

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ANA CRISTI BASILE DIAS

**Sistemas de análises químicas em fluxo explorando multi-impulsão e detecção  
espectrofotométrica: aplicação a formulações farmacêuticas e a extratos de solos**

PIRACICABA - SP

2006

ANA CRISTI BASILE DIAS

**Sistemas de análises químicas em fluxo explorando multi-impulsão e detecção  
espectrofotométrica: aplicação a formulações farmacêuticas e a extratos de solos**

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na  
Agricultura da Universidade de São Paulo como  
parte dos requisitos para obtenção de título de  
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química na Agricultura e no  
Ambiente  
Orientador: Prof. Elias Ayres Guidetti Zagatto

PIRACICABA - SP

2006

Amar o perdido  
deixa confundido  
este coração.

Nada pode o olvido  
contra o sem sentido  
apelo do Não.

As coisas tangíveis  
tornam-se insensíveis  
à palma da mão

Mas as coisas findas  
muito mais que lindas,  
essas ficarão.

(Memória, Carlos Drummond de Andrade)

*A Deus, que me permite viver juntamente com uma  
família que me ama, com amigos que me confortam, e  
com as mais lindas lembranças, que por mais que  
findas, ficarão eternamente em meu coração.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e à Universidade de São Paulo, pela instalação e facilidades oferecidas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa e auxílio financeiro.

Ao Prof. Elias Ayres Guidetti Zagatto, pelas discussões científicas, orientação e amizade.

Aos amigos e colaboradores portugueses Prof. José Luiz F.C. Lima e João L.M. Santos pelo apoio logístico, confiança e amizade.

Aos amigos e colaboradores do laboratório LabLaser da Universidade Federal da Bahia pela oportunidade, auxílio durante o estágio realizado e amizade que ficou, em especial a Profa. Cristina Quintella, Angelo, Magela, Helena, Ana Paula e Yuji.

Aos pesquisadores do Laboratório de Química Analítica do CENA, Prof. Boaventura, Prof. Francisco Krug e Profa. Maria Fernanda pela amizade e colaborações.

Aos técnicos do Laboratório de Química Analítica do CENA, Fátima, Sheila, Yolanda e Valdemir, pelo carinho e auxílio.

Às eficientes bibliotecárias do CENA, pela excelente ajuda, em especial à Marília.

Aos colegas e amigos do laboratório, Paula, Eduardo, Evandro, Silvia e Diego pelas discussões diárias, colaborações científicas e pessoais e amizade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Química Analítica do CENA, em especial a Rejane, Dario, Mario pela amizade e ajuda sempre disponível.

À minha amiga Viviane, por ter me acompanhado diariamente no decorrer deste trabalho, sempre com sua presença de espírito repleta de amor, carinho e compreensão, em bons e maus momentos.

À minha amiga Tatiana pela amizade, apoio, paciência e por excelentes momentos vividos.

Ao Alexandre, pelo profundo amor, amizade e respeito que ele sempre me ofereceu. Ao bom humor e paciência que me ensinou a manter. À sua presença sempre constante nos obstáculos, nas quedas e nas vitórias desta jornada.

À minha amiga Simone por me dar a oportunidade de compartilhar o nascimento, crescimento, educação e o amor do João Pedro. À sua profunda paciência em me escutar e a permitir meu consolo no sorriso e nas brincadeiras de uma criança.

À minha amiga Nádia pela amizade, conforto, crescimento espiritual, pelos ensinamentos e conversas intermináveis e relaxantes de toda semana.

Às minhas amigas distantes, Denise, Paula Pinto, Marta, Helena, Annelena e Paula Gervásio, que através de poucos e rápidos encontros se mantém uma linda amizade guardada bem perto, em meu coração.

Às amigas do Laboratório de Nutrição Mineral e Isótopos Estáveis do CENA, em especial, Tatiele, Alexsandra e Josiane pela ótima disposição e alegria que sempre compartilham.

Às minhas amigas Juliana Machado e Lúcia pela amizade, pelos momentos de relaxamento, e por me promover força física suficiente para terminar este trabalho.

Aos meus pais, José Carlos e Carmen, pela confiança inabalável e amor incondicional. Às minhas irmãs pelo respeito e amor que me transmitem.

À toda a minha família, pelo carinho e confiança que depositaram em mim, em especial aos meus novos familiares Alessandra, Eduardo, Teresa e Boaventura.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”*

Cora Coralina

*“A vida está cheia de desafios que, se aproveitados  
de forma criativa, transformam-se em  
oportunidades”.*

Maxwell Maltz

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Unidades propulsoras empregadas nos sistemas de análises em fluxo.....	26
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representações gráficas para diferentes variações temporais de vazão.....	32
Figura 2. Diagrama de fluxos do sistema multi-impulsão para a avaliação de suas características fluídicas.....	54
Figura 3. Representação do funcionamento da bomba solenóide.....	55
Figura 4. Diagrama de fluxos do sistema MC.....	59
Figura 5. Representação da válvula solenóide.....	60
Figura 6. Mecanismo das reações envolvidas na determinação de bromexina.....	61
Figura 7. Diagrama de fluxos dos sistemas MP (esquerda) e MC (direita) para determinação de bromexina.....	62
Figura 8. Diagrama de fluxos do sistema MP (esquerda) e MC (direita) para a determinação de fosfato em extratos de solos.....	66
Figura 9. Diagrama do sistema de fluorescência induzida por “laser” polarizado.....	69
Figura 10. Influência da frequência de pulsação (esquerda) e do tempo de operação (direita) das bombas solenóide na precisão volumétrica.....	73
Figura 11. Influência da vazão (esquerda) e do comprimento do reator (direita) na dispersão da solução de VBC.....	75
Figura 12. Influência da vazão nos sinais de VBC.....	77
Figura 13. Influência do volume da zona de amostra.....	79
Figura 14. Influência da frequência de pulsação da solução transportadora.....	81
Figura 15. Influência da concentração do ácido sulfúrico.....	83
Figura 16. Influência da concentração dos reagentes Ce(IV) e MBTH.....	83
Figura 17. Influência da temperatura na determinação de bromexina.....	84
Figura 18. Curvas analíticas.....	85
Figura 19. Influência da vazão de $R_1$ no sistema MC.....	86
Figura 20. Curva analítica para a determinação de bromexina.....	87
Figura 21. Influência do volume da zona de amostra nos sistemas MC (esquerda) e MP (direita).....	89
Figura 22. Influência da frequência de pulsação durante a inserção da zona de amostra.....	90
Figura 23. Curvas analíticas para determinação de fosfato em extratos de solos.....	90
Figura 24. Influência da frequência de pulsação durante a inserção da zona de amostra para sistema MP.....	92
Figura 25. Curvas analíticas para determinação de fosfato em extratos de solos.....	93



Figura 26. Variação temporal da distribuição radial da concentração de RB (Experimento E <sub>1</sub> ).....	98
Figura 27. Variação temporal da concentração de RB em três linhas de fluxo (Experimento E <sub>1</sub> ).....	99
Figura 28. Variação temporal da distribuição radial da concentração de RB (Experimento E <sub>2</sub> ).....	101
Figura 29. Variação temporal da concentração de RB em três linhas de fluxo (Experimento E <sub>2</sub> ).....	101
Figura 30. Variação temporal da distribuição radial da concentração de RB (Experimento E <sub>3</sub> ).....	102
Figura 31. Variação temporal da concentração de RB em três linhas de fluxo (Experimento E <sub>3</sub> ).....	104
Figura 32. Variação temporal da distribuição radial da concentração de RB (Experimento E <sub>4</sub> ).....	105
Figura 33. Variação temporal da concentração de RB em três linhas de fluxo (Experimento E <sub>4</sub> ).....	105
Figura 34. Variação temporal da distribuição radial da concentração de RB (Experimento E <sub>5</sub> ).....	107
Figura 35. Variação temporal da concentração de RB em três linhas de fluxo (Experimento E <sub>5</sub> ).....	107

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de vazão correspondente a diferentes frequências de pulsação das bombas solenóide.....	56
Tabela 2. Programação de acionamento das bombas solenóide.....	57
Tabela 3. Procedimento para a determinação de bromexina.....	63
Tabela 4. Procedimento para a determinação de fosfato no sistema MP.....	66
Tabela 5. Precisão e exatidão referentes aos volumes providos pelas diferentes bombas solenóide.....	72
Tabela 6. Coeficientes das curvas analíticas para a determinação de bromexina nos sistemas multi-impulsão e multi-comutação.....	85
Tabela 7. Resultados obtidos na determinação de bromexina em formulações farmacêuticas.....	87
Tabela 8. Resultados obtidos na determinação de fosfato em extratos de solos.....	94
Tabela 9. Parâmetros de dispersão.....	108

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
2.1. Analisadores em fluxo.....	4
2.1.1. Sistemas de análises explorando fluxo pulsante.....	15
2.2. Estabelecimento do fluxo.....	24
2.2.1. Unidades propulsoras de fluidos.....	24
2.2.2. Variações temporais da vazão e regimes de escoamento.....	30
2.2.3. Visualização da zona de amostra.....	35
2.3. Aplicações.....	39
2.3.1. Determinação de bromexina em fármacos.....	39
2.3.2. Determinação espectrofotométrica de fosfato em solos.....	42
<b>3. MATERIAIS</b> .....	49
3.1. Equipamentos e acessórios.....	49
3.2. Soluções-padrão, reagentes e amostras.....	50
3.2.1. Desempenho das bombas solenóide.....	50
3.2.2. Determinação de bromexina em fármacos.....	50
3.2.3. Determinação de fosfato em extratos de solos.....	52
3.2.4. Visualização da amostra dispersa explorando PLF.....	53
<b>4. MÉTODO</b> .....	54
4.1. Desempenho das bombas solenóide.....	54
4.2. Determinação de bromexina em fármacos.....	60
4.3. Determinação de fosfato em extratos de solos.....	64
4.4. Visualização da amostra dispersa explorando PLF.....	68
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	71
5.1. Desempenho das bombas solenóide.....	71
5.2. Determinação espectrofotométrica de bromexina.....	78
5.3. Determinação espectrofotométrica de fosfato em extratos de solos.....	88
5.4. Visualização da amostra dispersa explorando PLF.....	95
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	110
REFERÊNCIAS.....	112

## RESUMO

DIAS, A.C.B. **Sistemas de análises químicas em fluxo explorando multi-impulsão e detecção espectrofotométrica: aplicação a formulações farmacêuticas e a extratos de solos.** 2006. 128 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

Os sistemas de análises em fluxo com multi-impulsão (MP) empregam bombas solenóides como unidade propulsora de fluidos, as quais proporcionam um fluxo pulsante. Esta característica foi avaliada em função do funcionamento, operação e desempenho do sistema, das condições de mistura entre as soluções envolvidas e da dispersão da solução inserida.

A avaliação geral dos sistemas MP envolveu estudos de precisão e exatidão volumétrica dos pulsos, bem como da robustez da unidade propulsora, os quais envolveram medidas gravimétricas. Ainda, dispersão envolvendo uma solução colorida como amostra foi espectrofotometricamente avaliada. Os resultados foram corroborados por meio de aplicações analíticas. Limitações quanto ao uso de bombas com maiores volumes de pulso ( $> 25 \mu\text{l}$ ) foram observadas a elevadas frequências de pulsação ( $> 4,0 \text{ Hz}$ ). Os volumes experimentalmente determinados concordaram com os valores esperados (erro relativo  $< 2,0 \%$ ). A dispersão da amostra foi menor relativamente àquela inerente a fluxo constante (sistema explorando multi-comutação, MC).

O fluxo pulsante promoveu melhoria no desenvolvimento reacional devido principalmente à agitação dos elementos de fluido vizinhos. Este aspecto foi importante com relação à determinação espectrofotométrica de bromexina em fármacos. O método se fundamentou no acoplamento eletrofílico da bromexina com 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH), e posterior oxidação com Ce(IV) em ambiente ácido. Boa sensibilidade analítica foi conseguida com baixo consumo de reagentes e rapidez nas análises ( $300 \text{ h}^{-1}$ ). O

sistema comparativo, envolvendo fluxo constante, não apresentou a mesma sensibilidade analítica.

Outra aplicação foi a determinação espectrofotométrica de fosfato em extratos de solos envolvendo a formação do azul de molibdênio. Melhores resultados analíticos foram obtidos para frequências de pulsação  $< 0,5$  Hz, devido ao maior tempo disponível para a interação entre as espécies químicas envolvidas. O sistema MP proposto requer menor volume de amostra ( $48 \mu\text{l}$ ) relativamente ao sistema MC ( $96 \mu\text{l}$ ), sendo caracterizado por maior frequência analítica (MP:  $144 \text{ h}^{-1}$ ; MC:  $67 \text{ h}^{-1}$ ). Os resultados referentes às análises de extratos de solos foram concordantes entre si e com relação ao método referência.

A visualização de uma amostra se dispersando no fluxo pulsante foi possível empregando-se a técnica de despolarização da fluorescência induzida por “laser” envolvendo Rodamina B. Os experimentos foram conduzidos sob alta ( $3,0$  Hz) ou baixa ( $0,5$  Hz) frequência de pulsação na inserção de amostra, ausência ou presença de reator entre o local de introdução de amostra e o detector, e sentido horizontal ou vertical da cela de fluxo. Análise dos gráficos obtidos permitiu se visualizar a re-distribuição de massas em função do tempo. Em geral, observou-se formação de vórtices no centro da zona de amostra e uma migração bastante intensa no sentido radial. No sentido axial, melhores interações amostra / fluxo transportador foram observadas quando a frequência de pulsação foi baixa e em presença de um reator de  $60$  cm. O estabelecimento de vórtices resultou em uma mistura bastante rápida e pontual, o que foi confirmado pelas aplicações analíticas.

Palavras-chave: análises em fluxo, mini-bombas, espectrofotometria, fluxo pulsante, fluorescência induzida por “laser”.

## ABSTRACT

DIAS, A.C.B. **Multi-pumping flow systems with spectrophotometric detection: application to analysis of pharmaceuticals and soil extracts.** 2006. 128 f. Thesis (Doctoral) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

Multi-pumping flow systems (MP) utilize solenoid pumps as fluid propelling devices, which deliver pulsed flows. This feature was evaluated in relation to the design, operation and performance of the system, to the mixing conditions, and to the dispersion of the introduced solution.

The general evaluation of the MP systems involved investigations about precision and accuracy of the pulse volumes, as well as the pump ruggedness. To this end, gravimetric measurements were carried out. Moreover, dispersion was evaluated by exploiting a colored solution and spectrophotometric monitoring. Results were corroborated through analytical applications. Use pumps delivering higher pulse volumes ( $> 25 \mu\text{l}$ ) was limited when the pulsation frequency was  $> 4.0 \text{ Hz}$ . The experimentally measured volumes were in agreement with to the expected values (relative error  $< 2.0 \%$ ). Sample dispersion was lower in relation to that inherent to laminar flow (multi-commuted flow system, MC).

Exploitation of pulsed flow led to a enhanced reaction development mainly due to shaking of neighboring fluid elements. This aspect was important in relation to spectrophotometric determination of bromhexine in pharmaceuticals. The method was based on electrophilic coupling of bromhexine with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH), with further oxidation by Ce(IV) under acidic medium. Analytical sensitivity was fair, reagent consumption was low and sampling rate was  $300 \text{ h}^{-1}$ . These figures of merit were not compared with those inherent to the MC system due to the lack of sensitivity of this system.

Another application was the spectrophotometric determination of phosphate in soil extracts relying the molybdenum blue formation. Best analytical results were obtained for < 0.5 Hz pulse frequency, due to the higher available time for interaction among the involved chemical species. The proposed MP system required lower sample volume (48  $\mu\text{l}$ ) in relation to the MC system (96  $\mu\text{l}$ ), being characterized by higher sampling rate (MP: 144  $\text{h}^{-1}$ ; MC: 67  $\text{h}^{-1}$ ). Analytical results related to soil extracts were in agreement between them and with the reference method.

Visualization of a dispersing sample in a pulsed flow became feasible using the laser induced fluorescence technique applied to Rhodamine B, RB. Experiments were performed under high (3.0 Hz) or low (0.5 Hz) pulse frequency, optional insertion of a reactor between the injection point and detection, and vertical or horizontal positioning of the flow-cell. Analyses of the graphs obtained allowed the visualization of the mass re-distribution in function of time. In general, vortex formation at the central portion of the sample zone and a high RB migration in the radial direction, were noted. Concerning axial direction, better sample / carrier stream interactions were observed for lower pulse frequency and insertion of the 60-cm reactor. Vortex establishment led to a punctual and fast mixing, as confirmed by the analytical applications.

Key-words: flow analysis, solenoid pumps, spectrophotometry, pulsed flow, laser induced fluorescence.

## 1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de análises em fluxo permitem a automação de análises químicas, os quais condicionam as soluções em tubos de diâmetros internos reduzidos e não compressíveis, em um ambiente fechado e caracterizado por seu regime de escoamento constante o qual proporciona as condições de mistura entre amostra e reagentes. O bombeamento das soluções é realizado através de unidades propulsoras que promovem uma vazão constante, descontínua ou pulsante. Através desta diferenciação em vazão, os sistemas podem se tornar mais flexíveis e versáteis.

O desenvolvimento destes sistemas teve início nos analisadores contínuos (Hartridge e Roughton, 1923) e nos autoanalisadores (Skeggs, 1957), os quais levaram à concepção dos sistemas “stopped flow” com fluxos pulsantes acelerados (Chance, 1951; Owens et al., 1980) e dos sistemas de análises por injeção em fluxo (Ruzicka e Hansen, 1975). A aplicabilidade destes últimos cresceu exponencialmente devido à sua simplicidade de operação, versatilidade em acomodar qualquer metodologia, eficiência no controle temporal, minimização da manipulação de reagentes e amostras, etc. Desta forma, estes sistemas tem sido considerados como uma das principais ferramentas para a química analítica. Muitas modalidades deste sistema foram desenvolvidas, e as principais se constituem no sistema explorando injeção seqüencial (Ruzicka e Marshall, 1990a), no sistema explorando multi-comutação (Reis et al., 1994), no sistema multi-seringas (Cerdeira et al., 1999) e no sistema multi-impulsão (Lapa et al., 2002). Estes analisadores uniram os fundamentos do sistema de análises por injeção em fluxo com as técnicas computadorizadas, resultando em uma automação analítica mais robusta e versátil.

