica uma vez que apresentaram caráter linear nos intervalos estudados.

10.2. Avaliação do Sistema 2 na Determinação de Ácido Úrico:

Foram realizados monitoramentos a fim de avaliar o desempenho do Sistema 2 na determinação de ácido úrico utilizando a reação quimiluminescente. Para isso, foram estudadas as concentrações entre $5,0 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. As concentrações de H₂O₂, luminol, Cu(II) e carbonato foram $4,4 \times 10^{-2}$, $2,3 \times 10^{-3}$, $1,8 \times 10^{-4}$ e 0,2 mol L⁻¹. Os perfis de emissão relativos obtidos estão ilustrados na figura 71.

Devido à decomposição do H₂O₂, a concentração de O₂ presente no meio reacional é suficiente para também reagir com o luminol produzindo quimiluminescência. Como foi discutido no Capítulo 7, o primeiro máximo do perfil de emissão pode ser atribuído à presença de O₂. Por isso, para os cálculos analíticos, os perfis de emissão foram considerados a partir do segundo máximo de intensidade que deve ser atribuído a concentração de H₂O₂ no meio. A figura 71 apresenta (A) os perfis de emissão obtidos e (B) os perfis de emissão subtraídos da luminescência decorrente a presença de O₂ a partir do segundo máximo de intensidade.

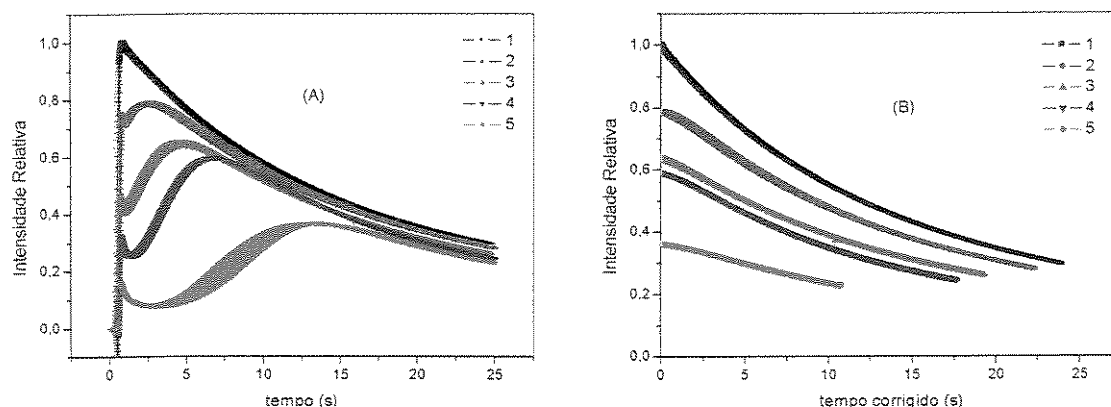


Figura 71. (A) Perfis relativos obtidos pela reação entre a solução de luminol ($2,3 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) na presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em tampão carbonato (pH=10,1, [CO₃²⁻]=0,2 mol L⁻¹) e soluções de H₂O₂ ($4,4 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) contendo diferentes concentrações de ácido úrico, em mol L⁻¹: (1) 0; (2) $5,0 \times 10^{-5}$, (3) $1,5 \times 10^{-4}$, (4) $3,0 \times 10^{-4}$, e (5) $6,0 \times 10^{-4}$. T = $25,0 \pm 0,1$ °C. Os monitoramentos foram realizados com o Sistema 2 ($\lambda_e=420$ nm; 1X de Ganho; V_{foto}=600V). (B) Perfis relativos a partir do segundo máximo de intensidade.

Foram realizados os tratamentos matemáticos análogos aos realizados como os dados obtidos com o Sistema 1. A relação da I_{max} também foi avaliada e está ilustrada na figura 72. O método do tempo fixo foi aplicado em vários intervalos sem que se observasse relação linear entre a intensidade em tempo fixo e a concentração de ácido úrico, [AU], conforme ilustra a figura 72.

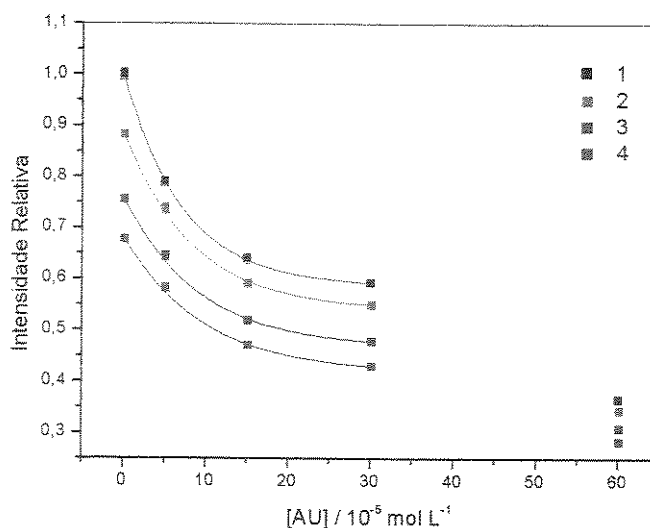


Figura 72. Curvas de calibração obtidas a partir da (1) $I_{\max}$ registrada e do método do tempo fixo em (2) 1,869 s, (3) 3,744 s e (4) 6,250 s dos perfis médios de emissão relativos obtidos pela reação quimiluminescente do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de ácido úrico. ($[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; tampão carbonato, $\text{pH} = 10,1$ e $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X de Ganho; $V_{\text{foto}} = 600\text{V}$). Os monitoramentos foram realizados com o Sistema 2. A tabela 7 apresenta as equações obtidas.

Tabela 7. Equações das curvas ilustradas na figura 72.

Parâmetro	Equação	r
$I_{\max}$	$I_{\max} = 0,588 + 0,41 \exp(-[\text{AU}] / 7,1)$	0,9999
Tempo fixo em 1,869 s	$I_{1,869} = 0,543 + 0,34 \exp(-[\text{AU}] / 8,2)$	0,9997
Tempo fixo em 3,744 s	$I_{3,744} = 0,470 + 0,288 \exp(-[\text{AU}] / 8,9)$	0,9996
Tempo fixo em 6,250 s	$I_{6,250} = 0,420 + 0,259 \exp(-[\text{AU}] / 9,5)$	0,9995

O método das tangentes foi aplicado em vários intervalos. A relação entre as tangentes obtidas no intervalo de 0,619 a 1,244 s apresentou uma curva de calibração com caráter linear na faixa de $5,0 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido úrico, como ilustra a figura 73.

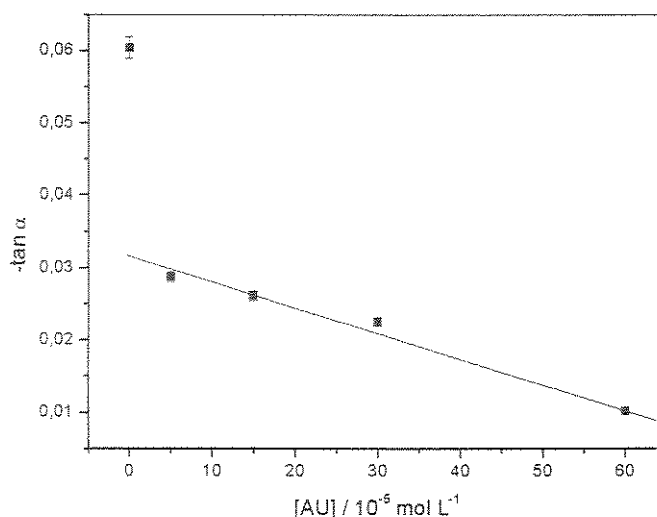


Figura 73. Curva de calibração linear obtida a partir do método das tangentes no intervalo de 0,619 a 1,244 s dos perfis médios de emissão relativos obtidos pela reação quimiluminescente do luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de ácido úrico ($[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; tampão carbonato, $\text{pH} = 10,1$ e $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; $\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X de Ganho; $V_{\text{foto}} = 600\text{V}$). Os monitoramentos foram realizados com o Sistema 2. Equação obtida $-\tan \alpha = 3,16 \times 10^{-2} - 3,6 \times 10^{-4} [\text{AU}]$, $r = 0,9956$.

O Sistema 2 não apresentou curvas de calibração adequadas para a determinação de ácido úrico em toda faixa de concentração. Já com o Sistema 1, o método do tempo fixo em vários intervalos apresentou relações lineares e adequadas para fins analíticos. As diferenças dos resultados dos sistemas, possivelmente, estão relacionadas com tempo de espera para iniciar os monitoramentos. Provavelmente, as soluções preparadas para a avaliação do efeito do ácido úrico pelo Sistema 2 foram usadas após um tempo maior de espera que as soluções da avaliação com o Sistema 1. Isto pode ter diminuído a concentração de H_2O_2 em uma faixa que não apresenta uma tendência linear com os parâmetros cinéticos.

Com estes resultados, pode-se dizer que o Sistema 1 apresentou um desempenho melhor que o Sistema 2 para determinação de ácido úrico. Contudo, novos monitoramentos com o Sistema 2 adequando o tempo de termostatização podem melhorar seu desempenho para a determinação deste analito.

