UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

APLICAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS DA ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUÊNCIAL (SIA). 1. DETERMINAÇÃO DE Cr(VI) POR OXIDAÇÃO DO ALCALÓIDE BRUCINA. 2. DETERMINAÇÃO DE Fe(II) POR COMPLEXAÇÃO COM 2,2'-BIPIRIDILA.

Tese de Doutorado apresentada
no Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como
exigência para o cumprimento de
conclusão de créditos do
Programa de Doutorado

Paulo Cesar Costa de Oliveira

Jorge Cesar Masini
Orientador

São Paulo - SP
Junho2001

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

O48a Oliveira, Paulo Cesar Costa de
Aplicações espectrofotométricas da análise por injeção
seqüencial (SIA). 1. determinação de Cr (VI) por oxidação do
alcalóide brucina. 2. determinação de Fe (II) por complexação
com 2, 2' - bipyridila / Paulo Cesar Costa de Oliveira. --
São Paulo, 2001.
101p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador : Masini, Jorge Cesar

1. Análise por injeção seqüencial : Química analítica 2. Química
ambiental 3. Ferro : Química inorgânica 4. Cromo : Química
inorgânica I. T. II. Masini, Jorge Cesar, orientador.

543.08 CDD

**“Aplicações Espectrofotométricas da Análise
por Injeção Sequencial (SIA): 1.
Determinação de Cr(VI) por Oxidação do
Alcalóide Brucina. 2. Determinação de Fe(II)
por Complexação com 2,2'-Dipiridila”**

PAULO CÉSAR COSTA DE OLIVEIRA

*Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Química Analítica.*

Aprovado por:

Prof. Dr. JORGE CESAR MASINI
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. NINA COICHEV
IQ - USP

Prof. Dr. CLAUDIMIR LUCIO DO LAGO
IQ - USP

Prof. Dr. CLAUDIO CELESTINO DE OLIVEIRA
UFSCar - Araras

Prof. Dr. HORÁCIO DORIGAN MOYA
FOC

SÃO PAULO
08 DE JUNHO 2001.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

APLICAÇÕES ESPECTROFOTOMÉTRICAS DA ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUÊNCIAL (SIA). 1. DETERMINAÇÃO DE Cr(VI) POR OXIDAÇÃO DO ALCALÓIDE BRUCINA. 2. DETERMINAÇÃO DE Fe(II) POR COMPLEXAÇÃO COM 2,2'-BIPIRIDILA.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jorge Cesar Masini, pela orientação sempre segura, pelo incentivo, paciência, consideração, amizade e respeito ao longo dos anos de convivência; **MUITO OBRIGADO POR TUDO.**

Ao Prof. Jaim Lichtig pelo respeito e consideração além da valiosa contribuição durante minha formação acadêmica e profissional durante esses anos.

A todos os Professores que de forma direta ou indireta contribuíram para minha formação profissional e pelos momentos de descontração.

Aos Funcionários do Instituto de Química de todos os setores, pela amizade e carinho, além da grande profissionalidade com que sempre me trataram e também pelos momentos de brincadeiras e descontração.

Ao Pessoal do Laboratório, Gilberto, Marcelo, Chico, Orlando, Nelso, Cris (Raponzel do Lab.), Eliane, Luciana e César pela grande amizade, pelo incentivo e carinho com que sempre me tratara; muito obrigado de todo coração.

Ao pessoal do Laboratório da Profa. Lílian: Célia, Andrea, Heliara, Silvana, Denise, Zé Carlos, Sílvio Gaúcho, Maurício e aos demais pelas horas de descontração, brincadeiras e pela grande e eterna amizade.

A Larisse Montero pela força, consideração, carinho, momentos de descontração e conselhos, que em muito ajudaram ao longo desses anos de convivência.

Aos Amigos da época do Mestrado, Kadowaki, Sidão, Ricardo e Luciana, Prof. Romário, Zé Bidu e Neusinha, Ricardo Carneiro, Eliezer, Murilo, Hélio e aos demais que sempre me trataram com muito carinho, atenção e respeito ao longo desses anos todos.

Aos amigos dos outros laboratórios, Vânia, Margarete, Luiz, Alberto, Vitor, Carol, Renato, Dozil, Flávio, Adriana e aos demais que eventualmente não foram citados, pelos momentos de descontração e pela amizade.

Ao Prof. José Soares (Vitória da Conquista) pelas discussões científicas e momentos de descontração.

A Carla, pelo incentivo e pela ajuda ao longo dos anos em que convivemos.

Ao meu irmão de coração, Elzio Quezada e Família, que sempre me apoiaram

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Dedico essa TESE á meus Pais, Antônio Angelo de Oliveira e Tereza Costa de Oliveira sem os quais seria impossível a execução desta e á meu Filho, Vinícius Azevedo de Oliveira que tanto amo.

Aos meus Irmãos, Francisco Aécio, Marcos Antônio, Rosângela e Adriana todo o agradecimento pelo encorajamento, apoio, carinho e confiança.

A vida é feita de coisas simples, mas de muita valia
Gestos singelos traduzidos em pequenas ações,
Procure sempre fazer o bem, procure sentido no que faz.
Procure fazer bem feito, porém, sem querer ser perfeito,
Encontre o sentido das coisas que lhe cercam,
E assim você verá que sua vida será mais FELIZ.

Paulo César Costa de Oliveira.

TÓPICOS

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A análise por injeção sequencial.....	1
1.2 Determinação de íons Cr(VI).....	8
1.2.1 Algumas metodologias e técnicas espectroanalíticas utilizadas para determinação de íons Cr(VI).....	10
1.2.2 Reagentes instáveis gerados in-situ e sua utilização analítica por técnicas de fluxo.....	16
1.2.3 Oxidação da Brucina por íons Cr(VI).....	17
1.3 Determinação de íons Fe.....	20
1.3.1 Algumas metodologias e técnicas espectroanalíticas empregadas para determinação de íons Fe.....	20
1.3.2 A reação entre íons Fe(II) e 2,2'-bipiridila.....	24
1.3.3 Determinação de íons Fe(II) em fármacos.....	24
1.3.4 Especificação de íons Fe(II) e Fe(III).....	27
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	29
2.1 Equipamentos, acessórios.....	29
2.2 Reagentes e soluções.....	29
2.2.1 Soluções para determinação de Cr(VI).....	30
2.2.2 Soluções para determinação de Fe(II).....	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
3.1 Determinação de íons Cr(VI) em amostras certificadas de aço e efluentes industriais.....	32
3.2.1 Amostras certificadas de aço.....	34
3.2.2 Amostras de efluentes industriais.....	35
3.2.3 Procedimento de análise das amostras de aço e efluente industrial.....	36
3.2.4 Determinação de Cr(VI) com brucina através de adição de padrão in-line.....	50
3.2.5 Construção e aplicação de uma cela espectrofotométrica delgada para análise em fluxo.....	64
3.2.6 Determinação de íons Fe(II) em amostras de interesse farmacológico.....	72
3.2.7 Especificação de íons Fe(II) e Fe(III).....	75

TÓPICOS

4. CONCLUSÕES.....	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 -	Limites máximos permitidos de íons Cr de acordo com os padrões de qualidade ambiental em corpos d'água em alguns países segundo suas Legislações.....	9
TABELA 2 -	Alguns reagentes utilizados para determinação de íons Fe e características dos complexos formados.....	21
TABELA 3 -	Composição média das amostras certificadas de aço.....	34
TABELA 4 -	Etapas realizadas para lavagem inicial do sistema e após cada troca de padrão e/ou amostra.....	39
TABELA 5 -	Etapas realizadas para lavagem inicial do sistema e após cada troca de padrão e/ou amostra para diluição in-line	40
TABELA 6 -	Etapas realizadas para determinação direta de Cr(VI) e através de diluição in-line em amostras reais.....	41
TABELA 7 -	Estudo de otimização do sistema - Influência do percurso analítico.....	42
TABELA 8 -	Estudo da influência do volume de amostra/padrão transferidos da bobina coletora para a bobina auxiliar sobre o coeficiente de dispersão.....	44
TABELA 9 -	Parâmetros analíticos das curvas de referência obtidas..	47
TABELA 10 -	Resultados obtidos para análise de amostras reais.....	48
TABELA 11 -	Efeitos de possíveis íons interferentes sobre o sinal de uma solução de Cr(VI).....	49
TABELA 12 -	Etapas realizadas no estudo de dispersão do sistema para adição de padrão in-line utilizando padrões de azul de bromotimol (BTB).....	52
TABELA 13 -	Resultados encontrados para adição de padrão in-line com solução de BTB de concentração conhecida.....	56
TABELA 14 -	Parâmetros analíticos das curvas de referência para adição de padrão convencional através da análise por injeção seqüencial.....	60
TABELA 15 -	Parâmetros analíticos das curvas obtidas na adição de padrão in-line para determinação de Cr(VI) em amostras reais.....	63
TABELA 16 -	Resultados obtidos para a adição de padrão in-line em amostras reais.....	63

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 17 -	Parâmetros analíticos das curvas obtidas.....	67
TABELA 18 -	Etapas executadas no sistema de injeção seqüencial para análise das amostras.....	70
TABELA 19 -	Resultados obtidos para análise de amostras certificadas de aços.....	71
TABELA 20 -	Resultados obtidos para determinação de Fe(II) em diferentes tipos de fármacos de ação anti-anêmica através de análise por injeção seqüencial.....	74
TABELA 21 -	Resultados obtidos para especiação de íons Fe em amostras de extratos acéticos de sedimentos.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Esquema do sistema de Injeção seqüencial.....	2
FIGURA 2 -	Curva de tendência para publicações envolvendo as aplicações da Análise por Injeção Seqüencial.....	8
FIGURA 3 -	Estrutura da Brucina.....	17
FIGURA 4 -	Proposta de estrutura do produto final de oxidação da brucina.....	18
FIGURA 5 -	Estruturas moleculares de alguns reagentes exibidos na Tabela 2.....	23
FIGURA 6 -	Reação entre íons Fe(II) e 2,2'-bipyridyl.....	24
FIGURA 7 -	Espectro de absorção de uma solução de brucina.....	33
FIGURA 8 -	Espectro de absorção da reação entre brucina e íons Cr(VI).....	33
FIGURA 9 -	Configuração do sistema de injeção seqüencial para determinação direta de Cr(VI) em amostras de aço e efluente industrial.....	37
FIGURA 10 -	Configuração do sistema de injeção seqüencial para determinação de Cr(VI) em amostras de aço e efluente industrial com diluição in-line.....	38
FIGURA 11 -	Influência da vazão sobre o sinal.....	43
FIGURA 12 -	Curva de referência para determinação de Cr(VI).....	45
FIGURA 13 -	Curva de referência para determinação de Cr(VI) com diluição in-line.....	46
FIGURA 14 -	Configuração do sistema de injeção seqüencial para avaliação do grau de dispersão no sistema causado pela bobina auxiliar na adição de padrão in-line.....	51
FIGURA 15 -	Registro do grau de dispersão de uma solução de BTB amostra através de diluição in-line por injeção seqüencial.....	54
FIGURA 16 -	Configuração do sistema de injeção seqüencial para determinação de íons Cr(VI) através da adição de padrão in-line.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 17 -	Registro dos sinais para determinação direta de íons Cr(VI) em amostras reais.....	58
FIGURA 18 -	Registros dos sinais obtidos para a adição de padrão convencional das amostras reais.....	59
FIGURA 19A -	Registros dos sinais obtidos para a adição de padrão in-line para a amostra de efluente industrial.....	60
FIGURA 19B -	Registros dos sinais obtidos para a adição de padrão in-line para a amostra certificada de aço BCS 466/1.....	61
FIGURA 19C -	Registros dos sinais obtidos para a adição de padrão in-line para a amostra Certificada de aço BCS 464/1....	61
FIGURA 19D -	Registros dos sinais obtidos para a adição de padrão in-line para a amostra Certificada de aço AISI 4330.....	62
FIGURA 19E -	Registros dos sinais obtidos para a adição de padrão in-line para a amostra Certificada de aço AISI 440 A.....	62
FIGURA 20 -	Desenho da cela delgada com fluxo vertical.....	64
FIGURA 21 -	Configuração do sistema de injeção seqüencial utilizada com a cela espectrofotométrica delgada.....	65
FIGURA 22 -	Comparação dos sinais obtidos com o uso da cela delgada e comercial.....	66
FIGURA 23 -	Variação do sinal em função do percurso óptico da cela delgada.....	68
FIGURA 24 -	Influencia da introdução de bolhas.....	69
FIGURA 25 -	Otimização das condições experimentais para determinação de íons Fe(II) em fármacos de ação anti-anêmica.....	72
FIGURA 26 -	Registro dos sinais obtidos na construção da curva de referência para determinação de íons Fe(II) em fármacos de ação anti-anêmica.....	73
FIGURA 27 -	Registro dos sinais obtidos para determinação de íons Fe(II).....	77
FIGURA 28 -	Registro dos sinais obtidos para determinação de íons Fe Total.....	78

ABSTRACT

Sequential injection methodologies were developed for determination of Cr(VI) and Fe(II) in samples of industrial and environmental interest. Cr(VI) was determined by the reaction with the alkaloid brucine, which is oxidized producing an intermediate with short lifetime and strong molar absorptivity between 500 and 550 nm. The optimized methodology was applied in the determination of Cr in certified stainless-steel samples and metallurgical industrial effluents. This was further exploited in the development of sequential injection procedures to perform in-line dilution and in-line standard addition. In addition to the construction and application of a thin layer vertical flow cell for spectrophotometric measurements was performed.

A sequential Injection methodology for determination of Fe(II) was developed based on the reaction with 2,2'-bipyridyl. This reaction produces a very stable pink complex with strong absorptivity peak at 523 nm. The methodology was tested and applied in Fe(II) determination in anti anemic pharmaceutical formulations and in the speciation Fe(II)/Fe(III) speciation in acetic extracts from river sediments.

OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de metodologia para determinação de analitos de relevância ambiental e industrial através de análise por injeção seqüencial (SIA). Os analitos estudados foram íons Cr(VI) e Fe(II) em função de seu largo uso industrial e possível impacto ambiental. A determinação de cromo hexavalente foi realizada pelo aproveitamento analítico do intermediário formado através de sua reação com o alcalóide brucina em meio sulfúrico na presença de ácido oxálico. O intermediário formado de curto tempo de vida apresenta máxima absorção em 525 nm.

Visando a minimização de tempo de análise e resíduos gerados durante as análises, metodologias de diluição e adição de padrão *in-line* foram propostas. A adição de padrão *in-line* utiliza apenas um único padrão de concentração conhecida reduzindo riscos de contaminação e fontes de erros associados à preparação de padrões.

A divulgação das técnicas de fluxo ainda encontra algumas dificuldades devido ao custo relativamente alto de alguns de seus componentes básicos. O elevado custo das celas de fluxo para estudos espectrofotométricos limita a ampliação do uso das técnicas de fluxo em instituições de ensino que normalmente contam com pouca verba. Na tentativa de contornar este problema, uma cela de baixo custo foi construída e aplicada.

Esta cela possui várias vantagens quando comparada com celas espectrofotométricas comerciais dentre elas, simplicidade de manufatura, percurso óptico variável, adequado para trabalhar com soluções com elevadas concentrações, entre outras.

A determinação de íons Fe(II) também foi explorada em matrizes de interesse farmacológico e ambiental. A determinação de íons Fe(II) baseou-se na sua reação com 2,2'-bipiridila na presença de tampão acetato pH 4,5. Este reagente forma um complexo solúvel de cor rosa intenso que absorve fortemente em 525 nm. Foi desenvolvido procedimento para determinação deste analito em

fármacos de ação antianêmica e procederam-se estudos de especiação em amostras de extratos acéticos de sedimento de rio. Os resultados obtidos mostraram boa concordância quando comparados com valores encontrados por outra técnica analítica.

RESUMO

Neste trabalho desenvolveram-se metodologias analíticas utilizando a análise por injeção seqüencial para determinação de analitos de interesse industrial e ambiental. Determinou-se Cr(VI) por meio de sua reação de oxidação com o alcalóide brucina. Esta reação gera um intermediário com curto tempo de vida (aproximadamente 7,5 s) que exibe máximo de absorção em 525 nm. A metodologia proposta teve suas condições experimentais otimizada e procedeu-se sua aplicação para análise de amostras reais. Investigaram-se os teores de Cr em amostras certificadas de aço e em efluentes industriais.

Foram construídas curvas analíticas utilizando-se água como solução transportadora e padrões também em meio aquoso, ácido sulfúrico (0,6 mol L⁻¹) como solução transportadora e padrões em solução aquosa e finalmente, ácido sulfúrico (0,6 mol L⁻¹) como solução transportadora e na preparação dos padrões com faixas de concentrações de íons Cr(VI) de 1,0 a 8,0 mg L⁻¹ ($r^2=0,9986$), de 0,2 a 1,0 mg L⁻¹ ($r^2=0,9982$) e de 0,1 a 1,0 mg L⁻¹ ($r^2=0,9992$) respectivamente.

Também foi desenvolvida metodologia analítica de diluição *in-line* para análise direta de amostras com concentrações mais elevadas, construindo-se curva analítica com padrões preparados em meio aquoso e utilizando-se água como solução transportadora. A faixa de concentração de íons Cr(VI) investigada foi de 20 a 100 mg L⁻¹ ($r^2=0,9948$) com frequência de amostragem de 80 análises por hora.

Desenvolveu-se metodologia analítica de adição de padrão *in-line* para análise das amostras, além da construção e aplicação de uma cela espectrofotométrica delgada de baixo custo para análise em fluxo. A curva de referência para análise de íons Cr(VI) na faixa de concentração entre 1,0 e 10,0 mg L⁻¹ exibiu coeficiente de correlação (r) 0,993 com uma frequência de amostragem de 80 análises por hora. Os resultados obtidos foram comparados com os valores certificados das amostras com nível de confiança de 95%, não apresentando evidência de erros sistemáticos.

Ainda foi desenvolvida e otimizada metodologia analítica para determinação de íons Fe(II) em diferentes amostras de fármacos e especiação de Fe(II) e Fe(III) em extratos acéticos de sedimento de rio através de análise por injeção seqüencial.

Essa metodologia baseou-se na reação entre íons Fe(II) com 2,2'-bipiridila, que gera um complexo bastante estável de estequiometria 3:1 entre o ligante e íons Fe(II) respectivamente, absorvendo fortemente em 523 nm. A curva de referência para análise dos produtos farmacêuticos apresentou faixa linear para concentrações entre 5,0 e 40,0 mg L⁻¹ de íons Fe(II) ($r=0,999$) com frequência de amostragem de 100 amostras por hora. Para a determinação de íons Fe(II) e íons Fe(III), as curvas analíticas mostraram boa linearidade na faixa de concentração de 0,35 a 4,5 mg L⁻¹ e 0,70 a 9,00 mg L⁻¹ com coeficientes de correlação 0,9998 e 0,9994 respectivamente, com frequência de amostragem de 45 amostra por hora para os dois estados de oxidação.

Todos os resultados obtidos tanto para determinação de Cr(VI) quanto de Fe(II) foram bastante satisfatórios e bem concordantes com valores encontrados por outras técnicas. As metodologias propostas mostraram-se bastante interessantes, inclusive com grande possibilidade de implementação na indústria ou para monitorização desses elementos estudados em trabalhos de campo.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Análise por Injeção Seqüencial (SIA)

A análise por injeção seqüencial, proposta inicialmente por Ruzicka e Marchall¹, é atualmente uma modalidade de técnica de fluxo bem estabelecida com aplicações em muitos campos do conhecimento. Os componentes básicos de um equipamento para injeção seqüencial são constituídos por um sistema de propulsão de líquidos, que pode ser uma bomba peristáltica ou uma bomba de pistão e uma válvula seletora contendo, tipicamente, 6 a 8 portas, além da chamada porta comum, a qual acessa individualmente as demais portas da válvula. Cada uma destas portas é conectada aos frascos contendo reagente, padrão, amostra e detector. A conexão entre o sistema de propulsão e a porta comum é feita com tubos de teflon ou polietileno com diâmetro interno de 0,8 a 1,0 mm, geralmente arranjado na forma de bobina helicoidal com capacidade de pelo menos 1000 μ L. Esta bobina normalmente chamada de bobina coletora, tem a função de armazenar segmentos de solução transportadora, reagentes e amostras que são aspirados para ela seqüencialmente através do sistema de propulsão e da seleção apropriada da porta da válvula. As dimensões da bobina coletora são projetadas de modo a impedir que os segmentos de amostra e reagente atinjam o frasco da solução transportadora ou o interior da seringa, no caso de seringa de pistão.

Com a reversão do movimento da seringa e o direcionamento da válvula seletora para a porta que permite a conexão entre a bobina coletora e a bobina de reação seguida pelo detector, injeta-se a mistura reacional em direção a este com vazão adequada, previamente estabelecida. Ao longo deste trabalho utilizou-se sempre seringa de pistão de modo que deste ponto em diante o sistema de propulsão de líquidos será tratado como seringa de pistão, conforme esquematizado na Figura 1.

Figura 1 - Esquema do Sistema de Injeção Seqüencial. ST - solução transportadora; SP - seringa de pistão; VS - válvula da seringa; BC - bobina coletora; VS - válvula seletora; R1 - reagente 1; R2 - reagente 2; BR - bobina de reação; D - detector; CF - cela de fluxo e L - lixo ou descarte.