Com a exploração da computação, foi possível associar a estes sistemas acessórios comutadores, os quais realizam amostragem, inserção das soluções no percurso analítico e



homogeneização das soluções com eficácia e robustez. Com relação à vazão, estes sistemas podem envolver vazão constante (multi-comutação), descontínua (análises por injeção sequencial) e pulsante (sistema multi-impulsão), dentre outras.

O fluxo pulsante, que resulta de uma parada do fluxo por um determinado tempo fixo entre cada pulso gerado, foi inicialmente utilizado para se avaliar constantes de velocidade de reação (Owens et al., 1980). Este fluxo caracterizado por pulsos se mostrou altamente benéfico por promover melhores condições de mistura, necessitando de mínimas quantidades de reagentes e amostra para uma sensibilidade analítica adequada. Diversas unidades propulsoras foram desenvolvidas para este fim, sendo manufaturadas a partir de bombas pistão e não comercialmente disponíveis (Korenaga et al., 1994; Carlsson et al., 1997).

Recentemente, uma bomba solenóide comercialmente disponível se mostrou bastante adequada para ser utilizada como unidade propulsora de fluidos em sistemas automatizados (Lapa et al., 2002). Estas bombas foram implementadas no sistema de análises em fluxo, o qual foi denominado de sistema multi-impulsão (do inglês “multi-pumping”). Este sistema foi explorado em diversas aplicações (Lima et al., 2004), e suas principais características como excelente gerenciador-comutador-homogeneizador foram salientadas. Entretanto, permanecem ainda muitas lacunas quanto às suas características fluídicas, tais como as condições de mistura, regime de fluxo, etc.

Desde os primeiros sistemas de análises em fluxo, a busca por um maior conhecimento de suas características fluídicas, e de como as soluções reagentes se comportavam e se misturavam dentro dos tubos resultou em diversas teorias e modelos matemáticos (Betteridge et al., 1984; Vanderslice et al., 1986). Estes modelos foram elucidados para uma visualização da dispersão da amostra no percurso analítico através de simulações matemáticas baseadas nas equações de convecção-difusão e coeficientes de dispersão, e diversos resultados demonstraram o comportamento de regime laminar do fluxo (Wada et al., 1986; Hull et al.,

1992). Na maioria destes modelos uma solução corante é inserida no fluxo transportador mimetizando a amostra e mostrando visualmente sua localização, dispersão e diluição através da absorção de radiação eletromagnética na região do visível. Neste sentido, o comportamento de novas unidades propulsoras implementadas nos sistemas de análises em fluxo pode ser avaliado em função de sua capacidade de homogeneização das soluções.

Desta forma, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de mistura do fluxo pulsante proveniente das bombas solenóides com ênfase em métodos espectrofotométricos. Para verificação de suas principais características operacionais e homogeneização das soluções, medidas gravimétricas e estratégias envolvendo a dispersão de uma solução corante simulando a amostra (Ruzicka e Hansen, 1988) foram exploradas. Os estudos envolvendo dispersão do corante também foram aplicados ao sistema de análises com fluxo constante para comparação.

Para a verificação do potencial destas bombas na condição de mistura envolvendo reações químicas, duas metodologias foram empregadas no sistema multi-impulsão: as determinações espectrofotométricas de bromexina em fármacos e de fosfato em extratos de solos. Ambas as reações foram também exploradas em um sistema de análises em fluxo explorando multi-comutação para comparação das condições de mistura variando-se apenas as unidades propulsoras de soluções. Ainda, a técnica de despolarização da fluorescência induzida por laser, PLF (do inglês “polarized laser fluorescence”) (Quintella et al., 2004) foi empregada para a visualização do fluxo pulsante e para uma maior compreensão do seu comportamento fluídico, o qual poderá explicar muitas observações realizadas neste trabalho.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

Esta revisão abrange a evolução dos sistemas de análises em fluxo desde suas concepções mais remotas, como os analisadores contínuos para estudos cinéticos, até os sistemas atuais. As interpretações dos trabalhos são explanadas em função da condição fluídica proporcionada por cada sistema, principalmente no que se refere à unidade propulsora de fluidos e à sua influência no desenvolvimento reacional. Os diversos tipos de fluxo proporcionados por estas unidades também são enfatizados, bem como os analisadores que os exploram. Uma revisão mais detalhada sobre o fluxo pulsante e suas aplicações é também apresentada. Finalmente é acrescentada uma revisão das aplicações analíticas selecionadas para este trabalho de Tese: as determinações espectrofotométricas de bromexina em fármacos e de fosfato em extratos de solos.

### **2.1. Analisadores em fluxo**

A automação da análise química, desde a etapa de preparo de amostra, gerenciamento de soluções reagentes, até o monitoramento do sinal analítico, é realizada eficientemente pelos sistemas de análises em fluxo. A busca por um controle maior das análises químicas remonta às primeiras décadas do século XX quando Hartridge e Roughton (1923) buscaram uma condição mais adequada para medir a velocidade de reações químicas que alcançavam o equilíbrio em uma faixa de tempo muito pequena (0,3 a 2,0 s).

O experimento envolveu um estudo para a verificação das condições de mistura de uma reação de neutralização ácido-base ( $\text{HCl} + \text{NaOH}$ ) na presença de fenolftaleína. Uma eficiente mistura entre as soluções foi avaliada de forma que o tempo necessário para ocorrer a mistura deveria ser tão pequeno a ponto de não se perderem as informações referentes ao desenvolvimento inicial da reação. Desta forma, os autores propuseram câmaras de mistura

baseadas no princípio da criação de vórtices em solução, conseguidos por vazões muito altas em espaços muito restritos. Para isto, conectores em forma de “Y” e câmaras cilíndricas com duas entradas foram desenvolvidos, sendo esta última a que apresentou melhores resultados. As melhores condições de mistura foram observadas quando unidades propulsoras de ar comprimido forçavam as soluções, que estavam contidas em garrafas, para dentro da câmara de mistura e logo a seguir, a mistura era inserida em um tubo de observação. Neste tubo, a reação de neutralização era monitorada visualmente, através da diminuição da coloração rosa (fenolftaleína + NaOH) na presença de HCl. O monitoramento era realizado através de medidas de tempo e distância, possibilitando o cálculo da vazão e da velocidade de reação. Esta estratégia possibilitou o monitoramento contínuo da reação, o qual abriu um leque de possibilidades para estudos de cinética reacional.

Com a descoberta de novas reações químicas e bioquímicas durante a década de 30, surgiu a necessidade do conhecimento mais aprofundado destas reações, e aspectos voltados à velocidade reacional, à visualização de formação de sub-produtos ou intermediários, e às condições favoráveis para seu desenvolvimento se tornaram bastante importantes. Todos estes aspectos desconhecidos resultaram em um crescente desenvolvimento em monitoramento da velocidade de reação através da automação da manipulação de soluções reagentes e da amostra, baseados na câmara de mistura de Hartridge e Roughton (1923). Neste sentido, novos sistemas explorando fluxo constante foram desenvolvidos utilizando seringas como unidades de propulsão de soluções. Estas seringas eram ligadas a um motor de passo que realizava o bombeamento das soluções até um ponto de confluência onde ocorria a mistura, que seguia depois até o espectrofotômetro para aquisição do sinal analítico (Chance, 1940). Como aplicação, reações enzimáticas (peroxidase + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e de oxidação (sulfato de cerio(IV) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram monitoradas através da adição de corantes como verde de malaquita, resultando em constantes de velocidade menores que de  $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Chance, 1940;

Chance, 1942). Melhorias no detector espectrofotométrico foram realizadas já que era necessária a obtenção de sinais com alta resolução em um tempo muito menor que 0,3 s. Com isto, equipamentos envolvendo a parada do fluxo (do inglês, “stopped flow”) foram projetados para o monitoramento de reações muito rápidas (Chance, 1951). Estes equipamentos realizavam a mistura das soluções através de jatos em câmaras de mistura (Hartridge e Roughton, 1923), e o desenvolvimento reacional era monitorado durante a parada do fluxo dentro da cela de fluxo do espectrofotômetro. Com a crescente aplicação desta estratégia, um aprimoramento dos aparelhos e circuitos eletrônicos para aquisição de sinais analíticos, dos acessórios para introdução de amostra e reagentes e para mistura reacional foi sendo observado no decorrer dos anos até os dias atuais (Beckwith e Crouch, 1972; Crouch, et al., 1977; White, et al., 1995; Chance, 2004).

Os sistemas de análises em fluxo explorando “stopped flow” foram inicialmente elaborados para se obter um maior conhecimento das novas reações químicas e bioquímicas que estavam surgindo, principalmente através de estudos de constantes de velocidade e de formação de produtos intermediários. Entretanto, muitos problemas envolvendo a troca de amostra, contaminação entre amostras, consumo elevado de reagentes foram relatados, e novos avanços para um controle maior destas condições foram requeridos. Isto se refletiu diretamente na crescente utilização dos analisadores em fluxo como gerenciadores de análises químicas antes realizadas por procedimentos manuais.

Em laboratórios de análises clínica onde um maior controle das análises químicas se faz importante, a exploração do escoamento contínuo de soluções em tubos não-compressíveis surgiu em meados de 1949 quando Skeggs introduziu pela primeira vez um sistema contínuo para o processo de diálise (Skeggs, 2000). Desde então, vários trabalhos foram propostos como tentativas para melhorar a automação analítica, resultando no início da minimização da intervenção e manipulação das amostras e reagentes, diminuição dos erros

analíticos relativamente aos ensaios manuais e maior rapidez nas análises. Em uma destas tentativas foram inseridas bolhas de ar no fluxo para a separação das amostras, as quais eram transportadas para uma membrana de diálise onde ocorria a permeação de uréia; após a separação do analito, o fluxo acceptor o transportava para a mescla com os reagentes específicos e depois para o detector espectrofotométrico (Skeggs, 1957). Este sistema utilizava uma bomba peristáltica de vários canais para bombeamento das soluções e permitiu a determinação de 40 amostras por hora, com resultados confiáveis, boa repetibilidade, e se consagrou como o Autoanalisador comercializado pela Technicon (Skeggs, 2000). Com uma base tecnológica envolvida, foi possível desenvolver autoanalisadores para determinações sequenciais de albumina, proteína total, cloreto, dióxido de carbono, sódio, potássio, glicose e nitrogênio para quantificar uréia, através da implementação dos respectivos métodos em único módulos de análises (Skeggs e Hochstrasser, 1964). Estas substâncias eram monitoradas sequencialmente através de 8 celas de fluxo com um intervalo de 20 s entre cada determinação. Amostras de soro sanguíneo foram analisadas a uma frequência analítica de 20 amostras por hora.

Comercialmente disponíveis, os autoanalisadores foram adquiridos em diversos laboratórios de análises clínicas, sofrendo muitas avaliações, como demonstrado por Grady e Lamar (1959) que avaliaram a melhor temperatura para diálise da glicose e compararam com o método manual de Somogyi-Nelson. Variações no sistema de detecção também foram relatadas, como a inserção de um detector fluorimétrico para determinação de cálcio em soro sanguíneo (Hill, 1965).

Deve-se destacar que, desde a proposta inicial de Skeggs em 1949, os sistemas fabricados pela Technicon possuíam as características inerentes as do fluxo segmentado, onde um fluxo de ar era inserido no percurso analítico por confluência. Desta forma, havia a necessidade de componentes como desborbulhador para evitar problemas na detecção e sua

condição de mistura se baseava em pouca dispersão da zona de amostra, já que esta era controlada pelas bolhas de ar, pela vazão do fluxo transportador e pela geometria do percurso analítico.

Mesmo com as benéficas características do fluxo segmentado de Skeggs, os trabalhos envolvendo estudos de cinética reacional não poderiam explorar a inserção de bolhas de ar entre as amostras, devido à continuidade do monitoramento. Blaedel e Hicks (1962) propuseram um sistema de análises contínuo que compreendia uma bomba peristáltica que inseria a amostra a uma vazão constante em um ponto de mistura onde encontrava o reagente que era introduzido continuamente por gravidade. Ambas as soluções fluíam a  $2,0 \text{ ml min}^{-1}$ , e a mistura era conduzida pela bomba peristáltica até a cela do espectrofotômetro onde era monitorado o sinal analítico referente à glicose. Este analito foi quantificado através da reação com glicose oxidase e oxigênio do ar que resultava na formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o qual na presença de peroxidase oxidava *o*-tolidina a um produto de coloração azul derivado da benzidina. Como a vazão era mantida constante, o intervalo de tempo necessário para a amostra ir do ponto de confluência entre reagente e amostra até a cela do espectrofotômetro também era fixo; foi então possível medir a velocidade reacional através da diferença em absorbância. A vazão constante descrita pelos autores, era caracterizada apenas pelo fato de não ocorrer segmentos de fluxo, pois a amostra e o reagente eram bombeados em volume “infinito” (Krug et al., 1981). Entretanto, a implementação de um acessório descrito como “pulser” proporcionava oscilações periódicas, estabelecendo um fluxo reverso. Foi observado que na ausência deste “pulser” um fluxo laminar era estabelecido, prejudicando a mistura entre reagente e amostra e diminuindo a velocidade da troca de amostra, resultando em um sistema com baixa frequência analítica. O “pulser” foi manufaturado com uma barra magnética a 300 rpm dentro de um disco de Nylon<sup>®</sup>, e sua variação em amplitude foi avaliada permitindo a visualização de melhores condições de mistura. Desta forma, foi possível determinar glicose

em solução aquosa até  $60,0 \text{ mg l}^{-1}$ , com uma frequência analítica de 15 amostras por hora. A aplicabilidade desta estratégia foi também demonstrada em relação à determinação amperométrica de glicose em sangue (Blaedel e Olson, 1964), utilizando as mesmas condições fluídicas, obtendo uma frequência analítica de 20 amostras por hora e resposta linear até  $100 \text{ mg l}^{-1}$  glicose.

Aproveitando as características benéficas do analisador como a versatilidade na seleção do tempo reacional para um adequado monitoramento, dependente da vazão das soluções reagentes e amostra e do comprimento do percurso, Hanna e Siggia desenvolveram em 1964 um sistema de análises em fluxo para estudos de cinética reacional. O sistema compreendia duas buretas onde eram inseridas as soluções reagentes e amostra para um ponto de mistura acoplado a uma outra bureta (percurso analítico) onde ocorria o monitoramento da reação. As duas buretas com as soluções eram mantidas na posição vertical e a de monitoramento na horizontal. Na saída desta última, uma bomba a vácuo era acoplada para promover o escoamento das soluções por diferença de pressão. A reação química empregada neste sistema envolvia a liberação de iodo através de uma mistura de tiosulfato de sódio e iodeto em meio ácido, a qual era acelerada em presença de dicromato ou de bromato. O desenvolvimento da reação foi monitorado através da distância relativamente ao aparecimento da coloração de iodo, e como a vazão foi mantida constante, a quantificação de cada analito pôde ser verificada de uma forma bastante simples.

Com a procura por melhores condições para minimizar a manipulação dos reagentes pelo analista, pela rapidez das análises, pela diminuição da contaminação das amostras e principalmente pela possibilidade de transformação dos processos manuais em processos automatizados, Ruzicka e Hansen em 1975, propuseram os sistemas de análises por injeção em fluxo. Neste sistema, uma alíquota da amostra era inserida no fluxo transportador através de uma seringa, os reagentes eram inseridos continuamente a uma vazão constante provida



por bomba peristáltica em pontos de confluência (pontos em “T”) onde se mesclavam de forma eficiente. A zona de amostra formada após a confluência era então bombeada até o detector, o que permitia a aquisição de um sinal analítico transiente. Este sistema conferiu uma diminuição no consumo das soluções de amostra, ausência de contaminação entre amostras, melhor mistura reacional, maior versatilidade, sendo exemplificado com a determinação espectrofotométrica de fosfato e potenciométrica de amônio. Ambos os sistemas apresentaram rapidez nas análises ( $200\text{-}250\text{ h}^{-1}$  para fosfato e  $60\text{ h}^{-1}$  para amônio), boa repetibilidade, adequada linearidade seguindo tanto a lei de Beer para espectrofotometria quanto a lei de Nernst para potenciometria. Com estes resultados comprovou-se a simplicidade, robustez, e ampla aplicabilidade destes sistemas em análises químicas, as quais podem ser conduzidas em um ambiente bastante controlado, com melhor repetibilidade na amostragem, menor compressibilidade do fluxo, maior frequência analítica, etc. A maioria destas características resulta principalmente do estabelecimento do fluxo constante com ausência de segmentação da amostra por meio de bolhas de ar.

Desde sua concepção, os sistemas de análises por injeção em fluxo proporcionaram simplicidade na automação de análises químicas morosas e complexas, e tem sido cada vez mais utilizados, somando um total de 14500 publicações (McKelvie, 2005). Dentre tantas características, a versatilidade aliada à simplicidade, resultante da beleza em se adaptar qualquer estratégia analítica no módulo de análises tem sido a mais relevante. Neste sentido, pode-se destacar a concentração/separação por extração em fase sólida (do inglês “solid-phase extraction”) (Ruzicka e Hansen, 1980), extração líquido-líquido (Karlberg e Thelander, 1978; Bergamin, et al., 1978a), separação por difusão gasosa (Baadenhuijsen e Seuren-Jacobs, 1979), titulação (Ruzicka e Hansen, 1977), digestão em linha (Burguera, et al., 1986), etc.

Com o objetivo de permitir um maior tempo de contato entre amostra e reagentes sem a dispersão da zona de amostra no decorrer do percurso analítico, Pasquini e Oliveira (1985)

aliaram o conceito de segmentação do fluxo ao sistema de análises por injeção em fluxo. A inserção de bolhas de ar para segmentar a amostra e conferir um maior tempo de residência foi demonstrada como melhoria em sensibilidade de reações com cinética relativamente lenta. A amostra era inserida entre duas bolhas, as quais eram retiradas do percurso analítico antes de alcançar o detector. Comparações com o sistema de análises por injeção em fluxo e o segmentado de Skeggs foram relatadas considerando as determinações espectrofotométricas de fosfato, Cr(VI) e amônio.