CAPÍTULO 11:

POTENCIALIDADE ANALÍTICA DO EFEITO MODIFICADOR DO ÁCIDO ASCÓRBICO

Analogamente ao ácido úrico, foi realizado um estudo para avaliar a viabilidade da determinação de ácido ascórbico empregando-se sua propriedade inibidora na reação quimiluminescente do luminol. Como apresentado no Capítulo 7, pode-se supor que o ácido ascórbico também pode interagir com todos os reagentes do sistema através da sua ação redutora e anti-radicalar.

Para realizar os estudos, foram utilizados os dois sistemas de detecção, que assim, puderam ser avaliados. As condições de monitoramento da reação quimiluminescente utilizadas foram as estabelecidas nos Capítulos 8 e 9.

11.1. Avaliação do Sistema 1 na Determinação de Ácido Ascórbico:

Segundo os resultados experimentais apresentados no Capítulo 7, o decaimento da luminescência, S , também é inversamente proporcional à concentração de ácido ascórbico, $[AA]$. Analogamente aos efeitos do ácido úrico, a inibição da quimiluminescência monitorada pode ser utilizada como técnica indireta de análise de ácido ascórbico.

Foram realizados monitoramentos da luminescência utilizando o Sistema 1, com ácido ascórbico na faixa de $6,5 \times 10^{-5}$ a $4,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Os perfis de emissão relativos estão ilustrados na figura 74.

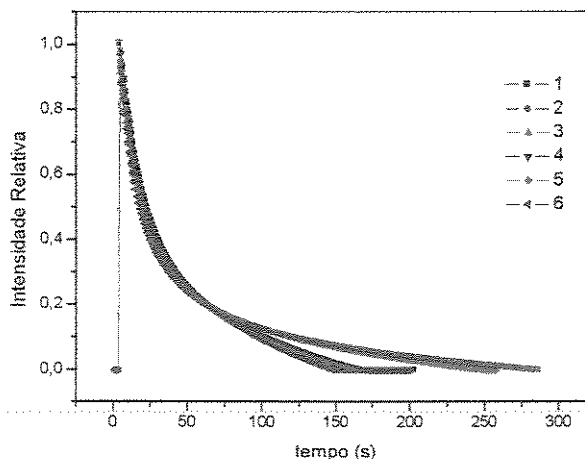


Figura 74. Perfis médios relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e em tampão carbonato ($[CO_3^{2-}] = 0,2$ mol L⁻¹; pH = 10,0) com H₂O₂ ($8,9 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) em presença de ácido ascórbico, em mol L⁻¹: (1) 0; (2) $6,5 \times 10^{-5}$; (3) $1,3 \times 10^{-4}$; (4) $1,9 \times 10^{-4}$; (5) $3,2 \times 10^{-4}$; e (6) $4,5 \times 10^{-4}$. T = $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 1.

Foram aplicados os métodos do tempo fixo e das tangentes nos perfis de emissão obtidos. O método do tempo fixo foi aplicado nos tempos 8 s, 12 s, 15 s e 25 s. As relações apresentaram caráter linear, ilustrados na figura 75. O método das tangentes foi

aplicado em vários intervalos sem que fossem obtidas relações lineares com a concentração de ácido ascórbico, [AA].

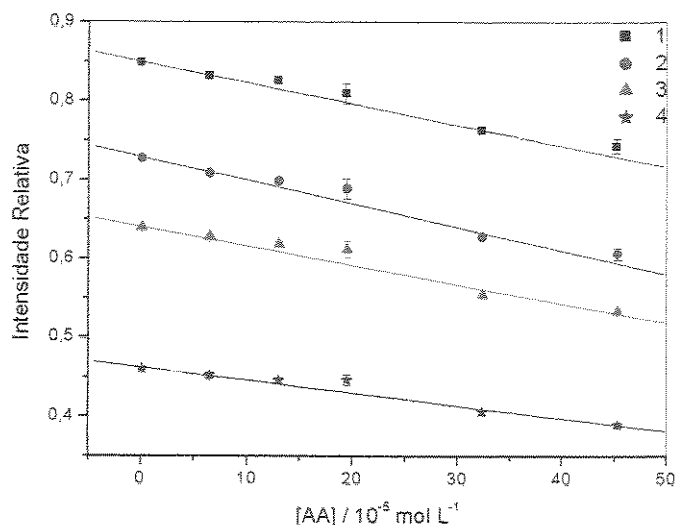


Figura 75. Curvas de calibração obtidas a partir do método do tempo fixo aplicado nos tempos de (1) 8s, (2) 12 s, (3) 15 s e (4) 25 s dos perfis relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2$ mol L⁻¹; pH = 10,0) com H₂O₂ ($8,9 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) em presença de ácido ascórbico. T = 25,0 ± 0,1°C. Dados obtidos com Sistema 1. As equações obtidas estão apresentadas na tabela 9.

Tabela 8. Equações das curvas ilustradas na figura 75. O símbolo r e I representam o coeficiente de correlação e a intensidade relativa em um intervalo, respectivamente.

Intervalo (s)	Equação	r
8	$I_{8s} = 0,850 - 2,67 \times 10^{-3} [\text{AA}]$	0,9970
12	$I_{12s} = 0,730 - 3,0 \times 10^{-3} [\text{AA}]$	0,9922
15	$I_{15s} = 0,6413 - 2,42 \times 10^{-3} [\text{AA}]$	0,9940
25	$I_{25s} = 0,463 - 1,62 \times 10^{-3} [\text{AA}]$	0,9916

11.2. Avaliação do Sistema 2 na Determinação de Ácido Ascórbico:

Analogamente ao Sistema 1, foram realizados monitoramentos da luminescência em presença de ácido ascórbico, na faixa de concentração de $6,4 \times 10^{-5}$ a $6,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O efeito modificador do ácido ascórbico é a diminuição da velocidade de decaimento e o aumento da duração da luminescência, D. A medida que há o aumento na concentração de ácido ascórbico ocorre a diminuição da velocidade e o aumento da duração de

emissão. Além disso, o aumento na concentração de ácido ascórbico leva à diminuição da intensidade máxima registrada, $I_{\max}$. Os perfis médios relativos de emissão obtidos estão apresentados na figura 76.

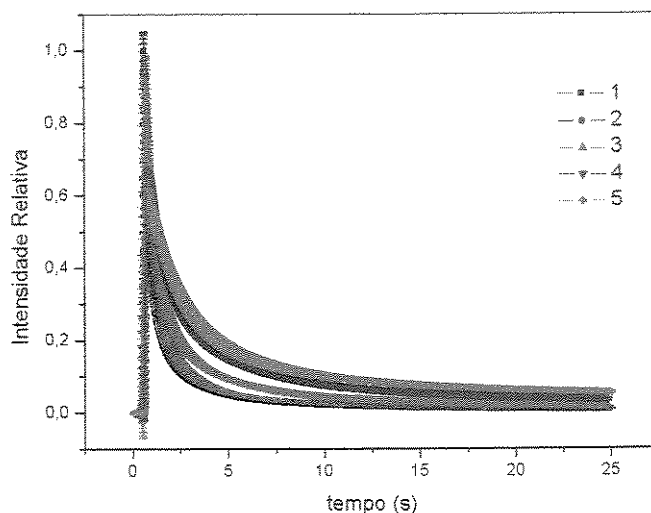


Figura 76. Perfis médios relativos de emissão da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; pH = 10,60) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de ácido ascórbico (mol L^{-1}): (1) $5,15 \times 10^{-5}$; (2) $1,03 \times 10^{-4}$; (3) $3,09 \times 10^{-4}$; (4) $5,15 \times 10^{-4}$; e (5) $6,18 \times 10^{-4}$. $T = 25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$).

Avaliando-se $I_{\max}$ com [AA], encontrou-se uma relação linear entre os pontos, como ilustrado na figura 77.

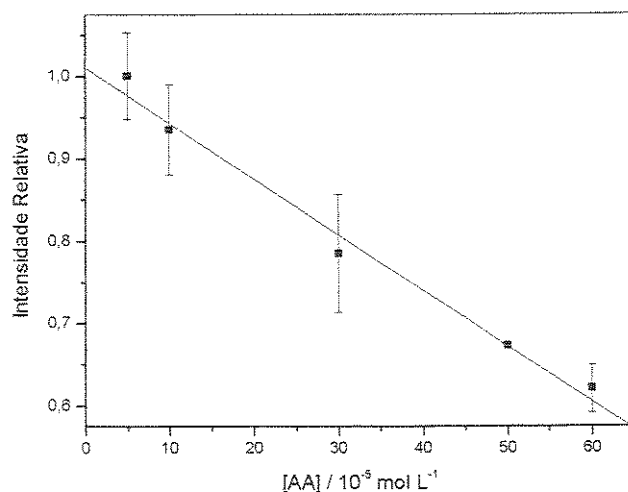


Figura 77. Curva de calibração obtida pela relação entre a $I_{\max}$ com [AA] a partir dos perfis médios relativos da reação de luminol ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de Cu(II) ($1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e em tampão carbonato ($[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; pH = 10,60) com H_2O_2 ($4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de AA. Dados obtidos com Sistema 2 ($\lambda_e = 420 \text{ nm}$; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$). Equação obtida: $I_{\max} = 1,01 - 6,8 \times 10^{-3} [\text{AA}]$, $r = 0,9956$.

