

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Lourival Cardoso de Faria e aprovado pela comissão julgadora.

Campinas, 07 de Julho de 1992.


Dr. Celio Pasquini

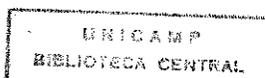
DETERMINAÇÃO CONDUTIMÉTRICA DE NITRATO,
NITRITO, AMÔNIO E URÉIA EM ANÁLISE POR
INJEÇÃO EM FLUXO E CONSTRUÇÃO DE UM
ANALISADOR AUTOMÁTICO.

LOURIVAL CARDOSO DE FARIA

TESE DE DOUTORADO

Orientador: Prof. Dr. CÉLIO PASQUINI

Campinas - 1992



0258126 07

Ao Prof. Dr. Célio Pasquini,
pela orientação amiga
durante os anos.

Aos meus pais e irmãos,
pelo estímulo e apoio.

À Aralice,
Rodrigo e
Daniel.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Célio Pasquini, pela orientação segura e dedicada.
- Aos amigos do Instituto de Química da UNICAMP, pela colaboração e amizade.
- Aos colegas e funcionários do Instituto de Química da UNICAMP, pelo auxílio e cooperação.
- Aos amigos do Departamento de Química e Geociências da UFG, pelo incentivo e companheirismo.
- À Aralice, pela ajuda e compreensão.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior(CAPES), pela bolsa concedida.
- Àqueles que direta ou indiretamente contribuíram neste trabalho.

ÍNDICE

	páginas
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi

CAPÍTULO I

I.1 - INTRODUÇÃO.....	1
I.2 - ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO.....	2
I.2.1 - Elementos Essenciais de um sistema FIA.....	3
I.3 - DETECÇÃO CONDUTIMÉTRICA APLICADA À ANÁLISE EM FLUXO CONTÍNUO,.....	4
I.4 - OBJETIVOS.....	7

CAPÍTULO II

DETERMINAÇÃO CONDUTIMÉTRICA DE FORMAS INORGÂNICAS DE NITROGÊNIO EM ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO.....	8
II.1 - DETERMINAÇÃO DE ÍON AMÔNIO POR ANÁLISE EM FLUXO CONTÍNUO.....	9
II.2 - DETERMINAÇÃO DE ÍONS NITRATO E NITRITO POR ANÁLISE EM FLUXO CONTÍNUO.....	10
II.3 - PARTE EXPERIMENTAL.....	12

II.3.1 - Instrumentos.....	12
II.3.2 - Reagentes, padrões e amostras.....	16
II.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
II.4.1 - Determinação de amônia.....	17
II.4.2 - Determinação de nitrato e nitrito.....	21
II.4.3 - Durabilidade da coluna.....	26
II.4.4 - Reprodutibilidade entre colunas.....	27
II.4.5 - Interferências.....	27
II.4.6 - Precisão e Exatidão.....	30
II.4.7 - Determinação de Nitrogênio Inorgânico total.....	32
II.4.8 - Especificação das Formas Inorgânicas de Nitrogênio.....	36

CAPÍTULO III

DETERMINAÇÃO DE URÉIA EM SORO SANGUÍNEO USANDO UREASE IMOBILIZADA NATURALMENTE EM SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO.....	39
---	----

III.1 - PARTE EXPERIMENTAL.....	42
III.1.1 - Instrumentos.....	42
III.1.2 - Construção da coluna de reação.....	42
III.1.3 - Reagentes, padrões e amostras.....	44
III.2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
III.2.1 - Efeito do pH e Inibidores.....	50
III.2.2 - Durabilidade da coluna.....	54

III.2.3 - Condições para determinação de uréia em
 soro sanguíneo.....55

III.2.4 - Exatidão do método proposto.....57

CAPÍTULO IV

CONSTRUÇÃO DE UM ANALISADOR AUTOMÁTICO DE FLUXO CONTÍNUO.....60

 IV.1 - PARTE EXPERIMENTAL.....64

 IV.1.1 - Dispositivo de introdução da amostra.....64

 IV.1.2 - Adaptação do amostrador.....66

 IV.1.3 - Controlador do Instrumento.....67

 IV.1.4 - Outros Instrumentos e Sistema FIA.....70

 IV.2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....72

CAPÍTULO V

CONCLUSÃO.....76

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFIA.....79

ÍNDICE DAS FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
II.1 - Cella de fluxo para medida condutimétrica.....	13
II.2 - Cella de difusão.....	14
II.3 - Sistema de fluxo para determinação de nitrogênio inorgânico total e amônia em águas naturais.....	15
II.4 - Sinais de calibração e determinação de amônia em em águas naturais.....	19
II.5 - Efeito da concentração do NaOH na redução.....	24
II.6 - Efeito do comprimento da coluna na redução.....	25
II.7 - Sinais de calibração e determinação de nitrogênio inorgânico total.....	35
III.1 - Sistema de fluxo para a determinação de uréia em soro sanguíneo.....	43
III.2 - Sistema de fluxo empregando uma solução de urease livre.....	44
III.3 - Efeito da concentração de NaCl no sinal analítico....	47
III.4 - Efeito da concentração de NaCl no tempo de retorno do sinal analítico.....	48
III.5 - Efeito do comprimento da coluna.....	49
III.6 - Efeito do pH da solução carregadora.....	52
III.7 - Efeito de inibidores no sinal analítico.....	53

III.8 - Sinais de calibração e determinação de uréia em soro sanguíneo.....	56
III.9 - Correlação dos resultados na determinação de uréia...	58
IV.1 - Diagrama do dispositivo de introdução da amostra.....	65
IV.2 - Diagrama do circuito da interface.....	67
IV.3 - Fluxograma do programa de controle do analisador.....	69
IV.4 - Sistema de fluxo para a determinação de Cr(VI).....	71
IV.5 - Sinais de calibração e determinação de Cr(VI).....	74
IV.6 - Sinais de calibração e determinação de amônia.....	75

ÍNDICE DAS TABELAS

TABELA	PÁGINA
II.1 - Resultados comparativos para determinação de nitrato em águas naturais.....	32
II.2 - Resultados comparativos para determinação de espécies inorgânicas de nitrogênio em águas naturais.....	38

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de dois sistemas de Análise por Injeção em Fluxo, que empregam detecção condutimétrica e difusão gasosa, para a determinação de formas inorgânicas de nitrogênio (NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^-) e nitrogênio inorgânico total em águas naturais e uréia em soro sanguíneo. Os sistemas utilizam basicamente dois fluidos: um fluido aceptor constituído de água deionizada que passa continuamente pelo detector, e um fluido doador. Para a determinação das formas inorgânicas de nitrogênio, o fluido doador é definido pela confluência de uma solução reagente de NaOH/EDTA, com água deionizada, na qual a amostra é introduzida. Após a confluência, a amostra passa por uma coluna cheia com zinco granulado, utilizada para reduzir as espécies nitrogenadas, para a forma de íons amônio. Na determinação de uréia, a amostra é introduzida em uma solução de NaCl 1% (m/v) e conduzida através de uma coluna preenchida com pequenos pedaços do feijão *Canavalia gladiata*, que contém a enzima urease imobilizada naturalmente, onde a uréia presente na amostra é hidrolizada. O fluido doador é definido pela confluência desta solução, com uma solução de NaOH/EDTA, logo após a coluna de hidrólise.

A amônia formada nesses dois procedimentos, passa por uma unidade de difusão, onde permeia uma membrana de PTFE, sendo

recebida no fluido aceptor, sofrendo ionização e alterando a condutância da água deionizada. Essa alteração é proporcional a concentração das espécies nitrogenadas presentes na amostra injetada. As influências de alguns parâmetros analíticos, concentrações dos reagentes e interferências foram estudadas. A exatidão foi avaliada, comparando-se os resultados obtidos pelo método proposto e por métodos padrões espectrofotométricos, sendo observada uma boa concordância. Os limites de detecção encontrados para nitrogênio na forma de NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^- , foram respectivamente 5, 20 e 20 ng.ml^{-1} . A velocidade mínima de determinação destas espécies bem como de nitrogênio inorgânico total, foi de 60 determinações por hora.

Além disso, este trabalho mostra o desenvolvimento de um analisador automático para injeção em fluxo. A construção de um módulo automático de introdução de amostra e a adaptação de um amostrador do tipo Technicon, ambos controlados por um sistema mínimo de microcomputador, são descritos. O analisador foi avaliado, empregando-se um sistema de fluxo para a determinação de Cr(VI), com detecção espectrofotométrica, e amônia em águas naturais por condutimetria. Os desvios padrões relativos dos sinais foram menores que $\pm 1\%$, nas duas avaliações. Estes resultados demonstram o bom desempenho do analisador.

ABSTRACT

The present work describes the development of two new Flow Injection Analysis(FIA) systems. Both the systems are fundamentally based on gas diffusion and conductimetric detection and have been used to determine inorganic specimens of nitrogen (NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^-) and total inorganic nitrogen in natural waters and urea in human serum. Two fluid streams were employed: an acceptor stream which uses deionized water passing continuously through the detector cell and a donor stream.

The total inorganic nitrogen was determined by merging the injected sample with an alkaline solution(NaOH/EDTA) and deionized water. The sample is, then, passed through a column which is filled with zinc granules in order to reduce all the nitrogen specimens to ammonia.

The urea samples were introduced in a NaCl 1% stream that carries them through a column filled with small pieces of the bean *Canavalia gladiata*. The bean pieces contain naturally immobilized urease that promotes the hydrolysis of the urea, producing ammonia.

The ammonia produced in both systems described above, passes through a gas diffusion cell and is received for the acceptor stream. The ammonia ionizes causing a change in the

conductance that is proportional to the nitrogen content of the sample.

The flow parameters, reagent concentrations and potential interferences have been studied. The results for both methodologies were compared with those obtained by employing standard spectrophotometric methods with good agreement.

Finally, a Flow Injection automatic analyser is described. The analyser includes a module for sample introduction working together with an adapted auto-sampler from Technicon. The analyser is controlled by a single-board microcomputer and was evaluated for the spectrophotometric determination of Cr(VI) and for conductimetric determination of ammonium in natural waters. The relative standard deviation was 1% or less, showing the good performance of the analyser.

CAPÍTULO I

I.1 - INTRODUÇÃO

Um dos maiores desenvolvimentos alcançados na Química Analítica durante as últimas décadas se deve ao aparecimento de métodos automáticos de análise, que produzem dados analíticos com a mínima intervenção do operador. Inicialmente, estes sistemas foram desenvolvidos para satisfazer as necessidades dos laboratórios clínicos, onde várias espécies são determinadas com propósito de auxiliar o diagnóstico médico. No entanto, alguns instrumentos encontraram também, aplicação em diversas áreas, tais como no controle de processos industriais, na área ambiental, farmacêutica e na agricultura.

O conceito dos métodos automáticos de análises está ligado a substituição das operações realizadas manualmente por um analista, por operações contínuas ou sequenciais, efetuadas sem a intervenção do operador. Este conceito foi introduzido em 1957 por Skeggs⁽¹⁾, ao descrever o primeiro sistema de análises segmentado por bolhas de ar, em fluxo contínuo, constituindo o primeiro passo significativo no desenvolvimento dos métodos automáticos. O primeiro instrumento automático de fluxo contínuo comercializado, o Auto-Analyzer, fabricado pela Technicon

Instruments Co., surgiu a partir deste conceito.

Em 1975, Ruzicka e Hansen⁽²⁾ introduziram um novo conceito de automação em fluxo contínuo que levou à construção de analisadores com desempenho igual ou melhor que o anterior, mas que resultou em instrumentos mais simples e de menor custo. Estes sistemas são de fácil construção e apresentam baixo consumo de amostras e reagentes, pequeno custo operacional, grande versatilidade, apresentando precisão e exatidão comparáveis às dos métodos convencionais. A denominação mais comumente adotada para esta metodologia de automação é: Análise por Injeção em Fluxo (FIA)*, embora a terminologia simplificada, Injeção em Fluxo (FI)** , tenha sido recentemente adotada em diversos periódicos especializados internacionais.

I.2 - ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO

A técnica de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) surgiu em 1975, e seu conceito está baseado na injeção ou inserção de uma amostra líquida em um fluido carregador não segmentado por bolhas de ar.

* Do inglês: Flow Injection Analysis (FIA)

** Do inglês: Flow Injection (FI)

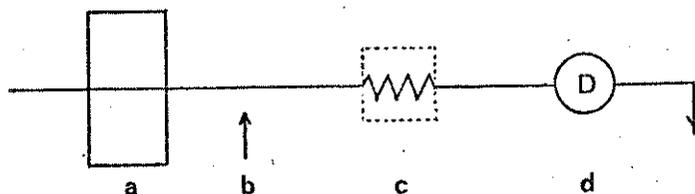
A técnica FIA, passou por um rápido desenvolvimento, desde a sua introdução, e hoje está sendo utilizada em um grande número de laboratórios analíticos, envolvidos com determinações químicas de rotina.

Diversos tipos de detecção têm sido utilizados com a técnica FIA⁽³⁻⁶⁾, bem como algumas etapas de separação e transformações analíticas⁽⁷⁻⁹⁾.

O grande número de publicações utilizando a técnica FIA, mostra sua grande aceitação pelos químicos analíticos. Detalhes do potencial analítico dos sistemas FIA podem ser obtidos em artigos de revisão⁽¹⁰⁻¹²⁾ e em duas monografias⁽¹³⁻¹⁴⁾.

I.2.1 - Elementos Essenciais de um Sistema FIA

Um sistema básico de Análise por Injeção em Fluxo, como mostrado abaixo, consta das seguintes partes:



- Diagrama de um sistema FIA em linha única.

a) Uma unidade propulsora que estabelece uma vazão controlada dos fluidos utilizados. Tal unidade é constituída comumente de uma

bomba peristáltica. Um sistema de pressão gasosa ou simplesmente a força da gravidade podem ser também empregados, desde que um controle mais rigoroso seja estabelecido com o objetivo de manter as vazões constantes.

b) Um dispositivo que permite inserir no fluido carregador, sem interrupção da sua vazão, um volume reproduzível da amostra.

c) Um módulo de pré-tratamento da amostra, comumente chamado de reator, onde se dá o transporte dos fluidos, e a mistura dos reagentes com as amostras. Este pode ser constituído de um tubo de material inerte, reto ou em forma de serpentina ou bobina. Este módulo pode incluir, também, câmaras de separação de fases para extração com solventes, enzimas imobilizadas, membranas de diálises, etc..

d) Uma cela de fluxo na qual é efetuada a detecção, incorporada a um instrumento de medida, o qual produz um sinal elétrico transiente que é transferido a um registrador potenciométrico ou a um microcomputador.

I.3 - DETECÇÃO CONDUTIMÉTRICA APLICADA À ANÁLISE EM FLUXO CONTÍNUO

Um dos pontos atrativos das técnicas de fluxo contínuo é

a facilidade com a qual elas podem acomodar diferentes tipos de detectores. A maioria destes sistemas de detecção têm sido investigados e os resultados obtidos são satisfatórios em quase todos os casos⁽¹³⁻¹⁴⁾.

O uso de detectores condutimétricos em Química Analítica é geralmente preterido em relação a outros detectores eletroquímicos e espectrofotométricos em razão, principalmente, da sua falta de seletividade. No entanto, estes detectores apresentam excelente sensibilidade e podem ser construídos com equipamentos e material simples e de baixo custo. Normalmente, alguns processos devem ser acoplados aos sistemas de fluxo com detecção condutimétrica, para se obter a necessária seletividade. Uma unidade de difusão gasosa pode ser utilizada para este propósito, permitindo uma transferência eficiente e rápida de uma espécie molecular volátil de um fluido doador, a um outro acceptor. Com essa finalidade, Carlson utilizou tubos de silicone⁽¹⁵⁾ de pequeno diâmetro e tubos de PTFE⁽¹⁶⁾ porosos para transferir a amônia de sua matriz, para um fluido de água deionizada, no qual ela se ioniza, sendo quantificada por condutimetria. Este método é bastante simples por não utilizar reações químicas complexas e por apresentar menor número de fontes de interferências do que o método colorimétrico⁽²²⁾. Entretanto, as medidas obtidas por Carlson estão baseadas no princípio do estado estacionário, incorporando limitações que

diminuem a frequência de determinações, aumentando o consumo de reagentes e o volume de amostra necessário a uma determinação.

Para a associação FIA-condutimetria, tem-se construído diversas celas, para estudos de dispersão⁽¹⁷⁾ e determinação de viscosidade⁽¹⁸⁾ de soluções. No entanto, esses trabalhos não objetivaram quantificar uma espécie química em uma determinada amostra, mas, descrevem somente a aplicação da detecção condutimétrica em estudos como os descritos acima.

Com o objetivo de determinar a concentração de espécies voláteis em solução, um sistema FIA com detecção condutimétrica, foi desenvolvido para a determinação de amônio em digeridos de Kjeldahl⁽¹⁹⁾, águas e solos⁽²⁰⁾, e na monitoração de bio-ensaios, determinando o teor de CO₂ dissolvido, visando a avaliação da toxidez de metais, sedimentos e antibióticos⁽²¹⁾. O sistema FIA básico emprega um fluido carregador que transporta a amostra injetada até a confluência com o fluido reagente. A mistura passa por uma cela de difusão, e as espécies voláteis formadas se difundem por uma membrana de PTFE* e são coletadas em um fluido acceptor de água deionizada, que passa continuamente pelo detector. A variação da condutância originada pela ionização da espécie volátil é proporcional a sua concentração na amostra original.

* - PTFE - Politetrafluoretileno

I.4 - OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi o de estender a aplicação da detecção condutimétrica em análise por injeção em fluxo, para espécies químicas não-voláteis. Essas espécies são transformadas, através de reações químicas apropriadas, em amônia, que permeia uma membrana de PTFE, sendo recebida em um fluido acceptor de água deionizada e determinadas por condutimetria. Desta forma, foram desenvolvidas metodologias para determinação de espécies inorgânicas de nitrogênio (NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^-) e determinação de nitrogênio inorgânico total, tendo sido avaliada a possibilidade de especiação destas formas inorgânicas de nitrogênio.

Além disso, com o uso da mesma técnica, foi desenvolvida uma metodologia para determinação de uréia em soro sanguíneo, utilizando a enzima urease imobilizada naturalmente no feijão *Canavalia gladiata*.

Finalmente, este trabalho descreve a construção de um analisador FIA, que ao realizar as operações de apresentação e introdução de amostras, sem a intervenção do analista, possibilita, a um baixo custo, a automação parcial das metodologias desenvolvidas e de outras baseadas na Análise por Injeção em Fluxo.

CAPÍTULO II

DETERMINAÇÃO CONDUTIMÉTRICA DE FORMAS INORGÂNICAS DE NITROGÊNIO EM ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO.

A determinação do teor de nitrogênio inorgânico total é de grande importância no controle de processos, nas análises clínicas, na monitoração de poluição, na caracterização de alimentos e na agricultura. As principais formas inorgânicas de nitrogênio são os íons amônio, nitrato e nitrito. Segundo a Organização Mundial de Saúde, o teor máximo recomendável para nitratos em água potável é $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, e $0,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ para nitritos⁽²²⁻²³⁾.

A presença de excessos de nitrato e nitrito em águas naturais é responsável direta pela ocorrência de casos de meta-hemoglobina infantil. Os íons nitrato e nitrito são também precursores da formação no organismo humano das nitrosaminas, que são potentes agentes cancerígenos⁽²⁴⁾. O excessivo uso de fertilizantes em agricultura é a causa mais frequente do elevado teor de nitrato em águas naturais. Outros fatores que contribuem com o alto teor de nitrato são a existência de descargas poluidoras, como esgoto domésticos e de resíduos industriais.

II.1 - DETERMINAÇÃO DE ÍON AMÔNIO EM SISTEMAS DE ANÁLISE EM FLUXO CONTÍNUO.

Muitas determinações de íons amônio são necessárias em amostras, nas quais sua concentração se encontra abaixo de $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Vários métodos espectrofotométricos e potenciométricos, empregando as técnicas segmentada ou FIA, têm sido descritos com este propósito. O método mais frequentemente empregado para baixos níveis de concentração é o espectrofotométrico, usando a reação de Berthelot modificada⁽²⁵⁻²⁶⁾. A reação envolve o uso de reagentes instáveis e tóxicos, e sofre de interferências como turbidez e alteração de pH da amostra. Uma solução indicadora ácido-base tem sido usada como fluido aceptor, em sistemas FIA/difusão, para determinações de íons amônio, em concentrações de até $17 \text{ ng}.\text{ml}^{-1}$, mas o efeito interferente do dióxido de carbono precisa ser evitado⁽²⁷⁾.