Com o aparecimento de novos desafios analíticos, com a inserção de microcomputadores nos laboratórios de análises, e em função das novas tendências em análises químicas, o sistema de análises em fluxo foi sendo moldado de acordo com essas perspectivas. Neste sentido, a busca por sistemas de análises em fluxo mais dinâmicos, sem a necessidade do bombeamento contínuo das soluções levou à concepção do sistema de análises por injeção sequencial (Ruzicka e Marshall, 1990). Este sistema proporcionou um controle da reação através de uma válvula seletora multi-portas, a qual possuía vias seletoras independentes que eram acionadas por um computador. Sua condição de mistura era baseada no fluxo reverso da bomba peristáltica ou pistão, e pequenos volumes de amostra e reagentes poderiam ser selecionados através do tempo de aspiração e vazão. As alíquotas das soluções eram então aspiradas para uma bobina de retenção e depois de formada a respectiva zona de amostra, o sentido da unidade propulsora era invertido dirigindo a mistura para a bobina de reação e sistema de detecção. O fluxo reverso resultou em características favoráveis tais como alta diluição da amostra quando necessário, alta precisão volumétrica, controle da dispersão da zona de amostra, minimização na geração de resíduos, facilidade em operação de todas as etapas a partir de um único programa computacional (Ivaska e Ruzicka, 1993), etc.

A viabilidade deste sistema foi confirmada em muitas aplicações, principalmente aqueles envolvendo a exploração de muitas etapas analíticas em um único módulo de análises

(Barnett et al., 1999; van Staden, 2002) e de sua miniaturização como Lab-on-valve (Ruzicka, 2000). Este também se tornou facilitador para determinações multi-paramétricas (Dias, et al., 2004) e para exploração de estratégias “stopped-flow” (Ruzicka e Hansen, 1980) e “flow-batch” (Carneiro et al., 2002a).

A simplicidade em automação das análises químicas com a chegada dos microcomputadores ao laboratório de análises proporcionou o desenvolvimento de sistemas bastante flexíveis como àqueles envolvendo multi-comutação (Reis et al., 1994). Este sistema compreendia diversas válvulas solenóide de três vias que eram empregadas para o direcionamento das soluções. As soluções de amostra e reagentes eram propulsionadas por uma bomba peristáltica em direção às válvulas, as quais direcionavam uma alíquota da solução reagente ou amostra para o percurso analítico a partir do tempo de abertura da válvula e da vazão de bombeamento da solução. Após a inserção da zona de amostra, a mistura era encaminhada ao sistema de detecção. A condição de mistura neste sistema se mostrou dependente dos parâmetros físicos do sistema, bem como das estratégias de inserção de amostra/reagentes. Sua aplicabilidade tem sido cada vez mais relatada, devido principalmente à flexibilidade em se adaptar a qualquer procedimento analítico (Rocha et al., 2002; Tumang et al., 2004; Reis, et al., 2004).

O conceito de multi-comutação tem sido explorado nas mais diversas aplicações (Icardo et al., 2002), e sua condição de inserção de alíquotas definidas de amostra e reagentes resultaram em estratégias como amostragem binária (Reis et al., 1994) e na capacidade de gerenciar qualquer estratégia de amostragem já previamente estabelecida, como zonas coalescentes (do inglês “merging zones”) (Bergamin et al., 1978b), diluição em linha (Luca e Reis, 2004), divisão da amostra (do inglês “splitting”) (Oliveira et al., 1996), aprisionamento da amostra (Krug, et al., 1983), parada de fluxo (do inglês “stopped-flow”) (Fernandes, 2002), etc. Deve-se salientar que o conceito de comutação associado à utilização de válvulas

solenóide se refere apenas à sua capacidade de inserção de alíquotas de amostra e reagentes como comutadores de soluções. Esta denominação também pode ser dada à válvula seletora do sistema de análises por injeção seqüencial e ao injetor comutador para o sistema de análises em fluxo (Bergamin, et al., 1978b), os quais empregam a mesma função de um modo caracteristicamente peculiar.

Além disto, outros tipos de unidades propulsoras também foram exploradas para promover fluxo constante, como as seringas, que foram implementadas em um analisador resultando no sistema multi-seringas (do inglês “multisyringe system”) (Cerdeira et al., 1999; Albertus et al., 1999). Nestes sistemas, as seringas eram exploradas individualmente para cada solução de interesse, as quais eram inseridas no percurso analítico através do tempo de bombeamento e volume da seringa. Além disto, para o direcionamento das alíquotas de amostra e reagentes e para o preenchimento da seringa após seu esvaziamento, válvulas solenóide eram empregadas na saída de todas as seringas.

Neste sentido, todas as vertentes que surgiram após o consagrado sistema de análises por injeção em fluxo (Ruzicka e Hansen, 1975) foram concebidas de um mesmo conceito e para um mesmo objetivo: o condicionamento de reações químicas em tubos não-compressíveis de diâmetro reduzido, o qual transpõe o desenvolvimento reacional para elementos de fluido caracterizados pelo regime de escoamento, vazão e zona fluídica formada. Na maioria dos analisadores, a dispersão tem sido considerada a responsável pela mistura eficiente entre amostra e reagentes, a qual pode ser explorada variando-se a geometria e a temporização do sistema.

A evolução dos analisadores em fluxo caminha para a miniaturização objetivando sistemas portáteis, simples, de baixo custo, mínima manutenção, e que ainda possuam todas as características benéficas já relatadas. Sistemas intitulados como Lab-on-chip, Lab-on-valve, Lab-at-valve, que realizam todas as tarefas analíticas em pequenos suportes ou em

chips são exemplos do novo conceito em micro-fluídica (Ruzicka e Hansen, 2000; Grudpan, 2004). Embora os novos sistemas de análises em fluxo estejam voltados à miniaturização, o comportamento das soluções como fluido e sua propulsão são regidos pelos conceitos fundamentais estabelecidos pelos primeiros analisadores em fluxo. Entretanto, como os canais são extremamente reduzidos, embora ainda estabelecidos como fluxo laminar, as condições de mistura tiveram que ser melhoradas através de geometrias que forçassem uma mistura mais rápida (Liu et al., 2004) ou ainda de novas unidades propulsoras de fluidos (Chapin e Wanty, 2005). Desta forma, como em qualquer analisador, não importando suas dimensões, a procura por melhoria das condições de mistura ainda permanece, e depende diretamente do tipo de escoamento de fluido proporcionado pela unidade propulsora de soluções. Ainda, desde a concepção das análises contínuas, a unidade propulsora tem sido o coração do sistema, determinando também a “personalidade” do sistema.

Neste sentido, diferentes condições fluídicas relativamente ao fluxo constante foram também exploradas nos sistemas de análises em fluxo, como as bombas solenóide que promovem fluxo pulsante (Rodenas-Torralba et al., 2005). Este fluxo se caracterizou pelo bombeamento de pulsos com volume definido de solução e, a cada pulso propellido, uma parada no fluxo era observada. Esta condição de bombear e parar o fluxo por um determinado tempo a certa velocidade denominou-se de frequência de pulsação que é proporcional à vazão. O analisador explorando estas bombas foi denominado de sistema multi-impulsão (do inglês, “multi-pumping”) (Lapa et al., 2002), cujo módulo de análises empregava diversas bombas para a propulsão individual de soluções. Este sistema se mostrou bastante eficaz em suas características fluídicas, promovendo adequada homogeneização, boa repetibilidade na inserção dos pulsos, e uma boa opção para o desenvolvimento das mais diversas aplicações, o qual será discutido mais detalhadamente no item a seguir.

### 2.1.1. Sistemas de análises explorando fluxo pulsante

Desde os primeiros trabalhos para estudos de cinética reacional explorados por Hartridge e Raughton (1923) e seguidos por Chance (1951) já havia a necessidade de unidades propulsoras que proporcionassem uma rápida mistura dos fluidos e que não envolvessem fluxo constante. A vazão constante utilizada nestes estudos se tornou uma desvantagem devido à alta geração de resíduos, baixa frequência analítica e ineficiente mistura em curto tempo, o que prejudicava os estudos de reações muito rápidas. Desta forma, Owens et al. (1980) desenvolveram um sistema com unidades propulsoras que bombeavam pulsos de soluções a uma velocidade constante. O fluxo pulsante era resultado da ação de seringas ligadas a um motor que controlava o número e volume de pulsos e a vazão; produzindo um fluxo turbulento o qual era medido a cada pulso gerado. Este tipo de fluxo produziu uma melhor condição de mistura para as reações avaliadas, e as constantes de reação foram determinadas para a reação de transferência de elétrons entre  $[\text{IrCl}_6]^{2-}$  e  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ; entre  $\text{Ce}^{4+}$  e  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ; e entre os complexos  $\text{Cu}(2,9\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})$  e  $\text{Cu(III)-peptídeos}$ . Estas reações foram monitoradas espectrofotometricamente através de variações na vazão dos pulsos resultando em baixo consumo de reagentes e valores de constantes de reação na faixa de  $300 - 5000 \text{ s}^{-1}$ . Este sistema foi denominado como PAF (do inglês “pulsed accelerated flow”) e sua alta eficiência na mistura e rapidez foram relatadas em diversas aplicações para determinação de constantes de velocidade da reação (Jacobs et al., 1984; Nemeth et al. 1987; Bowers et al., 1997).

Com base nos eficientes resultados obtidos por Korenaga et al. (1994) que desenvolveram uma unidade propulsora de fluidos que inseria pulsos de soluções com volume fixo, Carlsson et al. (1997) propuseram uma outra unidade que também gerava fluxo pulsante. Esta consistia de uma bomba pistão inserida em um cilindro que possuía dois orifícios, um para entrada de solução e outra para saída. Quando o pistão era acionado, uma alíquota com

um volume fixo era aspirada e depois que o pistão retornava a sua posição original, esta alíquota que estava mantida dentro do cilindro era propelida. Desta forma, a cada tomada de pulso, uma parada no fluxo era observada, caracterizando um fluxo pulsante. Para cada solução era utilizada uma bomba que gerava pulsos com volume na faixa de 3 - 4  $\mu\text{l}$ . Desta forma, um sistema miniaturizado foi desenvolvido, com volume total de 10 - 30  $\mu\text{l}$ , e estratégias de mistura e de amostragem, precisão volumétrica das bombas e estudos de dispersão e viscosidade foram salientados. As potencialidades destas unidades propulsoras de dispensar os fluidos em pulsos de pequenos volumes foram demonstradas em diversas aplicações; explorando a extração líquido-líquido para a minimização de resíduos orgânicos (Carlsson e Karlberg, 2000a, 2000b) e a titulação ácido-base para um maior controle em precisão volumétrica (Carlsson e Karlberg, 2001).

As condições de mistura nestes sistemas foram salientadas com relação à mescla eficiente entre os pulsos de volumes muito pequenos, considerando a dispersão da zona de amostra na parada do fluxo entre os pulsos. Neste sentido, o fluxo pulsante pôde ser explorado em duas condições, a de bombeamento dos pulsos e da parada de fluxo entre cada pulso gerado. Estudos da influência do fluxo pulsante na dispersão da zona de amostra foram verificados por van Akker et al. (1999) baseados nos efeitos de difusão e convecção em um micro sistema empregando uma unidade propulsora manufaturada com uma membrana. O fluxo pulsante era resultante da ação de preenchimento e esvaziamento desta membrana provocado por uma diferença de pressão. Como resultados comparativos, o experimento demonstrou que para o fluxo pulsante obter as mesmas condições em dispersão do sistema com fluxo constante, a vazão deveria estar associada a uma frequência entre 1,0 e 3,0 Hz. Deve-se salientar que o sistema proposto possuía dimensões muito pequenas (percurso analítico = 3,0 cm), com volume interno da cela = 1  $\mu\text{l}$ , e volume de amostra = 67 nl.

Com o crescente vislumbre das características do sistema com fluxo pulsante, novas

concepções em unidades propulsoras foram desenvolvidas. Wang et al. (1998) propôs um sistema que compreendia a inserção de pulsos por diferenças de pressão induzida em membranas, as quais estavam acopladas em pequenos orifícios por onde a solução passava. Os orifícios também eram variáveis, resultando em volumes de pulsos variados; com áreas bem pequenas era possível obter instantaneamente altas velocidades na saída do orifício, aumentando o número de Reynolds e gerando um fluxo turbulento. Devido a um movimento caótico deste tipo de fluxo, uma melhor condição de mistura era observada; como aplicação, a determinação potenciométrica de cálcio em águas naturais foi explorada. As bombas dispensavam alíquotas de 50 µl por pulso, a uma frequência de pulsação de no máximo 2,0 Hz, o que resultava em uma vazão de até 6,0 ml min<sup>-1</sup>. Resultados demonstraram que o fluxo pulsante produziu baixa dispersão axial, fluxo pulsante e turbulento, localização definida da zona de amostra devido ao total controle da inserção dos pulsos de amostra e reagentes e de seu transporte até o detector. Sua versatilidade foi avaliada através da exploração de estratégias de injeção em fluxo, fluxo contínuo e titulação em fluxo no mesmo módulo de análises, com variações apenas na programação computacional.

Metodologias com detecção quimioluminescente em geral requerem condições de mistura eficiente e que sejam suficientemente rápidas. Desta forma, Lewis et al. (2000) utilizaram as unidades propulsoras de fluxo pulsante propostas por Wang et al. (1998) para a exploração das melhores condições para a determinação quimioluminescente de morfina. O sistema empregava a reação de redução do permanganato de potássio pela morfina na presença de poli-fosfatos em meio ácido. A simplicidade do sistema aliada à sua característica pulsante com fluxo turbulento resultou em baixo consumo de reagentes (500 µl), boa sensibilidade analítica que foi conseguida através do monitoramento do pico máximo de emissão permitido por um eficiente controle da zona de amostra no percurso analítico. Baseado no sistema anterior, Lewis et al. (2002) desenvolveram um analisador com fluxo



pulsante para o monitoramento de uréia durante a hemodiálise. A oxidação da uréia com hipobromito era condicionada no sistema de modo que a mistura era realizada instantaneamente pela inserção de um pulso de amostra e um de reagente dentro do detector quimiluminescente. Com isto, uma boa sensibilidade era conseguida através da rápida mistura proporcionada pelo fluxo turbulento.

Desde a concepção das primeiras unidades compactas para geração de fluxos pulsantes propostas por Korenaga et al. (1994) e Wang et al. (1998), poucas aplicações quanto à automação de análises químicas com fluxo pulsante tem sido observada. Uma recente revisão sobre fluxo pulsante demonstrou todas as suas características favoráveis relativas a estas unidades propulsoras (Francis et al., 2002). Entretanto, a não comercialização destas unidades resultou em uma baixa aplicabilidade, e com a busca por bombas mais robustas associada ao avanço da tecnologia, novas unidades propulsoras de fluxo pulsante foram fabricadas. Deve-se aqui mencionar a bomba desenvolvida pela Bio-Chem Valve Inc. que foi primeiramente implementada em um analisador em fluxo por Lapa et al. (2002), o qual recebeu o nome de “multi-pumping flow system” (MP). A denominação “multi” se refere à inserção de mais de uma unidade propulsora no módulo de análises, e não requer a utilização de válvulas para a inserção de amostra e comutação do fluxo. As unidades desenvolvidas por Weeks e Johnson (1996) e Korenaga et al. (1994) que possuíam objetivos de unificar várias ações como a inserção de pulsos, comutação, e homogeneização em um único equipamento, sem a presença de válvulas podem ser agora exemplificadas pelas bombas solenóide que além de todas essas características pode produzir um fluxo caótico e provavelmente turbulento.

Estas bombas possuem em seu interior um solenóide que, quando acionado, aspira um volume fixo da solução de interesse, e depois de desligado o solenóide volta à sua posição original dispensando o volume que foi aspirado. Este volume é fixo para cada bomba e corresponde ao volume por pulso. Bombas solenóide de 8, 25, 50 e até de 250  $\mu\text{l}$  estão

comercialmente disponíveis, mas preferencialmente ao sistema de análises em fluxo apenas as três primeiras têm sido utilizadas. Estas são operadas individualmente, permitindo a realização de diferentes estratégias de amostragem sem a necessidade de mudanças no módulo de análises, sendo seu acionamento controlado por computador. Os diversos perfis do sinal analítico, bem como as influências dos diversos parâmetros e algumas considerações e elucidações acerca de sua condição de mistura foi relatada (Lapa et al., 2002). Para a visualização reacional, a determinação espectrofotométrica de Cr(VI) foi implementada, resultando em maiores sinais analíticos que os obtidos pelo sistema de análises por injeção em fluxo, devido à sua rápida e eficiente mistura provocada pelo fluxo caótico, possibilitando a determinação de 80 amostras por hora.

A facilidade em mesclar as soluções e obter rapidamente boas condições de mistura através do fluxo pulsante levou ao desenvolvimento de analisadores bastante simples, empregados nas determinações espectrofotométricas de ácido fítico em extratos de plantas (Carneiro et al., 2002b) e de dipirona em fármacos (Lima et al., 2003). Nestes sistemas, apenas três e duas bombas eram utilizadas respectivamente, proporcionando adequadas figuras de mérito, baixa dispersão, baixo consumo de reagentes e elevada frequência analítica.

No sistema MP, a vazão é proporcional à frequência de pulsação que corresponde ao número de pulsos por segundo (Hz), que é o inverso do período (tempo de parada do fluxo entre cada pulso gerado em segundos). Neste sentido, a característica fluídica destas bombas pode ser considerada como a soma da ação pulsante durante o bombeamento das soluções e da parada do fluxo entre cada pulso gerado. A exemplificação destas características foi relatada por Lima et al. (2004) através da influência de diversos parâmetros na dispersão da amostra. Neste contexto, uma solução corante mimetizava a amostra e a exploração de diferentes estratégias de amostragem, do comprimento do reator e da frequência de pulsação foram avaliadas em comparação com o tradicional sistema de análises por injeção em fluxo.

Melhorias nas condições de mistura devido a este fluxo foram demonstradas em função de menor dispersão, estreitamento da largura do pico, menor sobreposição de picos, etc. Entretanto, explicações mais aprofundadas sobre tipo de escoamento de fluxo não foi apresentada, mas uma perspectiva de novas aplicações foi apontada.