Os perfis de emissão foram tratados pelos métodos integral do tempo fixo e diferencial das tangentes, buscando-se construir curvas de calibração para correlacionar a concentração de ácido ascórbico com os parâmetros cinéticos.

O método do tempo fixo foi aplicado em vários intervalos. As relações obtidas possibilitaram a construção de curvas de calibração lineares em todos os intervalos estudados. A figura 78 ilustra algumas curvas obtidas e a tabela 9 apresenta as respectivas equações das curvas obtidas.

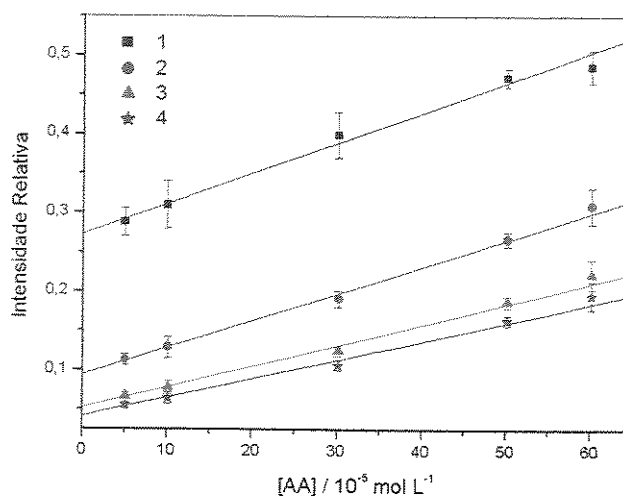


Figura 78. Curvas de calibração obtidas a partir do método do tempo fixo em: (1) 0,619 s; (2) 1,869 s; (3) 3,119 s; e (4) 3,744 s. As equações lineares obtidas estão apresentadas na tabela 10, respectivamente. ($\lambda_e = 420$ nm; 1X ganho; $V_{\text{foto}} = 600$ V; $[LN] = 2,3 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$; $[Cu(II)] = 1,8 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$; $[CO_3^{2-}] = 0,2$ mol L $^{-1}$; pH 10,60; $[H_2O_2] = 4,4 \times 10^{-2}$ mol L $^{-1}$).

Tabela 9. Equações das curvas ilustradas na figura 78. Os símbolos r e I representam o coeficiente de correlação e o valor da intensidade relativa em um intervalo, respectivamente.

Intervalo (s)	Equação*	r
0,619	$I_{0,619} = 0,27 + 3,9 \times 10^{-3} [AA]$	0,9934
1,869	$I_{1,869} = 9,5 \times 10^{-2} + 3,4 \times 10^{-3} [AA]$	0,9987
3,119	$I_{3,119} = 5,3 \times 10^{-2} + 2,7 \times 10^{-3} [AA]$	0,9967
3,744	$I_{3,744} = 4,3 \times 10^{-2} + 2,4 \times 10^{-3} [AA]$	0,9968

Pelo método das tangentes, vários intervalos foram estudados e apresentaram caráter linear. A figura 79 ilustra as curvas de calibração obtidas, com as equações descritas na tabela 10.

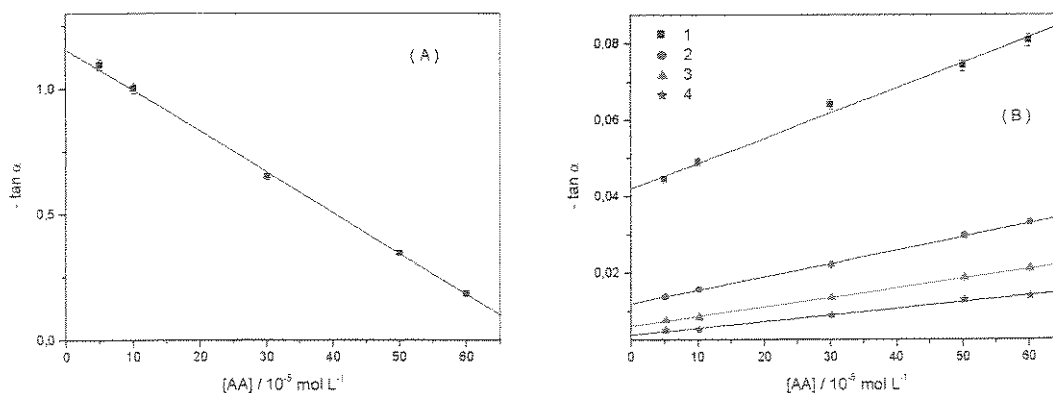


Figura 79. (A) Curva de calibração obtida pelo método das tangentes no intervalo de 0 a 0,619 s; e (B) curvas de calibração obtidas a partir do método das tangentes nos intervalos (1) de 1,869 s a 2,494s; (2) de 3,744 s a 4,369s; (3) de 4,994 s a 5,619 s; e (4) de 6,244s a 6,869 s. ($[H_2O_2]=4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $[LN]=2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[Cu(II)]=1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[CO_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; pH=10,6). As equações estão apresentadas na tabela 10.

Tabela 10. Equações das curvas ilustradas na figura 79. Os símbolos r e $-\tan \alpha$ representam o coeficiente de correlação e o valor negativo da tangente em um intervalo, respectivamente.

Intervalo (s)	Equação*	r
0,000 a 0,619	$-\tan \alpha = 1,16 - 1,63 \times 10^{-2}$	0,9997
1,869 a 2,494	$-\tan \alpha = 4,21 \times 10^{-2} + 6,6 \times 10^{-4} [AA]$	0,9966
3,744 a 4,369	$-\tan \alpha = 1,24 \times 10^{-2} + 3,5 \times 10^{-4} [AA]$	0,9996
4,994 a 5,619	$-\tan \alpha = 6,6 \times 10^{-3} + 2,48 \times 10^{-4} [AA]$	0,9987
6,244 a 6,869	$-\tan \alpha = 4,22 \times 10^{-3} + 1,72 \times 10^{-4} [AA]$	0,9938

Avaliando-se os resultados obtidos pelos dois sistemas, verificou-se que o Sistema 2 apresentou um melhor desempenho do que o Sistema 1, pois apresentou um número maior de curvas de calibração com coeficientes de correlação adequados para procedimento analítico.

Assim, optou-se por utilizar o Sistema 2 como sistema de detecção da aplicação do método analítico em amostras reais, o que será discutido no próximo Capítulo.

CAPÍTULO 12: DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM MEDICAMENTOS

O ácido ascórbico ou Vitamina C frequentemente é centro de discussões sobre seu papel e suas possíveis interações benéficas no organismo humano. Alguns cientistas e médicos propõem a utilização de altas doses desta vitamina, cerca de 1000 mg por dia, para tratamentos pós-cirúrgicos e tratamentos preventivos e de controle de algumas doenças, como a gripe e o câncer (CAMERON & PAULING, 1993). Deixando de lado se estas idéias são especulativas ou não, a verdade é que a popularização da vitamina C fez com que crescesse sua comercialização tanto em medicamentos quanto em alimentos. Além disso, aumentou também o interesse no estudo da função metabólica do ácido ascórbico no organismo, cujas concentrações estão na faixa de 10^{-4} mol L⁻¹ ou 15 µg mL⁻¹ (CAMERON & PAULING, 1993).

Sabendo-se da importância desta substância, o ácido ascórbico foi escolhido para avaliar o desempenho do método cinético proposto para a determinação em comprimidos e tabletes efervescentes de Vitamina C.

12.1. Análise de Medicamentos contendo Ácido Ascórbico:

A composição dos comprimidos de vitamina C varia bastante, dependendo do fabricante. A maioria dos comprimidos sem efervescência possui o ácido ascórbico com alguns excipientes, como talco, para transmitir ao particulado propriedades deslizantes e / ou antiaderentes. Por outro lado, os tabletes efervescentes apresentam em sua composição várias substâncias responsáveis pelas características organolépticas do produto, como lactose, amido, aspartame, sacarina sódica, sacarose e aromas de frutas cítricas, outras responsáveis para produção de efervescência, como NaHCO₃ e algum ácido fraco (ácido tartárico ou ácido cítrico). Algumas destas substâncias apresentam propriedades redutoras conhecidas e já determinadas pela reação quimiluminescente do luminol, como, por exemplo, glicose (LEBEDEVA, UGAROVA, 1995), lactose (BUSCH & POLSTER, 1992) e ácido tartárico (GAIKWAD, SILVA, PÉREZ-BENDITO, 1994). Outras espécies, como NaHCO₃, também modificam o comportamento da luminescência pela ação do carbonato no mecanismo.

Avaliando-se estas características, notou-se que a análise sem um tratamento prévio das amostras efervescentes possivelmente mostraria resultados maiores que o esperado pela interferência de outros agentes redutores presentes na matriz da amostra. Para verificar tal premissa, foram realizados as análises diretas das amostras de comprimido e de 2 tipos de tabletes efervescente pela dissolução e diluição em tampão carbonato.

Para comparar os resultados, foram realizadas as análises das amostras pelo método oficial da AOAC (1995) para análise de medicamentos e alimentos contendo ácido ascórbico. Este método consiste em uma titulação visual de ácido ascórbico em solução com o reagente 2,6-diclorofenolindofenol (DCFI) em presença de ácido oxálico. O excesso do próprio reagente funciona como indicador do final da titulação (pela mudança de cor de incolor para rosa).