No sistema de injeção seqüencial se faz necessário o uso de um computador interfaceado ao sistema propulsor e a válvula seletora. Um software apropriado é utilizado para controlar a direção, velocidade e tempo de aspiração ou injeção soluções através da bomba de pistão, assim como a posição da válvula seletora e aquisição de dados do detector. Como no sistema SIA a propulsão do carregador é intermitente, a freqüência de análise é mais baixa quando comparado aos sistemas de análise em fluxo contínuo. Ainda observa-se que a eficiência de mistura das zonas é menor que nos sistemas de fluxo contínuo pela falta de pontos de confluência e, portanto, procedimentos que utilizam muitos reagentes reduzem e dificultam consideravelmente a eficiência de mistura.

A análise por injeção seqüencial (SIA) baseia-se nos mesmos princípios de um sistema de injeção em fluxo (FIA), ou seja, baseia-se na injeção de segmentos de amostras e reagentes em um fluxo não segmentado seguido pela dispersão controlada e por um controle de tempo muito preciso. O sistema de análise por injeção seqüencial diferencia-se dos sistemas de análise por injeção em fluxo

convencional pela forma de propulsão das soluções, pois enquanto esses utilizam o fluxo basicamente unidirecional, sendo que a mudança do sentido do fluxo necessita obrigatoriamente de intervenção, na análise por injeção seqüencial esse movimento pode ser facilmente controlado bidirecionalmente através do programa que controla a direção do movimento avante ou reverso da seringa de pistão conforme a necessidade de escolha, conferindo maior versatilidade e autonomia ao sistema de injeção seqüencial.

Algumas vantagens do uso da seringa de pistão em relação a bombas peristálticas são evidenciadas pois sua utilização imprime maior robustez, eliminação de etapas de recalibração, entre outras, uma vez que a seringa de pistão não contém elementos deformáveis, presentes nas bombas peristálticas.

Além disso, problemas de pulsação que são comuns nas bombas peristálticas, são minimizados quando seringa de pistão é utilizada¹.

A robustez e autonomia conferida ao sistema viabilizam trabalhos envolvendo monitoramento ambiental in-loco, ou controle de processos industriais.

Devido a tais características, não se faz necessária à execução de freqüentes recalibrações, permitindo assim, sua utilização por longos períodos de tempo sem a necessidade de manutenção/intervenção, o que é muito importante para análise em processos e monitorização ambiental. A mistura dos segmentos de reagentes e amostra no fluxo carregador é promovida através do fluxo reverso e avante. No sistema FIA, assim como nos métodos cromatográficos, a utilização do fluxo unidirecional é fator primordial para o desenvolvimento da análise. Em cromatografia o fluxo unidirecional tem por finalidade a separação dos componentes presentes na matriz, no entanto, nos sistemas FIA, o objetivo visado é a conversão química do analito em uma segunda espécie possível de ser detectada em extensão reprodutível. Para alcançar-se tal objetivo, o fluxo unidirecional é fator primordial para obtenção da reprodutibilidade, controle da dispersão do fluido injetado no carregador e do tempo de chegada da zona reacional ao detector. O fluxo avante (reverso) promove a dispersão necessária na linha única do sistema injeção seqüencial, obtendo-se desta forma o sinal da espécie de interesse a ser detectada^{2,3}.

Outros sistemas para propulsão de soluções foram propostos. Desta forma, Cladera et al.⁵ implementaram a utilização de uma bureta automática convencional, interfaceada a um microcomputador e exemplificam sua utilização determinando íons Fe^{2+} com o-fenantrolina (uso de dois reagentes) e Mg^{2+} com 4-(2-pyridylazo)-resorcinol (PAR) em presença de tampão (trishydroxymethylaminomethano) (uso de três reagentes). Liu e Dasgupta⁶ utilizaram uma bomba eletroosmótica como sistema propulsor de soluções em um sistema de IS para fazer a determinação de íons nitrito e amônia em meio aquoso e num outro trabalho publicado, determinaram somente amônia por difusão⁷. Nesses sistemas, os tubos utilizados para passagem das soluções possuem dimensões capilares (28 μm) proporcionando baixo consumo de reagentes e amostra; gerando pequeno volume de produtos residuais e minimizando o tamanho físico do sistema.

O consumo de reagente, amostra e solução transportadora no sistema SIA são em número bem reduzido em relação aos sistemas FIA. Isto se deve a estratégia de concepção do sistema de injeção seqüencial onde o uso da seringa de pistão aspira ou injeta precisamente, quantidades pré-determinadas de amostra, reagente e solução transportadora enquanto que no sistema de injeção em fluxo usuais isto não é verificado, uma vez que a utilização da bomba peristáltica promove o bombeamento contínuo das soluções utilizadas.

Desde o surgimento da Análise por Injeção Seqüencial (SIA) em 1990¹, vários trabalhos foram publicados aplicando seus princípios e explorando suas potencialidades pela incorporação de várias metodologias e técnicas analíticas. Em função de sua autonomia, robustez e simplicidade, a injeção seqüencial surgiu como uma alternativa para monitorização de processos químicos e bioquímicos onde são exigidos medidas intermitentes e resultados em tempo real⁸.

Muitos processos industriais exigem o acompanhamento através de medidas *on-line* para monitorização de espécies químicas ou detecção de metabólitos gerados durante o processo. Nas indústrias em que se utilizam bioprocessos (principalmente indústrias de bebidas e alimentos), o acompanhamento da atividade microbiológica serve como parâmetro indicativo da eficiência do processo. Esta monitorização pode ser realizada pelo acompanhamento da

produção de substratos e metabólitos gerados a partir da atividade microbiológica ou pela quantidade de alimento disponível para continuação do processo e, portanto estes indicadores devem ser monitorizados seja continuamente ou intermitentemente. A concentração de analitos como ácido láctico, glucose, biomassa total, peróxido de hidrogênio (processos bioquímicos), entre outros, variam rapidamente com o tempo durante o processo, tornando atraente a aplicação da análise por injeção seqüencial para quantificação e acompanhamento destes.

A aplicação da análise por injeção seqüencial para monitorização de bioprocessos foi destacada por muitos autores. Baxter e Christian⁹ demonstraram as potencialidades do SIA para monitorização de biomassa total. O acompanhamento da concentração de glucose e fosfato inorgânico como agentes indicadores de desempenho do processo também são destacados em sua modalidade SIA.

Glucose e penicilina foram monitorizadas *on-line* por Min et al.¹⁰ através da análise por injeção seqüencial. A concentração de glucose durante o processo foi acompanhada indiretamente pela conversão de glucose em glucono-lactona pela ação da glucose oxidase. Esta reação enzimática gera peróxido de hidrogênio que é quantificado por quimiluminescência utilizando luminol. A penicilina é determinada também indiretamente por conversão enzimática em ácido penicilínico (por ação da enzima penicilinase) e determinação deste ácido por seu efeito de supressão da emissão da reação entre iodo e luminol ou espectrofotometricamente pelo efeito de descoloração deste ácido sobre a reação do complexo tri-iodeto/amido.

Várias aplicações da análise por injeção seqüencial direcionada para a monitorização de processos foram ressaltadas por Barnett e colaboradores¹¹. Nesse artigo de revisão, muitos trabalhos versando sobre a monitorização *on-line* de processos industriais são relatados e discutidos apropriadamente. O acompanhamento *on-line* de espécies químicas de interesse ambiental utilizando um sistema de injeção seqüencial tem sido bastante explorado por vários

pesquisadores. Elsholz et al.¹² realizaram a monitorizaram *on-line* da concentração de íons mercúrio em água de rio.

van Staden e Taljaard¹³ executaram a monitorização de íons sulfato em efluentes industriais por turbidimetria, com diluição das amostras *in-line*. Para contornar o problema de deposição do precipitado nas paredes dos tubos e na cela de detecção, os autores utilizaram um segmento de solução contendo EDTA em tampão alcalino. A diluição *in-line* das amostras foi realizada de duas maneiras: o primeiro, contendo a seguinte seqüência de segmentos levados para o detector; EDTA-água-reagente-água-amostra e o segundo EDTA-água-reagente-amostra. Com essa metodologia de diluição duas faixas dinâmicas de trabalho foram investigadas, uma de 50 a 500 mg L⁻¹ e outra de 500 a 5000 mg L⁻¹.

A acomodação de várias metodologias sem a necessidade de complicadas configurações e a adaptação de mais de uma metodologia no mesmo sistema de análise sem a necessidade de reconfiguração do sistema inicial, torna o sistema de injeção seqüencial extremamente versátil quando comparado com o sistema de análise em fluxo convencional. Esta característica do sistema de injeção seqüencial permite sua aplicação a análise de multicomponentes de forma simples. Muitos estudos sobre a determinação de multicomponentes utilizando o sistema de análise por injeção seqüencial têm sido relatados. A análise simultânea de analitos inorgânicos como Ca²⁺ e Mg²⁺, PO₄³⁻, SiO₃²⁻ e espécies orgânicas como glucose, ácido láctico e penicilina, glicerol e 2,3-butanodiol, entre outros, utilizando o sistema de injeção seqüencial foram publicadas^{14,15,16,17,18,19,20}.

Várias metodologias como pré-concentração^{21,22,23,24,25}, extração por solvente^{26,27,28,29}, diluições³⁰, determinação de estequiometria de reações³¹, sistemas de difusão gasoso³², medidas eletrométricas^{33,34,35,36}, entre outros, podem ser facilmente arranjados no sistema de injeção seqüencial. A alta precisão da seringa de pistão, controlada pelo software, faz da análise por injeção seqüencial uma ferramenta adequada para medidas na modalidade "stopped-flow", permitindo o acompanhamento mais preciso da velocidade da reação³⁷. O controle preciso da direção do fluxo, do tempo e escoamento do segmento contendo a mistura reacional, propicia a aplicações desta técnica de fluxo no modo stopped-flow³⁸.

Ruzicka e Gubeli³⁹ determinaram traços de enzimas proteolíticas utilizando a análise por injeção seqüencial no modo stopped-flow com detecção por fluorescência com o uso do tripeptídeo contendo 7-amino-4-metilcumarina como reagente. A análise de resíduos nucleares também tem se utilizado da análise por injeção seqüencial para separar e quantificar espécies como ⁹⁹Tc, ⁹⁰Sr, ⁹⁰Y entre outras^{40,41,42,43,44}. Neste campo de atividade onde etapas de manipulação das amostras tornam-se um fator crítico devido aos riscos associados à emissão de radiação, a injeção seqüencial apresenta-se como uma alternativa para minimização destas etapas de risco.

O uso de microesferas de vidro com dimensões microscópicas foram propostas como uma maneira bastante atraente de pré-concentrar, pois além de propiciar uma superfície sempre renovada entre outras vantagens⁴⁵. Uma cela especialmente construída e adaptada para uso nesse tipo de sistema de pré-concentração foi citada na literatura (jet ring cell)⁴⁶. Nesta cela, uma suspensão contendo as microesferas impregnadas com reagente é aspirada por um canal central em direção perpendicular a uma superfície óptica plana (detector). A solução escapa através da fenda entre a superfície óptica e um anel de borracha, ficando as microesferas retidas, juntas à superfície de detecção. Com a aplicação do fluxo reverso no sistema de injeção seqüencial, as microesferas são aspiradas e drenadas para o descarte. Além das microesferas funcionarem como pré-concentradoras, outra vantagem é o fato da constante renovação da camada junto ao detector aliado ao fato das microesferas poderem ser recuperadas (lavadas) após seu uso. A etapa de impregnação das microesferas é bastante simples e prática, facilitando assim, seu uso e implementação em estudos envolvendo desde imunoensaios até determinação de analitos de interesse ambiental^{47,48,49,50,51,52,53,54}.

Em virtude de sua crescente aplicação em muitas áreas do campo do conhecimento, alguns artigos de revisão foram publicados^{11,55,56}. Estes artigos de revisão contam com pouco mais de 100 publicações e segundo levantamento mais recente, observa-se que nos últimos dois anos (1999 e 2000), o número de artigos publicados envolvendo as aplicações da análise por injeção seqüencial

praticamente dobrou, chegando a algo em torno de 200 trabalhos publicados⁵⁷. A Figura 2 mostra o crescente avanço das aplicações do SIA.

Atualmente as aplicações da análise por injeção seqüencial encontram-se em pleno desenvolvimento e muitos trabalhos têm surgido, explorando cada vez mais as potencialidades deste sistema de injeção em fluxo. A utilização de multiseringas implementado por Cerdà et al.⁵⁸ tem ampliado consideravelmente a versatilidade da utilização da Injeção Seqüencial.

Figura 2 - Curva de tendência para publicações envolvendo as aplicações da Análise por Injeção Seqüencial (SIA).

1.2 Determinação de Cr(VI)

A determinação de Cr(VI) é de grande importância tanto do ponto de vista industrial e ocupacional, quanto ambiental. Sob o aspecto industrial este elemento participa de numerosos processos que se estendem desde a composição de aços inoxidáveis e ligas, até indústrias de galvanotecnia devido às propriedades químicas de resistência a oxidação deste metal. Os curtumes também contribuem consideravelmente em função do uso de sais de cromo no seu processo. Os

principais estados de oxidação deste elemento presente em solução são Cr(III) e Cr(VI). O cromo no seu estado trivalente é um nutriente essencial, atuando no metabolismo da glucose e lipídica. Sua deficiência nos seres humana causa efeito semelhante aos dos diabetes *mellitus* e em ratos, arteriosclerose. A ingestão média de Cr total necessária nos seres humanos está entre 30 e 100 $\mu\text{g dia}^{-1}$. A deficiência de Cr no organismo humano também leva a um aumento da toxicidade de íons chumbo, enquanto que o excesso de Cr(VI) nos sistemas biológicos tem implicado em formas específicas de câncer⁵⁹. O estado de oxidação hexavalente possui elevada toxicidade tanto aos organismos aquáticos e de uma maneira geral, ao meio ambiente quanto ao próprio homem. Ao Cr(VI) associam-se distúrbios gastro-intestinais, no trato respiratório, alergias, dermatites, além de ser potencialmente carcinogênico^{60,61,62,63}. Estudos comparativos mostram que o cromo hexavalente é cerca de 100 a 1000 vezes mais tóxico que o trivalente⁶⁴.

No Brasil, segundo a Legislação Federal (Resolução CONAMA 20/88) os limites máximos para íons cromo trivalente e hexavalente presentes nos corpos d'água são 0,5 e 0,05 mg L^{-1} respectivamente. As faixas de concentrações de Cr(VI) tipicamente encontradas em águas superficiais e marinhas estão entre 0,3-6,0 e 0,1-0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente⁶⁵. A Tabela 1 mostra os limites máximos permitidos de íons Cr em corpos d'água, de acordo com os padrões de qualidade ambiental estabelecidos por Legislação em alguns países.

Tabela 1 - Limites máximos permitidos de íons Cr de acordo com os padrões de qualidade ambiental, em corpos d'água em alguns Países.

PAÍS	CONCENTRAÇÃO DE Cr (mg L^{-1})		
	HEXAVALENTE	TRIVALENTE	TOTAL
Brasil*	0,05	0,5	0,5 [#]
CEE**	-	-	0,05
Alemanha***	-	-	0,07

*Resolução CONAMA Nº 20/88; [#] CETESB - Decreto Estadual Nº8468/76; ** CEE - Comunidade Econômica Européia - Directive 75/440/CEE; ***Landesamt Fur Wasser Und Abfall (NRW)/82.

1.2.1 Algumas metodologias e técnicas espectroanalíticas empregadas para determinação de Cr(VI)

Uma grande variedade de metodologias espectrofotométricas foram desenvolvidas para determinação de íons Cr(VI). Muitas destas, utilizam as propriedades oxidantes deste íon em meio ácido para sua determinação^{66,67}. Um largo número de reagentes é utilizado para tal fim, conferindo maior ou menor sensibilidade de detecção, destacando-se entre eles a difenilcarbazida que proporciona boa seletividade e sensibilidade^{68,69,70,71,72,73}. O produto de oxidação formado pela reação entre íons Cr(VI) e a difenilcarbazida em meio sulfúrico possui máxima absorção em 540 nm. A estrutura do cromóforo formado ainda não é bem conhecida.

Alguns pesquisadores sugerem que o produto de oxidação da difenilcarbazida (difenilcarbazona) reage com os íons Cr(III) para formar o complexo de cor violeta. Entretanto, esta explicação ainda não é totalmente aceita pois quando se adiciona íons Cr(III) a uma solução de difenilcarbazona, não se observa a formação do complexo violeta. A possibilidade dos íons Cr(III) não hidratados serem os responsáveis pela formação do complexo também não é totalmente aceita uma vez que quando o cromóforo é extraído em clorofórmio ou em isopentanol (em presença de íons perclorato), a fase aquosa residual ainda contém quase a metade dos íons Cr(III).

Balasubramanian e Maheswari⁷⁴ determinaram íons Cr(VI) de forma indireta baseados na oxidação quantitativa de hidroxilamina a nitrito (pH 3,5-4,5) e posterior determinação de íons NO_2^- através da reação de diazotação com p-nitroanilina, seguido do acoplamento do produto diazotado com N-(1-naphtyl)ethylenediamine (NEDA) formando o azo corante 4-(4-nitrophenylazo)-N-1-naphthylenediamine que absorve fortemente em 545 nm.

O uso de métodos de extração com solvente e posterior detecção espectrofotométrica também é uma alternativa e tem sido consideravelmente explorada, visando aumentar a sensibilidade e seletividade das determinações e consequentemente obtenção de melhores resultados. As técnicas de extração com

solvente são práticas bastante estabelecidas em química analítica e a formação de complexos binários ou ternários extraídos em solvente adequado, tem auxiliado na determinação de íons $\text{Cr}^{75,76,77,78,79}$. A aplicação das técnicas de extração com solventes proporcionam um aumento significativo da seletividade, reduzindo sobremaneira a influência de interferentes na análise além de pré-concentrar consideravelmente o analito presente em uma das fases.

Contudo, o uso de extração por solventes é relativamente moroso, mesmo quando adaptado para análise em fluxo, exigindo acessórios específicos como segmentadores e separadores de fase, entre outros⁸⁰.

Embora alguns métodos espectrofotométricos sejam consideravelmente sensíveis, os métodos cinéticos, espectrofluorimétricos e quimiluminescentes alcançam maior sensibilidade e menores limites de detecção^{81,82,83,84,85,86,87}. Os métodos cinéticos baseados no efeito catalítico de algumas espécies químicas geralmente apresentam baixa frequência de análise além de possuírem pobre seletividade, forçando em alguns casos, a utilização de agentes complexantes para evitar a ação de íons interferentes. Um pequeno número de metodologias para determinação de Cr(VI) por espectrofluorimetria é conhecido. Elas baseiam-se na formação de compostos fluorescentes^{88,89} ou na supressão de fluorescência de reagentes como no caso da Rodamina 6G em meio sulfúrico⁹⁰. Outros procedimentos espectrofluorimétricos que preconizam a determinação de Cr(III) ⁹¹, também podem ser aplicados à determinação de íons Cr(VI) através da redução prévia deste íon. Agentes redutores tais como: ácido ascórbico, cloridrato de hidroxilamina, sulfato de hidrazina, sulfito ou bissulfito de sódio, entre outros, podem ser utilizados para tal fim.

A oxidação de Cr(III) a Cr(VI) também é bastante explorada, permitindo-se desta maneira, especiar estes íons em uma vasta gama de matrizes ambientais como águas naturais, sedimentos e solos. Alguns trabalhos publicados na literatura apregoam a oxidação *in-line* de Cr(III) com H_2O_2 em meio básico, sendo também citado a utilização de sulfato de Ce(IV) em meio sulfúrico⁹² e peroxidissulfato em presença de traços de íons Ag^+ em meio ácido. Feigl⁶⁸ relata que os íons prata (II) formados atuam como um potente agente oxidante. Outro agente oxidante utilizado

utilizado para tal propósito é o periodato (IO_4^-), que em meio sulfúrico oxida íons Cr(III) a Cr(VI) , porém, melhores resultados são obtidos em meio básico. Segundo estudos realizados por Paleologos et al⁸⁸ a oxidação com periodato em meio básico é mais rápida quando comparado com o mesmo processo fazendo uso de peróxido de hidrogênio, porém, o uso de água oxigenada apresenta a vantagem da remoção do seu excesso ser mais facilitada por simples aquecimento.

Nas últimas décadas os estudos de especiação destes íons tem sido predominantemente realizadas através de técnicas de fluxo com detecção espectrofotométrica (utilizando a difenilcarbazida como reagente)^{93,94,95,96}, espectrofluorimétrica⁸⁸, espectrometria de absorção atômica (com chama ou utilizando atomização eletrotérmica)^{97,98,99,64}, espectrometria de emissão atômica com excitação através de plasma de argônio induzido¹⁰⁰ ou baseado na conjunção de mais de um detector¹⁰¹. Quando se utiliza apenas a espectrometria de absorção atômica ou emissão atômica como detector, normalmente torna-se necessário separar um destes íons através do uso de resinas de troca iônica, alumina ativada ou outro tipo de material que adsorva uma destas espécies¹⁰². Essas colunas atuam separando o analito e também pré-concentrando a espécie adsorvida, permitindo desta forma a determinação de traços deste analito.

O método quimiluminescente mais amplamente conhecido baseia-se na reação de oxidação catalítica de luminol por peróxido de hidrogênio em presença de íons Cr(III) ¹⁰³. Vários metais catalisam esta reação e para evitar interferência de outros íons metálicos, a adição de EDTA como agente mascarante torna-se necessária. Para execução desta metodologia, Cr(VI) deve ser previamente reduzido a trivalente.

Devido à importância deste analito quer no âmbito industrial, da saúde ocupacional ou ambiental, o desenvolvimento de novas metodologias ou a otimização de metodologias já existentes torna-se bastante relevante. No campo industrial, podemos observar que os efluentes gerados possuem elevadas concentrações de Cr(VI) , necessitando-se na maioria dos casos, etapas de diluição das amostras, consumindo demasiado tempo de análises.