A automação de análises químicas usualmente realizadas em batelada tem se mostrado bastante eficaz quando empregadas no sistema MP, devido à simplicidade que as bombas podem proporcionar no módulo de análises e aos melhores resultados analíticos obtidos, principalmente com relação à detecção espectrofotométrica. Neste contexto, Lavorante et al. (2005) automatizaram a quantificação de surfactantes aniônicos em águas, e os resultados foram comparados com o método manual mostrando elevada superioridade em limite de detecção, frequência analítica, consumo de reagentes e minimização dos erros. Melhorias também foram relatadas na implementação de um procedimento padrão para determinação espectrofotométrica de fenol no sistema multi-impulsão (Rodenas-Torralba et al., 2005). Este sistema apresentou muitas vantagens com relação àquele procedimento manual, redução no consumo de reagente e amostra e conseqüentemente na geração de resíduos, levando a um procedimento mais “limpo”. Esta condição se torna um dos principais atrativos neste sistema, já que sua excelente condição de mistura proporciona a redução dos reagentes envolvidos, como demonstrado por Rocha et al. (2005a) para a derterminação de ciclamato em adoçantes.

Uma outra reação espectrofotométrica implementada no sistema explorando multi-impulsão foi a determinação de ambroxol em fármacos (Santos et al., 2005). O objetivo desta automação consistia em explorar as principais potencialidades das bombas solenóide em função da facilidade operacional, alta frequência analítica e diminuição do consumo de reagentes com relação ao método manual oficial. Com um sistema de apenas três bombas foi possível gerenciar as soluções reagentes para uma excelente homogeneização através de inserção seqüencial de amostra e reagente produzindo múltiplas interfaces que se misturaram

instantaneamente devido às eficientes condições de mistura promovidas pelo fluxo pulsante.

A partir de uma maior divulgação, a aceitação destas bombas solenóide como unidades propulsoras de fluxo pulsante têm crescido e estratégias mais complexas foram sendo estabelecidas, como o acoplamento de um sistema “flow-batch” para tratamento individualizado de amostra. Este sistema desenvolvido por Carneiro et al. (2005) compreendia sete bombas no módulo de análises e uma câmara para dissolução e diluição de cápsulas contendo melaço de cana-de-açúcar. Com a boa flexibilidade do sistema MP foi possível realizar funções de aspiração, propulsão e comutação das etapas de preparo de amostra, desenvolvimento reacional e transporte ao detector. Neste sentido, a determinação espectrofotométrica seqüencial de glicose e frutose foram realizadas, obtendo resultados satisfatórios com boa repetibilidade (d.p.r. < 1,5 %), diluição e dissolução eficientes.

A versatilidade destas bombas foi também explorada no sistema de análises por injeção seqüencial, que possui uma válvula seletora para comutação das soluções e fluxo com vazão senoidal (reversa). A inovação demonstrada por Pinto et al. (2005) utilizou duas bombas de 8 µl por pulso, sendo uma para aspiração dos reagentes para a bobina de retenção e outra para o bombeamento, realizando então o fluxo reverso característico deste sistema. A seqüência de aspiração amostra-reagente podia ser variada tanto por número de pulsos da bomba e por tempo de abertura da válvula seletora com a bomba acionada. Considerando que o fluxo pulsante foi inovador neste sistema, foi necessário avaliar alguns parâmetros referentes à interpenetração das zonas, como dispersão mútua, seqüência de aspiração e volume de amostra e reagente; sendo avaliados através da inserção de uma solução corante como amostra. O fluxo pulsante das bombas solenóide se mostrou mais eficiente na mistura na vazão reversa do que o fluxo laminar propelido pela bomba peristáltica, resultando em um aumento significativo na homogeneização da zona de amostra. A determinação fluorimétrica do fármaco indometacin foi empregada no sistema e as melhores condições para seu

desenvolvimento foram descritas.

Como a principal característica do fluxo pulsante produzido pelas bombas solenóide se constituiu na rapidez na mistura, devido provavelmente a seu fluxo tendendo a turbulento ou à geração do movimento caótico dos fluidos, a detecção quimiluminescente se tornou bastante atrativa. A avaliação desta técnica de detecção no sistema multi-pumping foi desenvolvida por Meneses et al. (2005) para monitorar a capacidade antioxidante total de compostos como Trolox, ácido ascórbico e resveratrol, que são usualmente empregados como antioxidantes. Dois reagentes quimiluminescentes foram avaliados no experimento, luminol e lucigenin, os quais apresentaram diferenças na cinética de reação com peróxido de hidrogênio, resultando em uma frequência analítica de 160 e 70 amostras por hora, respectivamente. Devido à mistura quase instantânea proporcionada pelo fluxo pulsante e às ótimas condições referentes à quimiluminescência, a reação luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também foi explorada para a determinação de metformin em fármacos para controle de diabetes (Marques et al., 2005). A substituição do agente oxidante por hipoclorito na oxidação do luminol também foi explorada para a determinação de amônio (Rocha et al., 2005b) e carvedilol (Pires et al., 2005). Ambos os sistemas foram simples, robustos e apresentaram características analíticas favoráveis.

Um aumento exponencial em aplicação das bombas solenóide no decorrer do ano de 2005 foi observado, confirmando então sua confiabilidade, robustez e versatilidade. As bombas têm sido empregadas nas mais diversas estratégias, explorando sempre sua melhor característica, o fluxo pulsante, que influencia diretamente nas condições de mistura. Desta forma, Pons et al. (2005) desenvolveram um sistema MP com extração por fase sólida para especiação de Fe(II) e Fe(III) em águas do mar através da reação espectrofotométrica com tiocianato de amônio. Neste sistema, um disco quelante (ácido iminodiacético) era inserido no diagrama de fluxos para a separação e concentração de Fe(III), sendo apenas utilizado quando necessário a partir do acionamento de uma válvula solenóide. Adição de uma solução

oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) realizava a conversão de Fe(II) para Fe(III) diretamente na amostra. Desta forma, era possível verificar a quantidade das duas espécies a partir da concentração total de Fe(III). Este sistema foi comparado ao sistema empregando seringas como unidades propulsoras e melhoria em limite de detecção, sensibilidade e repetibilidade foram relatadas. Limitações quanto à frequência de pulsação foram observadas com relação à inserção do disco de fase sólida, devido a um aumento na pressão interna do sistema.

Os sistemas de análises em fluxo explorando multi-impulsão ainda estão em fase inicial de desenvolvimento, e novas explorações de suas características fluídicas estão ainda sendo projetadas. Isto pode ser refletido na possibilidade de mesclar os reagentes através de uma única interface em solução (Ribeiro et al., 2005). A flexibilidade deste sistema tornou possível novas aplicações e estratégias, já que suas condições físicas proporcionaram a geração de interfaces através de uma mútua penetração das zonas de amostra e reagentes, a exploração de gradientes de concentração e a aplicação de fluxos reversos repetitivos. As potencialidades deste trabalho foram demonstradas através das reações espectrofotométricas de Fe(III) - ácido salicílico e fosfato-heptamolibdato-redutor (azul de molibdênio). O sistema compreendia de 2 a 4 bombas e um detector espectrofotométrica que se localizava no centro do módulo de análises. Com o acionamento simultâneo ou individual das bombas, as soluções eram inseridas em direção ao detector, onde as interfaces eram formadas. Desta forma, uma maior flexibilidade em mistura das soluções e no tempo de monitoramento do sinal analítico foi conseguida.

A busca crescente por melhores condições aplicadas ao sistema multi-impulsão tem resultado em diferentes estratégias analíticas, através de variações no diagrama de fluxos, inserção de acessórios comutadores, mudanças no sentido de bombeamento, etc. Entretanto, permanece uma lacuna sobre suas condições fluídicas e seu tipo de escoamento de fluxo. Divergências sobre o regime de o fluxo pulsante ser laminar ou turbulento persistem em

alguns trabalhos, sendo que alguns relatam à existência de fluxo caótico. Desta forma, a avaliação do tipo de escoamento dos fluidos, seu estudo sistemático, bem como a sua visualização e caracterização se tornam importante para um maior conhecimento do comportamento do fluxo proveniente das bombas solenóide.

Deve-se concluir que os analisadores em fluxo, desde o remoto autoanalisador e o tradicional sistema de análises por injeção em fluxo, passando pelo sistema explorando multi-comutação e multi-impulsão até os sistemas miniaturizados, possuem suas condições de mistura dependente do tipo de regime de escoamento promovido pelas diferentes unidades propulsoras. Isto reflete diretamente no tipo de vazão estabelecida e conseqüentemente na dispersão da zona de amostra e transporte dos elementos de fluido. Desta forma, o estabelecimento do fluxo nos analisadores em função das diferentes unidades propulsoras será aqui revisado com ênfase em seus fundamentos, benefícios e evolução.

## **2.2. Estabelecimento do fluxo**

Para a avaliação das condições de mistura em um sistema de análises em fluxo é necessário se conhecer as suas características fluídicas, as quais são resultados dos tipos de unidades propulsoras, variações temporais da vazão, regime de escoamento e característica dos reatores. Para isto, uma breve revisão destes aspectos será demonstrada.

### **2.2.1. Unidades propulsoras de fluidos**

Desde a concepção do analisador com fluxo contínuo de Hartridge e Roughton em 1923, a propulsão dos fluidos já era um importante parâmetro no desenvolvimento reacional. A preocupação pela vazão adequada, ausência de interferências como pulsação e pressão dentro do tubo, já eram relatadas devido à propulsão das soluções serem realizadas por jatos. Nos trabalhos que se seguiram (Chance, 1940; Blaedel e Hicks, 1962), seringas e bombas

peristálticas foram exploradas, resultando em melhor precisão volumétrica, maior estabilidade da vazão e menores oscilações relativamente aos jatos.

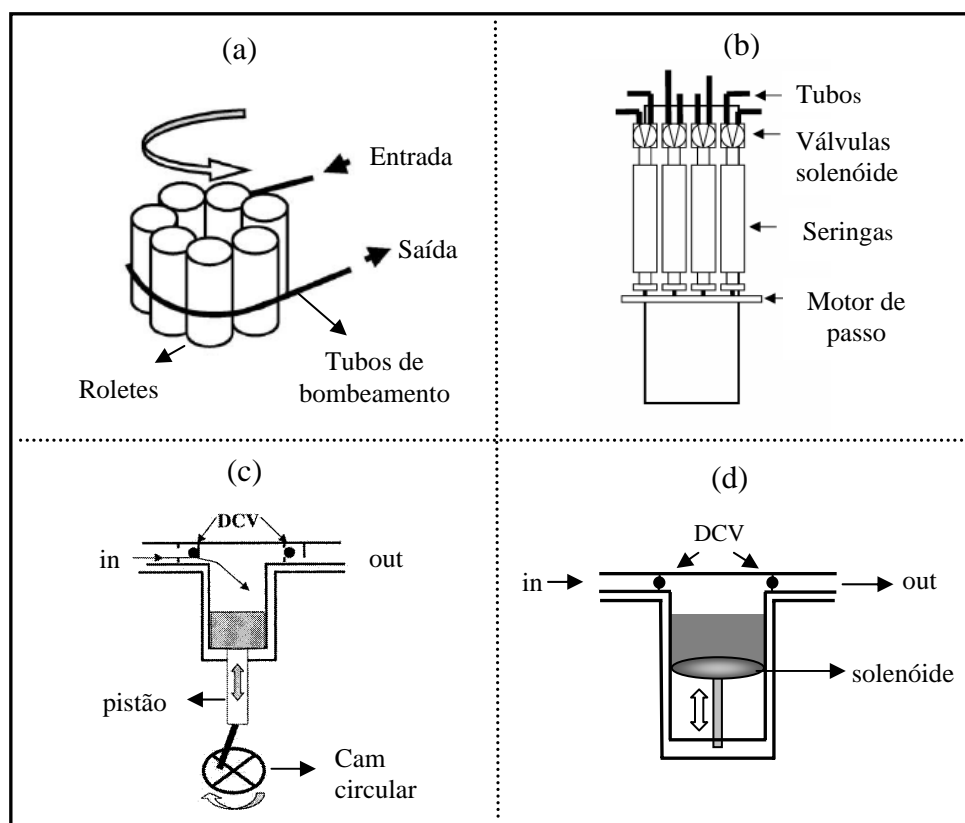
A bomba peristáltica com multi-roletes (Quadro 1, a) foi consagrada como a unidade propulsora dos sistemas de análises por injeção em fluxo devido à sua capacidade de acomodar vários canais, bombeando simultânea e continuamente as soluções, além de ser provida de tubos de bombeamento de diversos diâmetros internos e de vários materiais para acomodar qualquer tipo de reagente químico. Esta unidade, em geral, promove o bombeamento dos fluidos em um único sentido, mas acoplada a um microcomputador pode se tornar mais flexível e realizar diversas estratégias como inverter o sentido do fluxo, parar o fluxo por um determinado tempo, variar a vazão, etc. (Prados-Rosales et al., 2002).

Uma adequada propulsão de fluidos reflete diretamente em eficientes condições de mistura entre as soluções e conseqüentemente na sensibilidade analítica. Neste sentido, a bomba peristáltica promove a mescla das soluções através de pontos de confluência, injetores ou acessórios comutadores. Quando amostra e reagentes são inseridos através de um fluxo constante, as soluções confluem em um único ponto onde a mistura ocorre em função da vazão de bombeamento e tipo de fluxo empregado. Quando acessórios comutadores são empregados, diferentes estratégias de amostragem podem ser exploradas como um fator adicional para mistura.

As seringas (Quadro 1, b) também são bastante utilizadas como unidades propulsoras nos sistemas de análises em fluxo, as quais proporcionam fluxo constante com mínimas oscilações. Sua flexibilidade pode ser salientada quando acoplada a um motor de passo, que comandado por um programa computacional pode promover diferentes tipos de operação, como a exploração de fluxo constante, de fluxo reverso e de estratégias de amostragem usualmente empregadas nos sistemas multi-comutação. Esta flexibilidade foi alcançada pela necessidade de se acoplar válvulas solenóide na saída/entrada de cada seringa para o



direcionamento das soluções. A variedade de aplicações e suas potencialidades como alta precisão, robustez e versatilidade têm sido demonstradas (Miro et al., 2002). Entretanto, algumas limitações, como a necessidade de preenchimento da seringa após um período de tempo limita a frequência analítica.



**Quadro 1. Unidades propulsoras empregadas nos sistemas de análises em fluxo.** (a) bomba peristáltica (Prados-Rosales et al., 2002); (b) seringas (Miró et al., 2002); (c) bomba pistão (Prados-Rosales et al., 2002), onde DCV = “directional check valves”, in e out = entrada e saída da solução; (d) bomba solenóide, legendas idem (c).

A bomba pistão (Quadro 1, c), também conhecida como seringa de pistão, possui em seu interior um pistão e um pente circular que através de seu acionamento, aspiram as soluções pela entrada (“in”) por um volume fixo delimitado pelo seu volume interno, e depois bombeiam para saída (“out”). A entrada e saída dos líquidos são controladas pelas DCV (“directional check-valves”) que são acionadas para as respectivas funções de

direcionamento. A diferença entre a seringa e a bomba pistão está associada na condição de direcionamento das soluções, já que a pistão possui entrada e saída de soluções, e a seringa possui apenas um orifício para isto, sendo controlada pela presença de uma válvula solenóide. A bomba pistão tem sido mais utilizada em cromatografia a líquido devido à sua alta robustez em se adaptar a sistemas com alta pressão em um único canal (Prados-Rosales, 2002). Bombas pistão não têm sido utilizadas em sistemas de análises em fluxo devido ao seu alto custo e à necessidade de se obter uma unidade para cada solução envolvida. Bastante semelhante à seringa com relação ao seu modo de propulsão, pode promover fluxo constante e também descontínuo (Arnold et al., 1989).

Bombas solenóide possuem as mesmas características de bombeamento que as bombas pistão, sendo a única modificação localizada em seu interior, onde um solenóide realiza o movimento de aspiração e bombeamento (Quadro 1, d). Este solenóide, quando acionado, aspira uma quantidade de solução para dentro do compartimento de volume fixo e depois bombeia esta alíquota para o outro orifício, controlados pelas DCV. Estas bombas promovem também fluxo pulsante quando seu volume interno é muito pequeno, já que entre cada pulso há a necessidade de seu preenchimento interno e conseqüentemente a parada do fluxo. Além disto, estas unidades também tem sido fabricadas em menores dimensões e com materiais de baixo custo, permitindo sua implementação nos sistemas de análises em fluxo (Korenaga, et al., 1994; Lapa et al., 2002).

Com a tendência atual em minimização, aliada a uma alta flexibilidade, baixo custo, e ótimas condições de mistura dos fluidos, muitas unidades propulsoras bastante distintas das bombas peristálticas foram desenvolvidas, objetivando principalmente união de ações de bombeamento, comutação e homogeneização em uma única unidade. Neste contexto, Korenaga et al. (1994) desenvolveram uma unidade propulsora baseada na ação de uma pequena bomba pistão comandada por um motor de passo que gerava pulsos com volumes

fixos de 0,01 a 5 ml. Esta bomba foi manufaturada em cerâmica e suas aberturas para aspiração e bombeamento de soluções eram asseguradas por DCV. Estudos comparativos com as seringas que promovem fluxo constante foram realizados empregando a inserção de corante para a visualização da dispersão. Esta visualização foi realizada através de fotos de microscópio instalado imediatamente após o ponto de confluência onde amostra e reagente eram inseridos. Verificou-se que a nova bomba proporcionava uma maior dispersão no sentido radial, provavelmente devido à inserção alternada de volumes muito pequenos de amostra e reagentes. O fluxo resultante foi considerado como constante já que as duas bombas eram acionadas alternativamente, fazendo com que o tempo de fluxo parado entre cada pulso gerado fosse substituído pela inserção de um pulso proveniente da outra bomba, não estabelecendo um fluxo pulsante. Como aplicação para verificação da mistura entre segmentos de amostra e reagentes, a extração de chumbo por ditizona e a determinação da demanda química de oxigênio foram implementadas, resultando em melhor eficiência na extração, melhor repetibilidade, menor dispersão da zona de amostra e maior sensibilidade quando comparadas com a seringa. A melhoria no desempenho desta bomba foi comprovada através de uma eficiente mistura em um curto espaço de tempo, não requerendo percursos analíticos longos e vazões baixas, o que favoreceu a frequência analítica. Entretanto, nenhuma informação sobre a pulsação do fluxo e como este influenciava na mistura foi relatada.