Com o surgimento dos eletrodos sensíveis a gás⁽²⁸⁾, a determinação do íon amônio tem sido bastante simplificada. Como a medida com este eletrodo é rápida, o tempo requerido para análise é substancialmente reduzido, comparado aos métodos convencionais envolvendo destilação. Dentro desta classe se encontram os eletrodos do tipo "air-gap"⁽²⁾. O procedimento para determinação do íon amônio com os eletrodos sensíveis a este íon é bastante simples, mas a interferência do íon K^+ é muito séria, além do

efeito pronunciado do pH⁽²⁹⁾.

A detecção condutimétrica em um sistema FIA foi recentemente introduzida e aplicada à determinação de íons amônio em amostras submetidas ao procedimento de digestão Kjeldahl⁽¹⁹⁾. O método mostrou precisão e exatidão comparáveis ao procedimento padrão de destilação/titulação, com vantagens adicionais como a baixa suscetibilidade à interferências e uma economia significativa de reagentes, já que somente uma solução de NaOH/EDTA é utilizada⁽¹⁹⁾.

II.2 - DETERMINAÇÃO DE ÍONS NITRATO E NITRITO EM SISTEMAS DE ANÁLISE EM FLUXO CONTÍNUO.

As outras duas principais formas de nitrogênio inorgânico em amostras naturais são nitrato e nitrito. Foi recentemente demonstrado que nitrato e nitrito podem ser reduzidos à amônia, em sistema de fluxo contínuo, passando a solução através de uma coluna cheia com zinco metálico⁽¹⁶⁾. Este procedimento tem sido automatizado pelo uso de métodos de estado estacionário, em fluxo contínuo segmentado por ar⁽¹⁶⁾. Métodos alternativos fazem uso da redução do nitrato à nitrito com redutores homogêneos⁽³⁰⁻³¹⁾ ou heterogêneos^(9,32), seguido pela diazotização com sulfanilamida e acoplamento com N - (1 - naftil)

- etilenodiamina.

Quando o parâmetro que se deseja determinar é a concentração de nitrogênio total existente na forma inorgânica (soma de N-NH_4^+ , N-NO_3^- e N-NO_2^-), os métodos espectrofotométricos automáticos podem ser utilizados. No entanto, esta determinação requer dois diferentes conjuntos de reagentes, e a monitoração dos produtos necessita ser feita em dois diferentes comprimentos de onda de detecção, um para a diazotização/acoplamento (543 nm), e outro para a reação de Berthelot (630 nm), na determinação de íon amônio. Um analisador de fluxo contínuo controlado por computador foi usado para essa finalidade, mas, o nitrogênio inorgânico total pode ser encontrado indiretamente, somente após se ter determinado as contribuições dos íons nitrato, nitrito e amônio⁽³³⁾.

O desenvolvimento de um método FIA-condutimétrico, empregando somente um reagente, em um único sistema de fluxo e detecção, para a determinação de baixos teores de íons amônio, nitrato e nitrito e nitrogênio inorgânico total é, a seguir, descrito. A possibilidade de uso do sistema FIA proposto na especiação das formas inorgânicas de nitrogênio é também demonstrada.

II.3 - PARTE EXPERIMENTAL

II.3.1 - Instrumentos

Uma bomba peristáltica Ismatec MP13 GJ4, provida de tubos de Tygon, foi utilizada como unidade propulsora dos fluidos. A unidade de comutação utilizada para a introdução das amostras nos sistemas de fluxo é semelhante ao descrito na literatura⁽⁷⁾. Tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno foram usados para a construção do sistema FIA.

Um condutivímetro, modelo B-330 de fabricação Micronal, equipado com uma cela de fluxo como indicada na figura II.1, foi utilizado. Os sinais analíticos foram obtidos usando um registrador potenciométrico Cole-Parmer, modelo 0585.

A cela de difusão mostrada na figura II.2 é feita de duas peças de acrílico apresentando uma ranhura com 0,7 mm de profundidade, 4 mm de largura e 10 cm de comprimento.

A figura II.3 mostra o sistema FIA utilizado para determinação de formas inorgânicas de nitrogênio. Este sistema emprega uma microválvula solenóide de 3 vias (NResearch - 161T031, 12 V, 80 mA), usada para selecionar os caminhos (C_1) ou (C_2). O caminho (C_1) é utilizado para determinação do íon amônio, levando a amostra diretamente para a cela de difusão. O caminho

(C_2), carrega a amostra para a coluna de redução e é utilizado para a determinação de nitrogênio inorgânico total.

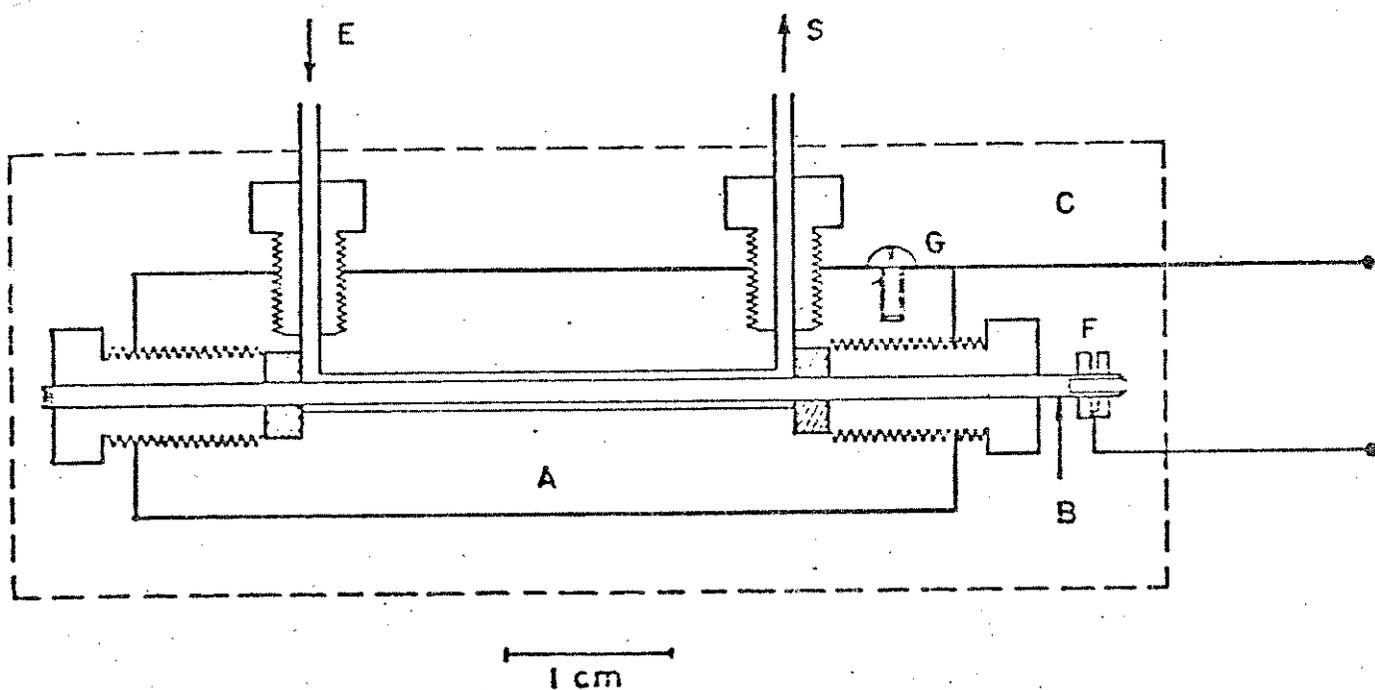
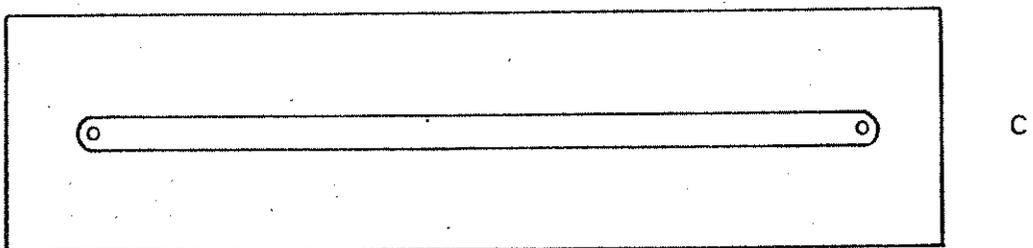
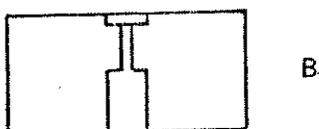
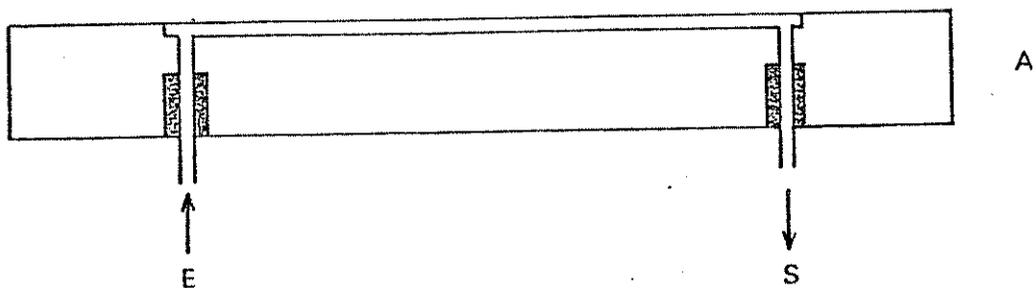


Figura II.1 - Cella de fluxo para medida condutimétrica. A, eletrodo externo. B, eletrodo interno (ambos de aço inoxidável). C, isolamento com resina epóxi. E, entrada do fluido. S, saída da solução. F e G, contatos dos eletrodos.



2 cm

Figura II.2 - Cella de difusão. A e B, corte longitudinal e lateral. C, vista superior. A figura mostra somente uma das partes da cela.

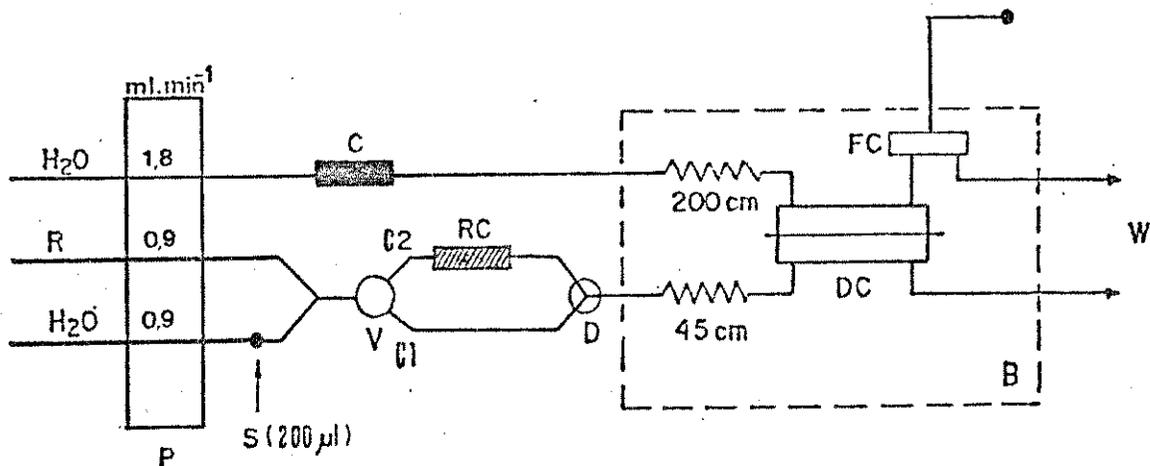


Figura II.3 - Sistema FIA para determinação de nitrogênio inorgânico total e amônia em águas. C, coluna de resina de troca iônica mista; P, bomba peristáltica; DC, cela de difusão; FC, cela de condutância; B, banho de água isolado; R, reagente NaOH/EDTA; V, válvula eletromecânica de três vias; RC, coluna de redução; S, amostragem.

A coluna de redução, mostrada na figura II.3, foi feita de um tubo de Tygon de 2 mm de diâmetro interno, cheia com zinco granulado (20 mesh). Nas extremidades da coluna foi usado algodão, para reter o zinco no seu interior. Antes de usar esta coluna, uma solução aquosa de CuSO_4 0,1 M foi injetada, duas ou

três vezes, usando água como fluido carregador, para ativar a superfície do zinco. A coluna C foi construída como descrito anteriormente⁽¹⁹⁾ e usada para purificação final da água deionizada, removendo no momento da sua utilização, os íons ainda presente ou espécies nela adsorvidas.

II.3.2 - Reagentes, padrões e amostras

- Soluções reagentes de hidróxido de sódio: essas soluções foram preparadas por diluição de uma solução de NaOH 12M, usando água deionizada previamente fervida.

- Soluções padrão de amônio: essas soluções foram obtidas por diluição de uma solução estoque de $1.000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de N-NH_4^+ , preparada com sulfato de amônio.

- Soluções padrão de nitrato: essas soluções foram obtidas por diluição de uma solução estoque de $1.000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de N-NO_3^- , preparada com nitrato de potássio.

- Soluções padrão de nitrito: essas soluções foram preparadas diariamente de uma solução estoque de $1.000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de N-NO_2^- , preparada com nitrito de sódio. Nesta solução foram

acrescentadas 5 gotas de clorofórmio. A solução foi mantida em refrigerador.

- Solução de ácido sulfanílico 1% (m/v): essa solução foi preparada, dissolvendo-se 1 g de sulfanilamida em 30 ml de ácido acético, e completando-se o volume para 100 ml com água deionizada.

- Zinco metálico (20 mesh): o zinco metálico que forneceu melhores resultados, em relação ao rendimento da redução, foi o comercializado pela Aldrich.

- As amostras de águas foram coletadas em frascos de polietileno e analisadas no mesmo dia.

II.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.4.1 - Determinação de amônia

Os primeiros experimentos foram feitos visando a otimização do sistema de fluxo para a determinação de baixas concentrações de amônia. O caminho C_1 , mostrado no sistema de fluxo da figura II.3, foi selecionado. As vazões foram 3,2

ml.min⁻¹ para o fluido aceptor e 1,6 ml.min⁻¹ para os fluidos reagente e carregador, respectivamente. Como descrito anteriormente⁽¹⁹⁾, a vazão total em ambos os lados da cela de difusão precisa ser igual, para evitar danos à membrana. Reduzindo-se a vazão global do sistema, há um aumento na sensibilidade porém, simultaneamente, é observado um decréscimo na frequência analítica.

Foi observado que os principais fatores instrumentais que afetam a sensibilidade foram o volume da amostra injetado e a área de difusão. A área de difusão foi aumentada de 1,5 cm², usada anteriormente⁽¹⁹⁾, para 4,0 cm² e o efeito do volume da amostra injetado, foi investigado. A modificação da área aumentou a sensibilidade de um fator de três. Um volume de 300 µl foi escolhido para a máxima sensibilidade e um tempo de limpeza aceitável.

Os sinais analíticos foram pouco afetados aumentando-se a concentração de hidróxido de sódio de 0,05 a 0,5 M e pela mudança da concentração de EDTA de 0,1 a 1% (m/v). As concentrações finais foram estabelecidas como NaOH 0,1 M e EDTA 0,5% (m/v).

Essas simples modificações, feitas no sistema de fluxo original⁽¹⁹⁾, permitiram que o limite de detecção para amônia, expresso como sendo a concentração desta espécie suficiente para fornecer um sinal três vezes maior que a razão sinal-ruído, fosse

diminuído para 5 ng.ml^{-1} . Os sinais típicos de calibração são mostrados na figura II.4.

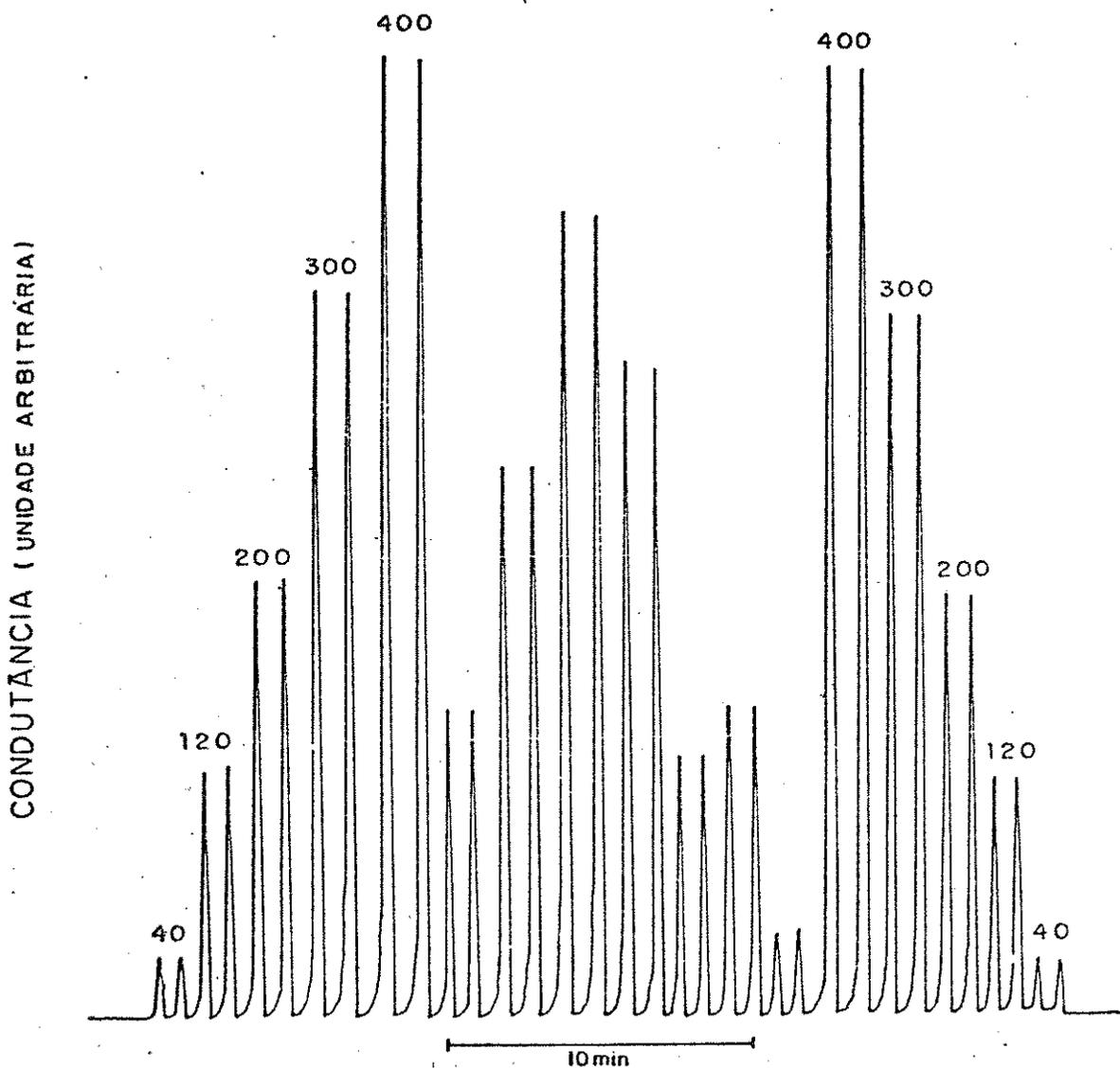


Figura II.4 - Sinais de calibração e determinação de amônia em águas naturais. Os números sobre os sinais são concentrações de padrões de amônia, em ng.ml^{-1} . Todas as medidas foram obtidas em duplicatas.

A relação entre os sinais analíticos e a concentração de amônia da solução foi examinada em detalhe e foi concluído, de dez dados experimentais, que as curvas de calibração são lineares na faixa de 30 à 500 ng.ml⁻¹. Coeficientes de correlação de 0,9996 ou melhores foram observados para todos os conjuntos de dados.