Uma maneira de se reduzir o tempo de análise é realizar a diluição em fluxo^{30,104,105,106,107}, ou ainda, pode-se também modificar o percurso óptico da cela de fluxo para reduzir a sensibilidade de detecção.

A execução da diluição em fluxo é bem mais rápida e precisa quando comparada com a operação manual à qual estão associadas algumas fontes de erro como: ajuste de meniscos, risco de contaminação das amostras pela manipulação, entre outros.

Por outro lado, o ajuste da geometria da cela pode reduzir consideravelmente o tempo de análise de amostras com altas concentrações através da diminuição da sensibilidade de detecção, reduzindo etapas de diluição. As celas de fluxo comerciais além de possuírem custo relativamente alto, geralmente não permitem a modificação de sua estrutura, dificultando, portanto a modificação de sua geometria.

Tais problemas encorajaram muitos pesquisadores a construir celas espectrofotométricas que conciliem baixo custo e bom desempenho. Alguns trabalhos têm sido descritos na literatura como alternativa de reduzir custos e contornar um dos principais problemas encontrados em algumas celas comerciais que é a retenção de bolhas no percurso óptico. Para contornar este inconveniente, as celas comerciais adotam várias geometrias como celas em forma de “U”, “Z” e com um aprisionador de bolha em forma de “J” antes do percurso óptico. Dentre as três configurações acima citadas, a cela espectrofotométrica com geometria em forma de “U” apresenta maior necessidade de intervenções devido ao aprisionamento de bolhas de ar durante as análises.

Reis¹⁰⁸ construiu uma cela espectrofotométrica de baixo custo, constituída de três blocos de Perspex^{MR} agrupadas em forma de sanduíche. Apesar de sua construção simples, a cela possui percurso óptico fixo e requer intervenção do operador para remoção de bolhas de ar.

Araújo et al.¹⁰⁹ desenvolveram um modelo de cela espectrofotométrica, inserindo um tubo de vidro (4,5 cm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno) verticalmente dentro de um suporte de madeira com uma fenda retangular com dimensões 2 x 5 mm para a passagem do feixe óptico. Esta configuração elimina a

possibilidade de retenção de bolhas, pois o fluxo ascendente arrasta as bolhas. Entretanto, o volume morto torna-se relativamente grande e a sensibilidade comprometida.

Pasquini e Raimundo Jr¹¹⁰ descrevem a construção de um fotômetro simples para análise por injeção em fluxo e adaptam uma cela de fluxo em U, com percurso óptico fixo, requerendo intervenção para retirada de bolhas.

Um modelo mais versátil foi construído por Pavón et al.¹¹¹, cuja cela é composta por dois blocos de PVC e utiliza separadores em Teflon^{MR}. As análises são realizadas pela medida da reflectância da luz captada através de cabos de fibra óptica. Suas vantagens residem no pequeno volume interno, facilidade de variar o percurso óptico, não retenção de bolhas, podendo ainda ser utilizada como cela de difusão de gases. Sua desvantagem está no elevado custo das fibras ópticas, além da necessidade de um espectrofotômetro apropriado para o seu emprego.

Uma cela para medidas espectrofotométricas em fase sólida foi construída por Reis e colaboradores¹¹². Esta cela é composta por dois blocos de acrílico separados por uma borracha de 1,0 mm de espessura na qual é feito um orifício de 10 mm de diâmetro. Este corte circular fixa a fase estacionária constituída de 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol (TAN), imobilizado em sílica funcionalizada C18. Com a detecção espectrofotométrica em fase sólida incorpora-se uma etapa de preconcentração, resultando em considerável ganho de sensibilidade quando comparado com sistemas convencionais. Um dos pontos críticos desta cela é o fato de sua geometria poder causar uma distribuição heterogênea do analito em virtude da ocorrência de caminhos preferenciais da solução contendo o analito. Para contornar este problema, um estudo do posicionamento da distância da cela em relação ao feixe óptico é crucial¹¹².

Uma cela espectroeletroquímica foi confeccionada por Gouveia et al.¹¹³ com volume interno de aproximadamente 20 µL para detecção de Fe(II) através do efeito de espalhamento de radiação (Raman).

Na tentativa de reduzir custo e reduzir a sensibilidade de detecção, construiu-se uma cela delgada com fluxo vertical e adaptou-se a um

espectrofotômetro comercial¹¹⁴. A cela espectrofotométrica construída consiste simplesmente de dois blocos de acrílico de dimensões 4,2 cm de altura por 1,3 cm de largura e 0,6 cm de espessura, contendo em um deles dois pequenos furos de 2,0 mm para entrada e saída de solução dispostos verticalmente e distantes entre si por 1,8 cm. Nos dois blocos foram feitos dois furos concêntricos de 8,0 mm e 4,0 mm de diâmetro respectivamente. O furo menor (4,0 mm) atravessa todo o acrílico nas duas peças e o de 8,0 mm não chega a atravessar as placas de acrílico, servindo apenas de apoio para a fixação das janelas de vidro. As placas de acrílico são separadas por um espaçador de borracha removível com espessuras que variam de 0,6 a 0,8 mm, que regulam o volume interno e o caminho óptico da cela. O volume interno da cela é de aproximadamente 31 μL quando a espessura do separador é 0,6 mm. Foram realizados experimentos comparativos entre a cela construída e uma cela de fluxo comercial utilizando uma solução de azul de bromotimol a fim de ressaltar sua aplicabilidade. Para demonstrar sua aplicação e verificar seu desempenho, determinou-se íons Cr(VI) em amostras certificadas de aço, utilizando análise por injeção sequencial.

Outro problema freqüentemente encontrado durante as análises é a presença constante de íons interferentes. Dentre as várias maneiras de contornar este problema, podemos citar o método de adição de padrão. Esse método possui grande eficiência e já é bastante conhecido na literatura^{115,116}.

A adaptação do método de adição de padrão convencional para técnicas de fluxo tem sido bastante explorada objetivando aumentar a rapidez, redução de rejeitos e ainda, a eliminação de interferências. O método de adição de padrão por interpolação foi criticamente investigado sob o aspecto teórico-experimental e comparado com o procedimento de calibração convencional por Koscielniak¹¹⁷. Neste trabalho ele investiga a influência de íons alumínio sobre a determinação de Mg^{2+} por espectrometria de absorção atômica.

Falcó e colaboradores¹¹⁸ compararam diferentes configurações de sistemas de fluxo que utilizam o método de adição de padrão em fluxo e propõem uma nova metodologia para adição de padrão com reduzido consumo de reagentes e amostra, fazendo uso de uma válvula seletora de 6 portas. Para contornar a

influência de interferentes na determinação espectrofotométrica de nitrato em extratos de plantas, Giné e co-autores¹¹⁹ desenvolveram um método simples de adição de padrão em fluxo. Este método permite uma frequência de análise de 100 medidas por hora.

Vários outros trabalhos têm sido publicados versando sobre a adaptação do método de adição de padrão para técnica de fluxo empregando detecção por espectrometria de absorção atômica^{120,121}, fotometria de chama¹²², espectrometria de emissão atômica com excitação por plasma induzido de argônio (ICP-plasma)^{123,124}.

Também foi desenvolvida uma metodologia para adição de padrão *in-line* através de análise por injeção seqüencial¹²⁵. Esta metodologia foi empregada para determinação espectrofotométrica de íons Cr(VI) em amostras certificadas de aço e efluente industrial. O método faz uso de um único padrão, reduzindo tempo na preparação de padrões e as fontes de erros associadas às etapas de manipulação de amostra e diluições.

1.2.2 Reagentes instáveis gerados *in-situ* e sua utilização analítica por técnicas de fluxo

A utilização de reagentes instáveis gerados *in-situ* para fins analíticos é uma prática antiga e nas últimas décadas tem sido mais bem aproveitada pela associação com técnicas de fluxo. Um dos sistemas clássicos mais conhecidos é aquele onde iodo é gerado em presença de excesso de iodeto em meio ácido. Devido à instabilidade e volatilidade dessa molécula alguns cuidados especiais são tomados para evitar resultados errôneos.

Uma maneira elegante de se contornar tais problemas surgiu com a utilização da coulometria, através da qual o reagente é gerado eletroquimicamente no meio reacional e instantaneamente reage com a espécie a ser determinada gerando assim, resultados mais precisos e exatos.

Com o advento das técnicas de fluxo, em meados da década de 70, a utilização analítica de reagentes instáveis gerados in-situ tornou-se bem mais praticável. Vários agentes oxidantes tais como Ag(II), Co(III), Mn(III), Cu(III), entre outros, foram gerados eletroquimicamente¹²⁶.

Algumas reações que formam estados transientes com curto tempo de residência são bem conhecidas na literatura. Dutt e Mottola¹²⁷ relatam algumas reações que apresentam estas características, dentre elas, a oxidação da brucina em presença de ácido oxálico.

A brucina é um alcalóide encontrado naturalmente em sementes de *Strychnos nux-vomica*. Estas sementes têm sido largamente utilizada na medicina tradicional chinesa para alívio de dores, redução de inchaços, promoção da circulação, entre outras¹²⁸. Muito embora em pequenas concentrações a brucina possua efeitos benéficos, em concentrações mais altas ela apresenta elevada toxicidade como a maioria dos alcalóides. A estrutura da brucina é apresentada em seguida (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura molecular da brucina.

1.2.3 Oxidação da Brucina por íons Cr(VI)

A brucina é utilizada como reagente para determinação de nitrato em meio sulfúrico¹²⁹. Esta reação é conhecida desde 1863 quando foram feitas as primeiras observações por Kersting . A Association of Official Analytical Chemists (AOAC)¹³⁰ recomenda a determinação de nitrato com brucina em meio sulfúrico monitorando a formação do produto final em 430 nm. Este procedimento além de ser demorado

exige condições drásticas de reação como aquecimento a 100 °C por 20 minutos e altas concentrações de ácido sulfúrico (7,0 mol L⁻¹). Masini et al.¹³¹ estudaram mais detalhadamente essa reação, realizando medidas eletroquímicas e estudos espectrofotométricos para elucidar melhor o mecanismo de formação do intermediário e do produto final. Nesse trabalho eles concluem que o produto final é formado pela dimerização do intermediário (bruciquinona) que se forma no início da reação conforme o esquema abaixo mostrado (Figura 4).

Figura 4 - Proposta de estrutura do produto de oxidação final da brucina.

A brucina reage também com espécies químicas oxidantes gerando um intermediário brucicromo de curto tempo de vida que absorve fortemente a 530 nm transformando-se rapidamente no produto final, que absorve mais fracamente entre 410 e 430 nm. Esta reação ocorre em meio ácido (sulfúrico) em presença de ácido oxálico como ativador da reação. Certos ácidos carboxílicos são conhecidos pelo seu efeito de ativação em reações catalíticas de oxidação de certos compostos orgânicos^{132,133}. Dolmanova e colaboradores investigaram a influência de vários ácidos orgânicos (p-aminobenzóico, oxálico, cítrico, salicílico e sulfosalicílico) sobre a oxidação da o-dianizidina por peróxido de hidrogênio e conclui que estes ácidos não aceleram a oxidação da o-dianizidina. Porém, é observado que a atividade catalítica de íons Cr(VI) na presença desses ácidos aumenta pronunciadamente. O mecanismo de ação dos ácidos carboxílicos e o papel desempenhado pelos íons Cr(VI) ainda não é totalmente compreendido, abrindo grandes perspectivas para futuras pesquisas neste campo.

O aproveitamento analítico do intermediário formado só é possível através de técnicas de fluxo. Yamane e Mottola¹³⁴ realizaram a determinação de Cr(VI) com brucina, utilizando um sistema de fluxo com recirculação de reagentes e produtos. Além da complexidade do sistema, no sistema em fluxo proposto, a recirculação do material reacional rapidamente contamina o sistema, mostrando-se pouco prática. Neste trabalho os autores relatam que a reação entre a brucina e o Cr(VI) ocorre em duas etapas distintas como mostrado a seguir:

Segundo Yamane e Mottola¹³⁴, o intermediário vermelho é postulado como sendo bruciquinona, formado pela oxidação das duas metoxilas ligadas ao anel aromático da brucina.

A presença de ácido oxálico agindo como ativador, favorece a formação do intermediário, catalisando a reação. A estrutura química do intermediário ainda não é totalmente conhecida, abrindo campo para estudos mais aprofundados.

1.3 Determinação de íons Fe

O ferro é um dos 5 elementos mais abundantes da crosta terrestre, podendo ser encontrado no estado fundamental, na forma bivalente e trivalente de oxidação. Devido sua larga utilização industrial, este elemento participa de grade variedade de processo químicos. O ferro é um elemento essencial a vida participando da formação das moléculas de hemoglobina e atuando no transporte de oxigênio para os tecidos e células.

Em ambientes aquáticos este elemento encontra-se principalmente no estado de oxidação bi e trivalente. Quando em concentrações elevadas, alguns inconvenientes como odor e gosto desagradáveis, devido a produção de ferro-bactérias, turvação pela formação de hidróxidos ligeiramente solúveis dificultando em muitos casos a utilização industrial dessas águas como em lavanderias industriais, indústrias que utilizam tais águas para alimentação de caldeiras, indústrias de bebidas, entre outras.

O limite de concentração máxima permitida por legislação para ferro em águas, refere-se geralmente a concentração total dissolvido (Fe(II)+Fe(III)), não excedendo na grande maioria dos casos, valores entre 0,3 e 5,0 mg L⁻¹.

1.3.1 Algumas metodologias e técnicas espectroanalíticas empregadas para determinação de íons Fe

Uma vasta gama de reagentes são empregados para determinação espectrofotométrica de íons Fe^{68,69,70,71,73}. Alguns desses reagem especificamente com íons Fe(II) e outros com Fe(III). A grande maioria dos reagentes utilizada

prima por boa seletividade, gerando considerável precisão e exatidão dos resultados. Devido a grande reversibilidade de redução do estado trivalente para bivalente e vice-versa ($E^{\circ}_{\text{Fe(III)/Fe(II)}} = + 0,771 \text{ Volt}$), a especiação destes estados de oxidação pode ser facilmente explorada, tomando-se os devidos cuidados para não causar alterações químicas e/ou físico-químicas durante a manipulação das amostras e padrões.

Dentre os reagentes espectrofotométricos mais empregados para determinação de íons Fe (Fe(II) ou Fe(III)) estão a 1,10-fenantrolina, 2,2'-bipiridila, 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (batofenantrolina), tiocianato, 7-iodo-8-hidroxiquinolina (ferron), 3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-sulfofenil)-1,2,4-triazina (ferrozina), 1,2-dihidroxibenzeno (tiron), entre outros. Dentre estes reagentes a 1,10-fenantrolina é o mais comumente utilizado para determinação de Fe. A Tabela 2 exibe algumas propriedades dos complexos formados pela reação de alguns dos reagentes mais utilizados para determinação de íons Fe através de espectrometria de absorção molecular.

Tabela 2 - Alguns reagentes utilizados para determinação de íons Fe através de espectrometria de absorção molecular e características dos complexos formados.

REAGENTE	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon \cdot 10^4$ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	M:L
(I) 2,2'-bipiridila (α,α -bipiridil ou Bipy)	522	0,87	1:3
(II) 2,2',2''-Terpiridil (terpy)	522	1,15	1:3
(III) 1,10-fenantrolina (o-fenantrolina)	510	1,11	1:3
(IV) 4,7-dihidroxi-1,10-fenantrolina	520	1,48	1:3
(V) 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (Batofenantrolina)	533	2,24	1:3
(VI) 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (Batofenantrolina)*	535	2,21	1:3
(VII) 2,4,6-tris(2'-piridil)-1,3,5-triazina (2,4,6-tripiridil-s-triazina ou TPTZ)	595	2,5	1:2
(VIII) 3-(4-fenil-2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina (PPDT)	570	2,9	1:3
(IX) Fenil-2-piridil Cetoxima	545	1,25	1:3

(X) Tiocianato (SCN⁻)	480	0,85	CV
(XI) 7-Iodo-8-hidroxiquinolina (Ferron)	610	0,4	
(XII) Cromo Azurol S	650	4,3	-
(XIII) Eriocromo Cianina R	565	3,3	-
(XIV) Ácido Sulfosalicílico	490	0,26	1:1
(XV) ácido 1,2-dihidroxibenzo-3,5-dissulfônico (3,5-pirocatecol ou Tiron)	470	0,57	CV
(XVI) 5-hidroxi-2-hidroximetil-4-pirona (Kojic acid)	430	-	-
(XVII) 2-hidroxi-1-nitroso-3,6-naftaleno* (Sal Nitroso R)	715	-	-
(XVIII) 4-amino-4'-metoxidifenilamônio** (Variamine® blue)	-	-	-
(XIX) Acetilacetona	440	-	-
(XX) Ácido Mercaptoacético ou Mercaptoacetato	535	-	-

M:L – Relação metal-ligante; * Na forma de dissulfonato de sódio; ** Na forma de cloreto; CV – composição variável; (I) a (IX) reagentes para determinação de íons Fe(II); (X) a (XX) reagentes para determinação de íons Fe(III).

Algumas das estruturas moleculares dos reagentes acima tabelados são exibidos na Figura 5. Além dos reagentes acima citados, outros reagentes menos usuais também podem ser utilizados para determinação desses íons^{68,69,70,71,73}.

Métodos que incorporam metodologias de extração com solvente através da formação de pares iônicos têm sido bastante explorados com o objetivo de quantificar Fe em uma grande variedade de matrizes^{135,136,137,138,139}. Metodologias mais sensíveis baseadas em fluorescência molecular também foram propostas. Gladilovich e Stolyarov¹⁴⁰ propuseram a oxidação da 1,2-fenilenodiamina por íons Fe, extraíndo o produto formado (2,3-diaminofenazina) que é altamente fluorescente, em solvente adequado. Koh e Ryan¹⁴¹ exploram a fluorescência exibida pela ação de íons Fe sobre biftalato de potássio em presença amalgama líquido de zinco e oxigênio. A determinação fluorimétrica de Fe(III) baseado na supressão de fluorescência do ácido salicílico, devido a complexação deste ácido com íons férricos foi apresentado por Cha e Park¹⁴². Guo-Zhong e Zhi-Liang¹⁴³

investigaram o efeito cinético-catalítico de íons Fe(III) sobre a oxidação da leuco Rodamina B (forma reduzida da Rodamina B) para quantificar esses íons em amostras de águas de rios e lagos. Bowei et al.¹⁴⁴ descrevem a quantificação de Fe(III) em níveis sub-nanomolar em água do mar por quimiluminescência.

Figura 5 - Estruturas moleculares de alguns reagentes exibidos na Tabela 2.

1.3.2 Reação entre íons Fe(II) e 2,2'-bipiridila

A 2,2'-bipiridila é um reagente bastante seletivo para íons Fe(II) , reagindo com estes íons em tampão acetato pH 4,5 para formar um complexo solúvel bastante estável, de cor rosada com composição 1:3 metal-ligante. A absorvidade molar deste complexo é $8,7 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, apresentando máxima absorção em 522 nm. Muito embora não seja o reagente mais largamente utilizado para determinação de ferro, este reagente possui propriedades químicas bastante semelhantes a 1,10-fenantrolina podendo-se citar a absorvidade molar. A reação entre íons Fe(II) e a 2,2'-bipiridila é exibida logo a seguir (Figura 6).

Figura 6 - Reação entre íons Fe^{2+} e 2,2'-bipiridila.

1.3.3 Determinação de íons Fe em amostras de fármaco

A indústria farmacêutica produz larga variedade de medicamentos a base de compostos de ferro. Estes medicamentos suprem a carência deste elemento no organismo, evitando desta forma problemas causados por anemia. Tais

medicamentos também são prescritos em circunstâncias especiais como hemorragias, entre outras.

Vários artigos versando sobre a determinação de ferro em fármaco têm sido publicados. Sakarov e colaboradores¹⁴⁵ determinaram Fe(II) em fármaco que apresentam turbidez e sem turbidez por amperometria.

A reação de complexação entre íons Fe(III) e o ácido 3-hidroxicolínico (hypo) foi estudada por Abubakr¹⁴⁶ e aplicada para determinação deste íon em multivitaminas. O complexo resultante foi monitorizado em 440 nm ($\epsilon = 1,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em pH 5,5.

Metodologias envolvendo extração em solvente apropriado foram propostas por pesquisadores. Uma delas baseia-se na complexação de Fe(III) com o ácido fenilacetoxihidroxâmico (FAHA) e subsequente extração em tolueno em presença de trioctilamônio (Adogen-646) e a outra na complexação de Fe(III) com o ácido mandelohidroxâmico (MHA) e posterior extração em n-butanol ($V_a/V_o = 5$)^{147,148} a pH 5,5. A fase orgânica de cor amarela possui máxima absorção em 430 nm ($\epsilon = 1,15 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), exibindo faixa linear de trabalho entre 0,6 e 3 mg L⁻¹ de Fe(III), com limite de detecção 0,5 mg L⁻¹. Issopoulos e Economou¹⁴⁹ utilizaram uma micela composta por Fe(II)-isoniazida-p-dietilaminosalicilaldeído hidrazina (IDSH)-Triton X-100 para determinação de íons Fe(II) em fármacos. A micela formada apresenta absorvidade molar aparente $2,3 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 471 nm, obedecendo a lei de Beer entre 0,1 e 5,0 mg L⁻¹ de Fe(III).

Mais recentemente, Araújo et al.¹⁵⁰ descrevem um procedimento através de análise por injeção seqüencial para determinação de íons Fe(III) em fármacos, utilizando tiocianato como reagente. Este procedimento permite uma frequência de análise de até 100 amostras por hora com uma faixa linear entre 0,5 e 20,0 mg L⁻¹ e limite de detecção de 0,5 mg L⁻¹.