Em análises ambientais, onde há necessidade de se transportar os equipamentos para determinações *in situ*, o emprego de unidades propulsoras menores, mais compactas e que não necessitam de muita manutenção e energia se torna fundamental quando se utilizam sistemas de análises em fluxo. Neste sentido, Weeks e Johnson (1996) propuseram um sistema de análises em fluxo utilizando bombas solenóide comercialmente disponíveis que são pequenas, portáteis, robustas e que consomem pouca energia e podem ser controladas individualmente. Esta unidade propulsora possuía uma membrana solenóide que, quando acionada, puxava um

diafragma integrado a uma DCV para aspiração da solução; depois o diafragma voltava a sua posição original gerando um pulso de volume fixo. Ao contrário do fluxo constante das bombas peristálticas, estas bombas proporcionavam fluxo pulsante, gerando um pulso de 50  $\mu\text{l}$  a cada 3 s, permitindo uma vazão de  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ . A influência desta vazão pulsante foi avaliada implementando-se uma reação com características já bem definidas no sistema de análises com fluxo constante, a determinação espectrofotométrica de nitrito (Johnson e Petty, 1983). O sistema envolvia três bombas para a inserção do fluxo transportador, reagente sulfanilamida e N-naftiletilenodiamina; e a amostra, era inserida por meio de uma válvula de injeção. Oscilações do sinal analítico em função do fluxo pulsante foram atenuadas empregando-se celas de fluxo com maior volume (140  $\mu\text{l}$ ) e de tratamentos adequados dos sinais digitais. Uma limitação na eficiência da bomba solenóide foi observada durante a avaliação da influência do comprimento do reator: para comprimentos de 1,5 e 2,5 m, uma resistência do fluxo era formada, resultando em diminuição da vazão determinada pela pressão contrária. O reator de 1,0 m foi empregado, e um volume de 100  $\mu\text{l}$  de amostra foi adequado. A robustez deste sistema foi avaliada durante sete meses corridos, não ocorrendo diferenças pronunciadas em sensibilidade analítica. Nenhum resultado comparativo com o fluxo constante foi relatado, apenas algumas melhorias em flexibilidade com relação à bomba peristáltica.

A exploração da miniaturização dos analisadores em fluxo tem se tornado um dos principais objetivos da química analítica voltada a estudos ambientais, principalmente quando os analitos são instáveis e se transformam em espécies não detectáveis durante a coleta e transporte da amostra do seu ambiente natural até o laboratório de análises (Chapin e Wanty, 2005). Com esta preocupação, estes autores desenvolveram um sistema de análises em fluxo com as mesmas bombas solenóide utilizadas por Weeks e Johnson (1996) para determinações *in situ* de zinco em águas de rios, obtendo alta robustez do sistema para diversas condições de

campo. Com a tendência dos analisadores em fluxo à substituição da bomba peristáltica para a obtenção de uma miniaturização e simplicidade, novas concepções de unidades propulsoras têm sido propostas. Pode-se mencionar a utilização de bombas de aquário, ou mini-compressores de ar, que foram implementadas como unidades propulsoras em sistemas de análises em fluxo por Matos et al. (2001) e apresentaram mínimas oscilações. Bombas osmóticas também foram empregadas para análises submersas (Jannasch et al., 1994), bem como bombas com gás hélio para uma adequada automação das análises em simultâneo com um tratamento de amostras complexas (Wang et al., 2000), por gravidade (Vieira et al., 2001), etc.

Dentre as diversas opções de unidades de propulsão de fluidos para os sistemas de análises em fluxo, muitas foram desenvolvidas com o intuito de superar algum problema decorrente da bomba peristáltica ou apenas para a diminuição do seu tamanho para análises *in situ*. Aspectos sobre influências nas condições de mistura reacionais são pouco relatados, e suas características fluídicas são sempre consideradas como regime de escoamento laminar. Entretanto, muitas destas unidades alternativas produzem fluxo pulsante que podem resultar em características fluídicas distintas das observadas relativamente ao fluxo constante, e em alguns casos, são consideradas como oscilações. Por outro lado, muitos trabalhos relatam seus benefícios como unidade propulsora nos sistemas de análises em fluxo, principalmente quando a reação necessita de uma mistura mais rápida e uma maior agitação. Entretanto, um conhecimento mais aprofundado sobre as características fluídicas destas novas unidades é requerido. Desta forma, segue-se uma breve revisão sobre os tipos de vazões resultantes destas unidades propulsoras e de suas características fluídicas.

### **2.2.2. Variações temporais da vazão e regimes de escoamento**

As unidades propulsoras se mostraram como um acessório essencial ao analisador em

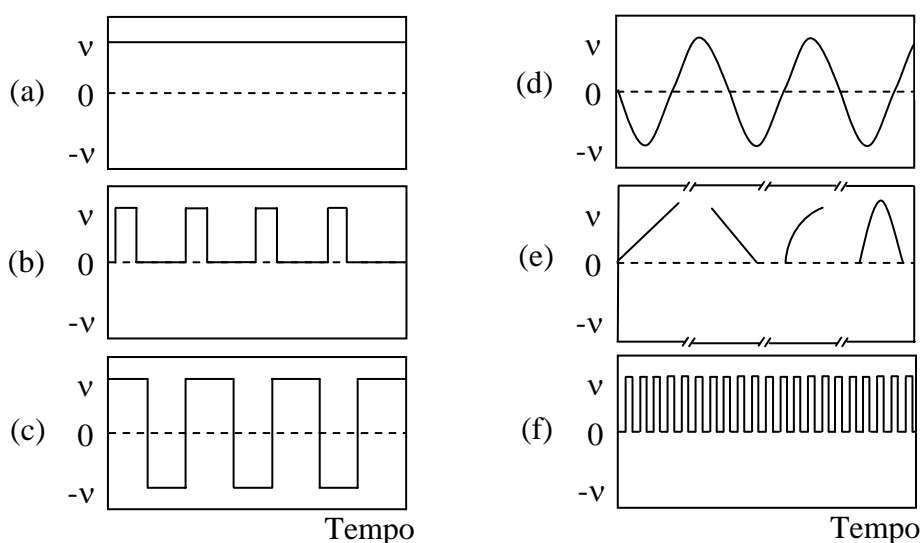
fluxo não só pela sua função de acomodar e conduzir as soluções reagentes, mas também de promover algumas situações benéficas para o desenvolvimento reacional. Além das diferenças em suas condições fluídicas, o parâmetro mais importante, e talvez, essencial em um analisador em fluxo, é a vazão (Rios e Valcarcel, 1991). Suas características, se exploradas adequadamente, podem favorecer a mistura, dispersão e características de detecção (Arnold et al., 1989). Os sistemas de análises por injeção em fluxo empregam geralmente vazão constante (Fig.1, a) onde nenhuma variação temporal ocorre, tais como o sentido de escoamento, interrupções no fluxo, etc. Variações temporais da vazão podem ser exploradas empregando estratégias como a parada de fluxo (do inglês “stopped flow”), que disponibiliza um tempo de contato entre as espécies químicas reagentes em uma localização específica no módulo de análises por um período definido (Fig.1, b). Esta estratégia pode ser controlada por computadores acoplados à unidade propulsora, e tem sido extensivamente explorada para estudos de cinética diferencial (Magni et al., 2005) e para matrizes complexas onde o sinal do branco deve ser suprimido (Lazaro et al., 1984).

Outra estratégia que pode ser explorada é o fluxo reverso, inerente ao sistema de análises por injeção seqüencial, mas que pode ser aplicado a outros sistemas através da mudança do sentido de escoamento dos fluidos (Fig. 1, c). Este tipo de vazão promove uma mistura baseada em interfaces entre reagentes e amostra, a qual pode ser melhorada através de diversas reversões no sentido do fluxo. Bombas que possuem a capacidade bi-direcional podem explorar este tipo de vazão sem muitas dificuldades, como a peristáltica, seringa, pistão e solenóide.

A exploração de gradientes de concentração da zona de amostra em simultâneo com o fluxo reverso (Fig.1, d) também pode ser uma opção para aplicação da variação temporal da vazão em uma mistura reacional. Desta forma, as condições de mistura podem ser avaliadas durante o aumento (linear ou não) da vazão e, ainda, durante o seu decréscimo (Fig.1, e).

Sistemas de análises químicas que exploram este tipo de estratégia podem melhorar as condições de mistura da reação através da utilização de unidades propulsoras que dispensam alíquotas de pequenos volumes com alta precisão, e ainda que possuam a capacidade de inverter o sentido de fluxo.

Unidades propulsoras que promovem fluxo pulsante são caracterizadas por inúmeras paradas no fluxo, durante as quais ocorrem a aspiração e propulsão das soluções. Desta forma, cada parada no fluxo corresponde a um intervalo de tempo fixo e, após este intervalo, o pulso é gerado (Fig.1, f). Nesta condição, a vazão é proporcional à frequência de pulsação. Usualmente, apenas bombas pistão e solenóide provém este tipo de fluxo, já que possuem em sua concepção os movimentos de aspiração e bombeamento, sendo mais salientados em bombas solenóide que possuem pequeno volume de pulso.



**Figura 1. Representações gráficas para diferentes variações temporais de vazão.** Na figura,  $v$  e  $-v$  representam sentidos opostos do fluxo, bombeamento e aspiração, respectivamente. Estratégias: (a) fluxo constante; (b) “stopped flow”; (c) fluxo reverso; (d) fluxo reverso senoidal; (e) exploração de gradientes em fluxo; (f) fluxo pulsante.

A maioria das estratégias exemplificadas acima pode ser explorada se as unidades propulsoras possuírem uma interface com um microcomputador e que os acionamentos de

variação da vazão nominal, de liga/desliga e de inversão do fluxo sejam acessíveis. As unidades mais empregadas são as bombas peristálticas, e maior flexibilidade pode ser conseguida inserindo-se acessórios comutadores nos sistema de análises por injeção em fluxo. A seringa fazendo uso de válvulas solenóide também produz as diferentes condições de vazão através da utilização de um motor de passo (Albertus et al., 2000). O fluxo resultante da seringa se caracteriza como constante, mas pode sofrer variações, como um comportamento senoidal (Ruzicka et al. 1990b) ou pulsante como demonstrado por Prior et al. (2003) que exploraram a inserção de alíquotas de amostra e reagentes no percurso analítico através de pulsos. Neste sentido, o fluxo constante foi alterado através de uma parada de fluxo entre cada alíquota inserida, sendo gerados pulsos de volume definido. Este tempo de parada entre cada pulso foi mantido fixo e controlado pelo motor de passos que acionava a seringa. A vazão resultante pôde ser variada através de sua frequência de pulsação, ou seja, quantidade de pulsos por segundo; e demonstrou uma mistura bastante efetiva entre as soluções de amostra e reagente aliando-se ainda a diferentes estratégias de amostragem que podem ser empregadas sem mudanças no diagrama de fluxos. Características hidrodinâmicas dos fluidos não foram relatadas, porém os autores ressaltaram que o fluxo pulsante produz um movimento caótico das soluções, ao contrário do fluxo constante que promove um comportamento ordenado e laminar dos elementos de fluido.

O regime de escoamento de uma solução fluindo dentro de tubos finos e retos é classificado como laminar ou turbulento. O fluido regido por um escoamento é constituído de inúmeros elementos de fluido, os quais se comportam de modo distinto relativamente ao tipo de escoamento proporcionado. Desta forma, a partir de como os elementos de fluido se movimentam dentro do tubo, pode-se denominar o tipo de fluxo estabelecido. O fluxo laminar é constante e caracterizado por deslocamentos regulares de todos os elementos de fluidos seguindo trajetórias paralelas (Zagatto e Worsfold, 2005). O fluxo turbulento é em média



constante, mas com significantes flutuações localizadas; e a principal característica é o deslocamento caótico dos elementos de fluidos resultante da incessante variação em sua velocidade e direção (Zagatto e Worsfold, 2005).

Em 1883, Reynolds demonstrou numericamente que a transição de um fluxo laminar a turbulento em um tubo está associada a uma medida chamada de número de Reynolds,  $Re$ , e para soluções fluindo no sistema de análises em fluxo representa a Equação 1 (Ruzicka e Hansen, 1988):

$$Re = 2\rho Q/\pi Rv \text{ (Equação 1)}$$

onde  $\rho$  = densidade em  $g\ ml^{-1}$ ,  $Q$  = vazão;  $R$  = raio do tubo,  $v$  = viscosidade.

O valor do  $Re$  depende das condições experimentais, portanto fluxo laminar pode ser mudado para fluxo turbulento ou vice-versa através da modificação de alguns parâmetros experimentais relevantes. Para  $Re < 2000$ , o fluxo em um tubo é geralmente laminar, ao passo que para valores  $> 2000$ , o fluxo é usualmente turbulento. Na prática, a transição entre laminar e turbulento não ocorre em um valor específico de  $Re$ , mas gradualmente sobre uma região de transição de 2000 a 4000. Em geral, a turbulência é completamente estabilizada quando  $Re > 4000$ . Baseado nestes valores, e considerando a vazão e as dimensões do tubo de um sistema de análises em fluxo típico, pode-se concluir que o fluxo laminar é o regime que prevalece (Ruzicka et al., 1988).

No fluxo laminar, a velocidade linear do elemento de fluido localizado no centro do tubo é quase duas vezes a velocidade linear média do fluxo, enquanto a velocidade dos elementos de fluido adjacentes às paredes internas do tubo aproxima-se a zero, resultando em um perfil parabólico típico da distribuição axial da velocidade linear (Ruzicka e Hansen, 1988). No fluxo turbulento, a velocidade linear de cada elemento de fluido é uma soma vetorial de suas velocidades individuais e, em consequência do deslocamento caótico, a

velocidade linear é a mesma para todos os elementos de fluido e se aproxima da velocidade linear média do fluxo (Zagatto e Worsfold, 2005). Em situações reais, a velocidade linear dos elementos de fluido perto das paredes do tubo é ligeiramente diminuída em função da perda de energia por fricção.

O comportamento do fluxo laminar dentro do sistema de análises por injeção em fluxo tem sido avaliado principalmente no que se refere à difusão molecular de espécies químicas e modelos matemáticos desenvolvidos para visualizar a distribuição dos elementos de fluido da amostra. Desta forma, a caracterização do fluxo como laminar ou turbulento pode ser baseada nos estudos da dispersão da zona de amostra dentro do sistema, que é dependente da vazão, tipo de unidade propulsora, tipos de reatores, presença de conectores, câmaras, etc.

### **2.2.3. Visualização da zona de amostra**

Nos analisadores em fluxo, cada elemento de fluido corresponde a um tempo diferente do processamento da amostra e o pico registrado representa um número infinito destes estágios, cada um associado com um diferente tempo de residência. Desta forma, a variação temporal da concentração do analito monitorada no detector reflete diretamente no comportamento da dispersão da zona de amostra. O processo de dispersão pode ser fundamentado por efeitos de difusão e convecção continuamente durante a passagem da amostra pelo percurso analítico (Bruno et al., 2001). A convecção é uma consequência da distribuição parabólica da velocidade linear dos elementos de fluido; e a difusão é dependente da diferença em concentração entre elementos de fluidos vizinhos e do coeficiente de difusão molecular (Valcarcel e Luque de Castro, 1987). Em um tubo reto, a dispersão axial é predominante e regida pela característica laminar de escoamento, sendo a dispersão radial estabelecida quando um reator tubular, helicoidal, com segmentação, ou ainda, com a presença de um fluxo turbulento (Ruzicka e Hansen, 1988).

A dispersão da zona de amostra pode ser avaliada considerando-se as características dos picos transientes registrados, como a altura, largura e área; e pode ser variada através de parâmetros como volume de amostra, geometria do reator e vazão (Reijn et al., 1981). Entretanto, o pico representa apenas a variação temporal da concentração e não representa a distribuição espacial da amostra dispersa. Neste sentido, quando novas unidades propulsoras ou novos tipos de fluxo são propostos, há a necessidade de uma interpretação visual da dispersão da zona de amostra.

Desde o primeiro sistema de análises em fluxo contínuo, muitas equações e modelos matemáticos foram propostos para visualizar o comportamento da zona de amostra no percurso analítico (Hull et al., 1992). Muitas destas foram baseadas no modelo de difusão-convecção proposta por Taylor em 1953, que mostrou a distribuição da concentração produzida pela inserção de uma solução solúvel em um fluxo constante em tubos de pequeno diâmetro interno. Os resultados demonstraram que a dispersão é governada por um coeficiente de difusividade que pôde ser calculado a partir da distribuição da concentração, e que a amostra dispersante se move de acordo com a velocidade média do fluxo. Isto forneceu equações para prever o comportamento de uma amostra através dos efeitos de convecção (transporte de massa axial) e difusão (transporte de massa em todos os sentidos, sendo o radial o mais efetivo).

Diversas modificações tiveram que ser realizadas para estas equações serem aplicadas nos analisadores em fluxo. Vanderslice et al. (1981) desenvolveram um modelo matemático para prever o comportamento da zona de amostra em um sistema de análises por injeção em fluxo, entretanto, as equações eram aplicáveis apenas para condições muito restritas, como fluxo laminar proveniente de seringas e não de bomba peristáltica, sistema de análises mono canal, etc. (Hull et al., 1992). Com o desenvolvimento da ciência computacional foi possível gerar simuladores através de modelos matemáticos e imagens foram então simuladas por

Vanderslice et al. (1986) que demonstrou a dispersão da zona de amostra através de variações na distância radial do tubo em função da distribuição axial. Wada et al. (1986) também demonstraram a dispersão da amostra através de simuladores computacionais com corantes e com uma reação química. Neste sentido, os perfis dos picos resultantes do simulador foram bastante concordantes com os obtidos no registro do sistema de análises por injeção em fluxo na prática. Posteriormente, com o auxílio de um microscópio, Korenaga et al. (1988) estudaram através de fotografias as propriedades do fluxo laminar em função de suas propriedades difusivas e convectivas. Diversos parâmetros físicos do sistema foram avaliados objetivando-se a minimização da dispersão da zona da amostra, a qual foi conseguida através do uso de tubos com menores diâmetros, reatores curtos e em espiral, baixas vazões, etc.