Abaixo do menor limite(30 ng.ml⁻¹), um decréscimo exponencial na sensibilidade foi observado, a medida que a curva se aproxima da origem. O ponto de início deste decréscimo de sensibilidade estabelece a concentração limite inferior da faixa linear de resposta. Este limite é afetado pela temperatura do banho de água, no qual as celas de permeação e detecção estão imersas, uma vez que esta altera a quantidade de amônia que permeia a membrana e a condutância da solução resultante no fluido acceptor⁽¹⁹⁾. A faixa de concentração descrita acima foi obtida com o banho de água à 30 °C.

O desvio padrão relativo da média das alturas dos sinais, obtidos para dez injeções de uma solução padrão de amônia de 200 ng.ml⁻¹, foi 0,8% e até 70 determinações por hora puderam ser processadas.

O sistema FIA foi usado na determinação de amônia em seis amostras de águas naturais e em água destilada exposta ao ambiente do laboratório. As amostras continham amônia na faixa de 40 a 350 ng.ml⁻¹. Os resultados foram comparados com os obtidos

pelo método espectrofotométrico convencional, baseado na reação de Berthelot modificada⁽²²⁾. O resultado de mínimos quadrados mostram a seguinte relação entre os métodos:

$$C_p = (0,66 \pm 0,45) + (0,981 \pm 0,012) C_s$$

onde;

C_p é a concentração de amônia encontrada pelo método proposto e C_s é a mesma pelo método espectrofotométrico. O coeficiente de correlação e a estimativa do erro padrão foram 0,9997 e 3 ng.ml⁻¹, respectivamente. Baseado no critério estabelecido por Eckschlager⁽³⁴⁾, pode-se concluir que não há erros proporcionais ou constantes entre os dois métodos, a um nível de confiança de 95%.

II.4.2 - Determinação de nitrato e nitrito

O sistema descrito na figura II.3 foi avaliado para a determinação de nitrato e nitrito e os resultados iniciais mostraram, que a vazão total através da coluna precisa ser reduzida para melhorar a eficiência da redução. As vazões de 1,8; 0,9 e 0,9 ml.min⁻¹ para o fluido acceptor, reagente e carregador, respectivamente, foram estabelecidas. Como consequência, o número

de amostras que podem ser processadas, sofreu um decréscimo substancial. Para contornar este problema, o volume de amostra foi também reduzido de 300 para 200 μ l, tornando o tempo de limpeza menor, com decréscimo aceitável na sensibilidade.

Com as condições acima, os efeitos das concentrações de NaOH e EDTA e o comprimento da coluna foram estudados, usando soluções padrão de nitrato e nitrito.

Os primeiros experimentos foram feitos para encontrar o efeito da concentração de NaOH na reação de redução. Uma coluna de 10 cm de comprimento, preparada como descrito no item II.3.1, foi empregada nestes estudos preliminares de otimização. Soluções padrão de nitrato e nitrito foram utilizadas e os sinais foram comparados com os obtidos para soluções padrão de amônia, contendo uma quantidade equivalente de nitrogênio. Os resultados são mostrados na figura II.5, onde pode ser notado que rendimentos de conversão à amônia de, aproximadamente 97% para nitrato e 98% para nitrito, foram obtidos, usando-se uma solução de NaOH 1,0 M.

Um aumento adicional no rendimento da redução foi observado com a presença de EDTA na solução de NaOH. Uma redução quantitativa de nitrato e nitrito à amônia foi observada, quando 0,4% (m/v) de EDTA (na forma do sal dissódico) foi adicionado à solução de NaOH 1,0 M. Provavelmente, o EDTA complexa o zinco dissolvido, produzido após a redução, aumentando a velocidade da

reação. Ao mesmo tempo, foi observado que o aumento da concentração de EDTA no reagente alcalino, causa danos à coluna. Pequenas bolhas de gás (hidrogênio) são observadas após 30 minutos de operação, quando uma solução de EDTA 0,6% (m/v), em NaOH 1,0 M foi usada. Diminuindo-se a concentração de NaOH e mantendo-se a concentração de EDTA em 0,6%, observou-se uma degradação considerável da coluna e um volume muito grande de gás foi desprendido. As concentrações dos reagentes foram, então, estabelecidas em: NaOH 1,0 M e EDTA 0,4%, quando uma redução quantitativa de nitrato e nitrito for requerida. Nestas condições, obtém-se uma degradação aceitável da coluna.

O efeito do comprimento da coluna foi, a seguir, investigado. A figura II.6 mostra como isto afeta o rendimento da redução. Uma coluna de 10 cm de comprimento foi selecionada para se obter uma redução quantitativa de nitrato e nitrito na faixa de concentração de interesse.

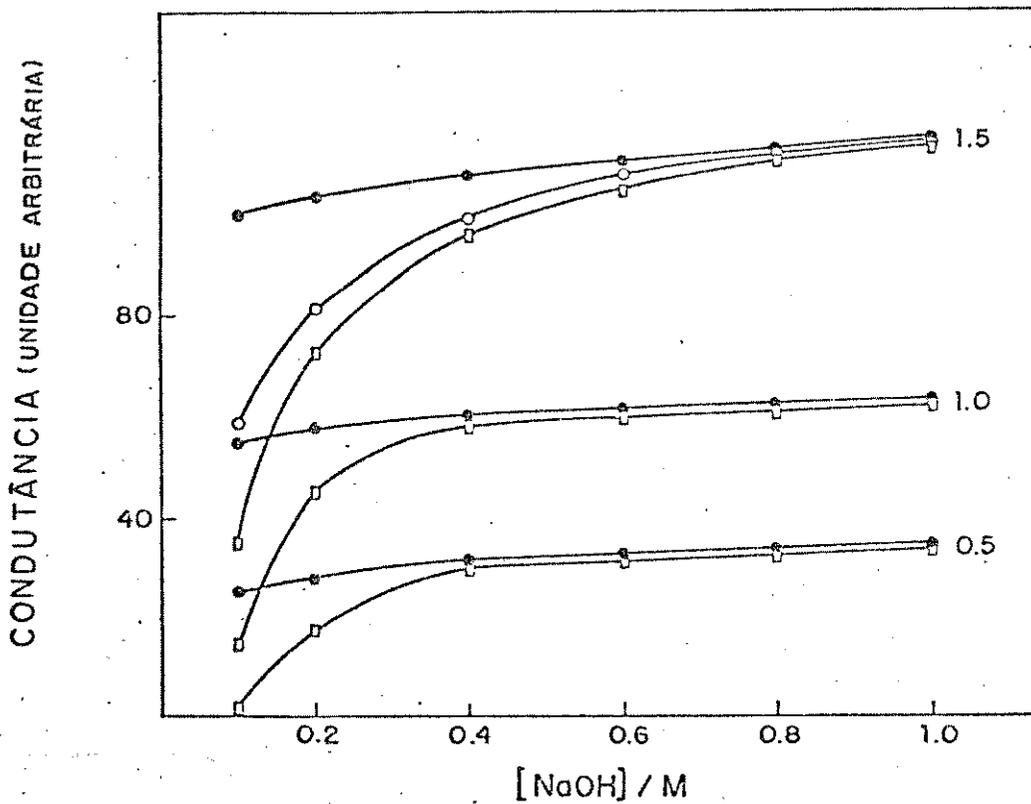


Figura II.5 - Efeito da concentração do NaOH na redução e sinal condutimétrico para várias soluções padrão de nitrogênio na forma de nitrato (□), nitrito (o) e amônia (o). As concentrações estão expressas em $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de nitrogênio, no lado direito de cada curva.

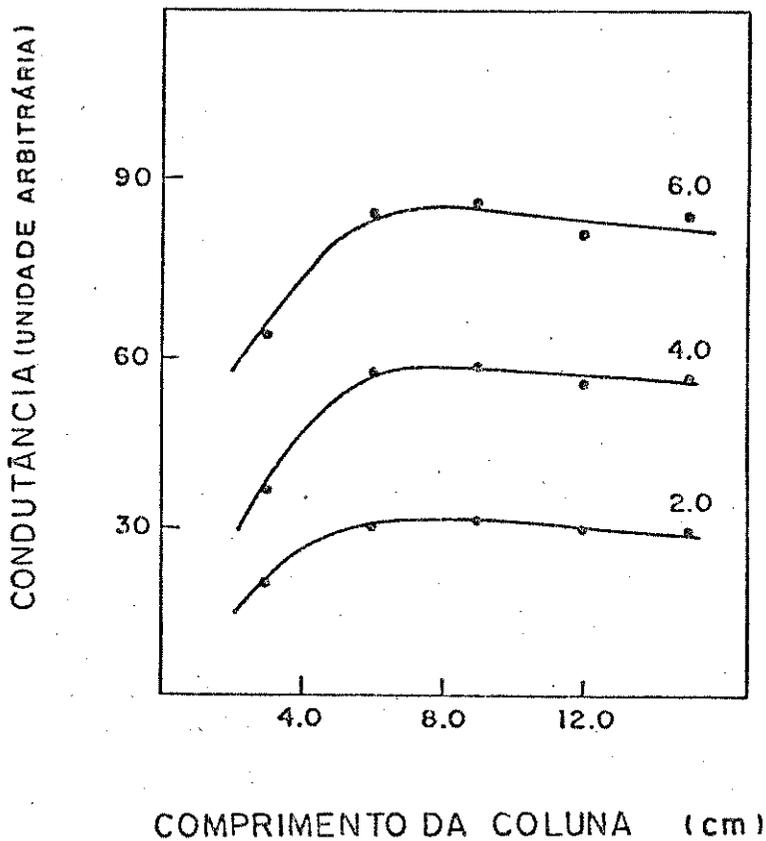


Figura II.6 - Efeito do comprimento da coluna na redução de nitrato à amônia. As concentrações de nitrogênio, expressas em $\mu\text{g.ml}^{-1}$, estão no lado direito de cada curva.

II.4.3 - Durabilidade da coluna

A durabilidade de uma coluna de 10 cm de comprimento, preparada segundo o ítem II.3.1 foi avaliada, usando-se uma solução de nitrato, de concentração de $6,0 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Quando se emprega uma solução de NaOH 1,0 M, contendo EDTA 0,4%, necessária para uma redução quantitativa, até 100 injeções desta solução padrão puderam ser feitas, antes que um decréscimo maior do que 1% na altura do pico do sinal condutimétrico, pudesse ser notado. O uso da solução reagente, composta somente de NaOH 1,0 M, pode aumentar a durabilidade da coluna, e até 200 injeções de uma solução padrão de $6,0 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de nitrato podem, neste caso, serem feitas, antes de qualquer degradação significativa ser observada. O uso da solução de NaOH, sem a presença de EDTA, pode, no entanto predispor a metodologia a interferências provenientes da existência de espécies que precipitam em meio alcalino, o que causaria, pelo menos, o bloqueio da coluna de redução. Quando um decréscimo no rendimento da redução é observado, a solução reagente é trocada por água deionizada e duas injeções da solução de CuSO_4 0,1 M são feitas, para restaurar a redução quantitativa. Considerou-se, portanto, que a durabilidade da coluna é adequada ao seu uso em determinações rotineiras de nitrato e nitrito.

II.4.4 - Reprodutibilidade entre colunas

A reprodutibilidade entre colunas foi primeiramente investigada, em função do zinco metálico usado. Discrepâncias significativas foram observadas entre colunas de 10 cm de comprimento, cheias com zinco metálico de diferentes fontes. Alguns dos lotes de diversos fabricantes testados, mostraram uma fraca capacidade de redução (menor que 50%), e a concentração de EDTA precisou ser aumentada para se obter uma redução quantitativa. A degradação da coluna é então mais acentuada e o número de amostras que podem ser processadas é reduzido. Os melhores resultados foram obtidos empregando-se um zinco metálico de 20 mesh de granulação, comercializado pela Aldrich.

Quatro colunas de 10 cm de comprimento cheias com este zinco mostraram menos que 2% de alteração da altura de pico, para uma solução padrão de $1,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de N-NO_3^- . A redução foi quantitativa para todas as colunas testadas e pequenas diferenças observadas foram atribuídas a pequenas alterações da dispersão da amostra injetada.

II.4.5 - Interferências

A determinação de amônia pode sofrer interferência de

outras aminas voláteis. A presença de metilamina, etilamina, dietilamina e trietilamina causa um aumento significativo no sinal analítico. Entretanto, é improvável a presença dessas espécies em águas naturais.

A presença de Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , SiO_4^{2-} , Zn(II) e Ca(II) , em concentrações de até $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$, Cu(II) a $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ e Cr(III) e Fe(III) a $0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$, em uma solução padrão de $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de nitrato, não causa qualquer interferência significativa no procedimento de redução ou na determinação direta de amônia.

Entretanto, a presença de íons Fe(III) e Cr(III) em concentrações acima de $0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$, afeta a coluna de redução de modo irreversível. Uma investigação detalhada do efeito dos íons Fe(III) foi efetuada, uma vez que esta espécie é a mais provável de ser encontrada em amostras de águas naturais. Observou-se que após a injeção de uma solução padrão contendo $3,0 \mu\text{g.ml}^{-1}$ do íon Fe(III) , há uma grande produção de gás hidrogênio. O volume de gás produzido pode afetar a reprodutibilidade dos sinais e a estabilidade da linha base, quando o hidrogênio permeia a membrana e passa pela cela de detecção. Foi observado que a excessiva produção de gás é causada pela presença do EDTA na solução reagente. Removendo-se o EDTA desta solução a produção de hidrogênio é eliminada, mas o rendimento da redução de nitrato e nitrito à amônia, é também reduzido.

Para as soluções contendo grande quantidade de íons Fe(III), um tratamento com hidróxido de sódio, seguido por filtração, foi avaliado. O procedimento para remoção de Fe(III) consistiu na adição de 1,0 ml de uma solução 5,0 M de NaOH na amostra, presente em um frasco volumétrico de 100 ml. O ferro foi então precipitado como hidróxido. Uma agitação suave foi aplicada ao frasco fechado que foi, a seguir, deixado em repouso para ocorrer a deposição do precipitado. A solução sobrenadante foi aspirada diretamente do frasco para o módulo de amostragem, usando algodão na extremidade do tubo para não arrastar o precipitado para o sistema de fluxo.

Quando uma grande quantidade de Fe(III) está presente na amostra, um pequeno efeito na exatidão (máximo de -2%) é esperado porque o procedimento empregado para remover essa interferência afeta a solução padrão de amônia (na qual também foi adicionado a solução 5 M de NaOH), usada para calibrar o sistema, de modo diferente que para as soluções de nitrato e nitrito. Se a forma de nitrogênio predominante na amostra for conhecida, pode-se minimizar este efeito. As soluções padrão para calibração podem, então, ser preparadas com esta forma e submetidas ao mesmo tratamento das amostras.

Esse tratamento aumentou em 3% o sinal condutimétrico obtido, para uma solução em $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de N-NH_4^+ , contendo $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de Fe(III), em relação ao sinal obtido para a mesma

solução padrão na ausência de Fe(III) e não submetida ao tratamento com NaOH. Soluções padrão contendo $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de Fe(III) e $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de N-NO_3^- , N-NO_2^- , bem como a mistura de ambos em várias proporções, também mostraram um pequeno aumento (1-2%) no sinal condutimétrico, após realizado tratamento com hidróxido.

II.4.6 - Precisão e Exatidão

A faixa linear de calibração para N-NO_3^- e N-NO_2^- foi de 0,2 a $1,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, com coeficiente de correlação de 0,9997. A precisão, expressa como o desvio padrão relativo dos sinais obtidos com soluções padrão contendo $0,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de N-NO_3^- e N-NO_2^- injetados dez vezes, foram 0,8 e 0,5%, respectivamente. O limite de detecção para nitrogênio presente na forma de ambas as espécies, foi estimado em $20 \text{ ng}.\text{ml}^{-1}$. Aproximadamente, 60 determinações podem ser processadas por hora.

Para avaliar a exatidão do procedimento de redução, para a determinação de nitrogênio, doze amostras de águas minerais foram analisadas para nitrato, usando o método proposto e o método espectrofotométrico padrão envolvendo a redução de nitrato a nitrito em uma coluna de cádmio, seguido por diazotização com sulfanilamida e acoplamento com N-(1-naftil)etilenodiamina⁽²²⁾.

A tabela II.1 relaciona os resultados obtidos para determinação de nitrato em águas naturais. Soluções padrão de nitrato foram usadas para calibrar o sistema. As amostras continham nitrato na faixa de 1 a 6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. A análise de mínimos quadrados mostrou a seguinte relação entre os métodos:

$$C_p = (0,04 \pm 0,91) + (1,001 \pm 0,023) C_s$$

onde,

C_p é a concentração de nitrato, em $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, encontrada pelo método condutimétrico e C_s é a mesma pelo método espectrofotométrico. O coeficiente de correlação e a estimativa do erro padrão foram, 0,9984 e 0,095 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, respectivamente. Nenhum erro proporcional ou constante foi detectado entre os métodos, a um nível de 95% de confiança⁽³⁴⁾. Deve-se salientar que, embora os resultados tenham sido expressos como o teor de nitrato nas amostras, qualquer outra espécie presente, possível de ser convertida à amônia foi, neste caso, avaliada como sendo nitrato. No entanto, testes colorimétricos realizados com a reação de diazotação/acoplamento revelaram que o teor de NO_2^- está abaixo do limite de detecção desta reação⁽²²⁾. Também, o teor de amônia nas amostras é desprezível. Nenhum sinal foi observado empregando-se a metodologia condutimétrica descrita no item II.4.1.

Tabela II.1 - Resultados comparativos para determinação de nitrato em águas naturais, obtidos pelo método FIA-condutimétrico e pelo método espectrofotométrico convencional⁽²²⁾.

Amostras	Concentração de Nitrato ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)	
	Método FIA-condutimétrico	Método Convencional
1	4,21	4,19
2	3,68	3,70
3	2,10	1,96
4	1,20	1,17
5	2,69	2,70
6	1,70	1,67
7	4,10	4,08
8	5,65	5,70
9	2,33	2,29
10	5,71	5,68
11	3,27	3,31
12	2,80	2,69

II.4.7 - Determinação de Nitrogênio Inorgânico total

Para a determinação de nitrogênio inorgânico total, quando uma redução quantitativa for observada, soluções padrão de amônio podem ser usadas para calibrar o sistema. A solução reagente adequada é NaOH 1,0 M contendo EDTA 0,4% (m/v). A figura II.7 mostra que o fato dos íons nitrato e nitrito serem reduzidos

pela coluna, não afeta a dispersão global da amostra uma vez que, quando o rendimento é quantitativo, as alturas dos sinais de calibração para as soluções contendo $1,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de N-NH_4^+ (sinais a), N-NO_3^- (sinais d) e N-NO_2^- (sinais e), são iguais.

A exatidão do procedimento de determinação de nitrogênio inorgânico total foi estabelecida, comparando as alturas dos picos, obtidos para três soluções padrão contendo $1,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de N-NO_3^- , N-NO_2^- e N-NH_4^+ , injetadas sucessivamente (sinais a, d, e e na figura II.7). Nenhuma diferença significativa nas alturas dos picos foi observada entre os três casos. Também, uma solução preparada, contendo $3,0 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de nitrogênio, como a soma de $1,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de N-NO_3^- e N-NO_2^- (sinais c), fornece o mesmo sinal que uma solução contendo $3,0 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de nitrogênio, preparada somente com íons amônio (sinais b).

Caso a redução quantitativa não seja obtida por algum motivo (uso de zinco de qualidade inferior ou de solução reagente contendo somente NaOH, por exemplo), a determinação de nitrogênio inorgânico total é ainda possível, embora se exija um procedimento mais trabalhoso. Para isto, pode-se avaliar um fator de conversão do sistema, injetando-se sucessivamente, soluções padrão de amônia e nitrato. Soluções de nitrato podem ser empregadas nesta avaliação, uma vez que, de forma geral, esta é a espécie predominante em amostras naturais. O teor de N-NH_4^+ é então obtido empregando-se o procedimento descrito no item

II.4.1. Do sinal condutimétrico, obtido injetando-se novamente a amostra e conduzindo-a através do caminho C_2 da figura II.3, subtrai-se o sinal obtido na determinação de $N-NH_4^+$. O resultado é multiplicado pelo fator de conversão obtido anteriormente. A altura é avaliada na curva padrão de $N-NH_4^+$ para se encontrar a contribuição das formas $N-NO_3^-$ e $N-NO_2^-$. Alternativamente, é possível se construir duas curvas de calibração, uma para $N-NH_4^+$ e outra para $N-NO_3^-$. O sinal obtido passando-se a amostra pelo caminho C_2 é subtraído do sinal obtido para $N-NH_4^+$. O resultado é avaliado diretamente utilizando-se a curva de calibração para $N-NO_3^-$.