A utilização de membrana para diálise foi proposta por van Staden e colaboradores¹⁵¹ com o auxílio de um sistema de injeção seqüencial. Os íons Fe(III) passam através da membrana de diálise e em seguida, reagem com o ácido 3,5-dissulfônico-1,2-dihidroxibenzeno (Tiron), sendo o complexo formado monitorizado em 667 nm. Esse procedimento permite a determinação

espectrofotométrica de amostras turvas em presença de matéria orgânica, além de enfatizar a potencialidade da utilização de processos de diálise no sistema de injeção seqüencial.

Teixeira e co-autores¹⁵² construíram um eletrodo de íon-seletivo para determinação de íons Fe(III). Este eletrodo gera resposta linear na faixa de concentração $1,0 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ em tampão citrato com limite de detecção $7,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, possuindo estabilidade de 800 determinações para cada membrana polimérica utilizada. Os resultados obtidos com o uso deste eletrodo foram comparados com os valores encontrados por espectrometria de absorção atômica, apresentando grande conformidade entre os níveis de concentração de íons ferro. Oliveira et al.¹⁵³ desenvolveram um procedimento analítico através de análise por injeção em fluxo, criando duas regiões diferentes na zona de amostragem para determinação seqüencial de Fe(II) e Fe(III) em produtos farmacêuticos, pela introdução de volume apropriado de reagente (1,10-fenantrolina) em um ponto de confluência posicionado na alça de amostragem.

Oliveira e Masini¹⁵⁴ propuseram a determinação espectrofotométrica de íons Fe(II) em fármacos de ação anti-anêmica com o uso do sistema de injeção seqüencial, baseado na reação entre íons Fe(II) e 2,2'-bipiridila. O complexo formado foi monitorizado em 523 nm em tampão acetato pH 4,5.

A curva de referência exibiu boa correlação linear entre os pontos escolhidos na faixa de concentração entre 5,0 e 40,0 mg L⁻¹ ($r = 0,999$), com limite de detecção (3 vezes a razão sinal/ruído) 0,97 mg L⁻¹. Neste trabalho, amostras sem turbidez foram simplesmente diluídas e avolumadas apropriadamente com tampão acetato pH 4,5 para em seguida, serem analisadas no sistema de injeção seqüencial sem qualquer tratamento químico prévio.

Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em chama e exibindo adequada consonância. O procedimento proposto apresentou frequência de análise de 100 amostras por hora, mostrando-se bastante adequado para monitorização de processos industriais, no controle de análises, onde a rapidez é uma característica exigida devido ao grande número de amostras.

1.3.4 Especificação de íons $Fe(II)$ e $Fe(III)$

Estudos de especificação de íons metálicos tem recebido grande destaque nas últimas décadas, principalmente em decorrência da preocupação com o lançamento destes íons no meio ambiente. Devido ao elevado e crescente grau de industrialização nos grandes centros urbanos a poluição de corpos d'água por metais pesados tem tornado estes ambientes alvo de despejos industriais que na grande maioria dos casos geram danos irreparáveis nestes ambientes.

Estudos de toxicidade revelam que dependendo da forma química como estes íons possam se encontrar no meio ambiente, maior ou menor impacto poderá ser causado. É fato que o estado de oxidação de alguns íons metálicos apresentam maior ou menor grau de agressividade ao meio ambiente como no caso do cromo e que ainda, alguns compostos formados por estes íons possuem maior toxicidade que o próprio íon isoladamente (na forma de aquacomplexos) como no caso do mercúrio.

Estudos de especificação permite precisar a forma química como o elemento metálico está disposto na natureza, possibilitando avaliar de forma mais precisa o impacto causado ao meio ambiente. Vários fatores químicos e físico-químicos estão associados com a predominância de uma forma química em detrimento de outras. Dentre estes fatores podemos citar o pH, condições redox, E_h , temperatura, pressão da coluna d'água, quantidade de oxigênio dissolvido, matéria orgânica total dissolvida, carbono total dissolvido, intensidade de incidência de radiação, CO_2 dissolvido, entre outros. Estes fatores atuam conjuntamente influenciando a biodisponibilidade dos elementos metálicos e seus compostos aos organismos vivos e conseqüentemente sua toxicidade.

Devido à dinâmica da grande maioria dos sistemas aquáticos, o controle de todas as variáveis torna-se impossível. Alguns fatores predominantes podem gerar reflexos em outras variáveis como, por exemplo, elevados valores de CO_2 dissolvido reduzem o pH e deslocam o equilíbrio entre íons $Fe(III)$ e OH^- . Fatores externos causam variações sobre toda a dinâmica dos compartimentos ambientais e portanto, sua extensão é também variável.

A especiação química de íons Fe tem grande importância no contexto da química analítica ambiental pois esse elemento participa de vários equilíbrios nos sistemas aquáticos. Devido sua participação em equilíbrios de precipitação, atuando como coletor, além da sua atuação nos fenômenos de adsorção, esse elemento ainda participa ativamente de equilíbrios redox. As principais formas de oxidação desse elemento nos ambientes aquáticos são a bivalente e trivalente. Como esse elemento possui elevada tendência para formar compostos de coordenação, seus íons normalmente se apresentam na forma de aquacomplexos carregados positiva ou negativamente quando associados a íons hidróxidos.

Em virtude de sua importância nos equilíbrios aquáticos, muitos artigos abordando estudos de especiação já foram publicados na literatura. Vários desses trabalhos incorporam metodologias que envolvem técnicas de fluxo, explorando as várias potencialidades de muitas técnicas analíticas^{155,156}.

Estudos abordando a especiação de íons Fe através do uso de espectrofotometria de absorção molecular têm sido largamente empregados, além da espectrometria de absorção atômica, entre outras. Quando a detecção espectrofotométrica é utilizada, procedimentos baseados na redução de íons férricos em solução, com o auxílio de agentes redutores como ácido ascórbico, hidrazina, sulfito, hidroxilamina, entre outros são bastante comuns. Outra estratégia muito utilizada para essa finalidade faz uso de amálgamas redutores como o redutor de Jones (amálgama de zinco). Devido a relativa facilidade de oxidação ou redução, muitos artigos exploram também a oxidação de íons ferrosos a férricos e subsequente determinação de íons férricos totais com o auxílio de reagentes específicos para esse íon.

Os artigos que propõem a especiação dos dois estados de oxidação de íons Fe geralmente determinam um dos estados de oxidação e em seguida, fazem a oxidação ou redução de uma alíquota de amostra e quantificam o conteúdo total e por diferença encontram a concentração de das espécies.

Nessa Tese, Oliveira e Masini¹⁵⁷ também desenvolveram metodologia para especiação de íons Fe utilizando análise por injeção seqüencial com detecção espectrofotométrica.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Equipamentos e acessórios

- 1 - Sistema de Análise por Injeção Seqüencial FIALab 3500 (Alitea), acoplado a microcomputador.
- 2 - Espectrofotômetro Micronal (modelo B 382), equipado com cela de fluxo em “U” e percurso óptico de 10 mm (71 μ L).
- 3 - Registrador Micronal modelo B 292.
- 4 - Espectrômetro de absorção atômica Thermo Jarrel Ash (modelo Scan A4).
- 5 - Chapa de aquecimento com controle de temperatura.
- 6 - Balança analítica.
- 7 - Pipetas Eppendorf de volume regulável.
- 8 - Espectrofotômetro HP 8452 com rede de diodos.
- 9 - Bomba de vácuo.
- 10 - Sistema de filtração Millipore (Nº Catálogo XX1004704).
- 11 - Cubetas de quartzo com 10 mm de percurso óptico.
- 12 - Vidraria em geral (Béqueres, balões, provetas, pipetas, entre outras vidrarias de diversas graduações volumétricas).

2.2 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada pelo sistema Milli-Q, assim como todas as diluições. Todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza analítica (Merck ou Aldrich).

2.2.1 Soluções para determinação de Cr(VI)

- *Ácido nítrico, clorídrico, sulfúrico, perclórico concentrado e ácido oxálico.*
- *Solução tampão borato 0,1 mol L⁻¹ (pH 9,0) obtida pela pesagem e dissolução de 38,1372 g de Na₂B₄O₇·10H₂O em 1 L de água desionizada.*
- *Solução estoque de corante azul de bromotimol (BTB) 0,01% (m/v) obtida a partir da pesagem de 0,01 g do corante, seguida de dissolução em tampão borato a volume final de 100 mL. Soluções com menor concentração foram preparadas por diluição adequada.*
- *Solução de K₂S₂O₇ 1,0% (m/v) (Merck) obtida por pesagem de 1 g (±0,01) de peróxidissulfato de potássio e dissolução em água com o volume final da solução, completado para 100 mL com água desionizada.*
- *Solução estoque de H₂SO₄ (Merck) 6,0 mol L⁻¹ preparada a partir de diluição adequada de uma solução de H₂SO₄ concentrado.*
- *Solução estoque de K₂Cr₂O₇ (M.M. 294,19 g mol⁻¹) 4,81·10⁻³ mol L⁻¹ (500 mg L⁻¹ em Cr(VI)), obtida pela pesagem de 0,2829 g de K₂Cr₂O₇ previamente dessecado em estufa à 140 °C por 1 hora e esfriado à temperatura ambiente em dessecador, seguido de dissolução com água desionizada a volume final de 200 mL. Os padrões foram preparados por diluição adequada a partir da solução estoque.*
- *Solução de Brucina (Aldrich) preparada pela pesagem de 0,220 g de sulfato de brucina monohidratada (M.M. 887,03), seguida por dissolução em 10 mL de ácido sulfúrico 6,0 mol L⁻¹ e acrescida de 0,95 g de ácido oxálico e o volume final completado para 100 mL com água desionizada em balão volumétrico. Esta solução contém 0,075 mol L⁻¹ de ácido oxálico, 0,0025 mol L⁻¹ de sulfato de brucina e 0,6 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico.*

- *Solução de AgNO_3 0,01% (m/v)* (Merck) preparada pela pesagem de 0,01 g de nitrato de prata seguido de diluição com água desionizada para 100 mL. Esta solução foi estocada em frasco escuro e ao abrigo da luz.

2.2.2 Soluções para determinação de Fe(II)

- *Solução estoque de tampão acetato pH 4,5* obtido pela pesagem de 82,034 g de acetato de sódio anidro (Merck) em 800 mL de água e o pH ajustado para 4,5 com ácido acético glacial e o volume final completado para 1 L.

- *Solução de 2,2'-bipiridila 0,20 % (m/v)* (Merck) em tampão acetato pH 4,5 preparada pela pesagem de 0,2 g ($\pm 0,01$) de 2,2'-bipiridila dissolvidos em mínima quantidade de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹ com volume final completado para 100 mL com tampão acetato pH 4,5 em balão volumétrico.

- *Soluções estoque 100 mg L⁻¹ de Fe(II)* (Merck), resultante da pesagem de 0,1755 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (M.M. 392,14 g mol⁻¹), seguido de dissolução em ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ a volume final de 250 mL em balão volumétrico. Os padrões foram preparados por diluição adequada a partir da solução estoque. Essa solução possui $1,79 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹.

- *Soluções estoque 100 mg L⁻¹ de Fe(III)* (Merck), preparada por pesagem e dissolução de 0,2158 g de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (M.M. 482,19 g mol⁻¹) em ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ com volume final completado para 250 mL em balão volumétrico. Os padrões foram preparados por diluição adequada a partir da solução estoque. Essa solução possui $1,79 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹.

- *Solução 1 % (m/v) de ácido ascórbico* (Merck).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação de íons Cr(VI) em amostras certificadas de aço e efluentes industriais

Foram determinadas as concentrações de Cr em amostras certificadas de aço e em amostras de efluentes industriais para verificar-se a performance da metodologia proposta. O cromo foi determinado na forma de seus íons hexavalente em solução.

Os espectros registrados conforme mostrado nas Figuras 7 e 8, foram obtidos com intervalo de 1 s entre si, durante um período total de aquisição de 1 minuto, a partir de uma solução de brucina sem a presença de íons cromo hexavalente e na presença desse íon para verificação do comportamento químico da reação e se havia alguma interferência espectral da brucina sobre a mistura reacional (brucina + Cr(VI)). Utilizou-se solução de ácido sulfúrico 0,3 mol L⁻¹ como solução de referência.

Os resultados mostram claramente que não ocorre interferência espectral na região onde será monitorizado o intermediário formado (525 nm), tornando possível a determinação de Cr(VI) com a brucina.

Observa-se na Figura 8 que o intermediário formado absorve fortemente em 525 nm e após cerca de 7 segundos, ele converte-se no produto final que absorve mais fracamente entre 410 e 430 nm. Devido à rapidez com que a cor do intermediário gerado in-situ esmaece, sua determinação pode ser realizada pelo aproveitamento analítico desse intermediário através de técnicas de fluxo.

Figura 7 - Espectro de absorção molecular de uma solução de brucina – Condições experimentais: $[brucina] = 1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[H_2C_2O_4] = 37,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $[H_2SO_4] = 0,3 \text{ mol L}^{-1}$; Espectro obtido com cubeta de quartzo com 10,0 mm de percurso óptico.

Figura 8 - Espectro de absorção molecular da reação entre a brucina e Cr(V) – Condições experimentais: $[brucina] = 1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[H_2C_2O_4] = 37,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[H_2SO_4] = 0,3 \text{ mol L}^{-1}$; $[Cr_2O_7^{2-}] = 3,85 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; Espectro obtido com cubeta de quartzo com 10,0 mm de percurso óptico.

Tabela 3 - Composição média das amostras certificadas de aço em %(m/m).

ELEMENTOS	ESPECIFICAÇÃO		
	AISI 4340 (IPT 17A)	AISI 440 A (IPT 22)	AISI 1005 (IPT 39)
C	0,415±0,003	0,628±0,005	0,048±0,002
Si	0,260±0,004	0,449±0,006	0,061±0,003
Mn	0,724±0,002	0,804±0,008	0,340±0,005
P	0,014±0,001	0,029±0,003	0,021±0,001
S	0,021±0,0005	0,009±0,001	0,034±0,003
Cu	0,074±0,002	0,050±0,001	0,048±0,003
Ni	1,76±0,02	0,143±0,007	0,019±0,003
Cr	0,820±0,004	16,21±0,03	0,084±0,005
Mo	0,259±0,004	-	0,012±0,001
Co	0,039±0,004	-	-
N	-	0,008±0,001	-
Al	-		0,169±0,003

3.2.1 Amostras certificadas de aço

O tratamento químico das amostras de aço foi realizado por pesagem de 0,2 g ($\pm 0,1$ mg) transferido para um bequer de 250 mL seguido da adição de 20 mL de água régia e coberto com vidro de relógio. Aqueceu-se a mistura em chapa de aquecimento a aproximadamente 100 °C até que todo o sólido estivesse dissolvido acrescentando-se 10 mL de ácido perclórico concentrado. Continuou-se o aquecimento até próximo da secura, observando-se a liberação de fumos brancos, seguida da precipitação do trióxido de cromo.

Suspendeu-se o aquecimento e procedeu-se a dissolução do óxido crômico formado com pequenas porções de água desionizada, seguido da filtração com papel de filtro Whatman Nº 42, recolhendo-se o filtrado diretamente em balão volumétrico de volume apropriado e completando-se o volume do balão até o menisco, com água desionizada.

3.2.2 Amostras de efluentes industriais

Duas amostras de efluentes industriais (banho de cromação) foram estudadas. Uma dessas amostras foi coletada antes do processo de tratamento químico realizado pela indústria (amostra bruta), e outra, após o tratamento químico efetuado pela indústria, que consiste basicamente de duas etapas: 1) ajuste de pH para redução de Cr(VI) a Cr(III) com hidrossulfito; 2) precipitação de Cr(OH)_3 e filtração em filtros prensa. Esse processo é bastante simples e eficiente, sendo capaz de remover consideravelmente o cromo trivalente na forma de seu hidróxido ligeiramente solúvel. As reações abaixo exibem mais detalhadamente o processo químico de acordo com as semi-reações de redução.

A partir de (I) e (II) obtemos a reação global (III) como exibido abaixo:

A formação de sulfito auxilia na manutenção do pH na faixa alcalina o que favorece a reação. De acordo com Fiegl⁶⁸, a hidrólise do hidrossulfito forma hidrogênio nascente, que também atua como um bom agente redutor (reação exibida abaixo).

Nas amostras industriais brutas, sem tratamento químico prévio, a concentração de íons Cr(VI) foi determinada diretamente com diluição *in-line* no

sistema de injeção seqüencial. A concentração de Cr total (Cr(VI)+Cr(III)) foi determinada pelo tratamento de uma porção de 50 mL de amostra bruta com 5,0 mL de peroxidissulfato 1,0 % (m/v) em presença de 1,0 mL de nitrato de prata 0,01 % (m/v), sob aquecimento até fervura por 15 minutos, seguido de apropriada diluição e análise. Este procedimento é efetuado para garantir a oxidação dos íons Cr(III) a Cr(VI).

3.2.3 Procedimento de análise das amostras de aço e efluente industrial

Inicialmente procedeu-se a lavagem do sistema de injeção seqüencial, cujas etapas estão descritas nas Tabelas 4 e 5.

Os procedimentos adotados para análise das amostras foram os seguintes: 1) Determinação da concentração de íons Cr(VI) na amostra bruta, após diluição em balão volumétrico, conforme mostrado na Figura 9 e 2) Determinação da concentração de Cr(VI) na mesma amostra sem etapa de diluição em balão volumétrico, procedendo a diluição *in-line* no sistema de injeção seqüencial (Figura 10). As etapas seguidas para as análises no sistema de injeção seqüencial são descritas na Tabela 6.

Figura 9 – Configuração do sistema de injeção seqüencial para determinação de Cr(VI) nas amostras certificadas de aços e efluente industrial (amostra bruta). **ST** - solução transportadora (H_2SO_4 $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ ou água desionizada); **SP** - seringa de pistão; **VS** - válvula da seringa; **BC** - bobina coletora; **VSE** - válvula seletora; **R1** – (brucina $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ $7,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; H_2SO_4 $0,6 \text{ mol L}^{-1}$); **R2** – padrões Cr(VI) e amostras; **BR** - bobina de reação; **D** - detector; **CF** - cela de fluxo e **L** - descarte.

Figura 10 - Configuração do sistema de injeção sequencial para determinação de Cr(VI) nas amostras certificadas de aços e efluente industrial (amostra bruta) com diluição *in-line*. **ST** - solução transportadora (H_2SO_4 $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ ou água desionizada); **SP** - seringa de pistão; **VS** - válvula da seringa; **BC** - bobina coletora; **VSE** - válvula seletora; **R1** - (brucina $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ $7,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; H_2SO_4 $0,6 \text{ mol L}^{-1}$); **R2** - padrões Cr(VI) e amostras; **BR** - bobina de reação; **BA** - bobina auxiliar; **D** - detector; **CF** - cela de fluxo e **L** - descarte.

Tabela 4 – Etapas realizadas para lavagem inicial do sistema e após cada troca de padrão e/ou amostra. Tendo como base, a configuração exibida na Figura 9.

ETAPAS	Nº	DESCRIÇÃO	VOLUME (µL) /		POSIÇÃO DA VÁLVULA DA	
			VAZÃO (µL s ⁻¹)		SERINGA	
	1	Aspiração de solução transportadora para a seringa de pistão.	5000 / 200		Para a solução transportadora (IN)	
	2	Injeção de solução transportadora para portas 1,2,6,7 e 8.	1000 / 150		Para válvula seletora (OUT)	
	3	Aspiração de solução transportadora para a seringa de pistão.	5000 / 200		Para a solução transportadora (IN)	
	4	Injeção de solução transportadora para porta do detector (porta 5).	3000 / 150		Para válvula seletora (OUT)	
	5	Injeção de solução transportadora para portas 1,2,6,7 e 8.	400 / 150		Para válvula seletora (OUT)	
	6	Aspiração de solução transportadora para a seringa de pistão.	2000 / 150		Para solução transportadora (IN)	
	7	Aspiração de brucina (porta 3) para bobina coletora.	300 / 100		Para válvula seletora (OUT)	
	8	Esvazia o conteúdo da seringa na lixeira (porta 7).	2300 / 150		Para válvula seletora (OUT)	
	9	Aspiração de solução transportadora para a seringa de pistão.	2000 / 150		Para solução transportadora (IN)	
	10	Aspiração de padrão ou amostra (porta 4) para bobina coletora.	300 / 100		Para válvula seletora (OUT)	
	11	Esvazia o conteúdo da seringa na lixeira (porta 7).	2300 / 150		Para válvula seletora (OUT)	

As etapas 9, 10 e 11 são realizadas em triplicata, após cada troca de padrão ou amostra.

Tabela 5 – Etapas realizadas para lavagem inicial do sistema e após cada troca de padrão e/ou amostra para diluição *in-line*. Tendo como base, a configuração mostrada na Figura 10.