As análises das amostras foram realizadas com o Sistema 2, nas condições otimizadas ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{LN}] = 2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\lambda_e = 420 \text{ nm}$; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$; $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 10,6$). Os padrões de ácido ascórbico variaram de $5,15 \times 10^{-5}$ a $6,18 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os perfis de emissão relativos foram tratados pelos métodos do tempo fixo e das tangentes. Os perfis de emissão relativos das amostras estão ilustrados na figura 80. Foram testados uma amostra de comprimido (amostra 1) e 2 tipos de tabletes efervescentes (amostras 2 e 3).

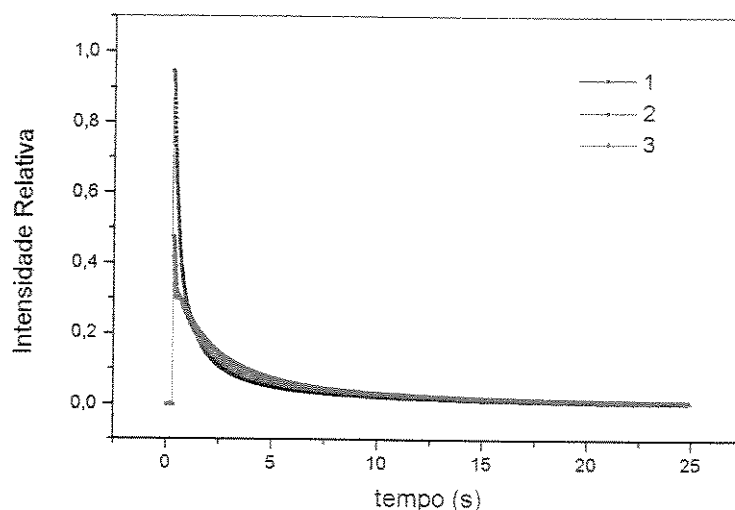


Figura 80. Perfis relativos de emissão das amostras: (1) amostra 1; (2) amostra 2; e (3) amostra 3. As condições de monitoramento foram: ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{LN}] = 2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\lambda_e = 420 \text{ nm}$; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$; 1X Ganho; $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 10,6$).

Os resultados obtidos pela análise direta das amostras e os resultados obtidos pelo método oficial estão ilustrados na tabela 11. As concentrações das amostras foram apresentadas em porcentagens em massa, calculadas pela razão entre a massa de ácido ascórbico e a massa da amostra. Os desvios entre os resultados do método proposto, C_e , e o método oficial, C_o , foram calculados de acordo com a equação abaixo:

$$d_{AOAC} = \frac{C_e - C_o}{C_o} \times 100 \quad (31)$$

Tabela 11. Resultados da análise direta das amostras de medicamentos.

Método	Amostra 1 (%)	R* (%)	d _{AOAC} (%)	Amostra 2 Efervescente (%)	R* (%)	d _{AOAC} (%)	Amostra 3 Efervescente (%)	R* (%)	d _{AOAC} (%)
Valor de rótulo	66,4	-	4,1	24,3	-	2,1	22,6	-	4,0
AOAC	63,7	95,9	-	23,8	97,9	-	21,7	96,0	-
Tempo fixo em 0,9312 s	64,3	96,8	0,9	82,3	339	71	-	-	-
Tempo fixo em 3,4312 s	63,4	95,5	0,5	76,8	316	69	49,1	217	56

* R representa **Recobrimento**: (Resultado / Valor de Rótulo) x 100.

Os melhores resultados da análise cinético-luminescente da amostra 1 foram obtidos pelo método do tempo fixo em 0,9312 e 3,4312 s, com desvios de 0,9 e 0,5 %, respectivamente, com relação aos resultados encontrados pelo método da AOAC.

As amostras 2 e 3, como esperado em função da sua composição, apresentaram resultados bem maiores que os nominais (valores de rótulo) e os obtidos pelo método oficial. Como observado na figura 81, as amostras 2 e 3 apresentaram maiores durações da luminescência, D, e menor intensidade máxima registrada, I_{max}. Isto, possivelmente, relacionou-se com a presença de outros agentes redutores (como lactose e sacarose) que inibem a luminescência e provocam o aumento do valor de [AA] encontrada.

Uma das formas para tentar contornar esta interferência sem um tratamento prévio das amostras foi a utilização do método de adição de padrão, conforme descrito no próximo item.

12.2. Análise de Medicamentos pelo Método de Adição de Padrão:

As concentrações dos padrões de ácido ascórbico utilizados foram de $1,0 \times 10^{-4}$ a 4×10^{-4} mol L⁻¹. Utilizando-se o procedimento do método proposto, foram avaliados os perfis de emissão relativos para as 3 amostras, com medidas em triplicata no sistema 2.

Os perfis de emissão relativos das amostras 1, 2 e 3 com a adição de padrão estão ilustrados nas figuras 81 a 83.

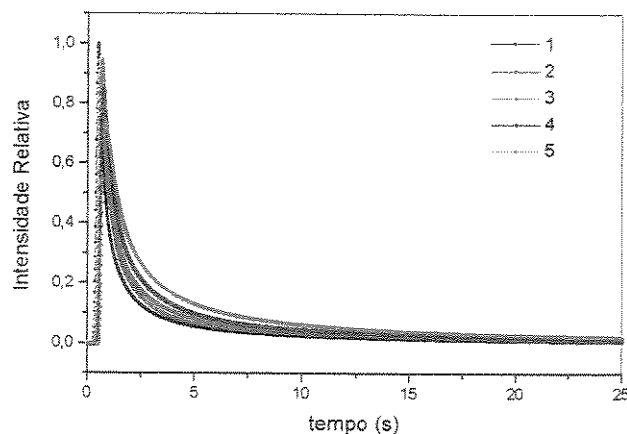


Figura 81. Perfis relativos de emissão do método da adição de padrão de ácido ascórbico (mol L^{-1}) à amostra 1: (1) 0; (2) $1,02 \times 10^{-4}$; (3) $2,04 \times 10^{-4}$; (4) $3,06 \times 10^{-4}$; e (5) $4,08 \times 10^{-4}$. As condições de monitoramento foram: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{LN}] = 2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\lambda = 420 \text{ nm}$; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$; 1X Ganho; $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 10,6$.

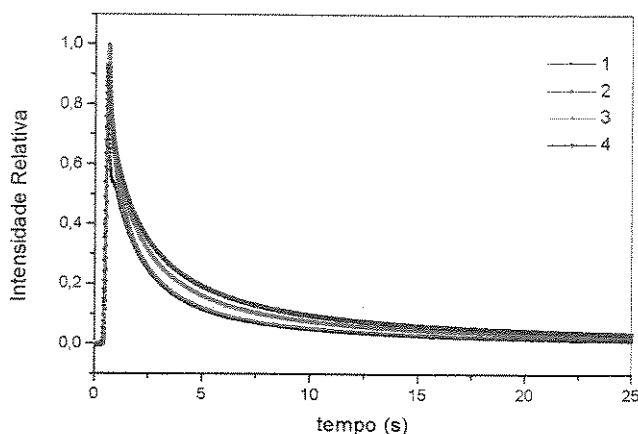


Figura 82. Perfis relativos de emissão do método da adição de padrão de ácido ascórbico (mol L^{-1}) à amostra 2: (1) 0; (2) $1,04 \times 10^{-4}$; (3) $2,08 \times 10^{-4}$; e (4) $3,12 \times 10^{-4}$. As condições de monitoramento foram: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{LN}] = 2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\lambda_e = 420 \text{ nm}$; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$; 1X Ganho; $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 10,6$.

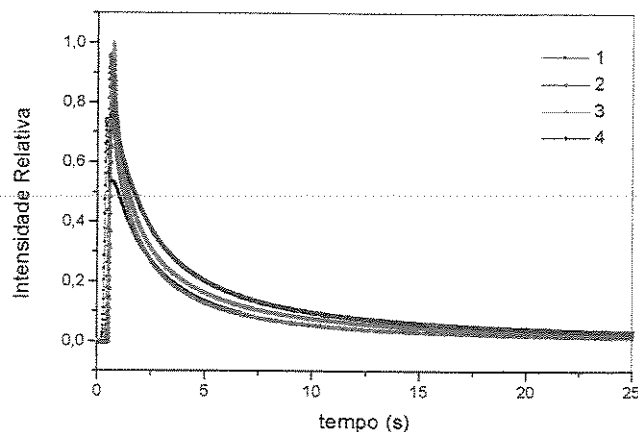


Figura 83. Perfis relativos de emissão do método da adição de padrão de ácido ascórbico (mol L^{-1}) à amostra 3: (1) 0; (2) $1,07 \times 10^{-4}$; (3) $2,14 \times 10^{-4}$; e (4) $3,21 \times 10^{-4}$. As condições de monitoramento foram: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{LN}] = 2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Cu(II)}] = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $\lambda = 420 \text{ nm}$; $V_{\text{foto}} = 600 \text{ V}$; 1X Ganho; $T = 25,0 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 10,6$.

A tabela 12 ilustra os resultados obtidos.

Tabela 12. Resultados das análises dos medicamentos com a adição de padrão.