De uma forma ou de outra, o procedimento proposto para determinação de nitrogênio inorgânico total apresenta vantagens sobre os métodos espectrofotométricos, uma vez que atinge o mesmo limite de detecção, utiliza somente um reagente estável e um só sistema de detecção simples e de baixo custo. Além disso, o método FIA/condutimétrico é menos susceptível a interferências e aos efeitos de matriz, como a coloração da amostra ou seu pH.

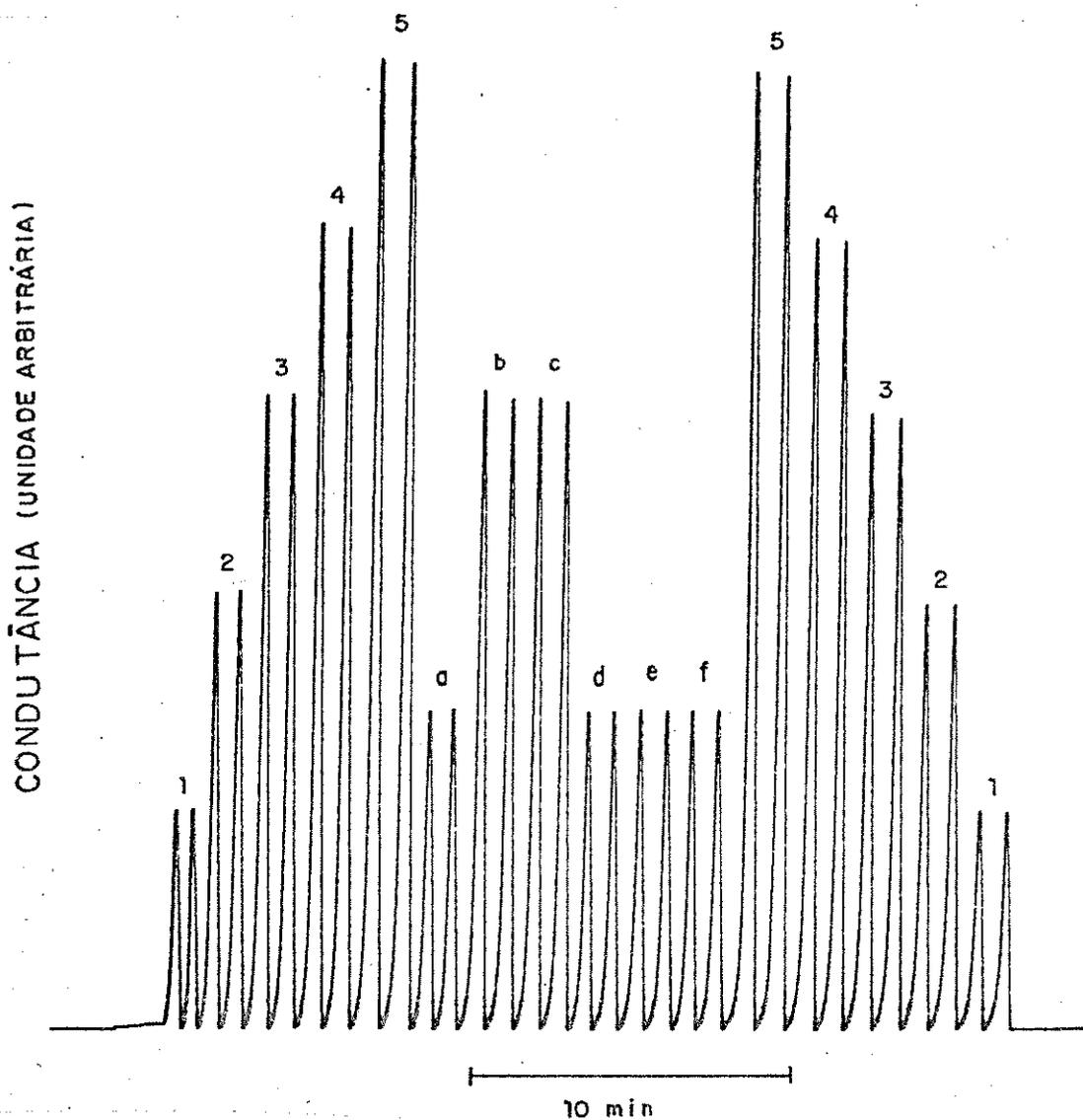


Figura II.7 - Sinais de calibração para determinação de nitrogênio inorgânico total. Os números sobre os sinais, todos em duplicatas, são as concentrações de N-NH_4^+ , em $\mu\text{g.ml}^{-1}$. As letras sobre os sinais se referem a soluções contendo: a, N-NH_4^+ , ($1,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$); b, N-NH_4^+ ($3,0 \mu\text{g.ml}^{-1}$); c, soma de $1,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de N-NO_3^- e $1,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de N-NO_2^- ; d, N-NO_3^- ($1,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$); e, N-NO_2^- ($1,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$); f, N-NO_3^- ($1,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$) mais N-NO_2^- ($1,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$), após adição de ácido sulfanílico.

II.4.8 - Especificação das Formas Inorgânicas de Nitrogênio

A especificação de formas inorgânicas de nitrogênio em amostras de águas naturais é de grande interesse em química ambiental. Embora o método até aqui descrito tenha como objetivo principal a determinação de nitrogênio total, simples modificações podem ser empregadas para possibilitar a especificação das formas inorgânicas de nitrogênio. A mesma composição da solução reagente, como descrita para a determinação de nitrogênio inorgânico total, pode ser usada para a determinação das três formas inorgânicas de nitrogênio.

O caminho (C₁) do sistema FIA da figura II.3 pode ser selecionado, para a determinação de amônio. Na determinação de amônio mais nitrato, o efeito do nitrito pode ser evitado pela adição de ácido sulfanílico na amostra. Os resultados mostraram uma remoção completa de $1,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de N-NO_2^- presente na amostra junto com $1,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de N-NO_3^- , 45 minutos após a adição de 1,0 ml de uma solução de ácido sulfanílico 1% (m/v), em ácido acético 30% (v/v), para 100 ml da amostra. Como o sinal para o nitrato não é afetado, sua concentração pode ser encontrada após ter sido obtida a concentração de amônio, usando o procedimento sugerido anteriormente no item II.4.1. A eficiência deste procedimento pode ser constatado observando-se o pelo pico f da figura II-7. A passagem da amostra original através da coluna, em outra

determinação, pode ser usada para encontrar, por diferença, a concentração de nitrito. O caminho da microválvula ao ponto D na figura II.3 precisa ser estabelecido, de forma a causar a mesma dispersão que a coluna, evitando a necessidade da construção de duas curvas de calibração.

A tabela II.2 apresenta os resultados obtidos para a determinação de espécies inorgânicas de nitrogênio (amônia e nitrato), em amostras de águas coletadas na entrada e na saída da lagoa do Taquaral, em Campinas - SP. Os resultados foram comparados com os métodos padrões espectrofotométricos para amônio⁽²²⁾ e nitrato⁽²²⁾. Também nestas amostras, os teores de NO_2^- se encontraram abaixo dos limites de detecção da técnica espectrofotométrica convencional e da condutimétrica aqui proposta.

A principal desvantagem do método de especiação das formas inorgânicas de nitrogênio, aqui proposto, é a sua ineficiência ao determinar a concentração de íons nitrito, quando outras formas inorgânicas (NH_4^+ e NO_3^-) estão presentes em concentrações mais elevadas, o que é comum em amostras de águas naturais. Esta ineficiência provém do fato de que se torna difícil observar a diferença de sinal analítico obtida, quando os teores de amônia e nitrato são muito maiores que o teor de nitrito presente na amostra. Mesmo assim, a sensibilidade encontrada para a determinação de nitrito é comparável a de

outros sistemas FIA-espectrofotométricos⁽³¹⁻³²⁾. Por outro lado, o uso de somente um reagente estável e não tóxico e a redução quantitativa encontrada no método proposto, constituem duas vantagens sobre os outros métodos⁽²²⁾. A sensibilidade para a determinação de íons nitrito pode ser melhorada, aumentando-se o volume de amostra injetado e diminuindo-se a vazão global do sistema, com conseqüente decréscimo na velocidade analítica.

Tabela II.2 - Resultados comparativos, obtidos para a determinação de espécies inorgânicas de nitrogênio em águas naturais. As concentrações estão expressas em $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de nitrogênio.

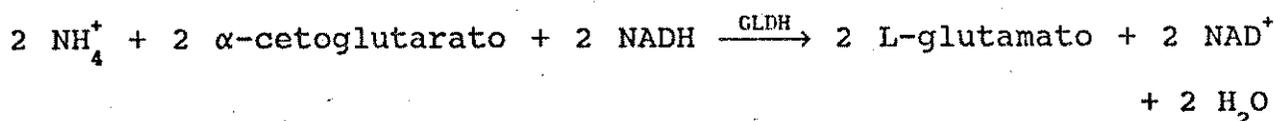
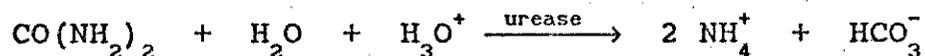
Amostras	FIA-condutimétrico			Método Convencional		
	NH ₃	NO ₃ ⁻	N _t	NH ₃	NO ₃ ⁻	N _t
1	0,88	0,80	1,68	0,91	0,74	1,65
2	0,41	0,92	1,33	0,44	0,90	1,34
3	0,50	0,86	1,36	0,39	0,91	1,30
4	0,84	0,60	1,44	0,81	0,63	1,44
5	3,90	4,85	8,75	3,69	5,01	8,70
6	3,41	5,20	8,61	3,38	4,99	8,37
7	3,74	2,39	6,13	3,90	2,70	6,60
8	2,73	3,98	6,72	2,75	4,20	6,95

CAPÍTULO III

DETERMINAÇÃO DE URÉIA EM SORO SANGUÍNEO USANDO UREASE IMOBILIZADA NATURALMENTE EM SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO.

A determinação de uréia em soro sanguíneo é utilizada com frequência em laboratórios de análises clínicas, para auxiliar em diagnósticos relacionados ao funcionamento dos rins. A uréia é formada no fígado e é o produto final do metabolismo do nitrogênio. Frequentemente, em moléstias como hepatite, a capacidade do fígado em formar uréia é prejudicada, resultando em baixo teor de uréia e alta concentração de amônia no sangue. No caso de debilitação renal, o paciente é incapaz de excretar uréia e, como consequência uma alta concentração de uréia aparece no fluido sanguíneo⁽³⁵⁾.

O método mais frequentemente utilizado nos laboratórios clínicos é o método enzimático-espectrofotométrico onde, a uréia é transformada enzimaticamente, de acordo com as seguintes reações:



O decréscimo na concentração de NADH é monitorado na região do ultravioleta⁽³⁶⁾.

Vários trabalhos descrevendo processos de imobilização artificial de urease, e construção de sensores para uréia foram apresentados nas últimas décadas⁽³⁷⁻⁴⁰⁾. Outros trabalhos mostram o desenvolvimento de diferentes eletrodos enzimáticos⁽⁴¹⁻⁴⁶⁾ para diversos substratos. No entanto, o eletrodo de uréia tem sido mais frequentemente investigado⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾. A razão para este interesse particular não está somente na importância da determinação de uréia em soro sanguíneo e sim, porque isto pode servir como um modelo para o desenvolvimento de métodos para determinação de outros compostos contendo nitrogênio⁽⁵¹⁾.

A imobilização artificial de enzimas tem sido apontada como um procedimento adequado para incorporar reações bioquímicas em análise por injeção em fluxo⁽⁵²⁻⁵³⁾. Recentemente, porém, tem sido demonstrado que, algumas vezes, é possível fazer uso de material contendo uma enzima imobilizada naturalmente dentro das células vegetais, na construção de biosensores. Wang e Lin⁽⁵⁴⁾ descreveram um biosensor que foi desenvolvido, usando a ocorrência natural de polifenol oxidase em banana como uma fonte de enzima, na determinação de dopamina. Tecidos de plantas também tem sido usados na construção de sensores eletroquímicos para glutamato⁽⁵⁵⁾, fosfato e fluoreto⁽⁵⁶⁾ e tirosina⁽⁵⁷⁾. Um pó, obtido da vagem do feijão *Canavalia ensiformis* foi usado na

construção de um biosensor potenciométrico para uréia⁽⁵⁸⁻⁵⁹⁾, e os resultados foram muito bons em termos de estabilidade e limite de detecção.

O uso de enzimas imobilizadas naturalmente é bastante atrativo, porque nenhum processo de imobilização é requerido. Por outro lado, a enzima deve apresentar atividade suficiente, e as condições nas quais a determinação é feita devem permitir um transporte rápido do substrato para o interior da célula e dos produtos para serem detectados do lado de fora da membrana celular. A difusão através da membrana celular é, em relação a outros, o fator limitante da velocidade de determinação para um sistema FIA que faz uso de imobilização natural, uma vez que a amostra, permanece em contato com o material que contém a enzima, por poucos segundos.

Um sistema condutimétrico foi previamente descrito para a determinação de uréia em soro sanguíneo e urina, empregando a metodologia FIA e a enzima urease artificialmente imobilizada⁽⁶⁰⁾. Cerca de 20 amostras por hora puderam ser analisadas por esta metodologia, que faz uso de instrumental complexo para efetuar a subtração da condutância de fundo, causada pelos demais íons presentes na amostra.

Neste capítulo é descrito um sistema FIA-condutimétrico que utiliza a urease imobilizada naturalmente presente no feijão *Canavalia gladiata*, para determinação de uréia em soro

sanguíneo⁽⁶¹⁾. O íon amônio originado na hidrólise enzimática da uréia é detectado usando a metodologia descrita anteriormente⁽¹⁹⁾.

III.1 - PARTE EXPERIMENTAL

III.1.1 - Instrumentos

Os mesmos instrumentos, cela de fluxo condutimétrica, cela de difusão e membrana de PTFE descritos no ítem II.3.1 foram usados. O sistema de fluxo usado para a determinação de uréia em soro sanguíneo está mostrado na figura III.1. Tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno foram usados na construção do sistema de fluxo.

III.1.2 - Construção da coluna de reação

A coluna C₂ da figura III.1, foi construída usando um tubo de Tygon com 2,5 mm de diâmetro interno. Essa coluna foi preenchida com pequenos pedaços (aproximadamente iguais a cubos com 2 mm de aresta) do feijão *Canavalia gladiata*. Algodão foi usado nas extremidades para reter o feijão dentro da coluna. Uma

coluna de 5 cm de comprimento contém uma massa média de 0,13 g do feijão. A coluna foi condicionada passando por ela uma solução de NaCl 1% (m/v), por 15 minutos.

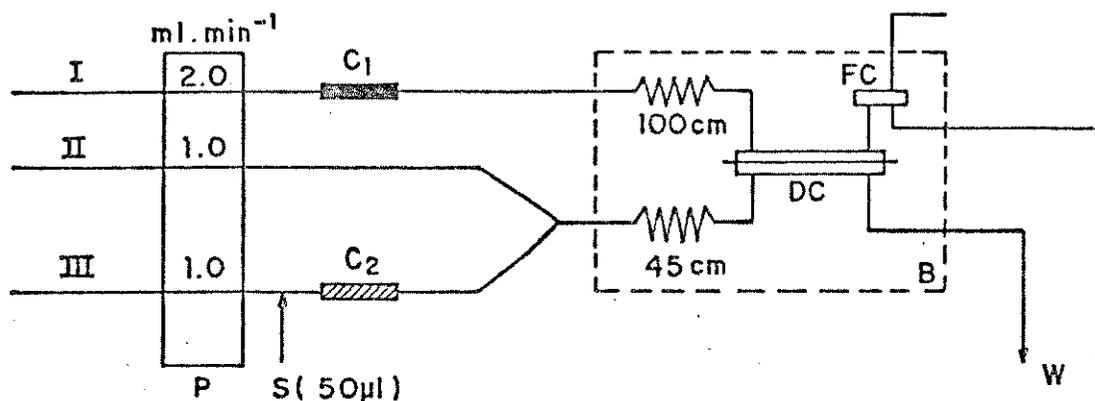


Figura III.1 - Sistema de fluxo para determinação de uréia em soro sanguíneo usando urease imobilizada naturalmente. P, bomba peristáltica; C₁, coluna de resina de troca iônica mista; C₂, coluna com enzima imobilizada naturalmente; DC, cela de difusão; FC, cela de fluxo condutimétrica; B, banho de água termicamente isolado; S, introdução da amostra; W, descarte de soluções; I, água deionizada; II, reagente NaOH/EDTA; III, reagente NaCl.

Para propósito de comparação, foi montado um sistema FIA para se trabalhar com uma solução de enzima livre. Esse sistema está mostrado na figura III.2.

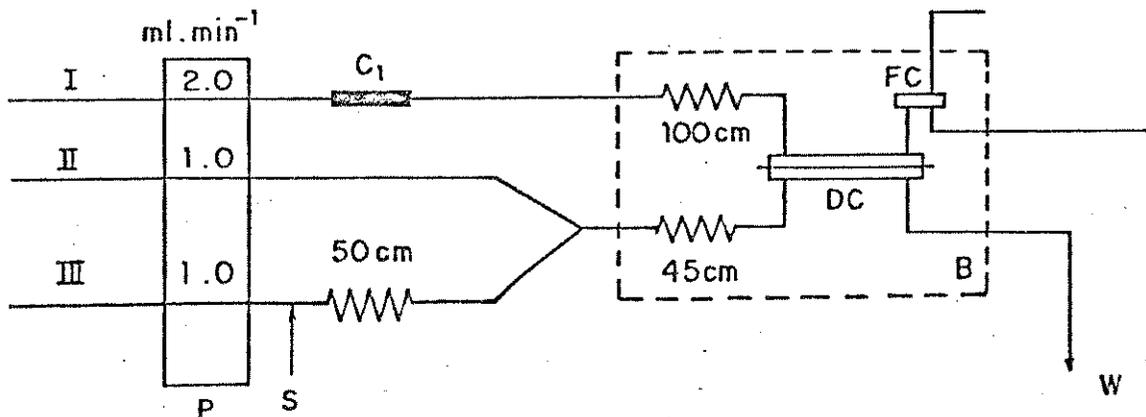


Figura III.2 - Sistema de fluxo empregando uma solução de urease livre. Este sistema é semelhante ao da figura III.1, onde a coluna C_2 foi trocada por uma bobina de reação de 50 cm de comprimento e o fluido carregador é a solução de enzima livre, em NaCl 1% (m/v).

III.1.3 - Reagentes, Padrões e Amostras

- Solução de hidróxido de sódio 0,5 M: esta solução, foi preparada como descrito no item II.3.2. Nesta solução foi adicionado EDTA 0,5% (m/v).

- Solução de NaCl 1% (m/v): esta solução foi preparada diariamente dissolvendo-se 1 g de NaCl em 100 ml de água deionizada.

- As soluções padrão de uréia foram preparadas diariamente por diluição adequada de uma solução estoque 1.000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de uréia.

- A solução de urease livre foi preparada dissolvendo-se 0,30 g da enzima (MERCK - 5 U/mg) em 5 ml de água e completando-se o volume para 500 ml com uma solução de NaCl 1% (m/v). Aliquotas de 20 ml desta solução foram colocadas em um balão volumétrico de 100 ml e o volume foi completado, usando uma solução tampão TRIS-HCl 0,02 M, contendo NaCl 1% (m/v).

- As soluções de uréia contendo diferentes quantidades de inibidores de urease (F^- e HSO_3^-) foram preparadas usando soluções estoques de NaF e NaHSO_3 0,100 M.

- As amostras de soro sanguíneo foram obtidas do Hospital das Clínicas da UNICAMP, por simples centrifugação. Todas as amostras foram analisadas pelo laboratório do hospital, que utiliza o método enzimático-espectrofotométrico, e pelo método FIA-condutimétrico no mesmo dia. No método de fluxo

proposto, 100 μ l das amostras foram diluídas com água deionizada para 100 ml, em balão volumétrico.

III.2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primeiros dados experimentais foram obtidos usando uma coluna de 5 cm de comprimento, contendo urease imobilizada naturalmente, construída como descrito na parte experimental.