ETAPAS	Nº	DESCRIÇÃO	VOLUME (μL) /		POSIÇÃO DA VALVULA DA	
			VAZÃO ($\mu\text{L s}^{-1}$)		SERINGA	
	1	Aspiração de solução transportadora para a seringa de pistão.	5000 / 200		Para a solução transportadora (IN)	
	2	Injeção de solução transportadora para porta do detector (porta 5).	3000 / 200		Para válvula seletora (OUT)	
	3	Injeção de solução transportadora para portas 1,6,7 e 8.	500 / 150		Para válvula seletora (OUT)	
	4	Aspiração de solução transportadora para a seringa de pistão.	5000 / 200		Para a solução transportadora (IN)	
Lavagem	5	Injeção de solução transportadora para bobina auxiliar (porta 2).	3000 / 200		Para válvula seletora (OUT)	
do sistema	6	Injeção de solução transportadora para portas 1,6,7 e 8.	500 / 150		Para válvula seletora (OUT)	
para	7	Aspiração de solução transportadora para a seringa de pistão.	1500 / 150		Para a solução transportadora (IN)	
diluição <i>in-</i>	8	Aspiração de brucina (porta 3) para bobina coletora.	300 / 100		Para válvula seletora (OUT)	
<i>line</i>	9	Esvazia o conteúdo da seringa na lixeira (porta 7).	1800 / 150		Para válvula seletora (OUT)	
	10	Aspiração de solução transportadora para a seringa de pistão.	1500 / 150		Para solução transportadora (IN)	
	11	Aspiração de padrão/amostra (porta 4) para bobina coletora.	300 / 100		Para válvula seletora (OUT)	
	12	Esvazia o conteúdo da seringa na lixeira (porta 7).	1800 / 150		Para válvula seletora (OUT)	

As etapas 7, 8 e 9 para lavagem do canal contendo brucina são realizadas em triplicata uma única vez, enquanto que as etapas 4, 5, 10, 11 e 12 são realizadas em triplicata para lavagem do canal contendo os padrões (porta 4) e após cada troca de padrão/amostra.

Tabela 6 - Etapas realizadas para determinação direta de Cr(VI) e através da diluição *in-line* em amostras reais conforme mostrado nas Figuras 9 e 10.

ETAPAS	Nº	DESCRIÇÃO	VOLUME (μL) / VAZÃO ($\mu\text{L s}^{-1}$)	POSIÇÃO DA VÁLVULA DA SERINGA
	1	Aspiração de solução transportadora para a seringa de pistão.	1500 / 200	Para a solução transportadora (IN)
Determinação	2	Aspiração de brucina (porta 3) para a bobina coletora.	200 / 100	Para válvula seletora (OUT)
direta de	3	Aspiração de padrão (porta 4) para a bobina coletora.	100 / 100	Para válvula seletora (OUT)
Cr(VI)	4	Injeção do conteúdo da bobina coletora para o detector (porta 5) esvaziando a seringa para lavagem do percurso analítico.	Esvazia seringa / 100	Para válvula seletora (OUT)
	5	Aspiração de solução transportadora para a seringa de pistão.	2000 / 200	Para a solução transportadora (IN)
	6	Aspiração de amostra (porta 4) para a bobina coletora.	50 / 100	Para válvula seletora (OUT)
	7	Injeção de amostra mais solução transportadora para bobina auxiliar (porta 2).	150 / 100	Para válvula seletora (OUT)
Diluição <i>in-</i>	8	Aspiração de brucina (porta 3) para a bobina coletora.	200 / 100	Para válvula seletora (OUT)
<i>line</i> de	9	Aspiração da amostra contida na bobina auxiliar (amostra dispersa na bobina auxiliar) para a bobina coletora.	50 / 100	Para válvula seletora (OUT)
amostras	10	Injeção da mistura contida na bobina coletora para o detector (porta 5).	1500 / 100	Para válvula seletora (OUT)
	11	Esvaziamento da seringa para lavagem da bobina auxiliar (porta 2).	Esvazia seringa / 150	Para válvula seletora (OUT)

Todas as etapas foram realizadas em triplicata para cada padrão e amostra.

Foram realizados estudos para otimização do sistema, onde foram avaliados a influências da vazão, do percurso analítico e do volume de amostra aspirado sobre o sinal obtido. O efeito da variação do percurso analítico sobre o sinal obtido, está resumido na Tabela 7 logo abaixo, seguido da Figura 11 que exhibe a influência da vazão.

Tabela 7 - Estudo de otimização do sistema - Influência do percurso analítico.

Comprimento do percurso analítico (m)	Sinal (U.A.)	Desvio padrão relativo (%)
0,50	10,47	0,49
0,75	10,33	1,11
1,0	10,35	3,41
1,5	9,87	3,25

* Utilizou-se uma solução de Cr(VI) 4,0 mg L⁻¹ para o estudo de otimização das condições experimentais de análise.

Observa-se que a variação do percurso analítico não tem tanta influência no sinal obtido. Muito embora fosse esperado que com o aumento do percurso analítico, o sinal sofresse uma queda mais apreciável, isso não ocorre, provavelmente devido ao fato de que com o aumento do percurso analítico uma zona de interpenetração mais eficiente entre as zonas de reagente e amostra ocorra, fazendo com que uma quantidade maior de intermediário se forme ao longo do percurso analítico. A seguir é exibida a influência da vazão sobre o sinal obtido no sistema (Figura 11). Neste estudo utilizou-se percurso analítico de 0,50 m.

Figura 11 - Influência da vazão sobre o sinal. A - 200; B - 100; C - 80; D - 40; E - 20 $\mu\text{L s}^{-1}$. Solução de Cr(VI) 2,0 mg L^{-1} ; Volume de solução de brucina - 200 μL ; Volume amostra - 50 μL ; Solução transportadora - Água desionizada.

Com a aplicação de vazões elevadas, o sinal obtido é um pouco menor que para vazões moderadas, isso ocorre pelo fato de não haver tempo suficiente para formação de quantidade apreciável do intermediário. Quando baixos valores de vazão é empregado (entre 20 e 40 $\mu\text{L s}^{-1}$), observa-se uma perda significativa do sinal devido ao desaparecimento ou esmaecimento da cor do intermediário formado. Isso ocorre por que para baixas vazões o tempo de residência aumenta consideravelmente. Para determinação de Cr(VI) em amostras mais concentradas, utilizou-se água como solução transportadora e para soluções de concentração mais baixa a solução transportadora utilizado foi ácido sulfúrico 0,6 mol L^{-1} para evitar a influência da variação do índice de refração (efeito Schlieren)^{158,159,160}.

A diluição *in-line* foi realizada com base no princípio em que, quando volumes iguais de uma solução contendo quantidades crescentes de um analito, em contato com um volume fixo de um fluido transportador, de composição bem definida, por igual intervalo de tempo, esses segmentos sofrerão dispersão proporcionalmente, sendo esse efeito extensivo aos componentes dessa solução.

Porém, antes de proceder à diluição *in-line*, realizou-se estudos para avaliar a dispersão no sistema, verificando-se assim, a influência do volume de amostra/padrão transferido (V_T) da bobina coletora para a bobina auxiliar (amostra/padrão mais solução transportadora), sobre o coeficiente de dispersão.

Este estudo foi executado com uma solução de azul de bromotimol (BTB) 0,004% (em tampão borato 0,01 mol L⁻¹). Para tal estudo, fixou-se o volume de padrão/amostra aspirados para a bobina coletora (V_A) e o volume de padrão/amostra aspirados da bobina auxiliar (V_S) (50 µL) para a bobina coletora. A Tabela 8 resume os resultados obtidos para tal estudo, verificando-se que o volume transferido para a bobina coletora (V_T) que concilia maior coeficiente de dispersão e baixo desvio padrão relativo foi 150 µL. Deve se observar que V_T é composto de BTB padrão (50 µL) mais solução transportadora, que nesse caso é tampão borato 0,01 mol L⁻¹.

Tabela 8 – Estudo do efeito de variação do volume de amostra/padrão transferidos da bobina coletora para a bobina auxiliar (bobina de diluição) sobre o coeficiente de dispersão.

V_T (µL)	Absorbância ^a (620 nm)	DPR (%) ^b	Coeficiente de Dispersão (D)
50	0,107	2,8	8,0
75	0,094	2,4	9,1
100	0,049	2,0	17,5
150	0,022	2,3	39,3
200	0,012	33,3	71,3

^a Medidas no pico máximo ; ^b Desvio padrão relativo de cinco experimentos. Volume de solução de BTB padrão aspirados para a bobina coletora (V_A) e Volume de mistura aspirado da bobina auxiliar para a bobina coletora após sofre dispersão = 50 µL.

A seguir (Figura 12) são apresentados os registros dos sinais obtidos para construção da curva de referência na determinação direta de Cr(VI) em amostras reais na faixa de concentração entre 0,2 e 1,0 mg L⁻¹ e os registros dos sinais para a construção da curva de referência através da diluição *in-line* na faixa de 20,0 a 100,0 mg L⁻¹ (Figura 13). As condições experimentais para aquisição dos registros são apresentadas logo abaixo das figuras.

Figura 12 - Curva de referência para determinação de Cr(VI). A - 0,20; B - 0,40; C - 0,60; D - 0,80 e E - 1,00 mg L⁻¹. Volume de solução de brucina - 200 µL; Vazão - 100 µL s⁻¹; Volume de amostra - 100 µL; Solução transportadora - H₂SO₄ 0,6 mol L⁻¹.

Figura 13 - Curva de referência para determinação de Cr(VI) através de diluição *in-line*. A - 20,0; B - 40,0; C - 60,0; D - 80,0 e E - 100,0 mg L⁻¹. Volume de solução de brucina - 200 µL; Vazão - 100 µL s⁻¹; Solução transportadora - Água desionizada; Volume de Amostra aspirado para a bobina coletora - 50 µL; Volume total (amostra + solução transportadora) injetados na bobina auxiliar - 150 µL; Volume de amostra dispersa na bobina auxiliar, aspirado para a bobina coletora - 50 µL.

A curva obtida para determinação de íons Cr(VI) através de diluição *in-line* exibiu boa linearidade entre 20 e 100 mg L⁻¹ com o uso de 50 µL de amostra.

Além da pequena quantidade de amostra, uma larga faixa de concentração pode ser analisada dessa forma, gerando menor quantidade de resíduos e maior economia de reagente e amostra. Na metodologia de diluição *in-line* proposta, a amostra é aspirada para a bobina coletora (50 µL) e em seguida é injetado 150 µL (amostra mais solução transportadora) para a bobina auxiliar (bobina de diluição).

Aspira-se 200 µL de solução de brucina para a bobina coletora e em seguida, aspira-se 50 µL de amostra da bobina auxiliar para bobina coletora enviando-se seqüencialmente a mistura para o detector. A Tabela 9 apresenta os parâmetros analíticos das curvas de referência obtidas tanto para determinação direta de íons Cr(VI), quanto para a diluição *in-line*. Os resultados obtidos apresentaram boa concordância com os valores certificados para as amostras de aço e com os resultados encontrados por espectrometria de absorção atômica no caso da amostra de efluente industrial. Na Tabela 10 são resumidos os resultados encontrados para as amostras anteriormente citadas.

Tabela 9 – Parâmetros analíticos das curvas de referência obtidas.

S _v (µL)	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	Parâmetros de Regressão				Limite de Detecção (mg L ⁻¹) ^d	FA ^e
		a	b (L mg ⁻¹)	r ²	n		
50 ^a	1,0-8,0	0,0004±0,0004	0,0302±0,0009	0,9986	5	0,40	120
100 ^b	0,2-1,0	-0,0005±0,0009	0,064±0,001	0,9992	5	0,045	120
100	0,1-1,0	-0,0009±0,0009	0,0523±0,001	0,9982	6	0,051	120
50 ^c	20-100	0,020±0,008	0,0021±0,0001	0,9948	5	11,2	80

^a Padrões e solução transportadora = H₂O ; ^b Padrões e solução transportadora = H₂SO₄ 0,6 mol L⁻¹ ; padrões em H₂O e solução transportadora H₂SO₄ 0,6 mol L⁻¹ ; ^c Volume transferido da bobina coletora para bobina auxiliar = 150 µL e volume aspirado da bobina auxiliar = 50 µL ; ^d Calculado como três vezes o valor do desvio padrão da reta dividido pelo coeficiente angular da reta¹⁶¹ ; FA = Frequência de análise (amostra h⁻¹) ; n = número de pontos na curva.

Tabela 10 – Resultados obtidos para análise de amostras reais.

Amostras	Concentração de Cr(VI)			Teste de recuperação	
	IS ^d	VC ^f	EAA ^g	Adicionado ^h	Recuperado ^h
AISI 440 ^a	16,34±0,19	16,21±0,03	-	-	-
AISI 4340 ^a	0,819±0,002	0,820±0,004	-	-	-
AISI 1005 ^a	0,081±0,001	0,084±0,005	-	-	-
EI ^b	49,51±1,1	-	49,5±1,1	-	-
EI ^c	ND ^e	-	ND	2,00	2,11±0,04

^a Concentração expressa como % (m/m) ; ^b EI = Efluente industrial sem tratamento para redução de Cr(VI), (concentração expressa em mg L⁻¹) ; ^c Efluente industrial após tratamento químico para redução de Cr(VI) (concentração em mg L⁻¹) ; ^d IS = Injeção seqüencial ; ^e ND = Não detectado ; ^f Valor certificado ; ^g Espectrometria de absorção atômica com chama ; ^h massa em mg ; Resultados expressos como a média aritmética de três medidas para cada amostra.

Para observarmos a influência de outros íons na execução das análises, efetuou-se estudos para alguns íons potencialmente interferentes. Agentes oxidantes são potencialmente interferentes, pois estes podem oxidar o reagente (brucina) formando o intermediário e competindo com o Cr(VI). Íons redutores também podem reduzir os íons Cr(VI), afetando sua concentração e portanto interferindo na análise. Dentre os íons estudados estão: Mo(VI), Fe(III), Mn(II), Cu(II), Ce(IV), NO₃⁻, NO₂⁻, BrO₃⁻, IO₃⁻, S₂O₈²⁻ e Cl⁻. A Tabela 11 mostra resumidamente o estudo de interferência realizado. Observa-se claramente que a interferência dos íons estudados causa pouco impacto sobre o sinal em sua grande maioria. Os interferentes mais críticos são os íons Ce(IV) e MnO₄⁻ que reagem oxidando a brucina similarmente ao Cr(VI) e os íons NO₂⁻, S²⁻, SO₂, SO₃²⁻ que reduzem prontamente os íons Cr(VI) a Cr(III) reduzindo consideravelmente a intensidade do sinal. Pode-se observar também que os íons Cr(III) não reagem com a brucina, possibilitando desta forma, a especiação desses dois estados de oxidação do elemento, através da oxidação de Cr(III) a Cr(VI) com peroxidissulfato, haja visto que, 1,68 g L⁻¹ deste íon causa um ligeiro erro positivo (+4,3 %). A

reação entre estes íons e Cr(VI) é mais lenta que a reação com brucina em meio ácido, torna-se necessária a adição de traços de íons Ag^+ que catalisam a reação e favorecendo a formação de Ag^{2+} que é um potente agente oxidante. A grande vantagem do uso deste agente oxidante ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) é o fato de sua decomposição à quente ser relativamente fácil e rápida, diminuindo consideravelmente a possibilidade de interferência.

Tabela 11 – Efeito de possíveis íons interferentes sobre o sinal de uma solução de Cr(VI) $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ em presença das quantidades abaixo especificada dos respectivos sais.

Espécie	Qtde (mg L^{-1})	Adicionado como	ER (%)
IO_3^-	15,0	KIO_3	+0,9
BrO_3^-	15,0	KBrO_3	0
NO_3^-	15,0	NaNO_3	0
NO_2^-	62,5	NaNO_2	-91,4
$\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$	1677	$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	+4,3
Cl^-	3550	HCl	0
Mn(II)	162,5	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-3,4
Cu(II)	12,5	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0
Ce(IV)	10,5	$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	+45,9
Mo(VI)	43,3	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-1,3
Mo(VI)	86,5	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-3,6
Fe(III)	58,0	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	+1,16
Fe(III)	116,0	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	-2,3

ER(%) = Erro relativo percentual quando comparado com o sinal de uma solução padrão de Cr(VI) $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ na ausência de interferente ; Utilizou-se água como solução transportadora e para preparação das soluções; Volume de solução aspirada = $50 \mu\text{L}$; Volume de solução de brucina = $200 \mu\text{L}$; Resultados expressos como uma média de cinco medidas para cada solução.

3.2.4 Determinação de Cr(VI) com brucina através de adição de padrão in-line

A adaptação do método de adição de padrão convencional para processos de análise por injeção em fluxo tem despertado grande atenção de muitos pesquisadores nas últimas décadas devido às grandes vantagens que este método exhibe quando comparado ao da curva de referência. Efeitos de matriz geralmente podem ser contornados e resultados mais precisos e exatos são produzidos.

Outras duas amostras certificadas de aço, BCS 464/1 e BCS 466/1 contendo as seguintes composições em % (m/m): [C (0,086); Mn (0,791); P (0,020); S (0,028); Si (0,57); Ni (20,05); Cr (25,39); Co (0,054); Pb (0,004); As (0,003)] e [C (0,062); Mn (0,698); P (0,020); S (0,016); Si (0,505); Ni (8,61); Cr (17,65); Mo (2,19); Nb (0,029); Pb (0,0014); B (0,0024); Sn (0,005); As (0,017)], respectivamente foram analisadas. O tratamento químico dessas amostras foi realizado conforme anteriormente descrito (3.2.1). A configuração do sistema de injeção seqüencial para realização da adição de padrão in-line é similar àquela utilizada para a diluição in-line anteriormente mencionado, onde também se fez uso de uma bobina auxiliar (Figura 10).

A metodologia proposta baseia-se na reprodutibilidade de volumes aspirados e injetados de amostra, padrão e solução transportadora para a bobina auxiliar, bem como na dispersão controlada dessas zonas. Esta bobina auxiliar tem por função a pré-estocagem da mistura (amostra/padrão/solução transportadora), além de promover a mistura e dispersão controlada das zonas.

O procedimento proposto consiste da injeção de volumes crescentes de um único padrão e redução proporcional de solução transportadora, mantendo-se constante os volumes de amostra e volume total (amostra/padrão/solução transportadora) injetado na bobina auxiliar.

Antes de realizar as análises de amostras reais, procedeu-se à investigação da influencia da dispersão causada pela bobina auxiliar no sistema. Para tanto, foram utilizadas duas soluções de azul de bromotimol (BTB), com concentrações conhecidas. Uma das soluções fez o papel da amostra a qual se desejava determinar a concentração e a outra do padrão de concentração conhecida.

Utilizou-se tampão borato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ como solução transportadora e na preparação das soluções de BTB.

Figura 14 - Configuração do sistema de injeção seqüencial para avaliação do grau de dispersão no sistema causado pela bobina auxiliar na adição de padrão in-line. **ST** - solução transportadora (tampão borato 0,01 mol L⁻¹); **SP** - seringa de pistão; **VS** - válvula da seringa; **BC** - bobina coletora; **VSE** - válvula seletora; **BR** - bobina de reação; **BA** - bobina auxiliar; **D** - detector; **CF** - cela de fluxo; **L** - descarte; λ = 620 nm.

As etapas envolvidas para avaliação do grau de dispersão no sistema, causado pelo uso da bobina auxiliar durante a adição de padrão in-line por injeção seqüencial, são descritas na Tabela 12, onde são fornecidas informações sobre as vazões e os volumes aspirados e injetados das soluções.

Tabela 12 - Etapas realizadas no estudo de dispersão do sistema para adição de padrão in-line utilizando padrões de azul de bromotímol.

ETAPA	DESCRIÇÃO	VOLUME (μL) /		POSIÇÃO DA VÁLVULA
		VAZÃO (μL s ⁻¹)	DA SERINGA	
1	Aspiração de solução transportadora para seringa	3500 / 200	Para solução transportadora (IN)	
2	Aspiração de solução transportadora (porta 2) para bobina coletora	200 / 100	Para válvula seletora (OUT)	
3	Aspiração de BTB amostra (porta 3) para a bobina coletora	100 / 100	Para válvula seletora (OUT)	
4	Injeção da mistura contida na bobina coletora para o detector (porta 6)	2500 / 100	Para válvula seletora (OUT)	
5	Esvazia a seringa na direção da porta 7 (lavagem da bobina auxiliar)	Esvazia seringa / 100	Para válvula seletora (OUT)	
6	Aspiração de solução transportadora para seringa	3500 / 200	Para solução transportadora (IN)	
7	Aspiração de BTB amostra (porta 3) para a bobina coletora	100 / 100	Para válvula seletora (OUT)	
8	Aspiração de solução transportadora (porta 2) para bobina coletora	400 / 100	Para válvula seletora (OUT)	
9	Injeção da mistura contida na bobina coletora para a bobina auxiliar	500 / 100	Para válvula seletora (OUT)	
10	Aspiração de solução transportadora (porta 2) para a bobina coletora	200 / 100	Para válvula seletora (OUT)	
11	Aspiração da mistura contida na bobina auxiliar para a bobina coletora	100 / 100	Para válvula seletora (OUT)	
12	Injeção da mistura contida na bobina coletora para o detector (porta 6)	2500 / 100	Para válvula seletora (OUT)	
13	Esvazia a seringa na direção da porta 7 (lavagem da bobina auxiliar)	Esvazia seringa / 100	Para válvula seletora (OUT)	
14	Aspiração de solução transportadora para seringa	3500 / 200	Para solução transportadora (IN)	
15	Aspiração de BTB amostra (porta 3) para a bobina coletora	100 / 100	Para válvula seletora (OUT)	
16	Aspiração de BTB padrão para bobina coletora	25 / 100	Para válvula seletora (OUT)	

Continuação.

17	Aspiração de solução transportadora (porta 2) para bobina coletora	375 / 100	Para válvula seletora (OUT)
18	Injeção da mistura contida na bobina coletora para a bobina auxiliar	500 / 100	Para válvula seletora (OUT)
19	Aspiração de solução transportadora (porta 2) para a bobina coletora	200 / 100	Para válvula seletora (OUT)
20	Aspiração da mistura contida na bobina auxiliar para a bobina coletora	100 / 100	Para válvula seletora (OUT)
21	Injeção da mistura contida na bobina coletora para o detector (porta 6)	2500 / 100	Para válvula seletora (OUT)
22	Esvazia a seringa na direção da porta 7 (lavagem da bobina auxiliar)	Esvazia seringa / 100	Para válvula seletora (OUT)

O sinal obtido com a execução das etapas de 1 a 5 ilustra a dispersão da mistura na linha, desde a bobina coletora até o detector. O sinal obtido pela execução das etapas de 6 a 12 mostra o grau de dispersão da mistura desde sua introdução na bobina coletora, passando pela bobina auxiliar e até sua chegada ao detector.