Método	Amostra 1 (%)	R* (%)	d _{AOAC} (%)	Amostra 2 Efervescente (%)	R* (%)	d _{AOAC} (%)	Amostra 3 Efervescente (%)	R* (%)	d _{AOAC} (%)
Valor de rótulo	66,4	-	4,1	24,3	-	2,1	22,6	-	4,0
AOAC	63,7	95,9	-	23,8	97,9	-	21,7	96,0	-
Tempo fixo em 2,1812 s	64,5	97,1	1,0	44,3	182	46	47,0	208	54
Tempo fixo em 4,0562 s	45,8	69,0	28	25,1	96,8	5,0	31,8	141	32

* R representa Recobrimento: (Resultado / Valor de Rótulo) x 100.

Avaliando-se os resultados, verificou-se que para a amostra 1 (comprimido) o menor desvio foi obtido pelo método do tempo fixo no 2,1812 s ($d_{AOAC} = 1,0$ %). Além disso, verificou-se que para a amostra 2 (tablete efervescente) o método com adição de padrão pelo tempo fixo em 4,0562 s apresentou o menor desvio ($d_{AOAC} = 5,0$ %) encontrado por todos os métodos de cálculos. Porém, os resultados da amostra 3 não apresentaram desvios menores de 5%, possivelmente, pela presença da sacarose em sua composição.

A proposta cinético-luminescente apresentou aplicabilidade para amostras reais de comprimidos de vitamina C com desvios menores que 1 % para os métodos de tempo fixo em 0,9312 e 3,4312 s para a análise direta da amostra (diluição em tampão carbonato) e resultados com desvios menores que 5 % para os outros métodos.

O método de adição de padrão apresentou resultados com desvios menores que 5% para o método do tempo fixo em 2,1812 s para amostra 1 (comprimido) e para o método do tempo fixo em 4,0562 s para a amostra 2 (tablete efervescente). Isto deve indicar aspectos favoráveis do estudo realizado.

12.3. Avaliação do Método Cinético com Técnica Quimiluminescente:

12.3.1. As Figuras de Mérito:

Na escolha de um método analítico, alguns critérios de desempenho do procedimento do método devem ser considerados para reconhecer o método mais

apropriado para obter informações desejadas. Estes critérios, como exatidão, precisão, seletividade, sensibilidade, limite de detecção, faixa de concentração dinâmica, tempo e custo de análise, dentre outros, são chamados de figuras de mérito. Partindo da importância da apresentação destes critérios para avaliação do método proposto, foram encontradas as figuras de mérito para o método cinético de acordo com as definições da IUPAC[#] (1978) e segundo SKOOG & LEARY (1992).

A exatidão de um método analítico deve ser avaliada pela análise de um material de referência ou através da comparação com um método padrão de análise (SKOOG & LEARY, 1992). O método proposto foi averiguado pela comparação com método oficial da AOAC (1995). Os resultados obtidos, como já apresentados, não tiveram um desvio maior do que 5 %, o que, possivelmente, indica a exatidão do método para as amostras de medicamentos.

A precisão de um método analítico descreve a reprodutibilidade dos resultados e, geralmente, é avaliada pelo valor do desvio padrão relativo entre as medidas (IUPAC, 1978 e SKOOG & LEARY, 1992). Geralmente, uma das desvantagens da técnica quimiluminescente é dificuldade para reprodutibilidade das medidas (JIMÉNEZ & NAVAS, 1997). Contudo, a utilização de um método cinético ao invés de um método termodinâmico como proposta de análise, geralmente, aumenta a reprodutibilidade da análise pela utilização de um maior número de pontos nos cálculos dos parâmetros analíticos e na construção das curvas de calibração. No caso do método proposto, as estimativas de desvios padrões relativos entre as medidas não foram maiores que 6,0%.

A seletividade de um método analítico demonstra o quanto o método está livre da interferência de outras espécies contidas na amostra (IUPAC, 1978 e SKOOG & LEARY, 1992). No caso do método proposto para a amostra de comprimido, a seletividade do método foi adequada, já que as espécies presentes não interferiram na análise. Porém, na análise de tabletes, a interferência de espécies redutoras, como o ácido tartárico e a sacarose, e a presença de NaHCO_3 indicam que o método direto de análise não é adequado. Contudo, para uma das amostras de tabletes efervescentes, que não apresentavam sacarose, o método de adição de padrão contornou a desvantagem da seletividade do método proposto.

A sensibilidade de um método analítico é dada pela mudança no sinal analítico em função da mudança da concentração do analito (SKOOG & LEARY, 1992). Geralmente, a sensibilidade é representada pela razão do coeficiente angular das curvas de calibração

[#] International Union of Pure and Applied Chemistry.

pelo desvio padrão das medidas, chamada de sensibilidade analítica, γ . No caso do método proposto, γ é igual a 0,195 e 0,108 para os métodos de tempo fixo em 0,9312 e 3,4312 s na análise direta, respectivamente.

O limite de detecção de um método analítico é a concentração de analito que pode ser encontrada pelo sinal analítico mínimo medido (SKOOG & LEARY, 1992). Geralmente, o cálculo do sinal mínimo medido, S_m , pode ser encontrado pela seguinte expressão (SKOOG & LEARY, 1992):

$$S_m = \overline{S_b} + ks_b \quad (32)$$

onde $\overline{S_b}$ é a média de sucessivas medidas do branco, s_b é o desvio padrão entre as medidas do branco e k é uma constante. Geralmente, escolhe-se o valor de k igual a 3, pois neste valor há 99,6% de confiança na medida. Supondo que as curvas de calibração são lineares, pode-se encontrar o limite de detecção de um método analítico, c_m , pela seguinte equação (SKOOG & LEARY, 1992):

$$c_m = \frac{S_m - S_b}{m} \quad (33)$$

onde S_m é mínimo sinal medido, calculado pela equação 32, S_b é o sinal do branco e m é o coeficiente angular da curva de calibração.

Segundo estas definições, os limites de detecção para os métodos do tempo fixo em 0,9312 e 3,4312 s na análise direta foram de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $3,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente.

A faixa dinâmica de concentração de um método analítico pode ser definida pelo intervalo entre a menor concentração que se pode realizar medidas quantitativas, o limite de quantificação, LQ, e a concentração onde a curva de calibração perde a linearidade, o limite de linearidade, LL (SKOOG & LEARY, 1992). O limite de quantificação é considerado igual a 10 vezes o valor do desvio padrão do branco. Assim, no caso do método proposto pelo método do tempo fixo em 0,9312 e 3,4312 s na análise direta, LQ é igual a $3,9 \times 10^{-5}$ e $5,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente. O limite de linearidade para as duas curvas de calibração foram de $6,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

O tempo e o custo da análise é um dos critérios mais importantes na escolha da análise (SKOOG & LEARY, 1992). O tempo gasto na análise pelo método proposto com 4 padrões é de cerca de 40 min e para cada amostra ou padrão adicionado à análise, pode-

se somar cerca de 5 a 10 min. O custo da técnica quimiluminescente é relativamente baixo em comparação a técnicas de separação e absorção atômica.

A partir das figuras de mérito, é possível caracterizar a proposta como um método analítico para a determinação de ácido ascórbico em medicamentos na faixa de concentração de $6,0 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com desvios padrões relativos menores que 6% e exatidão testada pela comparação com método oficial da AOAC. Além disso, as figuras de mérito do método são importantes para podermos compará-lo com outros métodos analíticos quimiluminescentes e com outras técnicas de detecção, como apresentado no próximo item.

12.3.2. Comparação do Método Cinético Quimiluminescente com Outros Métodos:

Para avaliar o método cinético proposto, foram escolhidos alguns métodos para determinação de ácido ascórbico, conforme apresentado na tabela 13. As siglas FIA e QL representam que o método analítico utiliza a técnica por injeção em fluxo e técnica quimiluminescente, respectivamente.

Tabela 13. Alguns métodos analíticos para determinação de ácido ascórbico. Os símbolos c_m e s_r representam os valores de limite de detecção e desvio padrão relativo, respectivamente.

Método Analítico	Faixa Dinâmica (mol L ⁻¹)	c_m (mol L ⁻¹)	s_r (%)	Referência
Método Proposto	$6,0 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-5}$	<6	Este trabalho
Titulação c/ DCFI	Até 5×10^{-3}	5×10^{-3}	-	AOAC, 1995
FIA-QL	5×10^{-7} a $1,0 \times 10^{-3}$	-	2,6	AGATER & JEWSBURY, 1997
Cinético – QL	1×10^{-5} a $1,0 \times 10^{-4}$	5×10^{-7}	6	ZAVERUKHA & SKOROBATYI, 1991
FIA-QL	$1,1 \times 10^{-9}$ a $3,0 \times 10^{-4}$	2×10^{-10}	1,22	PÉREZ-RUIZ, MARTÍNEZ-LOZANO, SANZ, 1995
FIA-Enzimático-QL	4×10^{-7} a 3×10^{-4}	6×10^{-7}	<10	SATO, CHIBA, TANAKA, 1993
Cinético-Espectrofotométrico	6×10^{-7} a 2×10^{-5}	4×10^{-7}	2,0	FAN et al, 1999
FIA-Potenciométrico-Elétrodo Modificado Tubular	10^{-3} a 10^{-1}	$8,5 \times 10^{-4}$	3,6	FERNANDES et al, 2000
Potenciométrico-Elétrodo Seletivo	$2,0 \times 10^{-4}$ a $5,5 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-5}$	<1,3	FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2000

Pode-se verificar que os métodos com técnica quimiluminescente associada a técnica de injeção por fluxo apresentam maior faixas dinâmicas, menores limites de detecção e menores desvios padrões relativos que o método proposto. Os métodos potenciométricos apresentaram maiores faixas dinâmicas e menores desvios padrões relativos, mas com limites de detecção maiores que o método proposto.