Os resultados obtidos no estudo da concentração do reagente hidróxido de sódio mostraram que os sinais das soluções padrão de uréia contendo de 1,0 a 5,0 μ g.ml⁻¹ foram pouco afetados, quando a concentração de NaOH foi variada de 0,1 a 1,0 M. A concentração final foi estabelecida em NaOH 0,5 M, contendo EDTA 0,5% (m/v).

Foi observado que se nenhum sal está presente no fluido carregador, a velocidade de hidrólise da uréia é muito pequena. Adicionando um sal, como NaCl ou KCl, no fluido carregador, causa um aumento sensível na produção de íons amônio e um decréscimo no tempo de retorno do sinal à linha base. As figuras III.3 e III.4 mostram a dependência do sinal analítico e do tempo de retorno do sinal analítico à linha base, quando a concentração de NaCl foi variada de zero a 1% (m/v). Concentrações do sal acima de 1%

(m/v) afetam a reprodutibilidade dos sinais, afetando a precisão das medidas. O mesmo efeito sobre o rendimento da conversão foi observado para outros sais, como KCl, CaCl_2 , MgCl_2 e NaNO_3 .

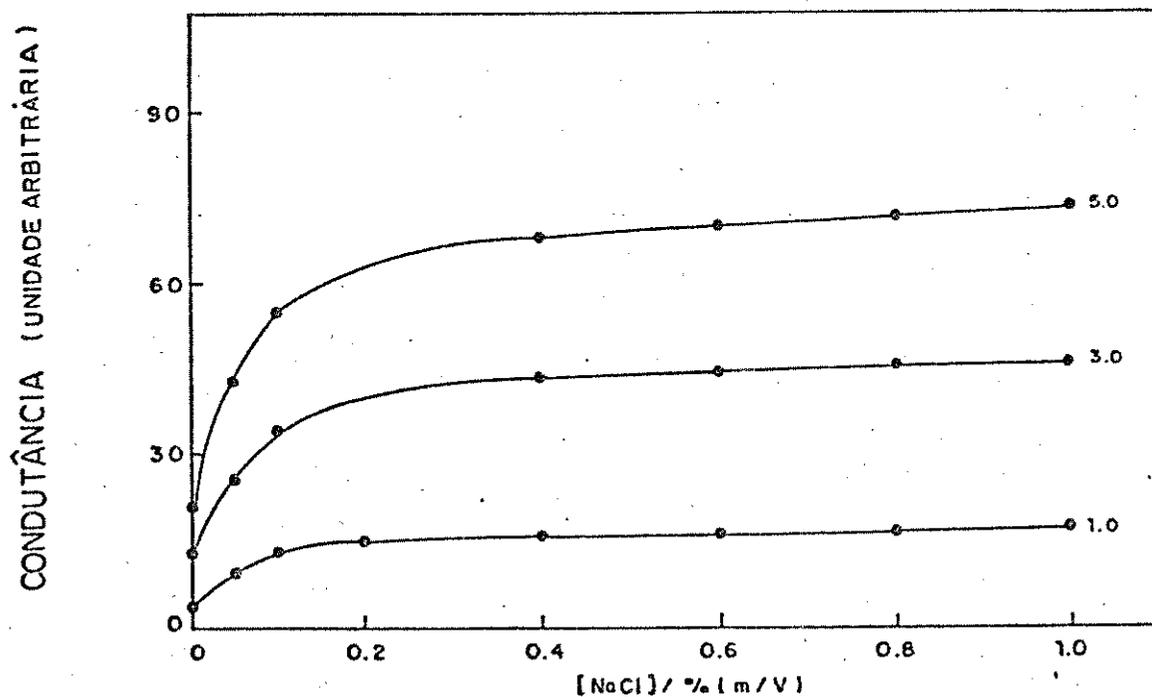


Figura III.3 - Efeito da concentração de NaCl, no sinal analítico de soluções padrão de uréia. Os números no lado direito das curvas são concentrações de uréia, expressas em $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

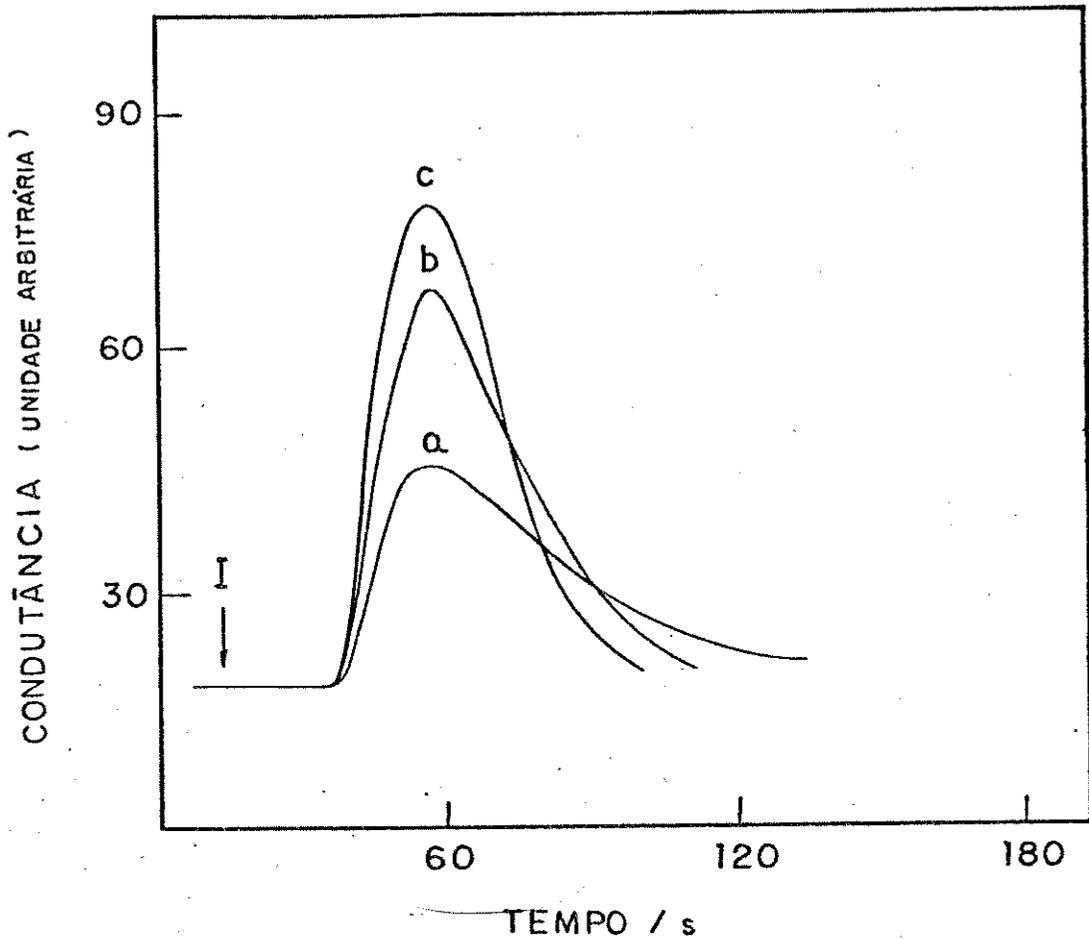


Figura III.4 - Efeito da concentração de NaCl no sinal analítico e no tempo de retorno do sinal à linha base, a, sem NaCl; b, NaCl 0,5% e c, NaCl 1%. I; instante de injeção da solução padrão de $5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

Outros experimentos foram feitos no sentido de avaliar o efeito do comprimento da coluna e da reprodutibilidade entre colunas. A figura III.5 mostra como o comprimento da coluna afeta

a hidrólise das soluções padrão de uréia. Esses resultados foram comparados com os obtidos para soluções padrão de íon amônio, contendo quantidade equivalente de nitrogênio. Essa comparação permitiu estimar o rendimento da hidrólise como sendo de, aproximadamente, 70 e 95% para colunas de 3 e 5 cm de comprimento, respectivamente. O aumento do comprimento da coluna também aumenta o tempo de limpeza, reduzindo a velocidade analítica do sistema de fluxo.

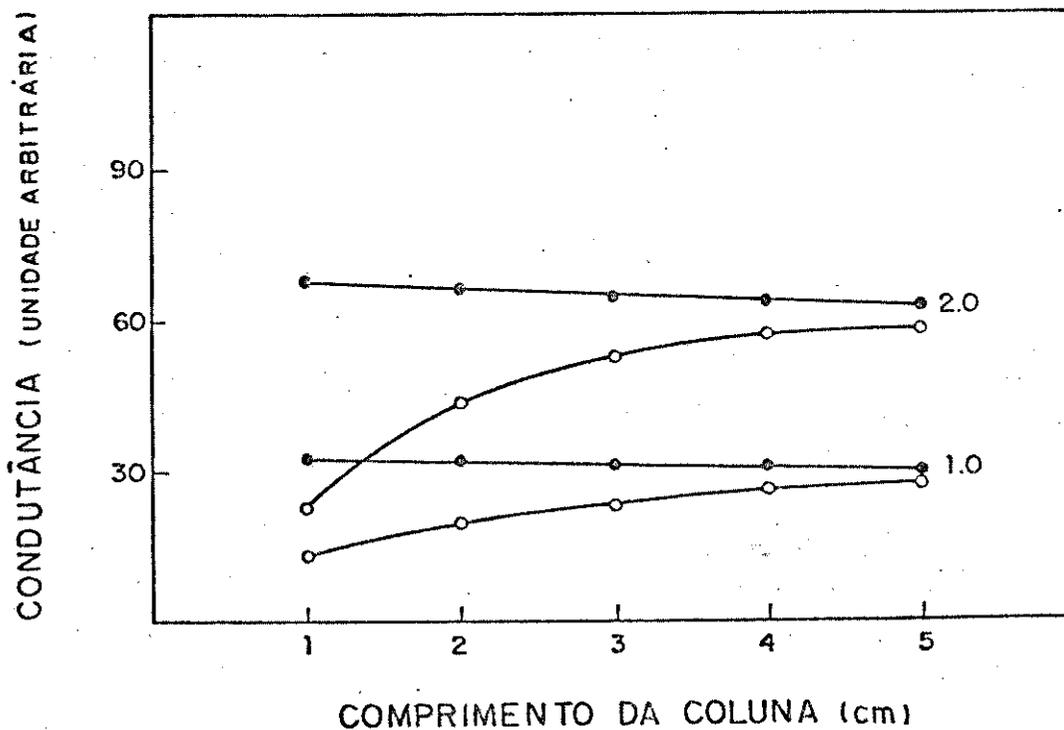


Figura III.5 - Efeito do comprimento da coluna na produção de íon amônio. ●, soluções padrão de íon amônio; ○, soluções padrão de uréia. Os números no lado direito das curvas são concentrações de nitrogênio como íon amônio e uréia, expressas em $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Os testes de reprodutibilidade entre colunas foram realizados utilizando-se cinco colunas de 5 cm de comprimento. Os sinais analíticos obtidos para cada coluna, usando soluções padrão de uréia na faixa de 1,0 a 5,0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, foram comparados. Uma diferença relativa em torno de 5% foi observada nas alturas dos sinais condutimétricos.

III.2.1 - Efeito do pH e Inibidores

Usando uma coluna de 3 cm de comprimento, os efeitos da mudança do pH da solução carregadora e da presença de dois inibidores da urease (íons F^- e HSO_3^-), adicionados na solução padrão de uréia, foram investigados. Os resultados foram comparados com os obtidos usando uma solução carregadora de urease livre, no sistema de fluxo mostrado na figura III.2. O sistema de fluxo empregando urease livre apresentou sensibilidade menor do que a obtida com a coluna de feijão. Desta forma, a comparação foi feita usando soluções de 3 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de uréia para o sistema com coluna e 30 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ para o sistema utilizando a solução de urease livre. Nenhuma tentativa foi feita na otimização do sistema de fluxo empregando a solução de urease livre, já que somente resultados relativos foram necessários.

A figura III.6 mostra como o pH da solução carregadora

afeta a altura do sinal analítico para ambos os sistemas de fluxo, mostrados nas figuras III.1 e III.2. Pode ser observado que o sistema utilizando a solução de enzima livre é mais afetado pela mudança do pH que o sistema que utiliza a coluna contendo a enzima imobilizada naturalmente. O pH tem sido apontado como um parâmetro crítico para biosensores potenciométricos construídos usando o pó do feijão⁽⁵⁸⁾ ou utilizando urease imobilizada artificialmente⁽⁶²⁾.

A figura III.7 mostra o efeito da presença de F^- e HSO_3^- , inibidores da atividade da urease, na solução da amostra para ambos os sistemas de fluxo. Na ausência do controle do pH, o efeito na solução de enzima livre é bastante crítico, enquanto a enzima imobilizada naturalmente é pouco afetada. O efeito total na inibição da atividade enzimática vem da presença do próprio inibidor e na mudança que ele causa no pH da solução da amostra. É importante ressaltar que a razão inibidor/substrato é 10 vezes maior quando a coluna contendo a enzima naturalmente imobilizada é utilizada, já que a concentração de uréia é 10 vezes menor do que a utilizada no sistema que emprega a solução de urease livre. Se um pH igual a 7,5 é mantido constante no fluido carregador, empregando um tampão TRIS-HCl, o efeito inibidor é cancelado no sistema de fluxo que usa a coluna de feijão, enquanto ele ainda permanece presente no sistema de fluxo que utiliza a solução de enzima livre.

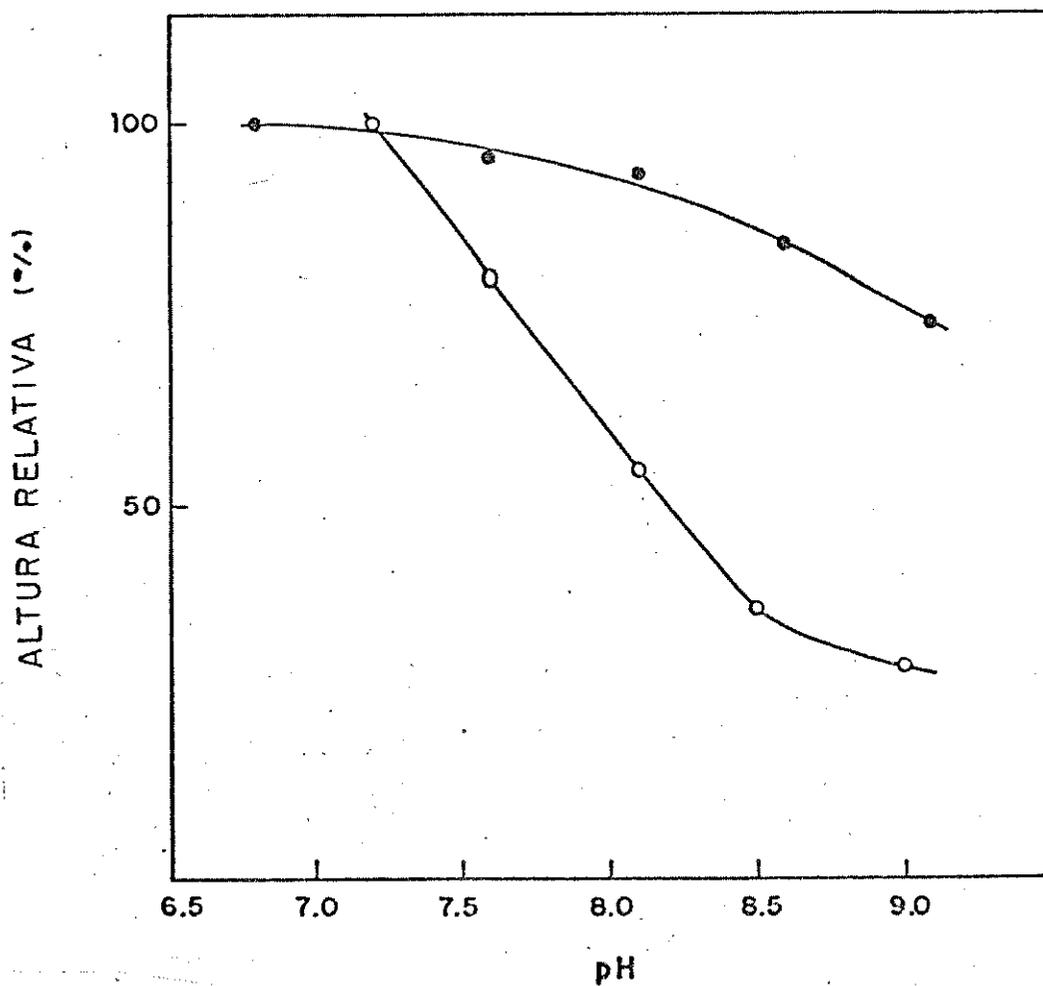


Figura III.6 - Efeito do pH da solução carregadora no sinal analítico. ●, usando urease imobilizada naturalmente; ○, usando uma solução de urease livre.

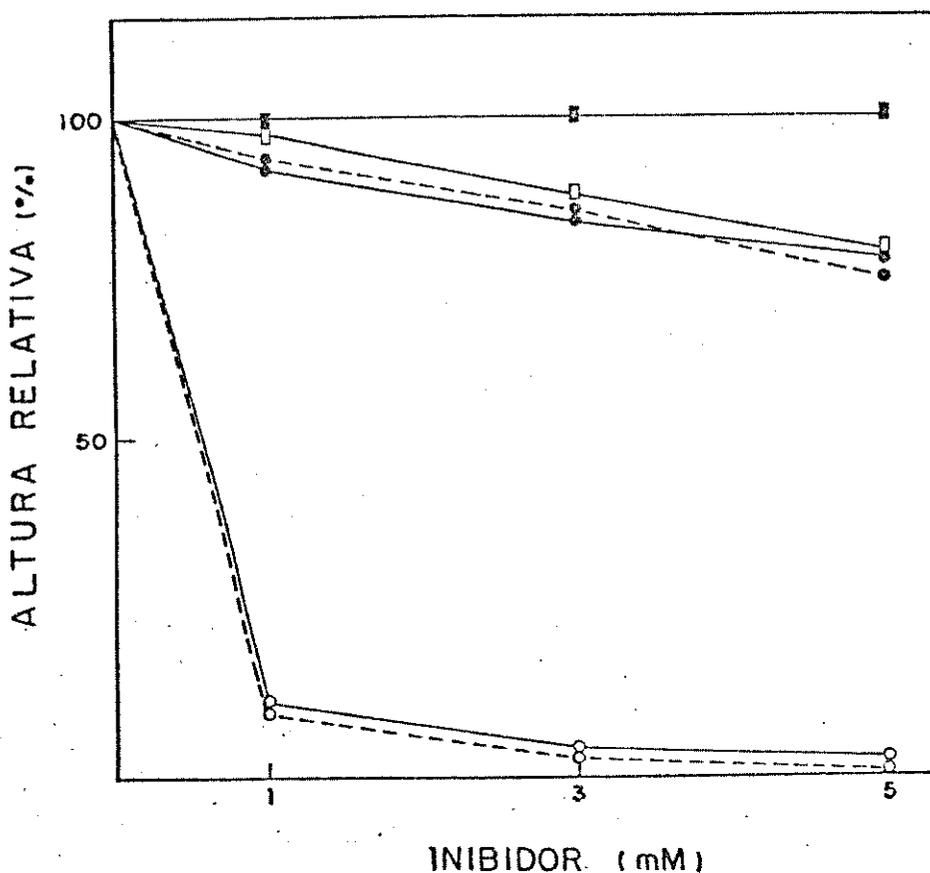


Figura III.7 - Efeito de inibidores (F^- e HSO_3^-) no sinal analítico. ● e ■, urease imobilizada naturalmente; ○ e □, solução de urease livre; — fluoreto adicionado na amostra; - - -, bissulfito adicionado na amostra; □ e ■, pH 7,5 usando o tampão TRIS-HCl; ○ e ●, sem controle do pH.

Embora o mecanismo de resposta para os biosensores de tecidos animais e vegetais não esteja ainda bem estabelecido⁽⁶³⁾, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a integridade da célula vegetal é mantida nos pedaços de feijão. A presença de um

sal, como NaCl ou KCl, é essencial para promover o transporte do substrato para dentro da célula vegetal, onde ocorre a reação catalisada pela enzima. A membrana da célula age como um filtro seletivo evitando a permeação de algumas substâncias, como os inibidores citados acima, tornando o método menos propenso a interferências. Também, o pH da amostra não representa um parâmetro crítico quando a coluna contendo o feijão é usada como fonte de urease. Isto é consequência do fato de que a reação ocorre dentro da célula, onde o pH é apropriado para a ação da enzima. Além disso, o sistema FIA-condutimétrico descrito aqui não requer que a reação enzimática ocorra no mesmo pH em que a detecção é feita, como necessário para os sensores potenciométricos não automatizados.