As etapas de 14 a 22 foram repetidas, aumentando-se o volume de BTB padrão e diminuindo-se o volume de solução transportadora aspirada (porta 2).

Para verificar a influencia da concentração do padrão em relação a concentração da amostra, três concentrações de soluções de BTB padrão foram preparadas e os sinais foram registrados, mantendo-se fixa a concentração da amostra (BTB amostra). As concentrações de BTB padrão preparadas foram: um padrão com a metade da concentração da amostra (BTB amostra), outro com igual concentração da amostra e finalmente o último com o dobro da concentração da amostra. Os resultados são exibidos na Figura 15.

Figura 15 - Registro do grau de dispersão da solução de BTB amostra através de adição de padrão in-line por injeção seqüencial. Solução transportadora = tampão borato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; volume de BTB amostra aspirado para bobina coletora = $100 \text{ }\mu\text{L}$; volume de amostra aspirado da bobina auxiliar para a bobina coletora = $100 \text{ }\mu\text{L}$; volume de solução transportadora aspirado = $200 \text{ }\mu\text{L}$; velocidade de registro do sinal = 20 cm h^{-1} . **A** = [BTB amostra] = $2,0 \times 10^{-4} \text{ \% (m/v)}$; [BTB padrão] = $1,0 \times 10^{-4} \text{ \% (m/v)}$; **B** = [BTB amostra] = $2,0 \times 10^{-4} \text{ \% (m/v)}$; [BTB padrão] = $2,0 \times 10^{-4} \text{ \% (m/v)}$ e **C** = [BTB amostra] = $2,0 \times 10^{-4} \text{ \% (m/v)}$; [BTB padrão] = $4,0 \times 10^{-4} \text{ \% (m/v)}$.

Os resultados são calculados conforme a adição de padrão convencional, levando-se em consideração o fator de dispersão (f_d) que expressa a razão entre os valores dos sinais encontrados para a amostra sem a dispersão na bobina auxiliar e com a dispersão promovida pela bobina auxiliar. Dessa forma temos a seguinte relação:

$$C_x = \frac{a \cdot C_p}{b \cdot V_a} \cdot f_d$$

Onde, C_x é a concentração da solução amostra; a expressa o coeficiente linear da curva de regressão; b o coeficiente angular da curva de regressão; C_p a concentração do padrão adicionado; V_a o volume de amostra aspirada da bobina auxiliar e f_d o fator de dispersão, que nada mais é, que a razão entre os sinais da amostra sem a dispersão da bobina auxiliar e quando essa passa pela bobina auxiliar.

No caso da solução de azul de bromotimol (BTB) com concentrações especificadas nesse estudo, a razão entre o sinal da amostra obtido sem dispersão na bobina auxiliar e depois da amostra dispersa na bobina auxiliar (fator de dispersão – f_d) foi de 0,592. Para efeito de cálculo, esse fator é o mesmo para todas as soluções padrão de BTB, haja visto, que ele independe da concentração do padrão adicionado, dependendo somente da dispersão que a amostra sofre durante o processo de estocagem na bobina auxiliar e aspiração da solução dessa para a bobina coletora.

O mesmo cálculo foi empregado para a determinação das concentrações de cromo nas amostras de aço certificado e efluente industrial.

Os parâmetros analíticos das curvas de adição de padrão convencional (Figura15) e os resultados encontrados são resumidos na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultados encontrados para adição de padrão *in-line* com solução de BTB de concentração conhecida ($2,0 \times 10^{-4} \%$ (m/v)).

CONC. DO PADRÃO ADICIONADO% (m/v)	COEF. ANG.	COEF. LINEAR	r	n	VALORES OBTIDOS $\times 10^{-4} \%$ (m/v)
$1,0 \times 10^{-4}$	0,015	4,92	0,999	4	1,98 (1,0)
$2,0 \times 10^{-4}$	0,029	4,93	0,999	4	2,04 (2,0)
$4,0 \times 10^{-4}$	0,059	4,97	0,998	4	2,02 (1,0)

Valores entre parêntesis = Erro porcentual relativo.

Observa-se que os resultados obtidos exibem boa concordância com os valores de concentração das soluções de BTB amostra, potencializando a aplicação dessa metodologia para amostras de concentração desconhecida.

Em seguida, procedeu-se a determinação de Cr(VI) nas amostras, adotando-se as mesmas vazões utilizadas para o estudo de dispersão das soluções de BTB, como descrito na Tabela 12 (etapas de 14 a 22).

Para determinação de Cr(VI) procedeu-se como segue, tendo como base a Figura 16 da página seguinte: Aspirou-se 50 μL de amostra (V_A) (porta 5) para a bobina coletora, seguido da aspiração de 200 μL de brucina (porta 3) e a mistura enviada para o detector. Nesta etapa, o sinal registrado não sofre o efeito de dispersão na bobina auxiliar. Em uma segunda etapa, aspirou-se 50 μL de amostra (porta 5) seguido de 350 μL de solução transportadora (V_{ST}) (porta 2) para a bobina coletora, injetado-os seqüencialmente para a bobina auxiliar (400 μL). Aspira-se 200 μL de brucina (porta 3) seguidos de 100 μL da mistura estocada na bobina auxiliar (porta 7) para a bobina coletora e enviou-se para o detector. Este registro corresponde ao sinal da amostra sem a adição de padrão, proveniente da bobina auxiliar. Na etapa subsequente aspirou-se 50 μL de amostra (V_A) mais 25 μL de solução padrão (V_{sp}) e 325 μL de solução transportadora (V_{ST}) para a bobina coletora nesta ordem e injetou-se na bobina auxiliar. Aspirou-se 200 μL de brucina e em seguida, 100 μL da mistura contida na bobina auxiliar para a bobina coletora e enviou-se para o detector. Na próxima etapa, eram aspirados o mesmo volume de amostra (V_A), 50 μL de padrão e 300 μL de solução transportadora para a

bobina coletora e em seguida, enviados para a bobina auxiliar. Aspirou-se 200 μL de brucina e em seguida, 100 μL da mistura contida na bobina auxiliar para a bobina coletora e enviou-se para o detector. As adições subsequentes foram realizadas mantendo-se constante o V_A , aumentando-se o V_p e diminuindo-se o V_{ST} de tal forma, que o volume total enviado para a bobina auxiliar se mantivesse constante (neste caso 400 μL).

Figura 16 - Configuração do sistema de injeção seqüencial para determinação de íons Cr(VI) através de adição de padrão *in-line*. **ST** - solução transportadora (H_2SO_4 0,6 mol L^{-1}); **AM** - amostra; **R1** - Brucina; **R2** - padrão Cr(VI) ; **SP** - seringa de pistão; **VS** - válvula da seringa; **BC** - bobina coletora; **VSE** - válvula seletora; **BR** - bobina de reação; **BA** - bobina auxiliar; **D** - detector; **CF** - cela de fluxo; **L** - lixo ou descarte; $\lambda = 525 \text{ nm}$.

Para efeito de comparação, as amostras foram analisadas através do método da curva de referência e pela adição de padrão convencional.

As Figuras 17 e 18 exibem o registro dos sinais obtidos por injeção seqüencial para as amostras pelo método da curva de referência, seguido pelo método da adição de padrão convencional respectivamente. A Tabela 14 mostra os parâmetros analíticos das curvas obtidas para a adição de padrão convencional.

Figura 17 - Sinais registrados para determinação de íons Cr(VI) através da curva de referência em amostra certificadas de aço. A - 1,0 ; B - 2,0 ; C - 4,0 ; D - 6,0 e E - 8,0 mg L⁻¹ em Cr(VI); Velocidade de registro = 20 cm h⁻¹.

Figura 18 - Registro dos sinais obtidos para a adição de padrão convencional para as amostras. Velocidade de registro = 20 cm h^{-1} .

Tabela 14 - Parâmetros analíticos das curvas de referência para adição de padrão convencional através de injeção seqüencial.

FAIXA DE PADRÃO					
AMOSTRA	ADICIONADO*	COEF. ANG.	COEF. LINEAR	r	n
AISI 4340	1,0 - 4,0	1,50	3,07	0,993	5
BCS 464/1	1,0 - 5,0	1,62	3,20	0,992	5
BCS 466/1	1,0 - 4,0	1,18	2,39	0,992	6

* Concentração em mg L⁻¹.

A seguir (Figuras 19A até 19E) são exibidos os resultados obtidos para adição de padrão *in-line* para as amostras através do sistema de injeção seqüencial.

Figura 19A - Registro dos sinais obtidos por adição de padrão *in-line* para amostra de efluente industrial.

Figura 19B - Registro do sinal obtido por adição de padrão *in-line* para amostra certificada de aço BCS 466/1.

Figura 19C - Registro do sinal obtido por adição de padrão *in-line* para amostra certificada de aço BCS 464/1.

Figura 19D - Registro do sinal obtido por adição de padrão *in-line* para amostra certificada de aço AISI 4340.

Figura 19E - Registro do sinal obtido por adição de padrão *in-line* para amostra certificada de aço AISI 440 A.

A Tabela 15 resume os parâmetros analíticos das curvas analíticas obtidas a partir dos sinais registrados na adição de padrão *in-line*, seguida da Tabela 16, onde são exibidos os resultados obtidos através da curva de referência, da adição de padrão convencional e adição de padrão *in-line*.

Tabela 15 - Parâmetros analíticos das curvas obtidas na adição de padrão *in-line* para determinação de Cr(VI).

AMOSTRA	COEF. ANG.	COEF. LINEAR	r	n
AISI 4340	0,0208	2,04	0,9992	4
AISI 440 A	0,018	2,2	1,00	3
BCS 464/1	0,020	2,38	0,9940	4
BCS 466/1	0,018	1,82	0,9960	5
Efluente Industrial	0,015	3,72	0,9993	4

Tabela 16 - Resultados obtidos para a adição *in-line* em amostras reais.

CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS (mg L ⁻¹)			
AMOSTRA	Curva de referência	Adição de padrão convencional	Adição de padrão <i>in-line</i>
AISI 4340	4,07 (4,00)	2,04 (2,0)	1,96 (2,00)
AISI 440 A	-	-	2,00 (2,00)
BCS 464/1	4,71 (5,00)	1,97 (2,00)	2,02 (2,00)
BCS 466/1	3,36 (3,50)	2,02 (2,00)	2,02 (2,00)
Efluente industrial	-	-	3,99 (4,00)

Os valores teóricos esperados estão em negrito entre parêntesis.

Os resultados obtidos para a adição de padrão *in-line* apresentaram boa concordância com os valores encontrados pelo método de adição de padrão clássico, mostrando-se vantajoso pelo fato de utilizar apenas um único padrão, reduzindo tempo e fontes de erros durante as análises.

3.2.5 Construção e aplicação de uma cela espectrofotométrica delgada para análise em fluxo.

Construiu-se uma cela espectrofotométrica delgada como representado na Figura 20. Esta cela foi aplicada para determinação de íons Cr(VI) nas amostras de aço certificadas. Como as amostras analisadas possuem elevadas concentrações de íons Cr(VI), objetivou-se reduzir etapas de diluição das amostras pela diminuição do percurso óptico da cela.

Figura 20 – Desenho da cela delgada com fluxo vertical construída.

Como o percurso óptico pode ser facilmente modificado pela mudança da espessura do espaçador, esta cela apresenta boa versatilidade e praticidade. A cela é de fácil construção e baixo custo, propiciando maior possibilidade de propagação das técnicas de fluxo em instituições de ensino e nas indústrias.

Problemas comuns encontrados em algumas celas comerciais como retenção de bolhas é contornado pelo direcionamento vertical do fluxo, reduzindo intervenções durante as análises e possibilitando a utilização desta em outros modos de análise em fluxo como no caso das análises por fluxo monosegmentado onde as bolhas podem ser mais facilmente descartadas sem a necessidade de acessórios adicionais.

A configuração do sistema de injeção seqüencial utilizada é exibida na Figura 21.

Figura 21 – Configuração do sistema de injeção seqüencial. **ST**– solução transportadora; **VS** - válvula da seringa; **SP** - seringa de pistão; **BC** - bobina coletora (d.i. 0,8mm; comp. 200 cm); **VSE** - válvula seletora; **L** - lixo; **R1** - reagentador colorimétrico; **R2** - padrões ou amostras; **BR** - bobina de reação (d.i. 0,5mm; comp. 100 cm); **D** - detector; **CV** - cela vertical.

3.2.5.1 Desempenho da Cella Delgada de Fluxo Vertical

Alguns testes comparativos entre a cela construída e uma cela comercial com geometria em “U” possuindo percurso óptico de 10 mm ($\sim 71 \mu\text{L}$) utilizando solução de azul de bromotimol (BTB) em tampão borato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) foram realizados, monitorizando-se o sinal do corante em seu máximo de absorção (620 nm).

Foram registrados os sinais obtidos com o corante (BTB) na seguinte faixa de concentração: $1 \cdot 10^{-4}\%$ a $1 \cdot 10^{-2}\%$ (m/v). Observou-se que com a utilização da cela delgada os resultados mostraram linearidade em toda a faixa de concentração enquanto a cela comercial só apresentou resposta linear entre $1 \cdot 10^{-4}$ a $1 \cdot 10^{-3} \%$ (m/v) de BTB como mostrado na Figura 22, logo abaixo.

Figura 22 - Comparação do sinal obtido com uso da cela delgada (0,6 mm de percurso óptico) e da cela comercial (10 mm de percurso óptico). **A** – Solução de BTB $1,0 \cdot 10^{-2} \%$ (m/v) com a cela delgada e **B** – Solução de BTB $4,0 \cdot 10^{-3} \%$ (m/v) com a cela comercial. **Condições Experimentais:** Volume de solução de BTB = $200 \mu\text{L}$; Vazão = $100 \mu\text{L s}^{-1}$; Percurso Analítico = 100 cm. Cada variação de 0,1 unidades de absorbância corresponde a 232 unidades arbitrárias (U.A.).

Os parâmetros analíticos das curvas obtidas são resumidos na Tabela 17 logo a seguir. Observa-se que com a utilização das duas celas, as curvas analíticas obtidas exibem boa linearidade, porém, a cela comercial não cobre toda a faixa de concentração, restringindo-se apenas aos valores de concentração de BTB entre 1×10^{-4} e 1×10^{-3} % (m/v), enquanto que a cela delgada apresenta linearidade desde 1×10^{-4} a até 1×10^{-2} % (m/v) de BTB.

Tabela 17 - Parâmetros analíticos das curvas obtidas.

Faixas*($\times 10^{-4}$)	Parâmetros de Regressão			n
	Coef. Angular*	Coef. Linear	Coef. de Correlação (r)	
1 - 100 ^a	0,214 $\pm$ 0,004	-0,3 $\pm$ 0,2	0,9997	11
1 - 10 ^a	0,17 $\pm$ 0,01	-0,06 $\pm$ 0,06	0,9991	6
1 - 10 ^b	1,23 $\pm$ 0,01	-0,04 $\pm$ 0,06	0,9999	6
1 - 10 ^c	0,84 $\pm$ 0,19	2,0 $\pm$ 1,0	0,993	5

* Concentrações de BTB em % (m/v); a = Resultados obtidos com a cela delgada; b = Resultados com uso da cela comercial; c = Curva analítica para determinação de Cr(VI) com a cela delgada (concentrações em mg L^{-1}). Todos os resultados estão expressos como médias de triplicatas. **Condições Experimentais (A e B):** Volume BTB = 200 μL ; Vazão = 100 $\mu\text{L s}^{-1}$; Percurso Analítico = 100 cm.

A influência da variação do caminho óptico sobre o sinal obtido foi investigada, observando-se boa concordância com a lei de Beer como mostrado na Figura 23. Quando se variou o percurso óptico de 0,8 mm para 1,4 mm observou-se que o sinal obtido aumentou 1,8 vez, quando comparado com o sinal encontrado quando se faz uso de um espaçador de 0,8 mm, sendo bastante concordante com a Lei de Beer. A pequena discrepância observada está ligada a flexibilidade do material que compõe o espaçador (borracha) que na montagem geralmente

deforma ligeiramente quando exposta à pressão causada pelo aperto dos parafusos.

Figura 23 - Variação do sinal em função do percurso óptico da cela delgada. **A** - 0,8 mm; **B** - 1,4 mm. **Condições Experimentais:** Concentração de BTB = $1,0 \cdot 10^{-3}$ % (m/v); Volume BTB = 100 μL ; Vazão = 100 $\mu\text{L s}^{-1}$; Percurso Analítico = 100 cm. Cada variação de 0,1 unidades de absorbância corresponde a 232 unidades arbitrárias (U.A.).

A estabilidade da linha de base observada na presença de bolha de ar também foi avaliada pela introdução de 10 μL de ar injetados no percurso analítico. O registro dos sinais em presença e na ausência de bolhas para a cela comercial e a cela vertical construída foi comparado (Figura 24). Constatou-se que a introdução

de bolhas no sistema não causou modificação significativa do sinal, diferentemente do que ocorre com a cela comercial, onde intervenções para retirada da bolha foi necessário.

Figura 24 - Influência da introdução de bolhas. **A** - Sem introdução de bolha; **B** - Com introdução de bolha. **Condições Experimentais:** Concentração de BTB = $1,0 \cdot 10^{-3}$ % (m/v); Volume BTB = 100 μL ; Vazão = 100 $\mu\text{L s}^{-1}$; Percurso Analítico = 100 cm. Volume do segmento de ar = 10 μL . Cada variação de 0,1 unidades de absorbância corresponde a 232 unidades arbitrárias (U.A.).

Após estes estudos a cela foi utilizada para determinação de Cr(VI) em amostras certificadas de aço. O procedimento de análise realizado para as amostras, tendo como base a configuração exibida na figura 21, é mostrado na Tabela 18, logo abaixo, seguida da Tabela 19 que resume os resultados obtidos para as amostras.

TABELA 18 - Etapas executadas no sistema de injeção seqüencial para análise das amostras.

Etapas	Descrição	Vazão ($\mu\text{L s}^{-1}$)
1	Válvula da seringa conecta seringa com frasco de solução transportadora	-
2	Aspiram-se 1,0 ml de solução transportadora para dentro da seringa	200
3	Válvula da seringa conecta seringa com a válvula seletora	-
4	Posiciona-se a válvula seletora na porta 4 e aspira-se 200 μL de padrão/amostra para a bobina coletora	100
5	Posiciona-se a válvula seletora na porta 7 e esvazia-se a seringa	200
6	Válvula da seringa conecta seringa com frasco de solução transportadora	-
7	Aspiram-se 2,5 ml de solução transportadora para dentro da seringa	200
8	Válvula da seringa conecta seringa com a válvula seletora	-
9	Posiciona-se a válvula seletora na porta 3 e aspira-se 200 μL de regente colorimétrico para a bobina coletora	100
10	Posiciona-se a válvula seletora na porta 4 e aspira-se 100 μL de amostra/padrão para a bobina coletora	100
11	Posiciona-se a válvula seletora na porta 5 e esvazia-se a seringa através da bobina de reação e detetor	100

As etapas de 1 a 5 são necessárias para preencher o canal entre o frasco de amostra e/ou padrão e a válvula seletora com a solução a ser analisada. As etapas 6 a 11 referem-se ao procedimento de análise propriamente dito.

Tabela 19 - Resultados obtidos para análise de amostras certificadas de aços.

MATRIZ	Valor Certificado (%m/m)	Valor Observado (%m/m)	t
BCS 464	25,40	25,1±0,2	2,6
BCS 466	17,60	17,8±0,9	0,38
AISI 4340	0,820	0,78±0,06	1,2
AISI 440 A	16,21	17,1±0,4	3,9
AISI 420	13,69	14,5±0,5	2,8

Os resultados são expressos como média de triplicatas para cada amostra; t tabelado para $P = 0,05$ e 2 graus de liberdade = 4,3.

Os resultados encontrados com o uso da cela delgada apresentaram boa concordância com os valores certificados e não se observou a existência de erros sistemáticos dentro do intervalo de 95 % de confiança, de acordo com o teste t-Student.

3.2.6 Determinação de íons Fe(II) em amostras de interesse farmacológico.

A indústria farmacêutica produz larga variedade de medicamentos contendo Fe como princípio ativo, destacando-se entre eles os antianêmicos. Determinaram-se íons Fe(II) nestas matrizes através de injeção seqüencial utilizando-se detecção espectrofotométrica. A 2,2'-bipiridila reage com estes íons formando um complexo bastante estável de composição 3:1 respectivamente. O complexo possui máximo de absorção em tampão acetato pH 4,5 em 523 nm.

As descrições das etapas para lavagem do sistema e para as análises também são similares às mostradas nas Tabelas 4 e 6 respectivamente.

A otimização das condições experimentais foi realizada variando-se a vazão, o percurso analítico e o volume de amostra como mostrado resumidamente na Figura 25.

Figura 25 – Otimização das condições experimentais para determinação de íons Fe(II) em fármacos de ação antianêmica. Testes realizados com uma solução de Fe(II) $2,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Observa-se que com o aumento do volume de amostra o sinal aumenta proporcionalmente devido a menor dispersão e maior quantidade de cromóforo formado, já o aumento da vazão não tem muita influência sobre o sinal obtido, haja visto que, a formação do cromóforo é imediata e o aumento do percurso analítico reduz o sinal obtido devido ao aumento da dispersão no sistema. Os sinais das concentrações adotadas para construção da curva de referência na faixa 5,0 a 40 mg L⁻¹ (Figura 26) mostraram boa correlação entre os pontos ($r=0,998$).