As desvantagens do método proposto são a baixa seletividade para outros agentes redutores, o maior tempo de análise, o maior limite de detecção e a pequena faixa dinâmica de concentração encontrada. Porém, o método apresenta precisão semelhante aos outros métodos, baixo custo nos equipamentos e reagentes e simplicidade no procedimento de análise.

CONCLUSÃO

“ Não existe nada em que um homem livre pense menos que a morte; sua sabedoria é meditar não sobre a morte, mas sobre a vida”
(Trecho retirado do livro *Ética* de Espinosa)

CAPÍTULO 13: CONCLUSÃO

Nos 2 anos de trabalho, foram realizados estudos qualitativos e quantitativos sobre as espécies envolvidas na reação do luminol, visando avaliar as aplicações analíticas que poderiam ser desenvolvidas.

Inicialmente, foram realizados os estudos para avaliar os efeitos modificadores das espécies através do monitoramento da luminescência com o sistema de detecção de um espectrofotômetro comercial e um sistema de injeção para adição e mistura dos reagentes. Os resultados serviram para caracterizar a luminescência em função dos reagentes, inclusive os agentes modificadores, produzindo os primeiros indícios da aplicabilidade analítica da reação. Foram verificados os efeitos modificadores de dois cátions de metais de transição, Cu (II) e Ni (II), e de dois agentes modificadores, ácido ascórbico e ácido úrico. Além disso, os resultados obtidos sobre a variação da luminescência com a concentração de H_2O_2 e com os efeitos modificadores de ácido ascórbico e ácido úrico possibilitaram a formulação da proposta para utilizar a reação quimiluminescente para fins analíticos. Os estudos com o ácido ascórbico resultaram na apresentação de trabalho na 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química em 2000 (FERREIRA & ROSSI, 2000).

Posteriormente, foi montado um sistema de detecção constituído por fotomultiplicadora acoplada ao monocromador e controlado por microcomputador. Este sistema permitiu o monitoramento da luminescência com maior velocidade de resposta e possibilitou selecionar faixas menores de comprimento de onda (± 1 nm) para as medidas. Assim, foi possível reavaliar e confirmar resultados obtidos com o espectrofotômetro. Com estes resultados, foi apresentado um trabalho na 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química em maio de 2001.

Por fim, o método cinético para determinação de agentes redutores (ácido ascórbico e ácido úrico) com técnica quimiluminescente foi testado com amostras de medicamentos contendo ácido ascórbico. Para comprimidos não efervescentes, os resultados da análise direta com método do tempo fixo podem ser considerados satisfatórios. Para os comprimidos efervescentes, com adição de padrão, o método do tempo fixo também apresentou resultados aceitáveis. Este material foi também apresentado na 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

PERSPECTIVAS

“ Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil [...] e, no
entanto, é a coisa mais preciosa que temos”

Albert Einstein (1879-1955)

CAPÍTULO 14:
PERSPECTIVAS DE APLICAÇÃO DE REAÇÕES
QUIMILUMINESCENTES

Atualmente, a aplicação analítica de técnicas quimiluminescentes vem se destacando devido à sensibilidade obtida e as inúmeras espécies que interagem com a quimiluminescência e podem ser analisadas. Além disso, o baixo custo e a simplicidade dos equipamentos necessários para construir um sistema de detecção, como luminômetros, biossensores e outros fotossensores, fazem com que o estudo da quimiluminescência seja interessante para Química Analítica.

Por outro lado, a interação nas reações quimiluminescentes de várias espécies mostra a pouca seletividade desta técnica. Além disso, outra desvantagem é baixa reprodutibilidade durante as medidas quimiluminescentes já que mudanças na forma de adição e mistura dos reagentes podem levar a mudanças na intensidade da luminescência da reação. Devido a estas desvantagens, as perspectivas na utilização da técnica quimiluminescente devem estar ligadas a métodos que aumentem a seletividade e a reprodutibilidade do sistema.

Geralmente, a seletividade da técnica quimiluminescente pode ser aumentada pela associação com técnicas de separação, como CLAE, eletroforese e cromatografia gasosa. Exemplos de aplicações analíticas de técnicas quimiluminescentes com técnicas de separação podem ser encontradas em análise de produtos petrolíferos (NAVAS & JIMÉNEZ, 2000), de produtos agroquímicos (JIMÉNEZ & NAVAS, 1997) e de poluentes gasosos (WARDENCKI & ZYGMUNT, 1991), dentre outras. Além das técnicas de separação, técnicas que utilizam enzimas para determinação de substratos com detecção quimiluminescente também aumentam a seletividade na análise. Exemplos de aplicações de sistemas enzimáticos são largamente encontrados em biossensores (ABOUL-ENEIN, STEFAN, VAN STADEN, 1999) e na união da técnica quimiluminescente com a técnica por injeção em fluxo (SEKINE et al, 1993, PREUSCHOFF et al, 1993, SATO, CHIBA, TANAKA, 1993, KIBA et al, 1998 e ALMUAIBED & TOWNSHEND, 1999).

A reprodutibilidade da técnica quimiluminescente pode ser melhorada pela utilização de técnicas por injeção em fluxo e outras técnicas de injeção que facilitem a adição e da misturas dos reagentes. Muitos métodos quimiluminescentes utilizam a injeção em fluxo para assegurar a reprodutibilidade das medidas. Alguns exemplos de analitos determinados por métodos quimiluminescentes por injeção em fluxo são compostos organo-estânicos (FUJIMAKI et al, 1993), açúcares (Cl et al^a, 1993 e PÉREZ-RUIZ et al, 1999), drogas (ALWARTHAN, AL-TAMRAH, AKEL, 1993 e KUBO et al, 1999), vitaminas (KUBO & TORIBA, 1997 e HE et al, 1999), poluentes (PRICE, WORSFOLD,

MANTOURA, 1994, LAN & MOTTOLA, 1996, e PRICE, MANTOURA, WORSFOLD, 1998), dentre muitos outros.

Provavelmente, as perspectivas de aplicação analítica da técnica quimiluminescente são o desenvolvimento de métodos mais seletivos e reprodutivos por sua associação com técnicas de separação, técnicas por injeção em fluxo e sensores bioquímicos e quimiluminescentes em fase heterogênea (ABOUL-ENEIN et al, 2000).

REFERÊNCIAS

ABOUL-ENEIN, H. Y., STEFAN, R. -I., VAN STADEN, J. F. Chemiluminescence-Based (Bio)Sensors – An Overview. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, v. 29, p. 323-331, 1999.

ABOUL-ENEIN, H. Y. et al. Recent Developments and Applications of Chemiluminescence Sensors. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, v. 30, p. 271-289, 2000.

AGATER, I. B., JEWSBURY, R. A. Direct Chemiluminescence Determination of Ascorbic Acid using Flow Injection Analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 356, p. 289-294, 1997.

ALAPONT, A. G., ZAMORA, L. L., CALATAYUD, J. M. Indirect Determination of Paracetamol in Pharmaceutical Formulations by the Inhibition of the System Luminol- H_2O_2 - $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ Chemiluminescence. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 21, p. 311-317, 1999.

ALBERTIN, R. et al. Quimiluminescência Orgânica: Alguns Experimentos de Demonstração para a Sala de Aula. **Química Nova**, v. 21, p. 772-779, 1998.

ALBRECHT, H. O. Chemiluminescence of Aminophthalic Hydrazide. **Z. Physik Chem.**, v. 135, p. 321-330, 1928.

ALMUAIBED, A. M., TOWNSHEND, A. Flow Injection Chemiluminescence Determination of Ornithine and Sequential Determination of Ornithine and Lysine by using Immobilized Lysine Oxidase. **Anal. Chim. Acta**, v. 388, p. 339-343, 1999.

ALWARTHAN, A. A. Determination of Ascorbic Acid by Flow Injection with Chemiluminescence Detection. **Analyst**, v. 118, p. 639-642, 1993.

ALWARTHAN, A. A., AL-TAMRAH, S. A., AKEL, A. A. Determination of Promethazine by its inhibition of Chemiluminescence of the Luminol- Hydrogen Peroxide-Chromium (III) System. **Anal. Chim. Acta**, v. 282, p. 169-174, 1993.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Arlington: AOAC International, 2 v., v. 2, cap. 45, p. 16-19, 1995.

ARYA, S. P., MAHAJAN, M., JAIN, P. Non-Spectrophotometric Methods for the Determination of Vitamin C. **Anal. Chim. Acta**, v. 417, p.1-14, 2000.

ASSUMPÇÃO, R. M. V., MORITA, T. **Manual de Soluções, Reagentes & Solventes: Padronização, Preparação e Purificação**. São Paulo: Edgar Blücher Ltda., 627p., 1968.

BACCAN, N. et al. **Química Analítica Quantitativa Elementar**. São Paulo: Edgar Blücher Ltda, 259p., 1995

BUSCH, M., POLSTER, J. Automated FIA Demonstrated on Chemiluminometric Lactate Determination using the Software Package FIACRE. **Trends in Anal. Chem.**, v. 11, p. 230-232, 1992.