Betteridge et al. (1984) apresentaram um modelo computacional mais complexo denominado de “random walk” para um sistema mono canal baseado nas funções do número de moléculas envolvidas, viscosidade e temperatura do fluido, vazão, coeficiente de difusão, etc. Com este modelo foi possível estudar as condições de mistura dos fluidos envolvidos, o qual foi aplicado posteriormente no sistema envolvendo zonas coalescentes obtendo excelentes resultados (Crowe et al., 1987).

Outros modelos foram propostos para uma melhor descrição quantitativa da dispersão da amostra, como o modelo “tanks-in-series”, o qual assume que um elemento de fluido flui através de N tanques idealmente misturados e ligados de uma maneira serial (Valcarcel, 1987). Neste sentido, Tyson e Idris (1981) consideraram o sistema de análises em fluxo como um tanque hipotético para estimar respostas em um espectrômetro de absorção atômica por chama. Este modelo também foi explorado por Stone e Tyson (1987) para a verificação do comportamento da dispersão da zona de amostra sob os efeitos da vazão, comprimento do percurso analítico, diâmetro do tubo, etc. Estes resultados confirmaram que o coeficiente de dispersão aumentava com o aumento do comprimento do percurso analítico e com o aumento

do diâmetro do tubo.

Outras maneiras mais simples de se verificar o deslocamento da zona de amostra e sua dispersão foram propostas por Reis et al. (1981) e Zagatto et al. (1986b), onde visualizaram a dispersão em função da concentração/tempo considerando zonas de amostragem (do inglês “zone sampling”).

Na maioria dos modelos matemáticos desenvolvidos para a visualização da dispersão da zona de amostra, poucos aplicavam reações químicas para a verificação das condições de mistura entre os reagentes e conversão em produtos. Atualmente, a inserção de um corante mimetizando a amostra tem sido bastante utilizada para visualização da dispersão da zona de amostra quando se necessita um conhecimento mais superficial de seu comportamento no sistema de análises em fluxo. Alternativas um pouco mais complexas têm sido desenvolvidas para a visualização da dispersão da amostra em sistemas de análises em fluxo, como a técnica de despolarização fluorescente induzida a laser (Quintella et al., 2004). Esta técnica permitiu a visualização da dispersão da amostra através de dados analíticos adquiridos pela fluorescência da Rodamina B como amostra induzida por um feixe de laser. Neste experimento, o laser incidia sobre o tubo onde a amostra fluía, e a intensidade de fluorescência era coletada por uma cela fotomultiplicadora. Desta forma, a quantidade de fluorescência emitida resultava nas concentrações de amostra dispersa através de uma distribuição espacial realizada por uma varredura do feixe de laser pelo tubo. Através da aplicação do modelo matemático “black box” (Quintella et al., 2003) foi possível identificar que a contribuição da parede do tubo na dispersão da amostra foi duas vezes maior do que a dispersão relativa a mistura entre os fluidos envolvidos. O modelo “tanks-in-serie” também foi aplicado quando experimentos envolvendo o efeito da gravidade mostraram maior dispersão longitudinal. Os resultados demonstraram uma influência pronunciada da ação da gravidade na dispersão da amostra nos sistemas de análises em fluxo.

## 2.3. Aplicações

Neste item uma breve revisão da literatura sobre as aplicações selecionadas para os estudos da influência do fluxo pulsante na mistura reacional é apresentada. Métodos envolvendo a determinação de bromexina em fármacos e fosfatos em extratos de solos são relatados, considerando quando possível, suas aplicações nos sistemas de análises em fluxo e detecção espectrofotométrica.

### 2.3.1. Determinação de bromexina em fármacos

Cloridrato de bromexina ou cloridrato de *N*-(2-amino-3,5-dibromofenilmetil)-*N*-metilciclo-hexilamina, é um princípio ativo que age diretamente na via respiratória, diminuindo a produção de muco nos brônquios aliviando os problemas respiratórios (Pérez-Ruiz et al., 1995). Sua ação farmacológica é baseada na fragmentação das fibras de mucopolissacarídeos dos mucos, e as formulações podem ser feitas com apenas este composto ou ainda com adição de outros compostos farmacológicos semelhantes para potencializar seu efeito. Este medicamento é apresentado em diversas formulações como xaropes, comprimidos, pastilhas e soluções injetáveis, sendo que cada fórmula apresenta diferentes substâncias excipientes resultando em matrizes diferenciadas.

Dentre os diferentes métodos analíticos para a determinação de bromexina, a titulação potenciométrica com hidróxido de sódio tem sido considerada como método oficial pela Farmacopéia Européia (Pharmacopée Européenne, 1990) e Britânica (British Pharmacopoeia, 1993).

A reação de diazotização envolvendo bromexina também foi explorada para métodos espectrofotométricos por Gala et al. (1993) através de seu acoplamento com o reagente *N*-(1-naftil)-etilenodiamina. Com relação à implementação do método em sistemas automatizados de análises, o desenvolvimento desta reação foi mais completo aplicando-se a estratégia

“stopped flow” onde os reagentes eram rapidamente misturados e logo a seguir o fluxo era parado e os produtos reacionais monitorados espectrofotometricamente. Devido à alta velocidade de reação, o método se apresentou apto para análises de rotina, já que a quantificação era possível em um intervalo de 0,5 e 1,0 s. A presença de antibióticos, como a penicilina, não interferiu nas medidas, resultando em um método bastante seletivo e robusto.

Em algumas técnicas de detecção, a complexidade das matrizes pode interferir severamente na análise, principalmente com relação à absorção de radiação na região do ultravioleta. Os principais interferentes espectrais são compostos ativos de mesma função farmacológica ou ainda excipientes e metabólitos (Rauha et al., 1996). Desta forma, existe a necessidade em se empregar estratégias de preparo de amostra para separação e extração da bromexina antes da análise. As principais técnicas de separação utilizadas tem sido a cromatografia líquida de alta eficiência (Rauha et al., 1996; Lau et al., 1995), eletroforese capilar (Perez-Ruiz et al., 1997; Pospisilova et al., 2001) e a cromatografia a gás (Rao et al., 1987). Alternativas como a determinação indireta de bromexina através de sua complexação com compostos inorgânicos que contenham metais também foi explorada para sua quantificação indireta por espectrometria de absorção atômica (Nerin et al., 1985; Eisman et al., 1993).

Estratégias menos complexas, envolvendo tratamentos matemáticos e estatísticos, foram exploradas para uma melhoria em seletividade e simplicidade relativamente a técnicas espectrofotométricas. Tantishaiyakul et al. (1998) aplicaram a primeira derivada dos espectros referentes a cloridrato de bromexina e bromato de dextrometorpan em fármacos para sua separação espectral. Este último composto tem sido utilizado concomitantemente com bromexina em diversas formulações para tratamento de bronquite, e seus espectros de absorção se sobrepõem na região de 230 a 300 nm. Ainda, compostos excipientes das formulações apresentaram algumas bandas espectrais que também podem interferir nas

análises. Desta forma, através da aplicação da primeira derivada, dois comprimentos de onda puderam ser selecionados, 234 e 324 nm para dextrometorpan e bromexina, respectivamente. Com isto, foi possível uma quantificação seletiva com simplicidade, rapidez e ausência de interferências espectrais da matriz. Comprimidos foram analisados e os resultados foram concordantes com o método comparativo (HPLC).

Outra estratégia para se atingir uma adequada seletividade na detecção espectrofotométrica de bromexina tem sido a aplicação de tratamentos estatísticos, como a calibração multivariada com PLS-1 (regressão por quadrados mínimos parciais). Esta ferramenta utiliza todas as informações espectrais resultando em uma rápida determinação de misturas sem uma separação prévia dos componentes. Goicoechea e Olivieri (1999) analisaram bromexina em xaropes por absorção na região ultravioleta aplicando a técnica PLS-1. Devido a esta amostra possuir compostos potencialmente interferentes que absorvem nesta região, outro tratamento estatístico denominado como HLA (análises linear híbrida) também foi aplicado. Com a utilização destas duas ferramentas foi possível selecionar comprimentos de onda adequados para a determinação seletiva de bromexina na presença de vários excipientes, resultando em excelentes resultados de recuperação.

Em algumas formulações específicas para tratamento de bronquite, cloridrato de bromexina pode se apresentar como constituinte menor da amostra com relação a outros compostos. Neste sentido, a espectrofotometria na região do UV não apresenta alta seletividade requerendo a utilização de ferramentas estatísticas para a sua quantificação. Ribone et al. (2000) determinaram bromexina como um constituinte menor em comprimidos de cotrimoxazola através da aplicação da técnica PLS-1. Embora estes dois compostos tenham apresentado espectros sobrepostos, os resultados após o tratamento com a calibração multivariada foram excelentes para as diferentes diluições da amostra.

Dentre os poucos métodos espectrofotométricos que utilizam reagentes cromogênicos



para a determinação de bromexina, apenas uma metodologia foi aplicada nos sistemas de análises em fluxo. Perez-Ruiz et al. (1995) implementaram uma extração líquido-líquido de bromexina em formulações farmacêuticas e plasma sanguíneo através da formação de íon-par com corantes ácidos. Neste sistema, a amostra (60 µl) era inserida em uma solução transportadora contendo ainda o corante Orange IV; a zona de amostra seguia para um reator onde o composto corante-bromexina era formado. Em seguida a mistura recebia por confluência o solvente orgânico (1,2-dicloroetano) que realizava a extração do par iônico durante sua passagem pela bobina de extração. A seguir, a fase orgânica era separada da fase líquida através de uma membrana separadora de fases e direcionada ao detector espectrofotométrico (412 nm). Diversos corantes foram avaliados para a formação do íon-par com a bromexina, e o que apresentou melhor eficiência na extração foi o Orange IV. As amostras foram analisadas e os resultados comparados à espectrometria de absorção atômica que determina bromexina indiretamente através da complexação com compostos metálicos. A metodologia apresentou superioridade com relação a técnica comparativa, como baixo limite de detecção  $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$  de bromexina, frequência analítica de 40 amostras por hora, simplicidade e eficiência na extração.

### **2.3.2. Determinação espectrofotométrica de fosfato em solos**

Fósforo é um elemento muito importante para o crescimento das plantas, nutrição do homem e animais, e está presente naturalmente nos solos, sedimentos, e em águas naturais. Nos solos, é considerado um macronutriente essencial para todas as culturas, devido à sua importante função em muitos processos fisiológicos e bioquímicos (Almeida et al., 2005). Sua importância na agricultura levou ao desenvolvimento dos fertilizantes fosfatados, os quais são geralmente empregados via solo para adequada nutrição das plantas. Entretanto, o seu uso impróprio pode acarretar contaminações ambientais, afetando a qualidade das águas através

da lixiviação, acelerando a eutrofização de lagos e rios (Daniel et al. 1998).

O fósforo no solo se apresenta na forma mineral e orgânica, fazendo parte de compostos com cálcio, ferro e alumínio; em solução, adsorvido de forma trocável nos colóides; e grande parte pode ser absorvida também de forma não disponível para as plantas (Tomé Jr., 1997). Mesmo com todas estas formas em que o fósforo se encontra, cada uma cumpre um papel fundamental na nutrição das plantas, e devido a isto, os procedimentos para especificação destas formas são muito complexos.

Para análise de fósforo em solos, uso de soluções extratoras tem sido a estratégia mais empregada, a qual atua de forma a retirar do solo o fósforo disponível. A extração também pode ser realizada por resina de troca iônica, porém tem sido considerada bastante morosa e complexa. Desta forma, devido à simplicidade e sua ampla aceitação no país, a solução extratora de Mehlich I tem sido a mais empregada para extração de fósforo disponível em solos (Tomé Jr, 1997). O fósforo extraído pode se encontrar em diversas formas dependendo do pH do solo e da composição da solução extratora (Novais e Smyth, 1999); e o conhecimento de suas formas na solução somente é possível com o emprego de resinas trocadoras de íons. Desta forma, a denominação de fosfato (P-PO<sub>4</sub>) pode ser empregada para denominar todas as formas de fósforo disponível extraídas pela solução extratora\*.

Com relação à determinação espectrofotométrica de fosfato em extratos de solos (solução contendo as espécies extraídas do solo), o método de formação do azul de molibdênio tem sido o mais utilizado. Este método baseia-se na reação dos fosfatos com molibdato em meio ácido formando heteropoliácidos fosfomolibdicos (complexo de coloração amarela) e sua posterior redução a azul de molibdênio (Dickman e Bray, 1940; Murphy e Riley, 1962; Tomé Jr., 1997). Diversos agentes redutores, tais como o ácido ascórbico, cloreto estanhoso e hidrazina têm sido empregados, os quais apresentam condições reacionais

---

\* Esta denominação foi considerada neste trabalho para determinação de fosfato.

bastante distintas, principalmente em suas cinéticas reacionais, sensibilidade analítica e seletividade (Motomizu et al., 2005).

Outras condições reacionais também podem influenciar na cinética e na seletividade da reação, como a composição da solução ácida, que pode ser variada entre clorídrico, sulfúrico, nítrico e perclórico (Dickman e Bray, 1940; Lueck e Boltz, 1956) e a presença de catalisadores como vanadato e tartarato de antimônio (Marczkenko, 1986) que aceleram a reação através da formação de heteropoliácidos ternários. Deve-se salientar que para qualquer alternativa explorada, a absorvidade molar do complexo (heteropoliácido) se torna bastante diferenciada. Estas diversas condições influenciam diretamente na formação dos heteropoliácidos, que possuem coloração amarela, o qual é posteriormente reduzido a azul de molibdênio.

Métodos espectrofotométricos para a determinação de baixos teores de fosfato devem apresentar além da sensibilidade, uma alta seletividade, já que muitas espécies presentes nas amostras ambientais apresentam formas químicas semelhantes ao fosfato. Este é o caso da formação do azul de molibdênio que também forma heteropoliácido com silicato, vanadato, zirconato, dentre outros. Ainda têm sido propostos métodos baseados na capacidade do heteropoliácido fosfomolibdico reagir com corantes catiônicos para a formação de íons associados (Motomizu e Li, 2005). Estes são em geral bastante seletivos, uma vez que após a associação iônica, o par deve ser separado por alguma técnica de extração, permitindo quantificar baixos teores de fosfatos. Diversos corantes foram explorados, tais como a Rodamina B, azul de metileno, Cristal Violeta, Verde de Malaquita, etc. (Munoz, et al., 1997; Motomizu e Li, 2005; Estela et al., 2005).

A automação do método azul de molibdênio para a determinação de fosfato teve início juntamente com a concepção dos sistemas de análises por injeção em fluxo (Ruzicka e Stewart, 1975). Esta reação foi explorada neste sistema para a verificação das suas

potencialidades com mais de um reagente confluindo e apresentou boas condições de mistura, com um intervalo de tempo de apenas 6 s após a mescla dos reagentes para o início do aparecimento da coloração, resultando em uma frequência analítica de 200 - 250 amostras por hora. A aplicação analítica foi então realizada no trabalho seguinte (Ruzicka e Stewart, 1975) que demonstraram a influência de todos os parâmetros do sistema de análises por injeção em fluxo para análises de digeridos de plantas. Após a otimização do sistema, foi possível aplicar o sistema em análises de rotina a uma frequência de até 420 h<sup>-1</sup>, com injeção manual.

Warrell e Moody (1984) empregaram o método do azul de molibdenio em um Autoanalisador II da Technicon para determinação de fosfato extraído com solução de 0,01 mol l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, que possui uma intensidade iônica próxima da solução de solo. O método empregado foi baseado na modificação realizada por Murphy e Riley (1962) que adicionaram antimônio para aceleração da reação, o qual era misturado na mesma garrafa dos reagentes molibdato de amônio e ácido ascórbico. Neste sistema, o desenvolvimento da coloração teve início após 6 minutos da mistura dos reagentes e amostra, com boa repetibilidade e detecção de teores < 100 µg l<sup>-1</sup> P. Os resultados das análises dos extratos de solos foram concordantes com aqueles obtidos pelo método manual confirmados pelo teste F.

A determinação espectrofotométrica de fosfato em extratos de solos tem sido pouco explorada nos sistemas de análises em fluxo devido, provavelmente, à complexidade da matriz. Desta forma, para uma adequada seletividade envolvendo detecção espectrofotométrica devem-se adotar técnicas de extração e filtração eficientes que minimizem a coloração dos extratos, interferentes em potencial e quantidade de matéria orgânica (Coutinho, 1996; Turner et al., 2005).

Neste sentido, alguns sistemas automatizados foram desenvolvidos para superação destas interferências, como os sistemas de análise com fluxo segmentado descrito por Coutinho (1996) e Novozamsky et al. (1993), que empregaram uma unidade de diálise para

remoção de possíveis interferentes. Os métodos empregados foram diferenciados devido ao limite de detecção necessário para cada tipo de extrato de solo. Neste sentido, Coutinho (1993) empregou a formação de azul de molibdênio na presença de antimônio, e Novozamsky et al. (1996) o método de associação iônica entre o poliácido fosfomolibdico e o corante verde de Malaquita. Estes métodos se mostraram adequados para análises de extratos com coloração ou matéria orgânica dissolvida, com baixos limites de detecção ( $2 \mu\text{g l}^{-1} \text{P}$ ) e concordantes com o procedimento manual.

Nos poucos trabalhos encontrados relativamente aos sistemas de análises em fluxo, o ácido ascórbico tem sido a espécie redutora preferencialmente empregada na redução do heteropoliácido fosfomolibdico para a formação do azul de molibdênio (Munoz et al., 1997). Entretanto, Garcia et al. (1991) desenvolveu um sistema de análises com fluxo reverso utilizando cloreto estanhoso como agente redutor. Neste sistema, a amostra foi inserida como fluxo transportador e os reagentes (molibdato de amônio e cloreto estanhoso) foram inseridos por uma válvula de injeção. O sistema apresentou uma frequência analítica de 70 amostras por hora, com consumo de reagentes de  $119,5 \mu\text{l}$  por determinação.