III.2.2 - Durabilidade da coluna

Uma coluna de 3 cm de comprimento, preparada como descrito na parte experimental, foi colocada no sistema de fluxo e seu desempenho foi avaliado durante 10 horas, efetuando-se aproximadamente, 380 injeções de soluções padrão de uréia de 2,0 e 5,0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Os resultados mostraram que após esse período, a atividade da coluna foi reduzida em torno de 10% de seu valor inicial. Como a mudança na atividade é lenta, uma recalibração periódica pode assegurar uma boa exatidão. Durante a determinação

de uréia em soro sanguíneo uma calibração, usando soluções padrão de uréia, foi repetida a cada 30 minutos. Uma mesma coluna pode ser usada em até 1.000 determinações, entretanto, esta pode ser trocada todos os dias, em vista do seu baixo custo e da sua fácil construção.

III.2.3 - Condições para determinação de uréia em soro sanguíneo

Baseado nos resultados anteriores, as condições para determinação de uréia em soro sanguíneo foram selecionadas. Uma coluna de 3 cm de comprimento foi escolhida, juntamente com uma solução carregadora contendo NaCl 1% (m/v) e uma solução reagente de NaOH 0,5 M contendo EDTA 0,5% (m/v). Nenhuma solução tampão necessita ser usada devido a alta diluição da amostra (1:1.000) e a pequena dependência do sinal analítico em relação ao pH. O volume de amostra injetado foi de 50 μ l. Os sinais de calibração obtidos nas condições acima, mostraram uma dependência linear da altura de pico, em relação a concentração de uréia, na faixa de 1,0 a 10,0 μ g.ml⁻¹, com um coeficiente de correlação de 0,9997. A figura III.8 apresenta os sinais de calibração e determinação de uréia em soro sanguíneo, usando enzima imobilizada naturalmente. O desvio padrão relativo de 10 injeções de uma solução padrão de 3,0 μ g.ml⁻¹ de uréia foi igual a 0,8%. Aproximadamente, 40 determinações podem ser realizadas por hora.

CONDUTÂNCIA (UNIDADE ARBITRÁRIA)

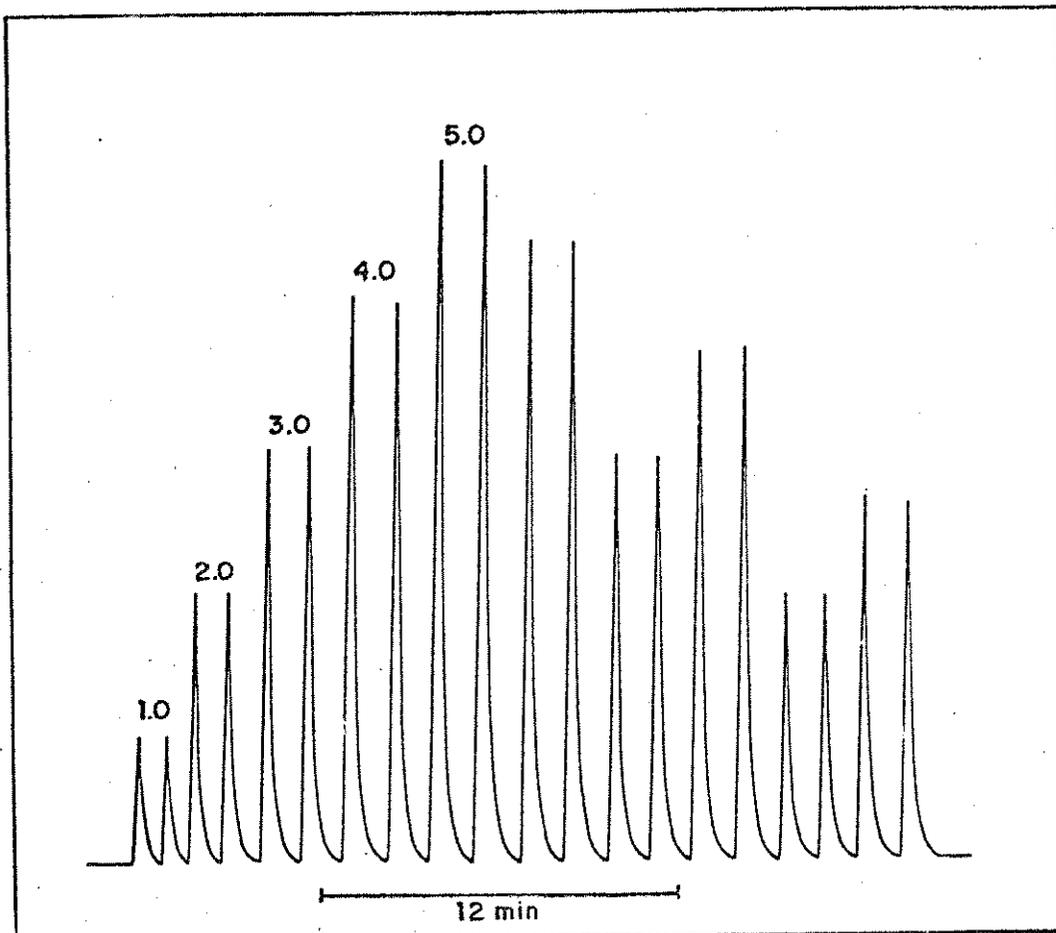


Figura III.8 - Sinais de calibração para determinação de uréia em soro sanguíneo usando enzima imobilizada naturalmente. Os sinais para 5 soluções padrão de uréia e 5 amostras, introduzidas em duplicata, são mostrados. Os números sobre os picos são concentrações de soluções padrão de uréia, em $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

III.2.4 - Exatidão do método proposto

Sessenta e cinco amostras de soro sanguíneo foram analisadas pelo método FIA-condutimétrico e pelo método enzimático-espectrofotométrico, o qual se baseia na reação de íon amônio produzido na hidrólise da uréia, com cetoglutarato e NADH na presença de glutamato dehidrogenase. Este método foi implementado em um analisador automático discreto Cobas Mira.

A figura III.9 mostra a comparação entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Os resultados estatístico de mínimos quadrados mostraram que a correlação entre os métodos pode ser expressa como:

$$C_p = (0,47 \pm 0,31) + (0,994 \pm 0,023) C_s$$

onde,

C_p é a concentração de uréia ($\text{mg} \cdot \text{dl}^{-1}$) encontrada pelo método proposto e C_s é a mesma pelo método enzimático-espectrofotométrico. O coeficiente de correlação é igual a 0,987 e a estimativa do erro é $\pm 2,4 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$. Estes resultados permitem concluir que existe uma boa concordância entre os métodos.

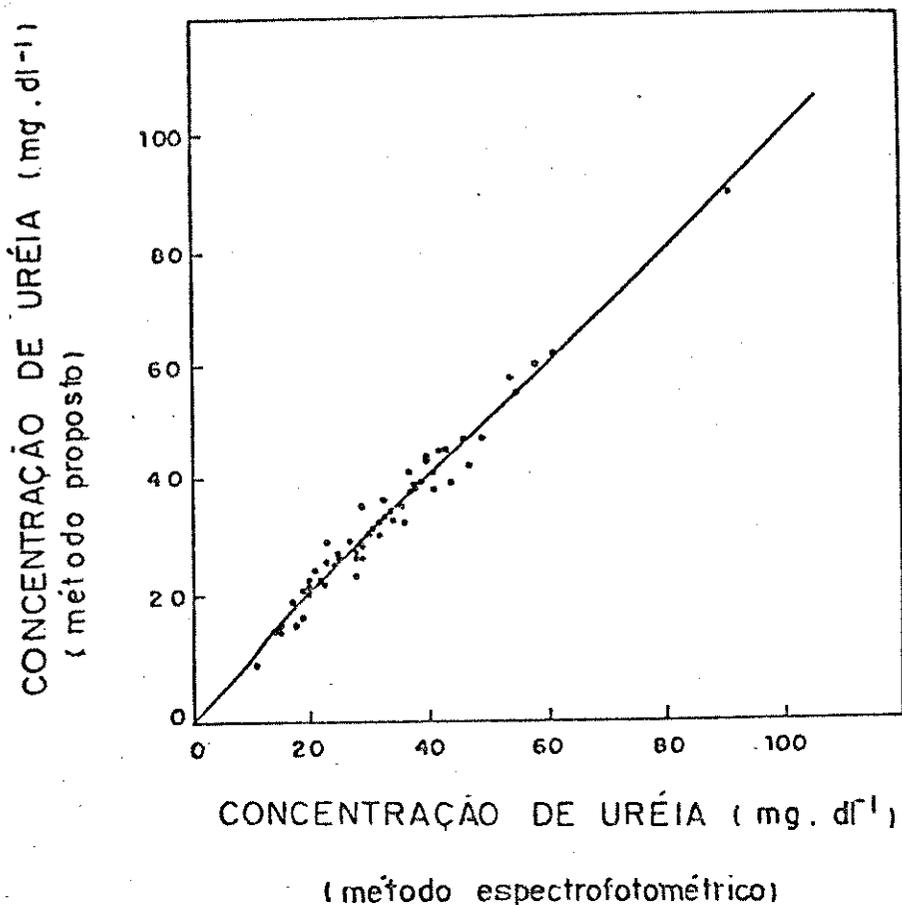


Figura III.9 - Correlação dos resultados para determinação de uréia em 65 amostras de soro sanguíneo obtidas pelo método proposto e pelo método espectrofotométrico padrão.

A sensibilidade do método FIA-condutimétrico possibilita uma alta diluição da amostra, o que ajuda a evitar efeitos de matriz. Além disso, o método apresenta vantagens em relação ao custo e demonstra que a enzima imobilizada naturalmente pode ser usada em reatores FIA.

Em relação ao método FIA-condutimétrico anteriormente

proposto⁽⁶⁰⁾, a metodologia que emprega a enzima naturalmente imobilizada apresentou uma velocidade de determinação duas vezes maior, fazendo uso de instrumental mais simples e de menor custo.

A gênero *Canavalia* possui outras espécies, dentre as quais a *Canavalia ensiformis* e a *Canavalia maritima*, que também apresentam atividade enzimática devido a presença da urease. Uma investigação futura poderá apontar possíveis vantagens e desvantagens, principalmente em relação a atividade enzimática, do uso destas outras espécies. De fato, investigações preliminares recentemente realizadas⁽⁶⁴⁾, após o término da parte experimental deste trabalho, demonstram que, no sistema FIA aqui apresentado e nas condições recomendadas, a espécie *Canavalia gladiata* apresenta uma atividade superior à *Canavalia ensiformis* e a *Canavalia maritima*. Tais dados demonstram também que outros aspectos devem ser considerados na avaliação da melhor espécie que pode ser empregada como fonte natural de enzima. Por exemplo, estes resultados se encontram em desacordo com aqueles obtidos para sensores de uréia potenciométricos que operam de forma convencional⁽⁵⁹⁾. Embora a origem deste desacordo não esteja ainda bem estabelecida, investigações futuras necessitam ser feitas também para verificar se a época de colheita do feijão, seu envelhecimento, o tipo de solo e a adubação com fertilizantes a base de uréia afetam a atividade enzimática das diferentes espécies.

CAPÍTULO IV

CONSTRUÇÃO DE UM ANALISADOR AUTOMÁTICO DE FLUXO CONTÍNUO

A quantidade de trabalho dos laboratórios analíticos vem aumentando constantemente a medida que áreas tradicionais, como a de controle de qualidade, análises clínicas e áreas mais novas como a da química ambiental aumentam a sua demanda por determinações quantitativas. Os laboratórios de rotina modernos precisam manipular um número muito grande de amostras e, portanto, processar uma grande quantidade de informação. Este fato tem sido o desencadeador do processo de automação pelo qual, atualmente, vem passando estes laboratórios.

Há vários instrumentos disponíveis que executam muitas, ou mesmo todas as etapas de uma análise. Os dados gerados podem ser processados por técnicas computacionais e computadores podem ser interfaceados para controlar um instrumento analítico.

A IUPAC* recomenda que se distinguem entre métodos e instrumentos automáticos e métodos e instrumentos mecanizados de análise química. Métodos verdadeiramente automáticos devem incorporar pelo menos uma etapa de realimentação na qual o

* - International Union of Pure and Applied Chemistry

instrumento se auto-controla utilizando seu sinal de saída para modificar uma das etapas envolvidas na determinação.

Um instrumento mecanizado não possui etapa de realimentação e são desenhados para processar, repetitivamente, sempre da mesma forma, uma ou mais etapas de uma determinação.

No entanto, as palavras "automático" e "automatizado" são sempre utilizadas, de modo comum, para se referir a metodologias e instrumentos que são, na verdade, mecanizados. O termo "instrumento mecanizado" é raramente utilizado. Ao invés, costuma-se falar em "grau de automação" de um sistema ou instrumento. O grau máximo é atingido quando etapas de realimentação estão presentes, condição que, só então, tornaria o uso das palavras "automático", "automatizado" e "automação" completamente correto. Neste trabalho adotou-se o uso mais comum dos termos, optando-se pelo emprego de "graus de automação" para diferenciar entre os instrumentos mecanizados e os realmente automatizados.

O primeiro analisador automático de fluxo contínuo comercializado foi o Auto-Analyser, fabricado pela Technicon. Ele é um analisador de fluxo segmentado por bolhas de ar, e foi construído, inicialmente, para determinação de uréia⁽⁶⁵⁾, em amostras de interesse clínico. No entanto, o instrumento pode ser adaptado para outras análises, pela mudança dos reagentes e da configuração de fluxo.

Em 1975, foi demonstrado que a segmentação por ar em análise em fluxo contínuo, não era essencial e que a amostra pode ser injetada diretamente em um fluido carregador. Esta técnica de análise em fluxo contínuo não segmentada, tornou-se conhecida como Análise por Injeção em Fluxo (FIA).

Muitos dos avanços alcançados pela técnica de Análise por Injeção em Fluxo nas últimas décadas resultaram do uso de dispositivos construídos em laboratórios, para implementação de novos sistemas de fluxo ou para permitir o uso de uma reação química particular^(14, 25, 66-69).

A técnica é capaz de atingir um alto grau de automação^(33, 70-72). Embora o controle do processamento de uma amostra líquida seja conseguido integralmente após sua introdução no sistema, há outros passos que podem ser implementados para aumentar o grau de automação do analisador. Recentemente, um sistema foi descrito para realizar a leitura e o armazenamento digital do sinal analítico em sistemas FIA⁽⁷³⁾.

É possível distinguir quatro etapas principais que levam a obtenção de um analisador FIA, totalmente automatizado. A primeira está relacionada com a operação de introdução da amostra no sistema de fluxo. O dispositivo empregado nesta tarefa deve ser capaz de ser controlado por um sinal digital. O consumo de energia elétrica precisa ser baixo para evitar o uso de fontes potentes de corrente contínua. Esta exigência está de acordo com

o fato que o dispositivo trabalhará em sistemas onde o fluido é impulsionado a pressão relativamente baixa (1 a 1,5 atm.). O dispositivo precisa ser capaz de introduzir volumes de amostras na faixa de 10 a 250 μ l.

A segunda etapa está relacionada com a apresentação automática da amostra ao analisador. Amostradores podem ser comprados de alguns revendedores, entretanto, o preço é bastante elevado. No entanto, amostradores de primeira geração, construídos para serem controlados mecanicamente, podem ser encontrados em muitos laboratórios de rotina. Isso é particularmente verdadeiro para os laboratórios que usaram, ou vem usando, os Auto-Analisadores segmentados por ar, comercializados pela Technicon. Muitas vezes, após desativação dos analisadores, os amostradores, embora em perfeitas condições de funcionamento, permanecem sem uso nos laboratórios.

Uma outra etapa é a implementação do controle do detector e da interface de aquisição dos dados. O sistema é totalmente automatizado se os dados puderem ser armazenados e processados para informar os resultados finais e se o sinal de saída puder, em um sistema de realimentação, controlar ao menos um passo do processo analítico.

A implementação das duas primeiras etapas, produzirá um analisador automático que pode realizar as operações mecânicas, necessárias ao processo analítico, sem a intervenção do operador.

A seguir, é descrito um analisador FIA, que faz uso de um amostrador da Technicon e de um dispositivo de introdução da amostra de baixo custo. Ambos, foram controlados por sinais digitais de um sistema mínimo de microcomputador. O instrumento pode analisar até quarenta amostras sem a intervenção do operador.

IV.1 - PARTE EXPERIMENTAL

IV.1.1 - Dispositivo de introdução da amostra

A figura IV.1 mostra o dispositivo de introdução da amostra desenvolvido. Ele foi construído, usando três válvulas eletromecânicas de três vias, com corpo de Teflon (NResearch-161T031, 12V, 80 mA). O dispositivo pode ser comutado da posição de amostragem para a posição de injeção ligando, simultaneamente, todas as válvulas. Portanto, a sua operação manual, se necessária, pode ser facilmente implementada⁽⁷⁴⁾.

A posição de injeção é encontrada quando as válvulas estão desligadas, porque, para muitas das aplicações FIA, o dispositivo é deixado por mais tempo nessa posição. Além disso, a amostra não é aspirada enquanto o dispositivo está nessa posição, resultando em uma redução substancial no consumo da amostra.

Ligando as válvulas, a amostra começa a ser aspirada. A aspiração pode se dar de muitos modos. Neste trabalho, empregou-se somente a força da gravidade, utilizando-se de um tubo de Tygon, de 3,0 mm de diâmetro interno, conectado no ponta W da figura IV.1.

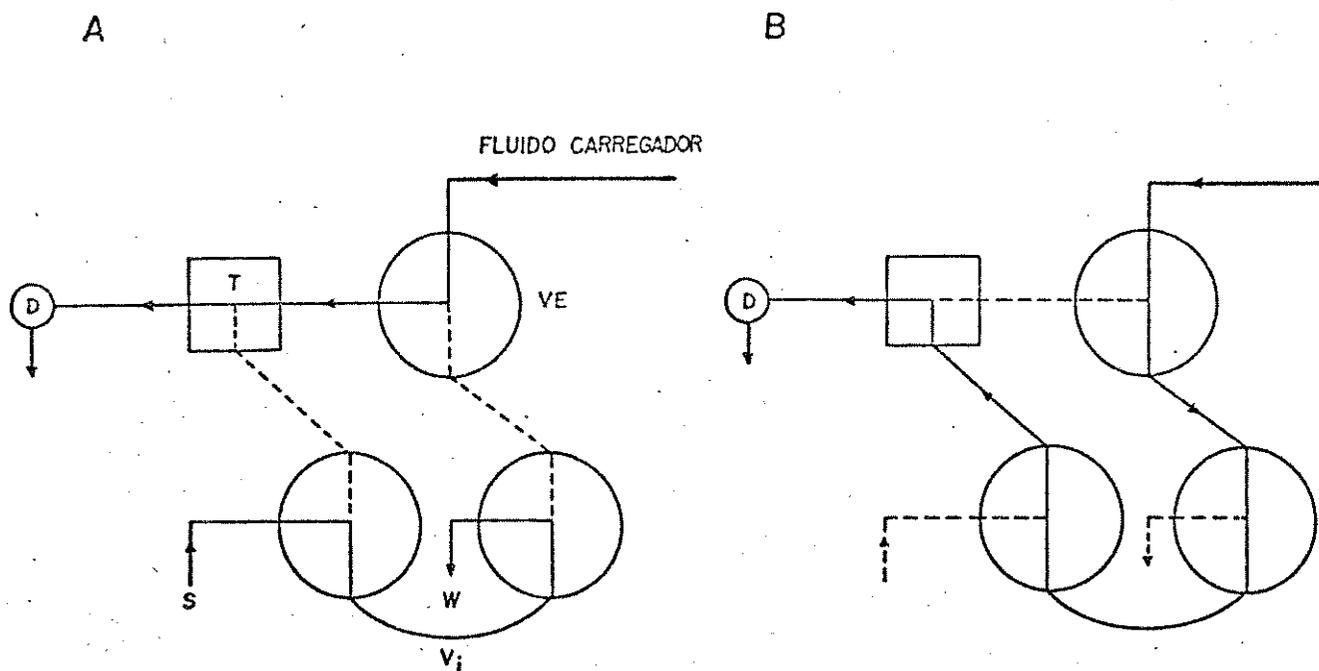


Figura IV.1 - Diagrama do dispositivo de introdução da amostra.