Figura 26 – Registro dos sinais obtidos na construção da curva de referência para determinação de íons Fe(II) em fármacos de ação antianêmica. A – 5,0 ; B – 10,0 ; C – 15,0 ; D – 20,0 ; E – 25,0 ; F – 30,0 e G – 40,0 mg L⁻¹ em Fe (II). **Condições Experimentais** – Volume de Bpiridila – 200 µL ; Volume de padrão e/ou amostra – 50 µL ; Volume de solução transportadora – 2000 µL ; Vazão – 100 µL s⁻¹ ; Percurso analítico – 100 cm.

As amostras analisadas apresentavam pouco ou nenhuma turbidez, proporcionando desta forma, sua análise direta depois de adequada diluição em tampão acetato pH 4,5.

Os resultados obtidos foram comparados com valores encontrados por espectrometria de absorção atômica com atomização em chama e com os valores nominais fornecidos pelos fabricantes. A Tabela 20 resume os resultados obtidos.

Tabela 20 – Resultados obtidos para determinação de Fe(II) em diferentes tipos de fármacos de ação antianêmica através de análise por injeção seqüencial.

Amostras	EAA (CHAMA)	Este Método(SIA)	Valores Nominais
1	23.7 $\pm$ 0.1	22.6 $\pm$ 0.2	21
2	25.9 $\pm$ 0.2	26.2 $\pm$ 0.2	25
3	27.1 $\pm$ 0.2	28.8 $\pm$ 0.3	25
4	32.8 $\pm$ 0.3	32.7 $\pm$ 0.3	25
5	24.0 $\pm$ 0.2	22.4 $\pm$ 0.2	21

Valores expressos em mg L⁻¹. Os resultados são médias de triplicatas.

Observa-se que os resultados exibem valores bem concordantes com os valores obtidos através de espectrometria de absorção atômica, muito embora tenham diferido ligeiramente dos valores nominais fornecidos pelos fabricantes dos respectivos fármacos. Todos os valores encontrados tanto por espectrometria de absorção atômica quanto por injeção seqüencial ficaram acima dos valores nominais rotulados pelos fabricantes. Um possível motivo disso se deve ao fato de que normalmente o valor nominal é um valor mínimo presente, além do que, dependendo do tempo que o fármaco fica na prateleira das farmácias pode acarretar a oxidação do Fe(II) a Fe(III) e para garantir um valor mínimo de Fe no fármaco colocarem um pequeno excesso.

Durante as análises, observou-se que a estabilidade da curva analítica para diferentes dias de trabalho apresentou-se bastante reprodutível com variação entre 3 a 4% com relação ao coeficiente linear e angular, mostrando que o sistema

permite trabalhar por alguns dias sem a necessidade de manutenção e recalibrações constantes. Devido a tal comportamento, recomenda-se o uso da metodologia proposta não somente em laboratórios de controle de qualidade farmacêutico como também na monitorização de processos industriais e em estudos de monitorização ambiental onde se necessita realizar análises *in-situ*.

A metodologia desenvolvida apresenta algumas características que merecem certo destaque como simplicidade, robustez, reduzido consumo de reagente, rapidez, versatilidade, entre outras. Podemos ainda verificar a facilidade de análise das amostras, necessitando-se somente de diluição prévia dessas para a determinação de Fe.

3.2.7 Especificação de íons Fe(II) e Fe(III)

Estudos de especificação do estado de oxidação de íons Fe(II) e Fe(III) foram executados em amostras de extratos acéticos de sedimentos de rio. As amostras foram recolhidas e imediatamente condicionadas a vácuo em sacos plásticos de polietileno sob atmosfera de nitrogênio e conduzidas para o laboratório. Estas amostras foram secadas sob vácuo em dessecador, tendo-se o cuidado de sempre abrir o dessecador em atmosfera de nitrogênio.

3.2.7.1 Tratamento químico das amostras

Foi pesado 1,0 g ($\pm 0,1$ mg) das amostras secas em um tubo de polietileno e adicionado 50,0 mL de ácido acético 0,1 mol L⁻¹, previamente purgado com nitrogênio gasoso para eliminar o oxigênio dissolvido e passou-se rapidamente nitrogênio gasoso no frasco de polietileno antes de vedá-lo. Encaminharam-se as amostras para um agitador mecânico de mesa e deixou-se sob agitação por 12 horas. Filtrou-se rapidamente o conteúdo dos frascos diretamente em balões

volumétricos de 50,00 mL e completou-se o volume com solução de ácido acético 0,1 mol L⁻¹ previamente purgado com nitrogênio gasoso.

A configuração do sistema de injeção seqüencial é igual ao mostrado na Figura 1 e a descrição das etapas seguidas para lavagem do sistema e para as análises também são similares às mostradas nas Tabelas 4 e 6 respectivamente.

A diferenciação existente consiste na utilização de mais uma porta da válvula seletora conectando a uma solução de regente (2,2'-bipiridila) em presença de ácido ascórbico 1,0 % (m/v).

Na primeira etapa, realizou-se a determinação de íons Fe(II) e em seguida, efetuou-se a determinação de Fe total. Foram utilizadas as mesmas condições experimentais já otimizadas anteriormente como mostrado na Figura 25.

3.2.7.2 Resultados obtidos

As Figuras 27 e 28 exibem o registro dos sinais obtidos para a construção das curvas de referência para determinação de Fe(II) e Fe total respectivamente.

Figura 27 – Registros dos sinais obtidos para determinação de íons Fe(II) . A – 0,35; B – 0,50; C – 1,5; D – 2,5; E – 3,5 e F – 4,5 mg L^{-1} em Fe(II) . **Condições experimentais** – Volume de 2,2'-bipiridila – 250 μL ; Volume de amostra – 50 μL ; Vazão – 100 $\mu\text{L s}^{-1}$; Percurso analítico – 100 cm.

Figura 28 – Registros dos sinais obtidos para determinação de íons Fe total. A – 0,70; B – 1,0; C – 3,0; D – 5,0; E – 7,0 e F – 9,0 mg L⁻¹ em Fe(II). **Condições experimentais** – Volume de 2,2'-bipiridila – 250 µL; Volume de amostra – 50 µL; Vazão – 100 µL s⁻¹; Percurso analítico – 100 cm.

Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 21 logo abaixo. Observa-se que os mesmos mostram-se bem concordantes quando comparados com aqueles obtidos para determinação de Fe total pelo método da 1,10-fenantrolina.

Tabela 21 – Resultados obtidos para especiação de íons Fe em amostras de extratos acéticos de sedimentos.

AMOSTRA	Fe(II)	Fe TOTAL	Fe TOTAL (o-fenantrolina)	E. R. (%)
R1Ox-1	0,69±0,02	10,16±0,07	9,92±0,05	+2,42
T1Ox-1	3,57±0,03	11,68±0,09	11,32±0,10	+3,18
T2pp	35,12±0,10	57,14±0,18	53,90±0,15	+6,01
R3pp	23,88±0,05	55,03±0,21	52,00±0,16	-5,83
B1pp	ND	9,37±0,04	10,02±0,03	+6,6

Resultados em mg L⁻¹ expressos como médias de triplicatas. ND – não detectado.

4. CONCLUSÕES

A determinação de íons Cr(VI) com brucina apresentou resultados bastante satisfatórios e bem concordantes com os resultados encontrados por outras técnicas. Muito embora a frequência de amostragem da metodologia desenvolvida seja menor que para os sistemas de análises químicas por injeção em fluxo (FIA) convencionais, a rapidez encontrada é ainda relativamente alta, justificando sua aplicabilidade no controle de processos industriais em tempo real e na monitorização deste analito em estudos de campo.

As metodologias de diluição in-line e adição de padrão in-line desenvolvidas exibiram resultados precisos, mostrando outras vantagens como economia de tempo e de reagentes. A utilização de um único padrão para as adições torna a metodologia bastante atraente para aplicação em análises de amostras reais mais complexas como, por exemplo, alimentos e outros tipos de amostras ambientais como solos, sedimentos, entre outras. Esta metodologia também pode ser aplicada com a utilização de outros detectores, onde efeitos de matriz podem causar interferência espectral ou formação de óxidos mistos.

A cela delgada construída apresentou bom desempenho quando comparada com uma cela de fluxo comercial. Suas principais vantagens são o baixo custo, facilidade de construção, robustez e facilidade de variação do percurso óptico. Esta cela tem grande potencialidade para possibilitar uma maior difusão das técnicas de fluxo em instituições de ensino com reduzidos recursos e em pequenas indústrias.

A determinação de ferro em amostras de fármaco apresentou uma grande vantagem quando aplicada a amostras sem turbidez ou com pequena quantidade de matéria orgânica, pelo fato destas não necessitar de tratamento químico, bastando somente realizar diluições adequadas e executar a análise química direta.

Esta vantagem é de grande interesse para a indústria farmacêutica, tendo em vista a grande economia de reagentes e tempo nas análises de rotina, uma vez

que a metodologia desenvolvida possui uma frequência de amostragem que pode chegar a aproximadamente 100 amostras por hora.

O estudo de especiação de íons ferro mostrou-se promissor, muito embora seja ideal que as análises possam ser realizadas em campo e em tempo real para que se possa garantir maior integridade das amostras, evitando etapas críticas de acondicionamento destas. Mesmo assim, os resultados obtidos foram bastante concordantes com os encontrados pelo método oficial (o-fenantrolina).

Os estudos desenvolvendo a determinação de analitos de interesse ambiental podem contribuir e gerar maior impacto se realizados nos locais de coleta. Nesse sentido a análise por injeção sequencial consegue preencher alguns quesitos necessários para a realização dessas tarefas. Devido suas vantagens, as aplicações deste tipo de sistema de análises químicas tem se difundido em muitos centros de pesquisas nos mais variados campos do conhecimento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Ruzicka, J. and Marshall, G. D.; "Sequential injection - A new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays"; *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 237, 329.
- 2 - Ivaska, A. and Ruzicka, J.; "From flow injection to sequential injection: comparison of methodologies and selection of liquid drives", *Analyst*, **1993**, 118, 885.
- 3 - Gubeli, T.; Christian, G. D. and Ruzicka, J.; "Fundamentals of sinusoidal flow sequential injection"; *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 2407.
- 4 - Ruzicka, J.; "The second coming of flow-injection analysis", *Anal. Chim. Acta*, **1992**, 261, 3.
- 5 - Cladera, A.; Tomàz, C.; Gòmes, E.; Estela, J. M. and Cerdà, V.; "A new instrumental implementation of sequential injection analysis"; *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 302, 297.
- 6 - Liu, S. R. and Dasgupta, P. K.; "Sequential injection analysis in capillary format with an electroosmotic pump"; *Talanta*, **1994**, 41, 1903.
- 7 - Liu, S. R. and Dasgupta, P. K.; "Flow-injection analysis in the capillary format using electroosmotic pumping"; *Anal. Chim. Acta*, **1992**, 268, 1.
- 8 - Masini, J. C. Baxter, P. J. Detwiler, K. R. and Christian, G. D.; "On-line spectrophotometric determination of phosphate in bioprocesses by sequential injection analysis" *Analyst*, **1995**, 120:(5), 1583.

- 9 - Baxter, P. J. and Christian, G. D.; "Sequential injection analysis: A versatile technique for bioprocess monitoring", *Acc. Chem. Res.*, **1996**, 11:(29), 515.
- 10 - Min, R. W., Nielsen, J. and Villadsen, J.; "On-line monitoring of glucose and pellicillin by sequential injection analysis", *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 320, 199.
- 11 - Barnett, N. W.; Lenehan, C. E. and Lewis, S. W.; "Sequential injection analysis: an alternative approach to process analytical chemistry"; *Trends Anal. Chem.*; **1999**, 18, 346.
- 12 - Elsholz, O.; Frank, C.; Matyschok, B.; Steiner, F.; Wurl, O.; Stachel, B.; Reincke, H.; Schulze, M.; Ebinghaus, R. and Hempel, M.; "On-line determination of mercury in river water at the German monitoring station Schnackenburg/Elbe"; *Fresenius J. Anal. Chem.*; **2000**, 366, 196.
- 13 - van Staden, J. F. and Taljaard, R. E.; "On-line dilution with sequential injection analysis: a system for monitoring sulfate in industrial effluents", *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1997**, 357.
- 14 - Gòmez, E.; Tomáz, Cladera, A.; Estela, J. M. and Cerdà, V.; "Multicomponent techniques in sequential injection analysis", *Analyst*, **1995**, 120, 1181.
- 15 - Araújo, A. N.; Costa, R. C. C., Lima, J. L. F. C.; Reis, B. F.; "Sequential injection system in flame absorption spectrometry for the determination of calcium and magnesium in mineral waters", *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 358, 111.
- 16 - Taljaard, R. E. and Van Staden, J. F.; "Simultaneous determination of Co(II) and Ni(II) in water and soil samples with sequential injection analysis", *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 366, 177.

- 17 - Min, R. W.; Nielsen, J. and Villadsen, J.; "Simultaneous monitoring of glucose, lactic acid and penicillin by sequential injection analysis"; *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 312, 149.
- 18 - Stefan, R.; Van Staden, J. F., Aboul-Enein, H. Y.; "Simultaneous detection of S and R captopril using sequential injection analysis"; *Talanta*, **2000**, 51, 969.
- 19 - Galhardo, C. X. and Masini, J. C.; "Spectrophotometric determination of phosphate and silicate by sequential injection using molybdenum blue chemistry"; *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 417, 191.
- 20 - Luca, G. C.; Reis, B. F.; Zagatto, E. A. G.; Conceição, M.; Montenegro, B. S. M.; Araújo, A. N. and Lima, J. L. F. C.; "Development of a potentiometric procedure for determination of glycerol and 2,3-butanediol in wine by sequential injection analysis"; *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 366, 193.
- 21 - Rubí, E.; Jiménez, M. S.; Bauzá de Mirabó, F.; Forteza, R. and Cerdà, V.; "Preconcentration and atomic absorption determination of iron by sequential injection analysis"; *Talanta*, **1997**, 44, 553.
- 22 - Xu, Z.; Xu, S.; and Fang, Z.; "A Sequential injection on-line column preconcentration system for electrothermal-AAS determination of thallium in geochemical samples"; *At. Spec.*, **2000**, 21, 17.
- 23 - Marshall, G. D. and van Staden, J. F.; "Analyte enrichment using sequential-injection analysis"; *Inst. Sci. Tech.*, **1997**, 25, 307.
- 24 - Xu, Z.; Pan, H.; Xu, S. and Fang, Z.; "A sequential injection on-line column preconcentration system for determination of cadmium by electrothermal atomic absorption spectrometry"; *Spectrochim. Acta*, **2000**, 55(B), 213.

- 25 - Rubí, E.; Forteza, R and Cerdà, V.; "Preconcentration and colorimetric determination of Fe(III) by sequential injection analysis"; *Lab. Rob. Autom.*; **1996**, 8, 149.
- 26 - Luo, Y.; Nakano, S.; Holman, D. A.; Ruzicka, J. and Christian, G. D.; "Sequential injection wetting film extraction applied to the spectrophotometric determination of chromium(VI) and chromium(III) in water"; *Talanta*, **1997**, 44, 1563.
- 27 - Lou, Y.; Al-Othman; R.; Ruzicka, J. and Christian, G. D.; "Solvent extraction-sequential injection with segmentation and phase separation based on the wetting film formed on a Teflon tube wall"; *Analyst*, **1996**, 121, 601.
- 28 - Nakano, S.; Lou, Y.; Holman, D.; Ruzicka, J. and Christian, G. D.; "Sequential injection photometric determination of molybdenum using organic wetting film extraction"; *Microchem. J.*, **1997**, 55, 392.
- 29 - Cladera, A.; Miro, M.; Estela, J. M. and Cerda, V.; "Multicomponent sequential injection analysis determination of nitro-phenols in waters by on-line liquid-liquid extraction and preconcentration", *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 421:(2), 155.
- 30 - Baron, A.; Guzman, M.; Ruzicka, J. and Christian, G. D.; "Novel single standard calibration and dilution method performed by the sequential injection technique"; *Analyst*, **1992**, 117, 1839.
- 31 - van Staden, J. F.; du Plessis, H.; Taljaard, R. E.; "Determination of reaction stoichiometries by using the sequential injection analysis technique"; *Inst. Sci. Tech.*, **1999**, 27, 1.
- 32 - Liu, S.; Dasgupta, P. K.; "Electroosmotically pumped capillary format sequential injection analysis with a membrane sampling interface for gaseous analytes"; *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 308, 281.

- 33 - Christian, G. D.; "Sequential injection analysis for electrochemical measurements and process analysis"; *Analyst*, **1994**, 119, 2309.
- 34 - Lindfors, T.; Lähdesmäki, I. and Ivaska, A.; "A jet ring cell with a renewable solid support for amperometric detection of glucose in a sequential injection analysis system"; *Anal. Lett.*, **1996**, 29, 2257.
- 35 - Ivaska, A. and Kubiak, W. W.; "Application of sequential injection analysis to anodic stripping voltammetry"; *Talanta*, **1997**, 44, 713.
- 36 - Silva, C. L. and Masini, J. C.; "Determination of Cu, Pb, and Zn in river sediment extracts by sequential injection anodic stripping voltammetry with thin mercury film electrode"; *Frezeniu's J. Anal. Chem.*, **2000**, 367, 284.
- 37 - Ruzicka, J.; "Discovering flow injection: Journey from sample to a live cell and from solution suspension", *Analyst*, **1994**, 119, 1925.
- 38 - Christian, G. D. and Ruzicka, J.; "Exploiting stopped-flow injection methods for quantitative chemical assays"; *Anal. Chim. Acta*, **1992**, 261, 11.
- 39 - Ruzicka, J. and Gubeli, T.; "Principles of stopped-flow sequential injection analysis and its application to the kinetic determination of traces of a proteolytic enzyme"; *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 1680.
- 40 - Egorov, O.; O'hara, M. J.; Ruzicka, J. and Grate, J. W.; "Sequential injection separation system with stopped-flow radiometric detection for automated analysis of ^{99}Tc in nuclear waste"; *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 977.
- 41 - Mateos, J. J.; Gómez, E.; Garcias, F.; Casas, M. and Cerdà, V.; "Rapid $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ determination in water sample using a sequential injection method"; *App. Rad. Isot.*, **2000**, 53, 139.

- 42 - Grate, J. W.; Strebin, R.; Janata, J.; Egorov, O. and Ruzicka, J.; "Automated analysis of radionuclides in nuclear waste: rapid determination of ^{90}Sr by sequential injection analysis"; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 333.
- 43 - Grate, J. W.; Fadeff, S. K. and Egorov, O.; "Separation-optimized sequential injection method for rapid automated analytical separation of ^{90}Sr in nuclear waste"; *Analyst*, **1999**, 124, 203.
- 44 - Grate, J. W. and Egorov, O.; "Automating analytical separations in radiochemistry"; *Anal. Chem.*, **1998**, December 1, 779 A.
- 45 - Pollema, C. H.; Ruzicka, J.; Christian, G. D. and Lernmark, A.; "Sequential injection immunoassay utilizing immunomagnetic beads", *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 1356.
- 46 - Ruzicka, J. Pollema, C. H. and Scudder, M.; "Jet ring cell: A tool for flow injection spectroscopy and microscopy on a renewable solid support", *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 3566.
- 47 - Pollema, C. H. and Ruzicka, J.; "Flow renewable surface immunoassay: A new approach to immunoanalysis with fluorescence detection", *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 1825.
- 48 - Ruzicka, J.; "Lab-on-valve universal microflow analyzer based on sequential and bead injection", *Analyst*, **2000**, 125, 2094.
- 49 - van Staden, J. F. and McComack, T.; "Influence of single bead strings reactors on zone penetration and isodispersion point in sequential injection analysis", *Inst. Sci. Technol.*, **1999**, 27, 167.

- 50 - Oliveira, C. C.; Zagatto, E. A. G.; Ruzicka, J. and Christian, G. D.; "A bead injection system for copper determination"; *Anal. Lett.*, **2000**, 33, 929.
- 51 - Ruzicka, J. and Scampavia, L.; "From flow injection to bead injection", *Anal. Chem.*, **1999**, 77:(7), 257A.
- 52 - Lahdesmaki, I.; Scampavia, L. D.; Beeson, C. and Ruzicka, J.; "Detection of oxygen consumption of cultured adherent cell by bead injection spectroscopy", *Anal. Chem.*, **1999**, 27, 5248.
- 53 - Lahdesmaki, I.; Beeson, C.; Christian, G. D. and Ruzicka, J.; "Measurement of cellular stimulation through monitoring pH changes by bead injection fluorescence microscopy", *Talanta*, **2000**, 51, 497.
- 54 - Ruzicka, J.; "Flow injection-renewable surface techniques"; *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 308, 14.
- 55 - Pasekova, H.; Polasek, M.; and Solich, P.; "Sequential Injection Analysis"; *Chem. Listy*, **1999**, 93, 354.
- 56 - Taljaard, R. E. and Van Staden, J. F.; "Application of sequential injection analysis as process analyzers"; *Lab. Rob. Autom.*; **1998**, 10, 325.
- 57 - Oliveira, P. C. C.; Galhardo, C. X e Masini, J. C.; Levantamento realizado no site Web of Science - FAPESP, Artigo de revisão em fase de redação, 2000.
- 58 - Cerdà, V.; Estela, J. M.; Forteza, R.; Cladera, A.; Becerra, E.; Altimira, P. and Sitjar, P.; "Flow techniques in water analysis", *Talanta*, **1999**, 50, 695.
- 59 - Kendrick, M. J.; May, M. T.; Plishka, M. J.; Robinson, K. D.; "Metals in biological systems"; Ellis Horwood Limited, Chichester, England, 1992.