Com a evolução dos analisadores, condições mais favoráveis, simples e rápidas foram propostas para o desenvolvimento desta reação. Neste sentido, sistemas de análises por injeção seqüencial (Gubeli et al., 1991; Galhardo e Masini, 2000), sistemas explorando multi-comutação (Kronka et al., 1996) e sistemas multi-seringas (Estela e Cerda, 2005) foram projetados para análises das mais diversas amostras. Ainda, estes sistemas sofreram diferentes modificações de acordo com a matriz envolvida, com o teor de fosfato, estratégias de preparo de amostra em linha, estratégias de amostragem, etc.

Almeida et al. (2005) implementaram o método azul de molibdênio em um sistema multi-seringas para análise de fosfato em extratos de solos. Neste sistema seringas eram utilizadas para cada solução, que inicialmente aspirava a amostra para uma bobina retentora e

depois bombeava apenas uma alíquota definida para a mescla com os reagentes molibdato de amônio em ácido sulfúrico e ácido ascórbico através de uma válvula solenóide. Para melhoria em sensibilidade, antimônio foi inserido como catalisador na solução de molibdato de amônio (400:1); e uma vazão de  $0,6 \text{ ml min}^{-1}$  foi aplicada no transportador para promover maior contato entre as espécies reagentes. O sistema apresentou frequência analítica de 5 amostras por hora, com boa repetibilidade (d.p.r.  $< 1,7 \%$ ,  $n = 20$ ). A curva analítica se apresentou linear de  $0,75$  a  $15,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ P-PO}_4$  e o limite de detecção foi estimado em  $0,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ P-PO}_4$ . Estes resultados em comparação aos obtidos com outros sistemas de análises em fluxo para análise de extratos de solos, apresentaram maiores consumo de reagentes por determinação e baixa frequência analítica.

Grassi et al. (2004) desenvolveram um sistema de análises por injeção sequencial para determinação de fosfato e zinco em extratos de solos explorando a estratégia de ensaios prévios. Neste sistema, a amostra era processada visando a determinação de fosfato pelo método azul de molibdênio. Se esta concentração fosse  $> 5,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ P-PO}_4$ , o sistema encaminhava a amostra para a determinação de zinco. Ambos analitos foram extraídos com a mesma solução extratora de Mehlich I ( $0,05 \text{ mol l}^{-1} \text{ HCl} + 0,012 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ). Este sistema apresentou características favoráveis como baixo consumo de reagentes e amostra, robustez e diminuição de etapas manuais. Em função da estratégia de ensaios prévios, a quantidade de determinações realizadas foi bastante reduzida.

Um sistema automatizado descrito como “all injection analysis” foi proposto para a determinação de fosfato em extratos de solos (Amornthammarong et al., 2005). O sistema compreendia válvulas de seis vias ligadas por alças de amostragem (do inglês “loops”) onde as soluções eram armazenadas. Durante o acionamento das válvulas para o início da análise, as soluções circulavam por um tempo e direção definidos dentro de um percurso analítico onde realizavam a mistura baseada no escoamento laminar, e depois seguiam para o detector.

Alta incidência de efeito Schlieren foi notada devido às interfaces formadas durante o percurso da mistura. Interferência de silício foi observada apenas com relação à solução extratora  $1,0 \text{ mol l}^{-1}$  HCl contendo ainda ácido tartárico; para a solução  $1,0 \text{ mol l}^{-1}$  NaOH uma tolerância de até  $600 \text{ mg l}^{-1}$  Si foi observada. Análises das duas soluções extratoras foram realizadas, obtendo resultados sem diferenças significativas comparativamente a amostras certificadas. O sistema apresentou baixo consumo de reagentes ( $< 1 \text{ ml}$  por determinação) e frequência analítica de  $72 \text{ h}^{-1}$ .

### 3. MATERIAIS

#### 3.1. Equipamentos e acessórios

Os sistemas de análises em fluxo explorando multi-impulsão ou multi-comutação compreendiam:

- bombas solenóide BIO-CHEM Valve Inc., modelos 090SP, 120SP e 150SP com volumes de pulso de 8, 25 e 50  $\mu$ l, respectivamente;
- válvulas solenóide de três vias, NResearch, modelo 161T031;
- bomba peristáltica de rotação variável Ismatec, modelo IPC - 08, com tubos Tygon de diversos diâmetros internos para bombeamento de soluções;
- espectrofotômetro Femto, modelo 482, equipado com cubeta de fluxo Hellma com 30  $\mu$ l de volume interno e 10 mm de passo óptico;
- registrador potenciométrico Kipp & Zonen, modelo 111;
- microcomputador provido de interface PCL-711 Advantech e operado por meio de programa desenvolvido em Quick Basic 5.0;
- fonte de “laser” (514,5 nm) modelo Nd:YAG Continuum Surelite SLII-10 (0,55 mJ por pulso, 10 Hz);
- lentes focais, espelhos, filtro óptico de 550 nm e polarizadores constituintes do sistema de PLF (despolarização fluorescente induzida por laser);
- tubo de borosilicato de 5,0 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno para aplicação de PLF;
- balança analítica Mettler modelo BB204;
- banho termostaticado Fanem modelo 100;
- reatores e linhas de transmissão de polietileno (0,8 mm d.i.), confluências de acrílico e conectores;



- outros materiais de uso rotineiro em laboratórios de Química Analítica, tais como capela, destiladores, agitadores magnéticos, banhos termostatizados, medidores de pH, vidrarias, filtros, etc.

### **3.2. Soluções-padrão, reagentes e amostras**

As soluções-padrão e reagentes utilizadas foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico e água destilada/desionizada.

#### **3.2.1. Desempenho das bombas solenóide**

Para os estudos referentes à dispersão da zona de amostra, diferentes soluções de verde de bromocresol (0,0 a 50,0 mg l<sup>-1</sup> VBC) foram preparadas a partir de uma solução-estoque de 500 mg l<sup>-1</sup> VBC, que foi preparada dissolvendo-se 0,5 g VBC em 1000 ml de 0,01 mol l<sup>-1</sup> de solução-tampão tetraborato de sódio. Esta foi preparada dissolvendo-se 3,81 g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> em 500 ml de água; após a dissolução o pH foi ajustado para 9,0 com 0,1 mol l<sup>-1</sup> NaOH e completou-se o volume para 1000 ml.

#### **3.2.2. Determinação de bromexina em fármacos**

As soluções utilizadas nos estudos referentes à determinação espectrofotométrica de bromexina em fármacos foram:

- solução-padrão estoque de 1000 mg l<sup>-1</sup> de cloridrato de bromexina: dissolveu-se 0,5 g de cloridrato de bromexina em 200 ml de água, e completou-se o volume até 500 ml. Esta solução era mantida sob refrigeração;
- soluções-padrão de trabalho (0,0 - 250,0 mg l<sup>-1</sup> bromexina): preparadas diariamente a partir de diluições da solução-padrão estoque com água;

- solução reagente estoque,  $4,0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH): dissolveu-se 0,86 g MBTH em 50 ml  $0,36 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  e completou-se o volume para 100 ml com a mesma solução; as soluções ( $8,0 \times 10^{-3}$  a  $1,6 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  MBTH) para estudos foram analogamente preparadas a partir da solução estoque acima;
- solução de  $3,6 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ : preparada diluindo-se 100 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado em água e completando-se o volume até 1000 ml; as soluções utilizadas nos estudos ( $0,1$  a  $1,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ) foram preparadas diluindo-se os volumes adequados da solução acima;
- solução reagente estoque de  $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  sulfato cérico: dissolveu-se 1,0 g de  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em 50 ml de  $0,36 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ , completou-se o volume para 100 ml com a mesma solução ácida; as soluções utilizadas nos estudos ( $1,25 \times 10^{-3}$  a  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  Ce(IV)) foram preparadas dissolvendo-se apropriadamente as quantidades da solução estoque;
- soluções de espécies químicas potencialmente interferentes utilizadas como excipientes (sacarose, lactose, galactose, glicose, amido, benzoato de sódio e estereato de magnésio): preparadas em concentrações de  $1000 \text{ mg l}^{-1}$ , diluindo-se 0,25 g de cada composto em 250 ml de água.

Amostras de fármacos contendo cloridrato de bromexina em suas formulações foram adquiridas em farmácias locais na forma de comprimidos e xaropes. A dissolução dos comprimidos foi feita com base em procedimentos padrão da farmacopéia (Pharmacopée Européenne, 1990): pesaram-se 10 comprimidos que foram macerados em um almofariz; após completa maceração (formação de um pó fino), foram dissolvidos em 15 ml de água, transferiu-se a um balão volumétrico e completou-se o volume até 50 ml com água. Amostras de xarope (30 ml) foram dissolvidas em água, sendo o volume completado até 50 ml com água.

### 3.2.3. Determinação de fosfato em extratos de solos

As soluções reagentes utilizadas nos estudos referentes à determinação espectrofotométrica de fosfato em extratos de solos foram:

- solução-padrão estoque de fosfato ( $1000 \text{ mg l}^{-1} \text{ P-PO}_4$ ): dissolveram-se 4,39 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em 100 ml de água e, após a dissolução, completou-se o volume até 1000 ml com água. Esta solução era mantida sob refrigeração;
- soluções-padrão de trabalho ( $0,0$  a  $20,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ P-PO}_4$ ): preparadas a partir da diluição de volumes apropriados da solução estoque em solução de Mehlich I (Grassi, 2003);
- solução Mehlich I ( $0,0125 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 0,05 \text{ mol l}^{-1} \text{ HCl}$ ): preparadas diluindo-se quantidades adequadas de soluções de  $0,36 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  e  $1,0 \text{ mol l}^{-1} \text{ HCl}$ ;
- solução estoque reagente  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  de heptamolibdato de amônio: preparada dissolvendo-se 6,17 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em 100 ml de  $0,9 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ;
- solução reagente, 0,5 % (m/v) ácido ascórbico: preparada diariamente a partir da dissolução de 0,5 g de ácido ascórbico em 100 ml de água. Esta solução era mantida ao abrigo da luz;
- soluções contendo espécies químicas potencialmente interferentes: preparadas a partir de soluções estoques de  $1000 \text{ mg l}^{-1} \text{ Fe}$ , Si e Cu: Estas soluções foram diluídas em solução extratora de Mehlich I para  $50,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Fe}$ ,  $100,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Si}$  e  $5,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$ ;
- solução mascarante, 0,05 % (m/v) de oxalato de potássio: preparada dissolvendo-se 0,05 g  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  na solução reagente  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  heptamolibdato de amônio em  $0,9 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ .

Amostras de solos (TFSA) foram pesadas (5 g) em um Erlenmeyer, adicionaram-se a seguir 50 ml de solução extratora Mehlich I e após um repouso de 30 min, agitou-se durante 5

min. A seguir, o sobrenadante foi separado e filtrado (Black e McLean, 1965; Silva, 1999; Grassi, 2003). Estas amostras foram estocadas em frascos de vidro.

#### **3.2.4. Visualização da amostra dispersa explorando PLF**

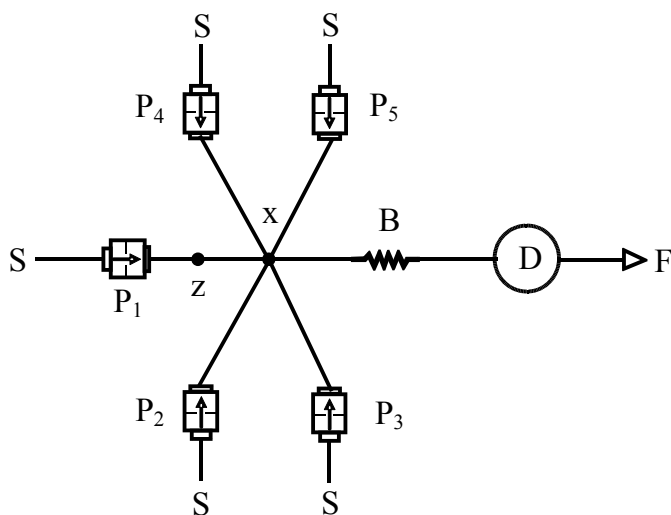
As soluções utilizadas para a exploração da técnica PLF (Quintella et al., 2004) compreendiam:

- reagente monoetileno glicol (MEG) com 99,5 % de pureza;
- solução reagente  $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  Rodamina B (RB): preparada a partir da dissolução de 31,1 mg RB em 50,0 ml de solução  $6,4 \text{ mol l}^{-1}$  MEG.

## 4. MÉTODO

### 4.1. Desempenho das bombas solenóide

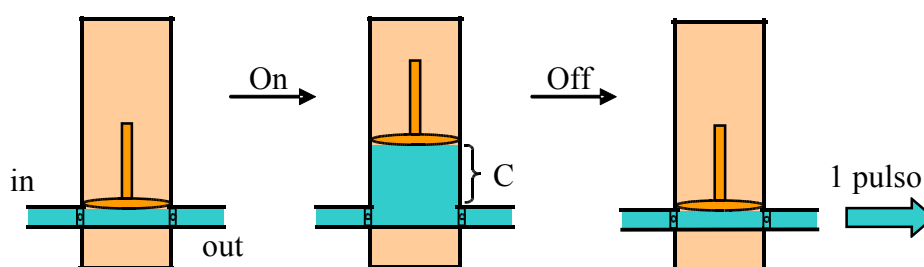
O comportamento das bombas solenóide em um sistema de análises em fluxo foi avaliado de uma forma sistemática, englobando tanto suas características funcionais, como precisão volumétrica dos pulsos e vazão, robustez e flexibilidade, quanto suas características fluídicas, como o efeito do fluxo pulsante na dispersão/diluição de uma solução corante para a visualização de suas condições de mistura. Para isto, um sistema multi-impulsão (MP) com cinco mini-bombas foi projetado (Fig.2). Neste sistema, as cinco bombas solenóide podem ser acionadas simultânea ou individualmente, dependendo da programação. Esta programação é realizada através de uma interface PCL-711 Advantech, em linguagem Quick Basic 5.0, que seleciona cada bomba pelo seu respectivo “bit”, e a aciona através de um tempo fixo de 150 ms por uma fonte de 12 V, requerendo até 4,0 W e 0,32 A, dependendo do modelo.



**Figura 2. Diagrama de fluxos do sistema MP para a avaliação de suas características fluídicas.** S = solução colorida ( $0,0 - 50,0 \text{ mg l}^{-1}$  VBC) ou solução diluente ( $0,01 \text{ mol l}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ); B = reator (15 - 100 cm);  $P_i$  = bombas solenóide; z = final da linha de transmissão; x = ponto de confluência; D = espectrofotômetro (617 nm); F = frasco coletor de resíduos.

No interior desta bomba se encontra uma membrana solenóide, a qual é levantada

quando a bomba é acionada, aspirando a solução de interesse, e depois do tempo de 150 ms a bomba é desligada fazendo com que a membrana solenóide volte à sua posição inicial, gerando um pulso de volume fixo correspondente ao seu volume interno (Fig. 3). A frequência de pulsação (pulsos por segundo, Hz) corresponde ao inverso do período (tempo entre cada pulso gerado). Desta forma, para uma bomba de 8  $\mu\text{l}$  a frequência de pulsação de 2,0 Hz, a vazão corresponde a 0,96  $\text{ml min}^{-1}$ . Os valores de vazão para cada bomba utilizada neste trabalho de Tese estão descritas na Tabela 1.



**Figura 3. Representação do funcionamento da bomba solenóide.** On = acionamento da bomba; Off = desligamento da bomba; C = compartimento interno de volume fixo para onde a solução é aspirada.

As bombas solenóide utilizadas nestes experimentos compreendiam três modelos diferentes, com volumes fixos de pulso de 8 - 25 e 50  $\mu\text{l}$  e, de acordo com o manual do fabricante, estas podem gerar vazões máximas de 1,2 - 3,75 e 7,5  $\text{ml min}^{-1}$ , respectivamente. Para estes valores de vazões, o fabricante considera as incertezas volumétricas de  $\pm 2 \mu\text{l}$  para a bomba de 8  $\mu\text{l}$  e de  $\pm 3\%$  para as de 25 e 50  $\mu\text{l}$ . Devido à utilização das bombas solenóide em sistemas de análises em fluxo ser recente e ainda possuir muitas lacunas com relação ao seu funcionamento, foram realizados experimentos visando avaliar seu desempenho. Desta forma, medidas gravimétricas com água destilada ( $d = 1,004 \text{ g ml}^{-1}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (Atkins, 1990) foram realizadas para verificação da precisão volumétrica. A gravimetria foi selecionada por ser uma técnica que não necessita de métodos comparativos para sua validação e é amplamente utilizada como medida de calibração de vários equipamentos (European co-

operation for Accreditation, 2005). As medidas gravimétricas foram realizadas para cada bomba anteriormente à sua utilização, fixando-se um volume correspondente a 50 pulsos a uma frequência de 1,0 Hz; as incertezas foram expressas em desvio padrão relativo (%). Estes estudos também foram aplicados para a verificação da robustez das bombas solenóide em função da frequência de pulsação (0,25 a 8 Hz) e do tempo de uso (0 a 8 h). Estes experimentos foram realizados com as bombas solenóide fora do sistema de análises em fluxo, ou seja, sem a presença de um percurso analítico.

**Tabela 1. Valores de vazão correspondente a diferentes frequências de pulsação das bombas solenóide.**

Bomba solenóide ( $\mu\text{l/pulso}$ )	Frequência (Hz)	Vazão ( $\text{ml min}^{-1}$ )
8	0,5	0,24
	1,0	0,48
	3,0	1,44
25	0,5	0,75
	1,0	1,5
	3,0	4,5
50	0,5	1,5
	1,0	3,0
	3,0	9,0

As bombas eram ligadas a uma caixa com uma interface que possuía sete entradas, permitindo a utilização de até sete unidades ao mesmo tempo. O programa computacional desenvolvido permitia selecionar cada uma das bombas solenóide independentemente, bem como os números de pulsos e as frequências de pulsação desejadas (Tab.2). Isto permitiu uma maior flexibilidade na operação das bombas no sistema de análises em fluxo, podendo ser explorados diversas estratégias de amostragem, como amostragem binária (preenchendo  $B_1$  e  $B_2$  com o “bit” das respectivas bombas); zonas coalescentes (preenchendo  $B_1$  com a soma dos “bits” das respectivas bombas) e volume único (preenchendo  $B_1$  e  $B_2$  com os respectivos

“bits”), como exemplificado na Tabela 2. O tempo de acionamento das bombas solenóide poderia ser variado, mas fixou-se um tempo de 150 ms em  $T_2$  para a geração de um pulso, como orientado pelo fabricante. Para a variação em frequência de pulsação,  $T_1$  era modificado, representando assim a frequência de pulsação. Assim, para  $T_1 = 0,5$  s, uma frequência de 2,0 Hz era estabelecida. Os números de pulsos eram variados de acordo com o procedimento operacional, mas para estratégias como amostragem binária e zonas coalescentes, o número permaneceu constante.