CAMERON, E., PAULING, L. **Cancer and Vitamin C**. Philadelphia: Camino Books, 278p., 1993.

CAMPBELL, A. K. **Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine**. Chichester: Ellis Horwood Ltd., 345p., 1988.

CARRETERO, A. S. et al. Acquisition of Chemiluminescence Spectral Profiles using a Continuous Flow Manifold with Two Dimensional CCD Detector. **Analyst**, v. 125, p. 387-390, 2000.

CEPAS, J., SILVA, M., PÉREZ-BENDITO, D. Potential of the Continuous Addition of Reagent Techine for Chemiluminescent Reaction-Rate Determinations. **Anal. Chim. Acta**, v. 285, p. 301-308, 1994.

Cl, Y. -X. et al ^a. Catalytic Behaviour of Fe(II)-Oxime Complexes in the Chemiluminescence Reaction of Luminol with H₂O₂. **Anal. Chim. Acta**, v. 277, p. 67-72, 1993.

Cl, Y. -X. et al ^b. Chemiluminescence Investigation of the Interaction of Metalloporphyrins with Nucleic-Acids. **Anal. Chim. Acta**, v. 282, p. 695-701, 1993.

CROUCH, S. R. Trends in Kinetic Methods of Analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 283, p. 453-470, 1993.

CROUCH, S. R., CULLEN, T. F. Kinetic Determinations and Some Kinetic Aspects of Analytical Chemistry. **Anal. Chem.**, v. 70, n° 12, p. 53R-106R, 1998.

CUI, H. et al. Flow Injection Analysis of Tannic Acid with Inhibited Chemiluminescence Detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 362, p. 151-155, 1998.

CUI, H. et al. Flow Injection Analysis of 3,4-Dihydroxybenzoic Acid with Inhibited Chemiluminescence Detection. **Spectr. Spectral Anal.**, v. 19, p. 377-379, 1999.

DAVIES, M. B., AUSTIN, J., PARTRIDGE, D. A. **Vitamin C, Its Chemistry and Biochemistry**. Letchworth: The Royal Society of Chemistry, 154p., 1991.

DE LEENHEER, A. P., LAMBERT, W. E., DE RUYTER, M. G. M. **Modern Chromatographic Analysis of The Vitamins**. New York: Marcel Dekker, Inc., 572p., 1985.

DIAZ, A. N., GARCIA, J. A. G. Non Linear Multicomponent Kinetic-Analysis for the Simultaneous Stopped-Flow Determination of Chemiluminescence Enhancers. **Anal. Chem.**, v. 66, p. 988-993, 1994.

ERIKSEN, T. E., LIND, J., MERÉNYI, G. Chemiluminescence of 5-Aminophthalazine-1,4-dione in the Presence of H_2O_2 . **J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1**, v. 77, p. 2125-2135, 1981.

ESTEVE, M. J. et al. Comparison of Voltametric and High-Performance Liquid-Chromatographic Methods for Ascorbic Acid Determination in Infant Formulas. **Food Chemistry**, v. 52, p. 99-102; 1995.

FAN, J. et al. Flow Injection Kinetic Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid based on an Inhibiting Effect. **Talanta**, v. 50, p. 893-898, 1999.

FARRINGTON, A. M.; JAGOTA, N.; SLATER, J. M. Simple Solid Wire Microdisk Electrodes for the Determination of Vitamin-C in fruit juices. **Analyst**, v. 119, p.233-238, 1994.

FATIBELLO-FILHO, O., VIEIRA, I. C. L-Ascorbic Acid Determination in Pharmaceutical Formulations Using a Biosensor Based on Carbon Paste Modified with Crude Extract of Zucchini (*Cucurbita pepo*). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 11, p. 412-418, 2000.

FENG, M. L., HUANG, Y. W., ZHANG, Z. J. New Chemiluminescence Reaction System for Analysis of Polyhydroxy Compounds – Determination of Uric Acid in Urine. **Acta Chim. Sinica**, v. 55, p. 806-810, 1997.

FERNANDES, J. C. B. et al. Potentiometric Determination of L - Ascorbic Acid in Pharmaceutical Samples by FIA Using a Modified Tubular Electrode. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 11, p. 182-186, 2000.

FERREIRA, E. C., ROSSI, A. V. Estudo Analítico do Ácido Ascórbico como Agente Modificador da Luminescência da Reação do Luminol com H_2O_2 em Meio Alcalino na Presença de Cu^{2+} . In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., Poços de Caldas, **Livro de Resumos**, 3v., v. 3, QA-087, 2000.

FUJIMAKI, T. et al. Chemiluminescence Detection of Organotin Compounds with bis(2,4,6-trichlorophenyl) oxalate by Flow-Injection Analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 282, p. 175-180, 1993.

GAIKWAD, A., SILVA, M., PÉREZ-BENDITO, D. Sensitive Determination of Periodate and Tartaric Acid by Stopped-Flow Chemiluminescence Spectrometry. **Analyst**, v. 119, p.1819-1824, 1994.

GUNDERMANN, K. D., MCCAPRA, F. **Chemiluminescence in Organic Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 271p., 1987.

GUYARD, M. A. ?. **Bull. Soc. Chim. Paris**, v. 25, p. 58-?, 1876.

HAWORTH, W. N., HIRST, E. L. Primary Product of the Synthesis of Ascorbic Acid and its Analogs. **J. Soc. Chem. Ind.**, v. 52, p. 645-?, 1933.

HE, C. et al. Determination of Rutin by Flow Injection with Inhibited Chemiluminescence Detection. **Anal. Lett.**, v. 32, p. 2751-2759, 1999.

HUANG, J. C., ZHANG, C. X., ZHANG, Z. J. Flow Injection Chemiluminescence Determination of Catecholamines. **Chin. Chem. Lett.**, v. 9, p. 843-845, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2 v., v. 1, p. 295, 1976.

IUPAC. Nomenclature, Symbols, Units and their Usage in Spectrochemical Analysis – II: Data Interpretation. **Spectrochim. Acta**, v. 33, p.241-245, 1978.

JIMÉNEZ, A. M., NAVAS, M. J. Chemiluminescent Methods in Agrochemical Analysis. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, v. 27, p. 291-305, 1997.

JEFFERY, G. H. et al. **Vogel, Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 712p., 1992.

KAMIDATE, T. et al. Effects of Metal-Ions on Delayed Chemiluminescence Reaction of Luminol Catalyzed by Copper (II). **Bull. Chem. Soc. Japan**, v. 66, p. 655-657, 1993.

KAMIDATE, T., KUNIYA, I., WATANABE, H. Simultaneous Determination of Cysteine and Glutathione via use of Time Resolved Luminol Chemiluminescence Method. **Chem. Lett.**, v. 12, p. 2049-2052, 1993.

KAMIDATE, T., TANI, T., WATANABE, H. Resolution of Amino Thiols in Time-Resolved Luminol Chemiluminescence Catalyzed by Peroxidases. **Analyt. Scienc.**, v. 14, p. 725-729, 1998.

KELLNER, R. et al. **Analytical Chemistry: the approved text to the FECS curriculum analytical chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 916p., 1998.

KIBA, N. et al. Chemiluminometric Branched Chain Amino Acids Determination with Immobilized Enzymes by Flow-Injection Analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 375, p. 65-70, 1998.

KING, C. G., WAUGH, W. A. Chemical Nature of Vitamin C. **Science**, v. 75, p. 357-358, 1932.

KLOPF, L. L., NIEMAN, T. A. Effect of Fe(II), Co(II), Cu(II), and Mn(II) on the Chemiluminescence of Luminol in the asence of H₂O₂. **Anal. Chem.**, v. 55, p. 1080-1083, 1983.

KUBO, H. et al. Chemiluminescence of β -Lactam Antibiotics based on the Luminol Reaction. **Anal. Chim. Acta**, v. 389, p. 89-94, 1999.

KUBO, H., TORIBA, A.. Chemiluminescence Flow Injection Analysis of Reducing Agents based on the Luminol Reaction. **Anal. Chim. Acta**, v. 353, p. 345-349, 1997.

KULYS, J., D'COSTA, E. J. Printed Eletrochemical Sensor for Ascorbic Acid Determination. **Anal. Chim. Acta**, v. 243, p. 173-178, 1991.

LAN, Z. -H., MOTTOLA, H. A. Determination of CO₂ (g) by Enhancement of Luminol-Co(II)-Phthalocyanine Chemiluminescence: Analysis of Atmospheric Air and Human Breath. **Anal. Chim. Acta**, v. 329, p. 305-310, 1996.

LEBEDEVA, O. V., UGAROVA, N. N. Chemiluminescence Determination of Glucose in Blood-Serum. **J. Anal. Chem.**, v. 50, p. 1017-1020, 1995.

LI, Z., LI, K., TONG, S. Study of the Catalytic Effect of Copper(II)-Protein Complexes on Luminol-H₂O₂ Chemiluminescence Reaction and its Analytical Application. **Anal. Lett.**, v. 32, p. 901-913, 1999.

LIND, J., MERÉNYI, G., ERIKSEN, T. E. Chemi-Luminescence Mechanism of Cyclic Hydrazides such as Luminol in Aqueous Solutions. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 105, p. 7655-7661, 1983.