D, detector; T, confluência; VE, válvula eletromecânica; S, entrada da amostra; V_i, volume de amostra; W, aspiração da amostra; A, posição de amostragem (válvulas ligadas); B, posição de injeção (válvulas desligadas).

IV.1.2 - Adaptação do amostrador

Um auto-amostrador II da Technicon foi usado para a apresentação da amostra no analisador FIA. O instrumento foi adaptado para ser controlado por um sinal digital, gerado externamente. O disco que controlava as operações de tempo no amostrador foi removido, juntamente com seu relê eletromecânico associado. Um relê eletromagnético (12V, 2A) foi instalado dentro do amostrador, e o ciclo liga/desliga pode ser agora, comandado por um sinal externo. Quando o relê eletromagnético está ligado, o amostrador recolherá a sonda da amostra para a posição de limpeza e moverá a bandeja para a próxima amostra. Quando o relê eletromagnético é desligado, a sonda será imersa na amostra. O reservatório de limpeza da sonda não é necessário para seu uso em FIA.

A bandeja de amostra original pode ser usada. Contudo, uma nova bandeja foi construída, permitindo assim, substituir as cubetas originais, por tubos de ensaio de 2,5 ml. A nova bandeja foi construída usando um disco de folha de alumínio, de 23 cm de diâmetro e 0,5 mm de espessura. Orifícios, de 1,25 cm de diâmetro, igualmente espaçados, foram feitos na borda do prato. Este disco foi colocado sobre outro, contendo pequenos orifícios de 0,5 cm, usados para segurar os tubos de ensaio. Os pratos foram separados por peças de acrílico.

IV.1.3 - Controlador do Instrumento

O amostrador e o dispositivo de introdução da amostra foram controlados por um sistema mínimo de microcomputador, baseado no microprocessador 8085 da Intel. Este sistema é produzido pela Telemática, sendo semelhante ao SDK 85, produzido pela Intel⁽⁷⁵⁾. Os sinais de controle digitais foram gerados através de um dispositivo periférico 8155 de entrada e saída.

A interface, baseada nos transistores TIP121 e BC548, para controle dos sinais digitais, está mostrada na figura IV.2. Pode se observado que somente dois bits da porta A da 8155 foram usados para acionar as válvulas e o relê eletromagnético.

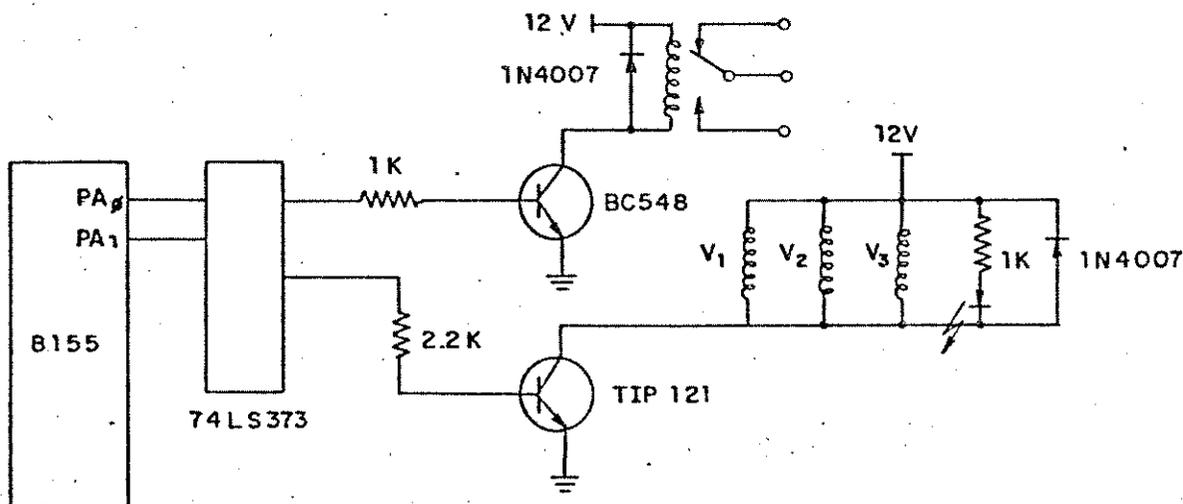


Figura IV.2 - Diagrama do circuito da interface entre o microprocessador 8085 e os componentes do analisador.

O programa de controle foi escrito em linguagem Assembler do microprocessador 8085, e opera de acordo com o diagrama de blocos mostrado na figura IV.3.

Quando em execução, o software permite que o operador programe os valores dos parâmetros necessários para o processo analítico. O primeiro é o número total de padrões somado ao das amostras, que precisa ser determinado. Se este parâmetro não estiver programado, o controlador não operará o instrumento. Os outros parâmetros são: o intervalo de tempo de amostragem, o intervalo de tempo de injeção, o número de replicatas para cada amostra ou padrão e um intervalo de tempo extra de amostragem. Os valores pré-estipulados são, respectivamente, 10s, 20s, triplicata e 0s. Após a introdução desta série de valores, o programa pergunta por uma reprogramação, se necessário. Os intervalos de tempo são gerados por software chamando uma subrotina que fornece um atraso de 1s.

Para otimizar o consumo de amostra, o programa emprega um tempo de amostragem mais longo quando uma amostra é acessada pela primeira vez (tempo de amostragem extra). O objetivo é o de limpar a sonda de amostragem, contaminada com a amostra anterior. Outras determinações dessa mesma amostra, se necessário, foram realizadas com tempo de amostragem programada.

O programa controlador foi gravado em um memória EPROM de 2 kbyte e inserida na placa do microcomputador, onde pode ser

acessada a partir do endereço 3000H. As variáveis programáveis foram guardadas na memória RAM da 8155.

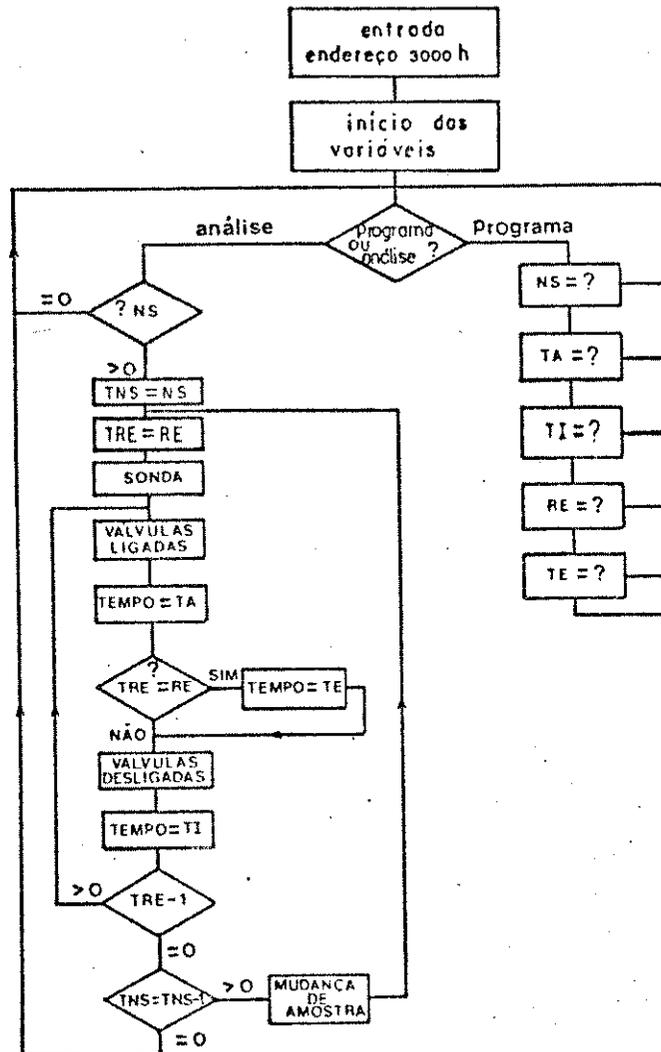


Figura IV.3 - Fluxograma do programa de controle do analisador. NS, número total de padrões mais amostras; TA, tempo de amostragem; TI, tempo de injeção; RE, número de replicatas para cada amostra ou padrão; TE, tempo extra; TRE e TNS, variáveis temporárias inicialmente contendo os valores de RE e MS, respectivamente.

IV.1.4 - Outros Instrumentos e Sistema FIA

Os fluidos foram bombeados usando uma bomba peristáltica ISMATEC MP13 GJ-4, empregando tubos de Tygon. Os sinais foram obtidos com um registrador potenciométrico Cole-Parmer, modelo 0585. Um espectrofotômetro da Micronal, modelo 311, operando a um comprimento de onda de 540 nm foi usado para determinação de Cr(VI).

O sistema FIA-espectrofotométrico controlado por microcomputador é mostrado na figura IV.4. Seu desempenho foi testado utilizando-se o procedimento padrão para a determinação de Cr(VI)⁽⁷⁶⁾. Tubos de polietileno de 0,80 mm de diâmetro interno foram empregados. Uma cela de fluxo de 80 μ l e 1 cm de caminho ótico foi utilizada. As soluções padrão de Cr(VI) foram preparados a partir de uma solução estoque de 1.000 μ g.ml⁻¹, por diluições adequadas.

Na determinação de amônia, empregou-se o sistema descrito na figura II.3, substituindo-se a válvula de injeção manual pela automática, utilizando-se o amostrador automático.

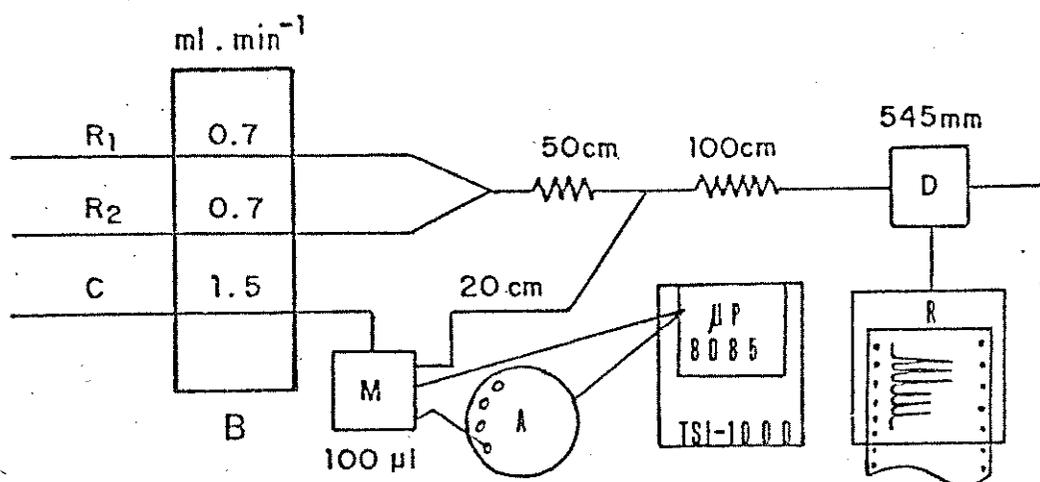


Figura IV.4 - Sistema de fluxo para determinação de Cr(VI). B, bomba peristáltica; M, módulo automático de introdução da amostra; R₁, reagente H₂SO₄ 0,8 M; R₂, DFC 0,15%; C, água destilada; D, detector; A, bandeja amostradora; TSI - 1000, sistema mínimo de microcomputador. R, registrador potenciométrico.

IV.2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O módulo de introdução de amostra desenvolvido permite que seu controle seja feito de maneira simples, com o uso de um único sinal lógico padrão TTL. O volume de amostra a ser introduzido pode variar de 20 a 200 μl sendo que, testes efetuados introduzindo volumes de amostra nesta faixa, de uma solução 10^{-4}M de KMnO_4 , mostraram que os sinais espectrofotométricos obtidos apresentaram um desvio padrão absoluto constante.

A adaptação do amostrador proposta é simples e seu uso permite que até 40 amostras sejam determinadas sem a atenção do operador. Esta adaptação apresenta-se de maior interesse para os laboratórios que utilizaram os AutoAnalisadores da Technicon ou que estão substituindo estes sistemas segmentados por sistemas de análise por injeção em fluxo.

A figura IV.5 mostra os resultados obtidos usando o analisador para a determinação de Cr(VI) , empregando o sistema de fluxo descrito na figura IV.4. O desvio padrão relativo obtido foi menor que 0,5% ($n=15$), para as alturas dos sinais referentes a uma solução de $1,0 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de Cr(VI) . O analisador também foi testado na determinação condutimétrica de amônia em águas, utilizando o sistema de fluxo descrito anteriormente⁽¹⁹⁾, e o desvio padrão relativo obtido foi menor que 0,8%, para os sinais

referentes a 8 injeções de uma solução de $6 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de NH_3 . A figura IV.6 mostra os sinais de calibração e determinação de NH_3 em águas. Esses resultados mostram o bom desempenho do analisador automático construído, em aplicações FIA. A sua combinação, com o sistema de coleta de dados previamente desenvolvido⁽⁷³⁾ pode levar a construção de um sistema de baixo custo e com alto grau de automação. Esta combinação seria facilitada pelo fato de que ambos os sistemas utilizam a mesma eletrônica digital, baseada na CPU-8085.

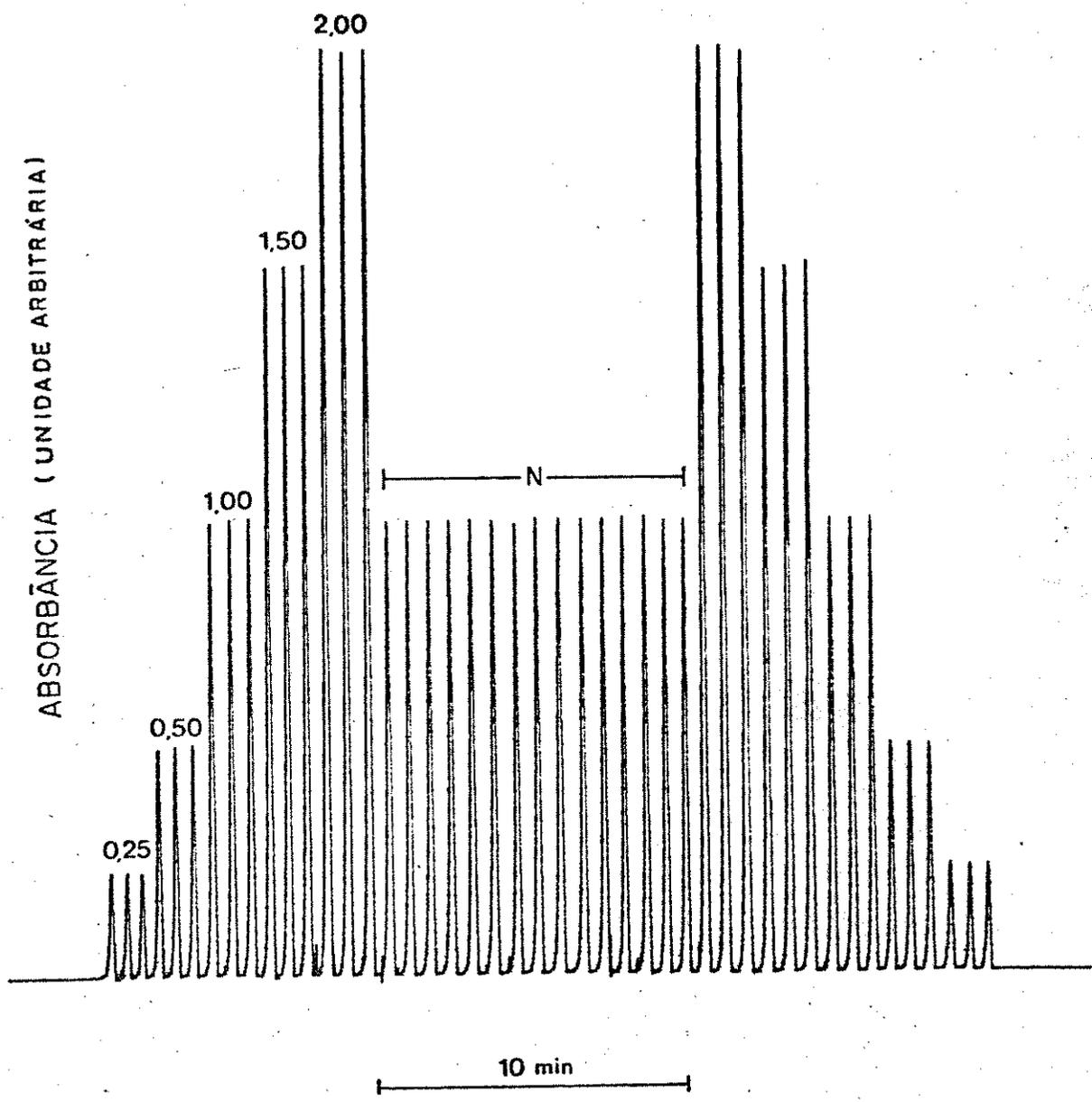


Figura IV.5 - Sinais de calibração e determinação de Cr(VI). Os valores acima dos sinais são concentrações de Cr(VI), expressas em $\mu\text{g.ml}^{-1}$. N, 15 sinais de uma solução padrão de $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ em Cr(VI) (teste de reprodutibilidade).

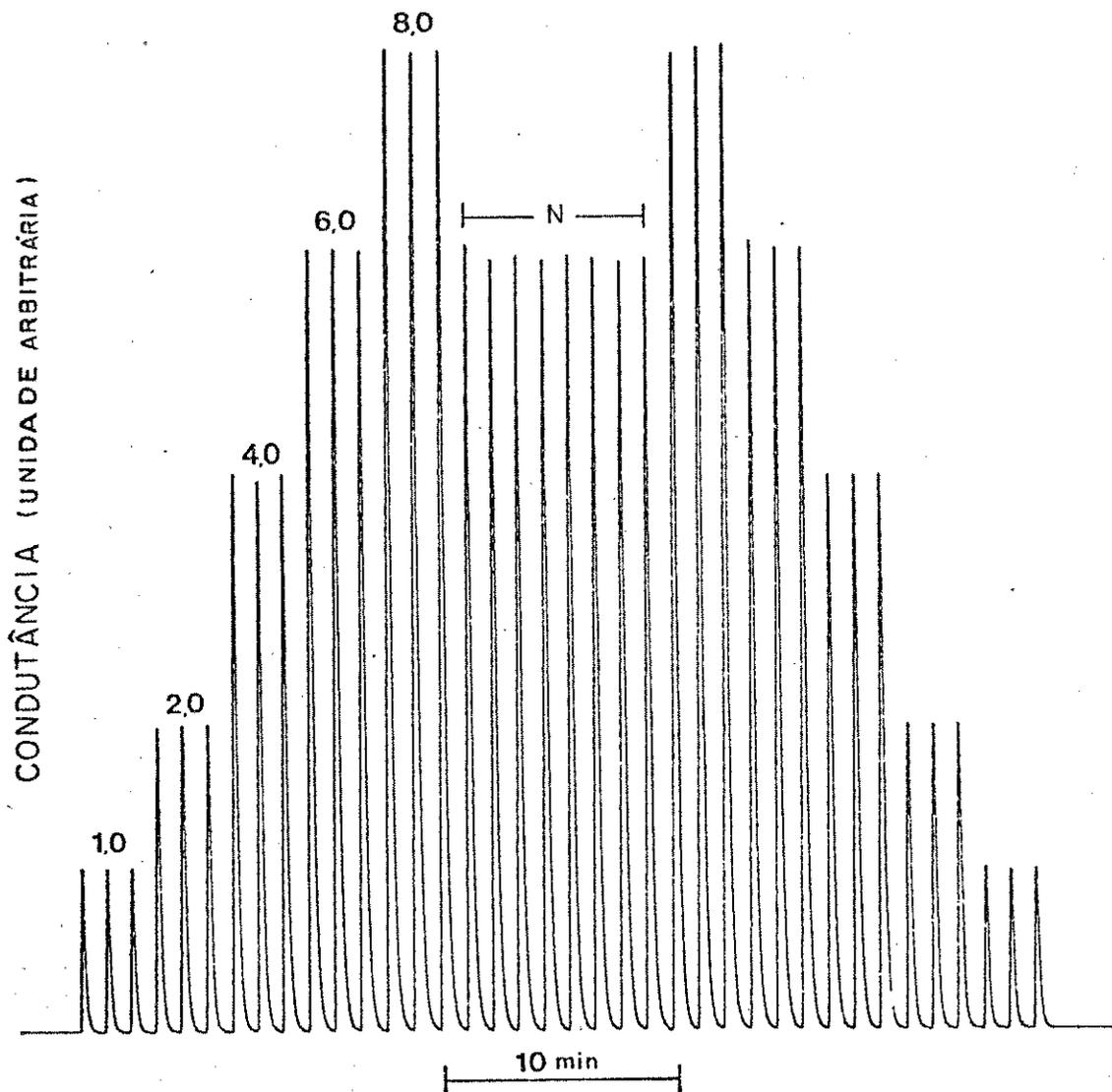


Figura IV.6 - Sinais de calibração e determinação de amônia em águas. Os valores acima dos sinais são concentrações de amônia expressas em $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. N, 8 sinais de uma solução padrão de 6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (teste de reprodutibilidade).