- 60 - Landson, A. B. G.; "Physiological and toxicological changes in the skin resulting from the action and interaction of metal-ion"; *Crit. Rev. Toxicol.*, **1995**, 25, 397.
- 61 - Cohen, M. D.; Kargacin, B.; Klein, C. B. and Costa, M.; "Mechanism of chromium carcinogenicity and toxicity"; *Crit. Rev. Toxicol.*, **1993**, 23, 225.
- 62 - Cassaret, A. and Doull's, D., "*Toxicology*" - The basic science of poisons, 3^a Ed. - USA, Mcmillan Publishing Co. - USA - 1986.
- 63 - Costa, M.; "Toxicity and carcinogenicity of Cr(VI) in animal models and humans"; *Crit. Rev. Toxicol.*, **1997**, 27, 431.
- 64 - Cespón-Romero, R. M.; Yebra-Biurrun, M. C.; Bermejo-Barrera, M. P.; "Preconcentration and speciation of chromium by the determination of total chromium and chromium(III) in natural waters by flame atomic absorption spectrometry with a chelating ion-exchange flow injection system"; *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 327, 37.
- 65 - Sperling, M.; Yin, X. and Welz, B.; "Differential determination of chromium(VI) and total chromium in natural waters using flow injection on-line separation and preconcentration electrothermal atomic absorption spectrometry"; *Analyst*, **1992**, 117, 629.
- 66 - Gao, R.; Zhao, Z.; Zhou, Q. and Yuan, D.; "Simultaneous determination of hexavalent and total chromium in water and plating baths by spectrophotometry"; *Talanta*, **1993**, 40:(5), 637.
- 67 - Devaragudi, C. S. and Reedy, K. H.; "Analytical properties of 5,5-dimethyl 1,3-cyclohexanedione dithiosemicarbazone monohydrochloride; spectrophotometric determination of chromium(VI) in alloy steels and industrial effluents"; *Talanta*, **1997**, 44, 1937.

68 - Feigl, F.; Spot Test in Inorganic Analysis; Elsevier Publishing Company - Fifth Edition, London, 1958.

69 - Welcher, F.; Chemical Solution - Reagents useful to the chemist, biologist, and bacteriologist; D. Van Nostrand Company, Inc., New York, 1942.

70 - Welcher, F.; Organic Analytical Reagents; volume four, D. Van Nostrand Company, Inc., New York, 1946.

71 - Marckzenko, Z.; Separation and Spectrophotometric Determination of Elements; Ellis Horwood Limited, New York, 1986.

72 - Andrade, J. C.; Rocha, J. C.; Pasquini, C. and Baccan, N.; "Effect of on-line complex formation kinetics on the flow injection analysis signal: The spectrophotometric determination of chromium (VI)", *Analyst*, **1983**, 108, 621.

73 - Onishi, Hiroshi; Photometric Determination of Traces of Metals - Part II A: Individual Metals, Aluminum to Lithium, Volume 3, Fourth Edition, John Wiley & Sons, New York, 1986.

74 - Balasubramaniam, N. and Maheswari, V.; "Indirect spectrophotometric determination of chromium"; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1996**, 79, 989.

75 - Kamburova, M.; "Spectrophotometric determination of chromium(VI) with methylene blue"; *Talanta*, **1993**, 40, 713.

76 - Kamburova, M.; "Spectrophotometric determination of chromium with iodonitrotetrazolium chloride and tetrazolium violet"; *Talanta*, **1993**, 40, 707.

77 - Kamburova, M.; "Neotetrazolium Chloride - A new analytical reagent for determination of chromium"; *Anal. Lett.*; **1997**, 30, 305.

- 78 - Fasolo, G. B.; Malvano, R. and Massaglia, A.; "Solvent extraction of chromium(VI) with tribenzylamine"; *Anal. Chim. Acta*, **1963**, 29, 569.
- 79 - Hellwege, H. E. and Schweitzer, G. K.; "Kinetics of the extraction of chromium(III) into chloroform containing acetylacetone"; *Anal. Chim. Acta*, **1963**, 29, 46.
- 80 - Kubán, V.; "Simultaneous determination of several components by flow injection analysis"; *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **1991**, 22, 477.
- 81 - Crouch, S. R.; Scheeline, A. and Kirkor, E. S.; "Kinetic determinations and some kinetic aspects of analytical chemistry"; *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 53R.
- 82 - Kawashima, T. and Nakano, S.; "Flow injection analysis of trace elements by use of catalytic reactions"; *Anal. Chim. Acta*, **1992**, 261, 167.
- 83 - MacCarthy, P; Klusman, R. W.; Cowling, S. W. and Rice, J. A.; "Water analysis"; *Anal. Chim.*, **1995**, 67, 525R.
- 84 - Guilbault, G. G.; Practical Fluorescence; 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., Chapter 5, p 185; New York, 1990.
- 85 - Schulman, S. G.; Molecular Luminescence Spectroscopy - Methods and Applications: Part 1; Chemical Analysis, Volume 77; Chapter 4, p 371, John Wiley & Sons, New York, 1985.
- 86 - Valcarcel, M. and Luque de Castro, M. D.; Flow Injection Analysis - Principles and Applications; Chapter 5, p 129, Ellis Horwood Limited 1987, Chichester, England.

- 87 - Haddad, P. R.; "Application of ternary complexes to spectrofluorometric analysis"; *Talanta*, **1977**, 24, 1.
- 88 - Paleologos, E. K.; Lafis, S. I.; Tzouwara-Karayanni, S. M. and Karayannis, M. I.; "Speciation of Cr^{III}-Cr^{VI} using flow injection analysis with fluorimetric detection" *Analyst*, **1998**, 123, 1005.
- 89 - Pilipenko, A. T.; Shevchenko, T. L. and Volkova, A. I.; "Luminescence determination of chromium(VI)"; *J. Anal. Chem. (transl. of Zh. Anal. Khim.)*;
- 90 - Jie, N.; Zhang, Q.; Yang, J. and Huang, X.; "Determination of chromium in waste-water and cast Iron samples by fluorescence quenching of rhodamine 6G"; *Talanta*, **1998**, 46, 215.
- 91 - Temkina, V. Ya.; Bozhevol'nov, E. A.; Dyatlova, N. M.; Kreingol'd, S. U.; Yaroshenko, G. F.; Antonov, V. N. and Lasyovskii, R. P.; "Triazinnylstilbexone - A new luminescent reagent for chromium(III)"; *Zh. Anal. Khim.*, **1967**, 22:(12), 1830.
- 92 - Andrade, J. C.; Rocha, J. C. and Baccan, N.; "Sequential spectrophotometric determination of chromium(III) and chromium(VI) using flow injection analysis"; *Analyst*, **1985**, 110, 197.
- 93 - Jorgensen, S. S. and Regitano, A. B.; "Rapid determination of chromium(VI) by flow injection analysis"; *Analyst*, **1980**, 105, 292.
- 94 - Andersen, J. E.; "Introduction of Hydrogen peroxide as an oxidant in flow injection analysis: speciation of Cr(III) and Cr(VI)"; *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 36, 125.
- 95 - Andrade, J. C.; Rocha, J. C. and Baccan, N.; "On-line oxidation of Cr(III) to Cr(VI) for use with the injection analysis technique"; *Analyst*, **1984**, 109, 645.

- 96 - Ruz, J.; Ríos, A.; Luque de Castro, M. D. and Valcárcel, M.; "Flow Injection configurations for chromium speciation with a single spectrophotometric detector"; *Anal. Chim. Acta*, **1986**, *186*, 139.
- 97 - Girard, L. and Hubert, J.; "Speciation of chromium(VI) and total chromium determination in welding dust samples by flow-injection analysis coupled to atomic absorption spectrometry"; *Talanta*, **1996**, *43*, 1965.
- 98 - Marques, M. J.; Morales-Rubio, A.; Salvador, A. and de la Guardia, M.; "Chromium speciation using activated alumina microcolumns and sequential injection analysis-flame atomic absorption spectrometry", *Talanta*, **2001**, *53*, 1229.
- 99 - Milosavljević, E. B.; Solujić, L.; Nelson, J. H. and Hendrix, J. L.; "Simultaneous determination of chromium (VI) and chromium(III) by flame atomic absorption spectrometry with a chelating ion-exchange flow injection system"; *Mikrochim. Acta*, **1985**, *III*, 353.
- 100 - Cox, A. G.; Cook, I. G. and McLeod, C. W.; "Rapid sequential determination of chromium(III)-chromium(VI) by flow Injection analysis - inductively coupled plasma atomic-emission spectrometry"; *Analyst*, **1985**, *110*, 331.
- 101 - Lynch, T. P.; Kernoghan, N. J. and Wilson, J. N.; Speciation of metals in solution by flow injection analysis - Part 1 - Sequential spectrophotometric and atomic-absorption detectors"; *Analyst*, **1984**, *109*, 839.
- 102 - Vassileva, E.; Hadjiivanov, K.; Stoychev, T. and Daiev, C.; "Chromium speciation analysis by solid-phase extraction on a high surface area TiO₂", *Analyst*, **2000**, *125*, 693.

- 103 - Escobar, R.; Lin, Q. and Guiraúm, A.; Rosa, F. F.; "Flow injection chemiluminescence method for the selective determination of chromium(III)"; *Analyst*, **1993**, 118, 643.
- 104 - Novic, M.; Berregi, I.; Ríos, A. and Valcárcel, M.; "A new sample-injection/sample-dilution system for the flow-injection analytical technique"; *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 381, 287.
- 105 - Oliveira, P. C. C. and Masini, J. C.; "Sequential injection determination of chromium(VI) by transient oxidation of brucine with spectrophotometric detection and in-line dilution"; *Analyst*, **1998**, 123, 2085.
- 106 - van Staden, J. F. and Taljaard, R. E.; "On-line dilution with sequential injection analysis: A system for monitoring sulfate in industrial effluents"; *Frezeniu's J. Anal. Chem.*, **1997**, 357, 577.
- 107 - Albertús, F.; Horstkotte, B.; Cladera, A. and Cerdá, V.; "A robust multisyringe system for process flow analysis - Part I. On-line dilution and single point of protolytes"; *Analyst*, **1999**, 124, 1373.
- 108 - Reis, B. F.; "Uma cela de fluxo feita em acrílico para espectrofotometria em sistemas de análise química por injeção em fluxo"; *Quim. Nova*, **1994**, 17, 228.
- 109 - Araújo, M. C. U.; Honorato, R. S.; Santos, A. V.; Silva, E. C.; "Uma célula espectrofotométrica simples para sistemas de análise química em fluxo contínuo"; *Quim. Nova*, **1996**, 19, 86.
- 110 - Pasquini, C.; Raimundo Jr., I. M.; "Um fotômetro simples para análise por injeção em fluxo"; *Quim. Nova*, **1984**, 7, 24.

- 111 - Pavon, J. L. P.; Gonzalo, E. R.; Christian, G. D.; Ruzicka, J.; "Universal sandwich membrane cell and detector for optical flow injection analysis"; *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 923.
- 112 - Reis, B. F.; Rocha, F. R. P.; Texeira, L. S. G.; Costa, A. C. S.; Korn, M.; "Construção de uma cela de fluxo para medidas por espectrofotometria em fase sólida"; *Quim. Nova*, **2000**, 23, 116.
- 113 - Gouveia, V. J. P.; Gutz, I. G.; Rubim, J. C.; "A new spectroelectrochemical cell for flow-injection analysis and its application to the determination of Fe(II) down to the femtomol level by surface-enhanced resonance Raman-scattering (SERRS)"; *J. Eletroanal. Chem.*, **1994**, 371, 37.
- 114 - Oliveira, P. C. C.; Gouveia, J. V. P. e Masini, J. C.; "Construção e aplicação de uma cela espectrofotométrica de camada delgada para análises em fluxo"; *Quim. Nova*, **2001**, 24(3), 399..
- 115 - Bader, M.; "A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis"; *J. Chem. Educ.*, **1980**, 57, 703.
- 116 - Fuller, C. W.; "A simple standard additions technique using the model 306 atomic absorption spectrophotometer"; *At. Abs. Newsl.*, **1972**, 11:(3), 65.
- 117 - Koscielniak, P.; "A critical look at the interpolative standard addition method"; *Analisis*, **1996**, 24, 24.
- 118 - Falcó, P. C.; Reig, F. B.; and Gómez, F. B.; "Standard addition method in FIA. comparison between different assemblies"; *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 379, 89.

- 119 - Giné, M. F.; Reis, B. F.; Zagatto, E. A. G.; Krug, F. J. and Jacintho, A. O.; "A simple procedure for standard additions in flow injection analysis"; *Anal. Chim. Acta*, **1983**, 155, 131.
- 120 - Haghighi, B.; Maleki, N. and Safavi, A.; "Standard additions in flow injection analysis with atomic absorption spectrometry"; *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 357, 151.
- 121 - Tyson, J. F.; Appleton, J. M. H. and Idris, A. B.; "Flow injection calibration methods for atomic absorption spectrometry"; *Anal. Chim. Acta*, **1983**, 145, 159.]
- 122 - Giné, M. F.; Krug, F. J.; Bergamin Filho, H.; Reis, B. F. and Zagatto, E. A. G.; "Flow injection calibration of inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using the generalized standard additions method"; *J. Anal. At. Spec.*, **1988**, 3, 673.
- 123 - Israel, Y. and Barnes, R. M.; "Standard addition method in flow injection analysis with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry"; *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 1192.
- 124 - Araújo, M. C. U.; Pasquini, C. and Bruns, R. E.; "A fast procedure for standard additions in flow injection analysis"; *Anal. Chim. Acta*, **1985**, 171, 337.
- 125 - Oliveira, P. C. C. and Masini, J. C.; "Sequential injection in-line standard additions with spectrophotometric detection"; em fase inicial de redação.
- 126 - DenBoef, G.; "Unstable reagents in flow injection analysis"; *Anal. Chim. Acta*, **1989**, 216, 289.
- 127 - Dutt, V. V. S. E. and Mottola, H. A.; "Novel approach to reaction-rate based determinations by use to transient redox effects"; *Anal. Chem.*, **1975**, 47:(2), 357.

- 128 - Li, M.; Hu, N. and Lin, S.; "Indirect measurement of brucine by adsorptive stripping voltammetry at mercury electrode"; *Talanta*, **1995**, 42, 1389.
- 129 - Jenkins, D. and Medsker, L. L.; "Brucine method for determination of nitrate in ocean, estuarine, and fresh waters"; *Anal. Chem.*, **1964**, 36:(3), 610.
- 130 - Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 25th ed.; Helrich, K. Ed.; AOAC: Washington, DC, **1990**, 320.
- 131 - Masini, J. C.; Aragon, S. and Nyasulu, F.; "Electrochemistry of brucine. 2. The brucine-based determination of nitrate"; *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 1077.
- 132 - Dolmanova, I. F.; Shekhovtsova, T. N. and Peshkova, V. M.; "Kinetic determination of chromium based on the oxidation of o-dianisidine by hydrogen peroxide in the presence of activators"; *Zh. Anal. Khim.*, **1972**, 27:(10), 1981.
- 133 - Jasinskiene, E. I. and Bilidiene, E. B.; "Use of carboxylic acids as activators for the kinetic determination of microamounts of chromium(VI)"; *Zh. Anal. Khim.*, **1968**, 23:(1), 143.
- 134 - Yamane, T. and Mottola, H. A.; "The transient oxidation of brucine in solution as a tool for the determination of chromium(VI) and brucine"; *Anal. Chim. Acta*, **1983**, 146, 181.
- 135 - Korenaga, T.; Motomizu, S. and Toei, K.; "Spectrophotometric determination of iron in sea-water by solvent extraction as the ternary complex iron(II)-2-nitroso-4-chlorophenol-rhodamine B", *Talanta*, **1974**, 21, 645.

136 - Satake, M. Nagahiro, T. and Puri, B. K.; "Solid-liquid separation after liquid-liquid extraction: Spectrophotometric determination of iron(II) by extraction of its ternary complex with 2,2'-dipyridyl and tetraphenylborate into molten naphthalene", *Analyst*, **1984**, 109, 31.

137 - Morales, A. and Toral, M. I.; "Extraction-spectrophotometric determination of iron as the ternary Tris(1,10-phenanthroline)-iron(II)-picrate complex", *Analyst*, **1985**, 110, 1445.

138 - Vydra, F. and Pribil, R.; "Utilization of ternary and ion-association complex in analysis – I. Selective extraction and colorimetric determination of traces of iron as "ferroin iodide" ", *Talanta*, **1959**, 3, 72.

139 - Toral, M. I. And Bermejo-Barrera; "Spectrophotometric and derivative spectrophotometric determination of iron by extraction of the iron(II)-TPTZ-Picrate ion-association complex", *Talanta*, **1989**, 36, 1069.

140 - Gladilovich, D. B. and Stolyarov, K. P.; "Extraction-fluorometric determination of iron(III) according to the oxidation of 1,2-phenilenodiamine", *Zh. Anal. Khim.*, **1983**, 38, 876.

141 - Koh, K. J. and Ryan, D. E.; "Fluorescence and metallic valency states – Part V . Determination of iron with phthalic acid", *Anal. Chim. Acta*, **1971**, 54, 303.

142 - Cha, Ki-Won and Park, Kwang-Won; "Determination of Iron(III) with salicylic acid by the fluorescence quenching method", *Talanta*, **1998**, 46, 1567.

143 - Guo-Zhong, D. and Zhi-Liang, J.; "A new catalytic kinetic spectrophotometric method for determination of iron", *Talanta*, **1989**, 36, 1107.

- 144 - Bowei, A. R.; Achterberh, E. P.; Mantoura, R. F. C. and Worsfold, P. J.; "Determination of sub-nanomolar levels of iron in seawater using flow injection with chemiluminescence detection", *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 361, 189.
- 145 - Sakharov, A. A.; Danevich, V. I.; Gael, E. V.; "Amperometric determination of iron in pharmaceutical preparations"; *Pharm. Chem. J.*, **1992**, 4, 91.
- 146 - Abubakr, M. S.; "Spectrophotometric study of the complexation equilibrium of iron(III) with 3-Hydroxypicolinic acid and determination of iron in pharmaceutical preparations"; *J. Chem. Technol. Biot.* **1993**, 58:(3), 231.
- 147 - Cortes, G.; Llompart, M. A.; Estela, J. M.; Cerdà, V.; Salinas, F.; "Application of phenylacetohydroxamic acid to the spectrophotometric determination of iron in vitamin complexes"; *An. Quim.* **1992**, 88:(1), 133.
- 148 - Salinas, F.; Martinez-Vidal, J. L.; Fernandez-Alba, A. R.; "Spectrophotometric determination of iron in wines, vegetables, pharmaceutical compounds and minerals with mandelohydroxamic acid (MHA)"; *Anal. Lett.* **1989**, 22:(1), 187.
- 149 - Issopoulous, P. B.; Economou, P. T.; "Spectrophotometric determination of iron(II) in anti-anemic preparations using a newly developed Schiff's base"; *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1992**, 342:(4-5), 439.
- 150 - Araújo, A. N.; Garcia, J.; Lima, J. L. F. C.; Lucia, M. P. M. and Saraiva, M. F. S.; "Colorimetric determination of iron in fortified formulas by sequential injection analysis"; *Freseniu's J. Anal. Chem.* **1997**, 357, 1153.
- 151 - van Staden, J. F.; du Plessis, H. and Taljaard, R. E.; "Determination of iron(III) in pharmaceutical samples using dialysis in a sequential injection analysis system"; *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 357, 141.

- 152 - Teixeira, M. F. S.; Aniceto, C. and Fatibello-Filho, O.; "Ion-selective electrode for the determination of iron(III) in vitamin formulations"; *J. Braz. Chem. Soc.*, **1998**, 9, 506.
- 153 - Oliveira, A. F.; Fatibello-Filho, O.; Diniz, M. C. T. and Nóbrega, J. A.; "Sequential determination by confluent reagent introduction in the sample loop: system: Characteristics and applications"; *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 366, 281.
- 154 - Oliveira, P. C. C. and Masini, J. C.; "Sequential injection determination of iron(II) in anti-anemic pharmaceutical formulations with spectrophotometric detection"; *Anal. Lett.*, **2001**, 34, 389.
- 155 - Chalk, S. J. and Tyson, J. F.; "Comparison of the maximum sensitivity of different flow injection manifold configurations: Alternating variable search optimization of the Iron(II)/1,10-phenanthroline system", *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 660.
- 156 - Haguigui, B. and Safavi, A.; "Simultaneous flow injection determination of iron(II) and iron(III) with opto-eletochemical detection", *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 354, 43.
- 157 - Oliveira, P. C. C. and Masini, J. C.; "Speciation of the oxidation state of iron by sequential injection analysis", Em fase de redação.
- 158 - Maniasso, N.; Zagatto, E. A. G. and Santelli, R. E.; "A new approach for compensating concentration gradients in flow analysis", *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 331, 17.
- 159 - Mckelvie, I. D.; Peat, D. M. W.; Matthews, G. P. and Worsfold, P. J., "Elimination of the Schlieren effect in the determination of reactive phosphorus in estuarine waters by flow-injection analysis", *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 351, 265.

160 - Zagatto, E. A. G.; Arruda, M. A. Z.; Jacinto, A. O. and Matos, I. L., "Compensation of the Schlieren effect in flow-injection analysis by using dual-wavelength spectrophotometry", *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 234, 153.

161 - Miller, J. C. and Miller, J. N., "Statistics for Analytical Chemistry"; Ellis Worwood, Chinchester, 1988.