LJUNGGREN, S., MERÉNYI, G., LIND, J. A plausible Mechanism for the Chemiexcitation of Cyclic Hydrazides – The Double Crossing Model. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 105, p. 7662-7666, 1983.

MACHLIN, L. J. **Handbook of Vitamins**. 2^a ed., New York: Marcel Dekker, Inc., 595p., 1991.

MERÉNYI, G., LIND, J., ERIKSEN, T. E. The Equilibrium Reaction of the Luminol Radical with O₂ and the One-Electron-Reduction Potential of 5-Aminophthalazine-1,4-dione. **J. Phys. Chem.**, v. 88, p. 2320-2323, 1984.

MERÉNYI, G., LIND, J., ERIKSEN, T. E. Nucleophilic-Addition to Diazoquinones-Formation and Breakdown of Tetrahedral Intermediates in Relation to Luminol Chemiluminescence. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 108, p. 7716-7726, 1986.

MERÉNYI, G., LIND, J., ERIKSEN, T. E. Oxidation Potential of Luminol – Is the Autoxidation of Singlet Organic-Molecules an Outer-Sphere Eletron Transfer. **J. Phys. Chem.**, v. 94, p. 748-752, 1990.

MICHL, J. Role of Biradicaloid Geometries in Organic-Photochemistry. **Photochem. Photobiol.**, v. 25, p.141-154, 1977.

MOTTOLA, H. A. **Chemical Analysis: A series of monographs on analytical chemistry and its applications - Kinetics Aspects of Analytical Chemistry.** New York: John Wiley & Sons, Ed.: J. D. Winefordner, 96 v., v. 96, p. 1-2; 24-36, 1988.

NAVAS, M. J., JIMÉNEZ, A. M. Chemiluminescent Methods in Petroleum Products Analysis. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, v. 30, p. 153-162, 2000.

PALAROAN, W. S., BERGATIN JR., J., SEVILLA III, F. Optical Fiber Chemiluminescence Biosensor for Antioxidants based on an Immobilized Luminol / Hematin Reagent Phase. **Anal. Lett.**, v. 33, p. 1797-1810, 2000.

PÉREZ-BENDITO, D., SILVA, M. **Kinetic Methods in Analytical Chemistry.** Chichester: Ellis Horwood Limited, 1988. 330p.

PÉREZ-RUIZ, T. et al. Flow Injection Determination of Lactate based on a Photochemical Reaction using a Photometer and a Cheniluminescence Detection. **Analyst**, v. 124, p. 1517-1521, 1999.

PETERSSON, B. A., HANSEN, E. H., RUZICKA, J. Enzymatic Assay by Flow Injection Analysis with Detection by Chemiluminescence – Determination of Glucose, Creatinine, Free-Cholesterol and Lactic Acid using a Integrated FIA Microconduit. **Anal. Lett.**, v. 19, p. 649-665, 1986.

PREUSCHOFF, F. et al. Chemiluminometric L-Lysine Determination with Immobilized Lysine Oxidase by Flow Injection Analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 280, p. 185-189, 1993.

PRICE, D., WORSFOLD, P. J., MANTOURA, R. F. C. Determination of Hydrogen Peroxide in Sea Water by Flow-Injection Analysis with Chemiluminescence Detection. *Anal. Chim. Acta*, v. 298, p. 121-128, 1994.

PRICE, D., MANTOURA, R. F. C., WORSFOLD, P. J. Shipboard Determination of Hydrogen Peroxide in the Western Mediterranean Sea using Flow-Injection with Chemiluminescence Detection. *Anal. Chim. Acta*, v. 377, p. 145-155, 1998.

RADZISZEWSKI, B. ? *Ber. Chem. Ges.*, v. 10, p. 70-?, 1877.

REICHSTEIN, T., GRÜSSNER, A., OPPENHAUER, R. Synthese der d- und l-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *Helv. Chim. Acta*, v. 16, p. 1019-1033, 1933.

ROBARDS, K. WORSFOLD, P. J. Analytical Applications of Liquid-Phase Chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta*, v. 266, p.147-173, 1992.

ROSSI, A. V., FERREIRA, E. C. Sistema de Injeção Simultânea de Reagentes Líquidos para Monitoramento Cinético com Aplicações Analíticas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 20., Poço de Caldas, **Livro de Resumos**, 1997, 3v., v. 3, ED-47.

ROSSI, A. V., TUBINO, M. The Kinetics and Mechanism of the Reaction of ZINCON, α -[1-(2-hidroxy-5sulfophenyl)-3-phenyl-5-formazane] Benzoic Acid, with Zn^{2+} , Cu^{2+} and $[Zn^{2+} + Cu^{2+}]$ Equimolar Mixtures. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 7, p.161-168, 1996.

ROSSI, A. V., DAVANZO, C. U., TUBINO, M. The Struture of Liquid Water in Aqueous Solutions: A proposed Model from Near and Mid Infrared Spectroscopy. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 7, p.403-410, 1996.

PÉREZ-RUÍZ, T., MARTÍNEZ-LOZANO, C., SANZ, A. Flow-Injection Chemiluminometric Determination of Ascorbic Acid based on its Sensitized Photooxidation. *Anal. Chim. Acta*, v. 308, p. 299-307, 1995.

SALEM, A., SALEM, M. A., GEMEAY, A. H. Kinetics of Heterogeneous Decomposition of H_2O_2 with some Transition Metal Complexes Supported on Silica-Alumina in Aqueous Decomposition. *J. Mol. Catal.*, v. 84, p. 67-75, 1993.

SANDELL, E. B., KOLTHOFF, I. M. Chronometric Catalytic Method fpr the Determination of Micro Quantities of Iodine. *J. Amer. Chem. Soc.*, v. 56, p.1426, 1934.

SATO, K., CHIBA, Y., TANAKA, S. Selective Determination of L-Ascorbic Acid by a Chemiluminescence Method with Ascorbate Oxidase. *Anal. Chim. Acta*, v. 277, p. 61-65, 1993.

SEKINE, Y. et al. Seletive Flow Injection Determination of Methanol in the presence of Ethanol based on a Multienzyme System with Chemiluminescence Detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 280, p. 179-184, 1993.

SKOOG, D. A., LEARY, J. J. **Principles of Instrumental Analysis**. New York: Saunders College Publishing, 4^a ed., 700 p., 1992.

SVIRBELY, J. L., SZENT-GYÖRGYI, A. ? **Biochem. J.**, v. 26, p. 865-?, 1932.

SZEBELLEDY, L., AJTAI, M. Microchemical Estimation of Vanadium by Catalysis of Oxidation Reactions. **Magyar Gyógyszerésztud. Társaság Entesítője**, v. 14, p. 560-577, 1938.

SZEBELLEDY, L., AJTAI, M. Determination of Vanadium by Means of Activated Catalysis. **Mikrochemie**, v. 26, p. 87-94, 1939.

SZENT-GYÖRGYI, A. ? **Biochem. J.**, v. 22, p. 1387-?, 1928.

VOET, D., VOET, J. G. **Biochemistry**. New York: John Wiley & Sons Inc., 2 ed, 1361p., 1995.

VINAS, P., GARCIA, I. L., GIL, J. A. M. Determination of Thiol-Containing Drugs by Chemiluminescence Flow Injection Analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 11, p. 15-20, 1993.

WARDENCKI, W., ZYGMUNT, B. Gas Chromatographic Sulfur-Sensitive Detectors in Environmental Analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 255, p. 1-13, 1991.

WEB OF SCIENCE, 1999. Disponível na internet: <<http://www.webofscience.com>>.

WIEDEMANN, E. Ueber Fluoreszenz und Phosphoreszenz: I. Abhandlung. **Ann. Physik & Chemie**, v. 34, p.446-469, 1888.

WITZ, C., OSMOND, F. ? **Bull. Soc. Chim. Paris**, v. 45, 309-?, 1885.

WORSFOLD, P. J. Chemiluminescence and Bioluminescence – Preface. **Anal. Chim. Acta**, v. 266, p.145, 1992.

XIAO, C. et al. Study of Enhancement Effects in the Chemiluminescence Method for Cr(III) in the ng L⁻¹ Range. **Anal. Chim. Acta**, v. 415, p. 209-219, 2000.

XIE, Y., BAEZA-BAEZA J. J., RAMIS-RAMOS, G. A comparative study of several chemometric methods applied to the treatment of two-way kinetic-spectral data for mixture resolution. **Anal. Chim. Acta**, v. 321, p. 75-95, 1996.

XINRONG, Z. et al. Chemiluminometric Analysis of Captopril – Comparison between Luminol and Rhodamine B – Sensitized Cerium (IV). **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 13, p. 425-429, 1995.

YEBRA-BIURRUN, M. C. Flow Injection Determination Methods of Ascorbic Acid. **Talanta**, v. 52, p. 367-383, 2000.

ZAVERUKHA, O. M., SKOROBATYI, Y. P. Chronometric Determination of Ascorbic Acid by Means of Luminol. **Z. Anal. Khimii**, v. 46, p. 1344-1347, 1991.

ZHANG, Z., QIN, W. Chemiluminescence Flow Sensor for the Determination of Ascorbic Acid with Immobilized Reagents. **Talanta**, v. 43, p. 119-124, 1996.

ZHOU, H. et al. Studies of Decomposition of H_2O_2 over MnO Octahedral Molecular Sieve Materials **J. Catal.**, v. 176, p. 321-328, 1998.