CAPÍTULO V

CONCLUSÃO

O desenvolvimento dos sistemas de fluxo, com detecção condutimétrica e difusão gasosa, para a determinação de nitrogênio inorgânico total e formas inorgânicas de nitrogênio em águas naturais, e uréia em soro sanguíneo confirma a potencialidade e versatilidade da técnica FIA. Estes sistemas demonstram que é possível tornar a detecção condutimétrica mais seletiva e estender seu uso a espécies não voláteis, através de transformações químicas apropriadas. Estes sistemas apresentaram, também, precisão e exatidão comparáveis às dos métodos padrões oficiais de análise e demonstram que podem ser utilizados nas áreas Ambiental e Clínica.

Os sistemas de fluxo descritos neste trabalho apresentam algumas vantagens sobre outros existentes, tais como: utilização de somente um reagente estável, enquanto o método colorimétrico utilizado na determinação de nitrogênio inorgânico total emprega dois conjuntos de reagentes instáveis e tóxicos, e as espécies são monitoradas em dois diferentes comprimentos de onda. Além disso, o método condutimétrico apresenta a mesma sensibilidade e é menos susceptível a interferências e efeitos de matriz, como coloração das soluções e pH da amostra. Adicionalmente, a

instrumentação utilizada é mais simples e de menor custo do que a requerida pelos métodos colorimétrico e potenciométrico.

A utilização de um único sistema de fluxo para determinação de nitrogênio inorgânico total e formas inorgânicas de nitrogênio, e a possibilidade de especiação dessas formas, mostra a versatilidade do sistema FIA desenvolvido. A única desvantagem apresentada está na dificuldade em determinar nitrito, quando as outras formas de nitrogênio estão presentes em altas concentrações na amostra.

O sistema de fluxo desenvolvido para a determinação de uréia em soro sanguíneo mostra que é possível a utilização de um material contendo a enzima imobilizada naturalmente. Demonstrou-se que a imobilização natural apresenta vantagens com relação a diminuição do efeito do pH e da presença de inibidores enzimáticos na amostra, uma vez que a membrana celular atua de modo seletivo, no caso da determinação de uréia. A sensibilidade obtida possibilita uma alta diluição da amostra, evitando outros efeitos de matriz. Além disso, o método apresenta vantagens em relação ao custo das análises e uma maior simplicidade, já que nenhum processo de imobilização é requerido.

A importância de um instrumento automático em um laboratório está em eliminar os erros humanos, além de liberar o operador para outras tarefas. O módulo de introdução da amostra desenvolvido neste trabalho utiliza microválvulas solenóides de

baixo custo, baixo consumo de energia elétrica, além de ser controlado por um único sinal digital. A adaptação do amostrador é bastante simples e atrativa para os laboratórios que utilizaram os AutoAnalisadores da Technicon, e que estão desativados ou sendo substituídos pela técnica FIA. Este amostrador apresenta uma mecânica muito boa e perfeitas condições de uso. O analisador automático foi testado com detectores espectrofotométricos e condutimétricos, demonstrando a sua versatilidade.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFIA

- 1 - SKEGGS, L.T.: "An Automatic Method for Colorimetric Analysis"; Am. J. Clin. Pathol., 28 (1957) 311.
- 2 - RUZICKA, J. e HANSEN, E.H.: "Flow Injection Analysis: Part I - A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis"; Anal. Chim. Acta, 78 (1975) 145.
- 3 - RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. e ZAGATTO, E.A.G.: "Flow Injection Analysis. Part VII. Use of Ion-Selective Electrodes for Rapid Analysis of Soil Extracts and Blood Serum. Determination of Potassium, Sodium and Nitrate"; Anal. Chim. Acta, 88 (1977) 1.
- 4 - KRUG, F. J.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E. A. G. e JORGENSEN, S. S.: "Rapid Determination of Sulphate in Natural Waters and Plant Digests by Continuous Flow Injection Turbidimetry"; Analyst, 102 (1977) 503.
- 5 - ZAGATTO, E.A.G.; KRUG, F.J.; BERGAMIN FILHO, H.; JORGENSEN, S.S. e REIS, B.F.: "Merging Zones in Flow Injection

- Analysis. Part 2 - Determination of Calcium, Magnesium and Potassium in Plant Material by Continuous Flow Injection Atomic Absorption and Flame Emission Spectrometry"; Anal. Chim. Acta, 104 (1979) 279.
- 6 - REIS, B.F.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G. e KRUG, F. J.: "Merging Zones in Flow Injection Analysis. Part 3 - Spectrophotometric Determination of Aluminium in Plant and Soil Materials with Sequential Addition of Pulsed Reagents"; Anal. Chim. Acta, 107 (1979) 309.
- 7 - BERGAMIN FILHO, H.; MEDEIROS, J.X.; REIS, B.F. e ZAGATTO, E. A.G.: "Solvent Extraction in Continuous Flow Injection Analysis - Determination of Molybdenum in Plant Material"; Anal. Chim. Acta, 101 (1978) 9.
- 8 - ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F.; BERGAMIN FILHO, H. e KRUG, F. J.: "Isothermal Distillation in Flow Injection Analysis: Determination of Total Nitrogen in Plant Material"; Anal. Chim. Acta, 109 (1979) 45.
- 9 - GINÉ, M.F.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G. e REIS, B. F.: "Simultaneous Determination of Nitrate and Nitrite by Flow Injection Analysis"; Anal. Chim. Acta, 114 (1980) 191.

- 10 - BETTERIDGE, D.: "Flow Injection Analysis"; Anal. Chem., 50 (1978) 832A.
- 11 - RUZICKA, J. e HANSEN, E.H.: "Flow Injection Analysis. Principles, Applications and Trends"; Anal. Chim. Acta, 114 (1980) 19.
- 12 - STEWART, K.K.: "Flow-Injection Analysis: A Review of its Early History"; Talanta, 28 (1981) 789.
- 13 - VALCARCEL, M. e LUQUE de CASTRO, M. D.: Análisis por Inyección en Flujo, San Pablo, Cordoba, 1984.
- 14 - RUZICKA, J. e HANSEN, E.H.: Flow Injection Analysis, 2th ed., New York, Wiley, 1988.
- 15 - CARLSON, R.M.: "Automated Separation and Conductimetric Determination of Ammonia and Dissolved Carbon Dioxide"; Anal. Chem., 50 (1978) 1528.
- 16 - CARLSON, R.M.: "Continuous Flow Reduction of Nitrate to Ammonia with Granular Zinc"; Anal. Chem., 58 (1986) 1590.
- 17 - REIJN, J.M.; VAN DER LINDEN, W.E. e POPPE, H.: "Some

- Theoretical Aspects of Flow Injection Analysis"; Anal. Chim. Acta, 114 (1980) 105.
- 18 - BETTERIDGE, D.; CHENG, W.C.; DAGLESS, E.L.; DAVID, P.; GOAD, T.B.; DEANS, D.R.; NEWTON, D.A. e PIERCE, T.B.: "An Automated Viscometer Based on High-precision Flow Injection Analysis. Part I - Apparatus for High-precision Flow Injection Analysis"; Analyst, 108 (1983) 1.
- 19 - PASQUINI, C. e de FARIA, L.C.: "Flow-Injection Determination of Ammonia in Kjeldahl Digest by Gas Diffusion and Conductometry"; Anal. Chim. Acta, 193 (1987) 19.
- 20 - de FARIA, L.C. e PASQUINI, C.: "Flow-injection Determination of Inorganic forms of Nitrogen by Gas Diffusion and Conductimetry"; Anal. Chim. Acta, 245 (1991) 183.
- 21 - JARDIM, W.F.; PASQUINI, C.; GUIMARÃES, J.R. e de FARIA, L. C.: "Short-Term Toxicity Test Using *Escherichia Coli*: Monitoring CO₂ Production by Flow Injection Analysis"; Wat. Res., 24 (1990) 351.
- 22 - American Public Health Association, American Water Works Standard Method for Examination of Water and Wastewater,

17th ed., New York, 1989, pg. 4.110 - 149.

- 23 - NOZAKI, J.: "Determinação de Nitratos e Nitritos em Águas de Poços Residenciais do Bairro da Cacuia, Ilha do Governador-RJ"; Química Nova, 3 (1980) 151.
- 24 - O'NEILL, P.: Environmental Chemistry, George Allen & Unwin Ltd, London, 1985, pg. 102.
- 25 - KRUG, F.J.; REIS, B.F.; GINÉ, M.F.; ZAGATTO, E.A.G.; FERREIRA, J.R. e JACINTHO, A.O.: "Zone Trapping in Flow Injection Analysis: Spectrophotometric Determination of Low Levels of Ammonium íon in Natural Waters"; Anal. Chim. Acta, 151 (1983) 39.
- 26 - HANSEN, E.H.; KRUG, F.J.; GHOSE, A.K. e RUZICKA, J.: "Rapid Determination of Nitrogen, Phosphorus and Potassium in Fertilisers by Flow Injection Analysis"; Analyst, 102 (1977) 714.
- 27 - VAN SON, M.; SCHOTHORST, R.C. e DEN BOEF, G.: "Determination of Total Ammoniacal Nitrogen in Water by Flow Injection Analysis and a Gas Diffusion Membrane"; Anal. Chim. Acta, 153 (1983) 271.

- 28 - RUZICKA, J. e HANSEN, E.H.: "A New Potentiometric Gas Sensor - The Air-Gap Electrode"; Anal. Chim. Acta, 69 (1974) 129.
- 29 - MILHAN, P.J.; AWAD, A.S.; PAULL, R.E. e BULL, J.H.: "Analysis of Plants, Soils and Waters for Nitrate by Using an Ion-selective Electrode"; Analyst, 95 (1970) 751.
- 30 - MADSEN, B.C.: "Utilization of Flow Injection with Hydrazine Reduction and Photometric Detection for the Determination of Nitrate in Rain-Water"; Anal. Chim. Acta, 124 (1981) 437.
- 31 - AL-WEHAID, A. e TOWNSHEND, A.: "Spectrophotometric Flow Injection Determination of Nitrate Based on Reduction with Titanium(III) Chloride"; Anal. Chim. Acta, 186 (1986) 289.
- 32 - VAN STADEN, J.F.: "Automated Simultaneous Determination of Nitrate and Nitrite by Pre-valve Reduction of Nitrate in a Flow-Injection System"; Anal. Chim. Acta, 138 (1982) 403.
- 33 - MALCOME-LAWES, D.J. e PASQUINI, C.: "A Novel Approach to Non-segmented Flow Analysis: Part 3. Nitrate, Nitrite and Ammonium in waters"; J. Autom. Chem., 10 (1988) 192.
- 34 - ECKSCHLAGER, K. : Errors, Measurements and Results in

Chemical Analysis, Van Nostrand Reinhold, London, 1972, pg. 144.

- 35 - LLENADO, R.A. e RECHNITZ, G.A.: "Automated Serum Urea Determination Using Membrane Electrodes"; Anal. Chem., 46 (1974) 1109.
- 36 - SAMPSON, E.J. e BAIRD, M.A.: "Chemical Inhibition Used in a Kinetic Urease/Glutamate Dehydrogenase Method For Urea in Serum"; Clin. Chem., 25 (1979) 1721.
- 37 - GUILBAULT, G.G. e MONTALVO, J.G.: "A Urea-Specific Enzyme Electrode"; J. Am. Chem. Soc., 91 (1969) 2164.
- 38 - ANFALT, T.; GRANALI, A. e JAGNER, D.: "A Urea Electrode Based on the Ammonia Probe"; Anal. Letter, 6 (1973) 969.
- 39 - ALEXANDER, P.W. e JOSEPH, J.P.: "A Coated-Metal Enzyme Electrode for Urea Determinations"; Anal. Chim. Acta, 131 (1981) 103.
- 40 - IANNIELLO, R.M. e YACYNYCH, A.M.: "Urea Sensor Based on Iridium Dioxide Electrodes With Immobilized Urease"; Anal. Chim. Acta, 146 (1983) 249.

- 41 - GUILBAULT, G.G. e HRABANKOVA, E.: "An L-Amino Acid Electrode"; Anal. Letter, 3 (1970) 53.
- 42 - GUILBAULT, G.G. e HRABANKOVA, E.: "New Enzyme Electrode Probes for D-Amino Acids and Asparagine"; Anal. Chim. Acta, 56 (1971) 285.
- 43 - GUILBAULT, G.G. e LUBRANO, G.J.: "Enzyme Electrode for Glucose"; Anal. Chim. Acta, 60 (1972) 254.
- 44 - RECHNITZ, G.A. e LLENADO, R.: "Enzyme Electrode For Amygdalin"; Anal. Chem., 43 (1971) 283.
- 45 - NEUBECKER, T.A. e RECHNITZ, G.A.: "Arginine Determination With Ion-selective Membrane Electrodes"; Anal. Letter, 5 (1972) 653.
- 46 - GUILBAULT, G.G. e NAGY, G.: "Enzyme Electrodes for the Determination of 1-Phenylalanine"; Anal. Letter, 6 (1973) 301.
- 47 - GUILBAULT, G.G. e MONTALVO, J.G.: "An Improved Urea Specific Enzyme Electrode"; Anal. Letter, 2 (1969) 283.

- 48 - GUILBAULT, G.G. e MONTALVO, J.G.: "An Enzyme Electrode for the Substrate Urea"; J. Am. Chem. Soc., 92 (1970) 2533.
- 49 - GUILBAULT, G.G. e NAGY, G.: "Improved Urea Electrode"; Anal. Chem., 45 (1973) 417.
- 50 - GUILBAULT, G.G.; NAGY, G. e KUAN, S.S.: "An Improved Electrode for the Assay of Urea in Blood"; Anal. Chim. Acta, 67 (1973) 195.
- 51 - HANSEN, E.H. e RUZICKA, J.: "Enzymatic Analysis by Means of the Air-Gap Electrode Determination of Urea in Blood"; Anal. Chim. Acta, 72 (1974) 353.
- 52 - MOTTOLA, H.A.: "Enzymatic Preparations in Analytical Continuous-Flow Systems"; Anal. Chim. Acta, 145 (1983) 27.
- 53 - PETERSSON, B.A.: "Enzymatic Determination of Urea in Undiluted Whole Blood by Flow Injection Analysis Using an Ammonium Ion-selective Electrode"; Anal. Chim. Acta, 209 (1988) 239.
- 54 - WANG, J. e LIN, M.S.: "Mixed Plant Tissue-Carbon Paste Bioelectrode"; Anal. Chem., 60 (1988) 1545.

- 55 - KURIYAMA, S. e RECHNITZ, G.A.: "Plant Tissue-Based Bioselective Membrane Electrode for Glutamate"; Anal. Chim. Acta, 131 (1981) 91.
- 56 - SCHUBERT, F.; RENNEBERG, R.; SCHELLER, F.W. e KIRSTEIN, L.: "Plant Tissue Hybrid Electrode for Determination of Phosphate and Fluoride"; Anal. Chem., 56 (1984) 1677.
- 57 - SCHUBERT, F.; WALLENBERG, U. e SCHELLER, F.W.: "Plant Tissue-Based Amperometric Tyrosine Electrode"; Biotechnol. Letter, 5 (1983) 239.
- 58 - ARNOLD, M.A. e GLAZIER, S.A.: "Jack Bean Meal as Biocatalyst for Urea Biosensors"; Biotechnol. Letter, 6 (1984) 313.
- 59 - da SILVA, V.L.: "Construção e Avaliação de Eletrodo enzimático para Determinação de Uréia Utilizando *Canavalia maritima*"; Tese de Doutorado(1991), Instituto de Química - UNICAMP.
- 60 - TAYLOR, D. e NIEMAN, T.A.: "Bipolar Pulse Conductometric Detection of Enzyme Reactions in Flow-Injection Systems - Urea in Serum and Urine"; Anal. Chim. Acta, 186 (1986) 91.

- 61 - de FARIA, L.C.; PASQUINI, C. e NETO, G.O.: "Determination of Urea in Serum by Using Naturally Immobilized Urease in a Flow Injection Conductimetric System"; Analyst, 116 (1991) 357.
- 62 - MASCINI, M. e GUILBAULT, G.G.: "Urease Coupled Ammonia Electrode for Urea Determination in Blood Serum"; Anal. Chem., 49 (1977) 795.
- 63 - ARNOLD, M.A. e RECHNITZ, G.A.: "in Biosensors, Fundamentals and Application", Oxford University Press, Oxford, 1987, pg. 54.
- 64 - ROHWEDDER, J.J.R.; Comunicação Pessoal.
- 65 - CHRISTIAN, G.D.: "Analytical Chemistry", 4th ed., John Wiley & Sons, New York, 1988, pg. 490.
- 66 - BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G.; KRUG, F.J. e REIS, B.F.: "Merging Zones in Flow Injection Analysis: Part 1. Double Proportional Injector and Reagent Consumption"; Anal. Chim. Acta, 101 (1978) 17.
- 67 - BASSON, W.D. e STADEN, J.F.: "Direct Determination of

Calcium in Milk on a Non-segmented Continuous-flow System";
Analyst, 104 (1979) 419.

- 68 - REIS, B.F.; JACINTHO, A.O.; MORTATTI, J.; KRUG, F.J.;
ZAGATTO, E.A.G.; BERGAMIN FILHO, H. e PESSEDA, L.C.R.:
"Zone-sampling Processes in Flow Injection Analysis"; Anal.
Chim. Acta, 123 (1981) 221.
- 69 - PAVON, J.L.P.; PINTO, C.G.; CORDEIRO, B.M. e MENDEZ, J.H.:
"Reversed Injector Loading Technique for Simultaneous
Determinations by Flow Injection Analysis"; Anal. Chem., 62
(1990) 2405.
- 70 - STEWART, K.K.; BROWN, J.F. e GOLDEN, B.M.: "A Microprocessor
Control System for Automated Multiple Flow Injection
Analysis"; Anal. Chim. Acta, 114 (1980) 119.
- 71 - PROP, L.T.M.; THIJSSSEN, P.C. e VAN DOGEN, L.G.G.: "A
Software Package for Computer-controlled Flow-Injection
Analysis"; Talanta, 32 (1985) 230.
- 72 - CLARK, G.D.; CHRISTIAN, G.D.; RUZICKA, J.; ANDERSON, G.F. e
VAN ZEE, J.A.: "A Microcomputer-based Experiment Control and
Detection System for Flow Injection Analysis"; Analytical

Instrumentation, 18 (1989) 1.

- 73 - REIS, B.F.: "Desenvolvimento de uma Interface de Baixo Custo para Aquisição de Dados em Laboratório"; Química Nova, 12 (1989) 282.
- 74 - de FARIA, L.C. e PASQUINI, C.: "Um Módulo Automático de Introdução de Amostra para Sistemas de Análise por Injeção em Fluxo"; Química Nova, 14 (1991) 216.
- 75 - HOROWITZ, P. e HILL, W.: "The Art of Electronics", Cambridge, Cambridge University Press, 1980.
- 76 - de ANDRADE, J.C.; ROCHA, J.C.; PASQUINI, C. e BACCAN, N.: "Effect of On-line Complex Formation Kinetics on the Flow Injection Analysis Signal: the Spectrophotometric Determination of Chromium (VI)"; Analyst, 108 (1983) 621 .