**Tabela 2. Programação de acionamento das bombas solenóide.** Cada bomba inserida no sistema correspondia a um número de “bit”. Posição 1 (“bit” 1), 2 (“bit” 2), 3 (“bit” 4), 4 (“bit” 8), 5 (“bit” 16), 6 (“bit” 32), 7 (“bit” 64). Exemplos: Etapa 1 (amostragem binária), Etapa 2 (zonas coalescentes), Etapa 3 e 4 (inserção a volume único).

Etapa	$B_1$	$T_1$	$B_2$	$T_2$	N pulsos
1	2	0,5	4	0,15	5
2	6	0,5	0	0,15	5
3	2	0,5	0	0,15	5
4	4	0,5	0	0,15	5

Antes de qualquer procedimento analítico envolvendo o sistema MP, era necessário preencher com as respectivas soluções todas as bombas solenóide do sistema, para retirar o ar contido nelas e possíveis soluções interferentes. Após o preenchimento das bombas solenóide, a solução transportadora direcionava todas as soluções contidas no percurso analítico para o descarte, deixando apenas as linhas de transmissão, referente à saída das bombas solenóide até o ponto de confluência, preenchidas com as respectivas soluções. Desta forma, linhas de transmissão de até 5,0 cm foram utilizadas.

Para a verificação das potencialidades do sistema MP, como a flexibilidade e capacidade de homogeneização das soluções, utilizou-se o sistema descrito na Figura 2 que permitiu a operação de até cinco bombas solenóide, de forma individual ou simultânea, onde



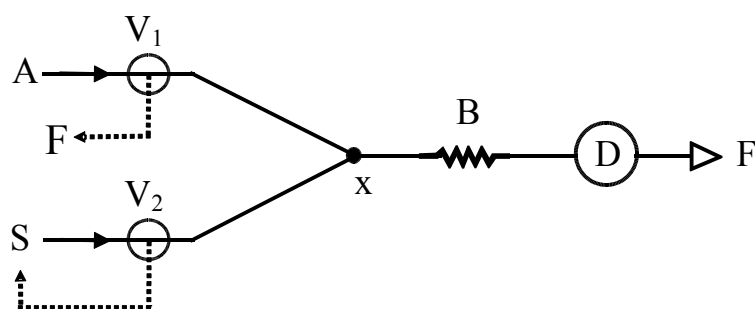
P<sub>1</sub> - P<sub>2</sub> - P<sub>3</sub> - P<sub>4</sub> e P<sub>5</sub> possuíam volumes de pulsos de 8 - 8 - 25 - 25 e 50 µl, respectivamente. Para isto, a estratégia “dye approach” (Ruzicka e Hansen, 1988) foi explorada, a qual consiste na inserção de uma solução colorida mimetizando a amostra para a visualização da sua dispersão/diluição ao longo do percurso analítico. Esta estratégia é bastante recomendada para um maior conhecimento das condições de mistura entre amostra e reagentes e para a localização da zona de amostra, resultando em uma visualização geral do sistema de análises em fluxo. Verde de bromocresol (VBC) preparado em uma solução-tampão de tetraborato de sódio (pH 9,0) foi selecionado. Para as soluções diluente e transportadora, a mesma solução-tampão foi empregada. Este corante foi monitorado a 617 nm e os resultados de dispersão/diluição foram verificados em função da magnitude do sinal analítico em absorbância. Soluções de 0,0 a 50,0 mg l<sup>-1</sup> VBC foram inseridas como amostra e o volume do corante foi variado em função do número de pulsos e do volume de pulso da bomba solenóide; os volumes das soluções diluentes também foram variados desta forma. O reator e a cubeta de fluxo foram mantidos nos seus mínimos volumes possíveis, 30 cm e 30 µl, respectivamente, para refletir o efeito de dispersão provocado apenas pelo fluxo pulsante e não pelo percurso analítico.

Para estudos de diluição, apenas uma bomba solenóide correspondia à amostra e as outras quatro bombas, a soluções diluentes; estudos com a inserção simultânea em confluência de duas ou mais bombas solenóide com volumes de 50 µl e de 8 µl foram realizados para a verificação da eficiência da “check-valve” localizada no interior da bomba, a qual possui função de não permitir a volta de soluções para seu interior. Neste experimento, foi possível também visualizar se ocorreu uma contaminação entre soluções no ponto de confluência.

A influência da impedância de um reator de 250 cm e de uma cubeta de fluxo de 120 µl foi avaliada em função da precisão volumétrica dos pulsos e foi comparada aos resultados

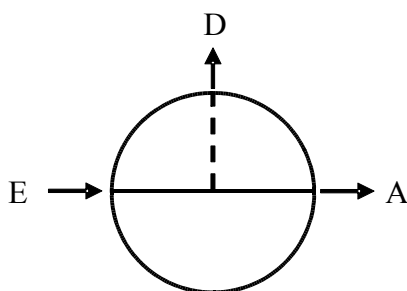
das medidas gravimétricas realizadas sem percurso analítico.

Como estratégia comparativa para os estudos de diluição/dispersão foi selecionada o sistema de análises em fluxo explorando multi-comutação, MC (Figura 4). Este sistema emprega válvulas solenóide de três vias que direcionam o fluxo constante proveniente de uma bomba peristáltica.



**Figura 4. Diagrama de fluxos do sistema MC.** A = solução colorida ( $0,0 - 50,0 \text{ mg l}^{-1}$  VBC); S = solução diluente ( $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ); B = reator (15 - 100 cm); V<sub>1</sub> e V<sub>2</sub> = válvulas solenóide; x = ponto de confluência; D = espectrofotômetro (617 nm); F = frasco coletor de resíduos.

As válvulas eram acionadas através do mesmo procedimento utilizado para as bombas solenóide (Tab.2), e os volumes dos “plugs” a serem inseridos no percurso analítico corresponderam à diferença do tempo de acionamento e desligamento da válvula (Fig.5) e a vazão de bombeamento da solução. Desta forma, para uma efetiva comparação com o sistema MP, o volume dos “plugs” foi calculado de forma a se obter o mesmo volume dos pulsos das bombas solenóide utilizadas no sistema MP. Para um volume de “plug” de  $8 \mu\text{l}$ , o intervalo de tempo correspondente à diferença entre T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> na programação (Tab. 2) foi ajustado para 0,6 s considerando uma vazão de  $0,8 \text{ ml min}^{-1}$ .



**Figura 5. Representação da válvula solenóide.** E = entrada de solução, A = saída de solução com a válvula acionada, D = saída de solução com a válvula desligada.

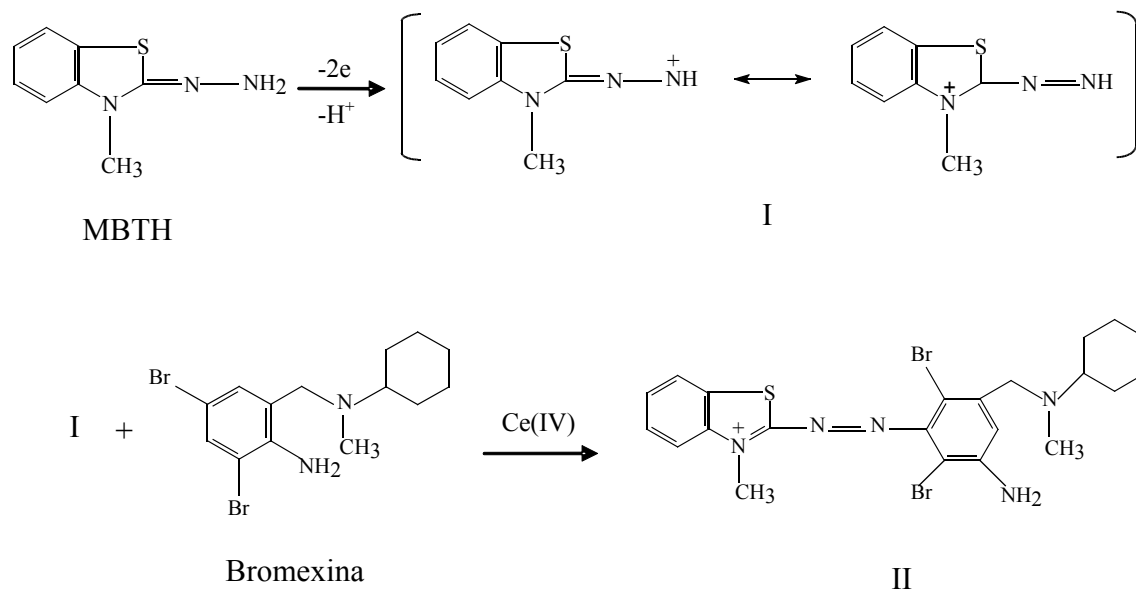
Para a avaliação comparativa entre os dois tipos de fluxo, todos os parâmetros físicos foram mantidos fixos, bem como os volumes de “plugs” e de pulsos das bombas solenóide. Para isto, 64  $\mu\text{l}$  (8 pulsos ou “plugs”) de 30,0  $\text{mg l}^{-1}$  VBC foram inseridos no percurso analítico, e depois transportados por um reator de 30 cm até o detector. As influências da vazão (0,1 a 6,0  $\text{ml min}^{-1}$ ) e do comprimento do reator (30 a 250 cm) também foram avaliadas nos dois sistemas.

#### 4.2. Determinação de bromexina em fármacos

O método espectrofotométrico para a determinação de bromexina em fármacos foi selecionado para a avaliação do fluxo pulsante do sistema MP por envolver reações químicas relativamente lentas quando realizado manualmente (30 min), e ainda por este método não ter sido implementado em um sistema de análises em fluxo.

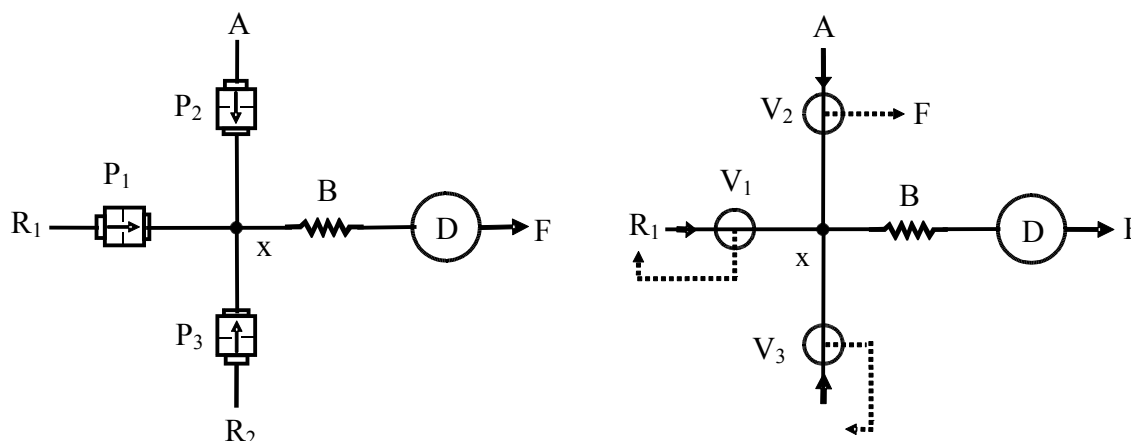
As reações englobam o acoplamento eletrofílico do reagente 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) com bromexina e posterior oxidação com Ce(IV) (Sawick, et al., 1961). Sob condições ácidas, MBTH perde dois elétrons e um próton, formando os compostos eletrofílicos em ressonância (I, Fig.6) que reagem com bromexina. O mecanismo destas reações (Fig.6) é fundamentado na literatura (Sawicki, et al., 1961; El-Kommos e Emara, 1987) e seu produto (II, Fig.6) foi considerado como a possibilidade mais

provável dentre diversos outros que poderiam ser formados. Este produto apresentou máxima absorção em 550 nm sob as condições deste trabalho.



**Figura 6. Mecanismo das reações envolvidas na determinação de bromexina.**

Os principais parâmetros reacionais foram avaliados empregando-se o sistema mostrado na Figura 7 (esquerda). Este sistema foi projetado objetivando simplicidade em automação analítica e eficiência na mistura reacional, permitindo um controle eficiente das etapas de amostragem, das condições de mistura e da detecção. Este sistema compreendia três bombas solenóide com volumes fixos de 8  $\mu\text{l}$  por pulso, as quais eram acionadas de forma a dirigir as correspondentes soluções para um único ponto de confluência, ligado ao percurso analítico e cubeta de fluxo. O volume de pulso referente às bombas solenóide e suas posições no módulo de análises foram selecionados em função do compromisso entre simplicidade, sensibilidade e repetibilidade. A frequência de pulsação, número de pulsos e estratégias de inserção de amostra e de reagentes foram estudados objetivando-se alta frequência analítica com baixo consumo de reagentes e sem perda em sensibilidade.



**Figura 7. Diagrama de fluxos dos sistemas MP (esquerda) e MC (direita) para determinação de bromexina.** A = amostra ( $0,0 - 250,0 \text{ mg l}^{-1}$  bromexina em água);  $R_1 = 7,5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ Ce(SO}_4)_2$  em  $0,36 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ;  $R_2 = 4,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ MBTH}$  em  $0,36 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ;  $P_1$  = bombas solenóide;  $V_i$  = válvulas solenóide; x = ponto de confluência; B = reator (50 cm); D = espectrofotômetro (550 nm); F = frasco coletor de resíduos.

Antes de iniciar o procedimento, todas as bombas solenóide eram acionadas para preenchimento de seu interior e das linhas de transmissão até o ponto de confluência. Após o preenchimento,  $P_1$  era acionada para a limpeza do percurso analítico e estabilização da linha de base. O procedimento analítico se iniciava com a inserção simultânea de 10 pulsos de A +  $R_2$  através do acionamento de  $P_2$  e  $P_3$ , a uma frequência de pulsação de 4,0 Hz, totalizando 20 pulsos (etapa 1). Em seguida,  $P_1$  era acionada (50 pulsos, 6,0 Hz) inserindo o agente oxidante e, ao mesmo tempo, transportando a mistura até o detector para obtenção do sinal analítico (etapa 2). Para a substituição de amostras (etapa 3), a solução desejada era aspirada para dentro da bomba e bombeada através do percurso analítico com o acionamento de  $P_2$  (15 pulsos, 6,0 Hz); logo em seguida,  $P_1$  era acionada realizando a limpeza do percurso analítico e estabilização da linha base (etapa 4). Os procedimentos operacionais do sistema estão descritos na Tabela 3.

As estratégias de amostragem foram avaliadas a partir do acionamento das bombas solenóide  $P_1$ ,  $P_2$  e  $P_3$  explorando zonas coalescentes, onde amostra e reagentes eram inseridos simultaneamente, e por amostragem binária onde pulsos de amostra e reagentes eram

inseridos alternadamente por um número de pulsos determinado e depois transportado ao detector. A inserção individual de uma única alíquota de amostra no fluxo transportador entre as duas alíquotas de reagentes também foi avaliada.

**Tabela 3. Procedimento para a determinação de bromexina.**

Etapa	Operação	Bomba solenóide (volume/pulso)	Pulsos (n)	Frequência (Hz)
1	Inserção da zona de amostra	P <sub>2</sub> (8 µl) + P <sub>3</sub> (8 µl)	10	4,0
2	Transporte ao detector e aquisição do sinal analítico	P <sub>1</sub> (8 µl)	50	6,0
3	Substituição de amostra	P <sub>2</sub> (8 µl)	15	4,0
4	Limpeza do percurso analítico	P <sub>1</sub> (8 µl)	50	6,0

Os volumes de pulso referente a cada solução foram avaliados substituindo as bombas solenóide de 8 µl pelas de 25 e 50 µl, considerando melhor homogeneização, repetibilidade e sensibilidade analítica. A influência do número de pulsos para a formação da zona de amostra foi avaliada entre 2 e 18 pulsos; e a frequência de pulsação de inserção de A + R<sub>2</sub> e do fluxo transportador (R<sub>1</sub>) foi variada de 0,5 a 6,0 Hz; bem como o número de pulsos para o transporte da zona de amostra até o detector. O comprimento do reator foi avaliado de 25 a 300 cm, sendo modificada em simultâneo ao estudo de volume de zona de amostra, objetivando-se nestes dois casos, frequência analítica e sensibilidade. A influência da concentração dos reagentes foi explorada, variando-se R<sub>1</sub> de 1,2 x 10<sup>-3</sup> a 5,0 x 10<sup>-2</sup> mol l<sup>-1</sup> Ce(IV) e R<sub>2</sub> de 5,0 x 10<sup>-4</sup> a 8,0 x 10<sup>-3</sup> mol l<sup>-1</sup> MBTH.

A influência da acidez do ambiente reacional foi avaliada variando-se a concentração de ácido sulfúrico em R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> de 0,09 a 1,44 mol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, uma vez que a solução transportadora era o próprio reagente oxidante. A influência da temperatura (18 a 40 °C) foi verificada empregando-se um banho termostatizado onde o reator era mantido imerso.

Para a verificação de suas condições de mistura, o sistema MP foi comparado ao sistema com fluxo constante estabelecido pela bomba peristáltica. Neste sentido, após o procedimento analítico ter sido otimizado, o mesmo foi implementado em um sistema de análises em fluxo explorando multi-comutação (Fig. 7, direita). Para não ocorrer mudanças nos parâmetros físicos, foi realizada a substituição das bombas solenóide pelas válvulas solenóide e bomba peristáltica na mesma configuração do sistema MP. Desta forma, apenas a unidade propulsora foi modificada, e o procedimento analítico foi mantido, seguindo as mesmas estratégias de amostragem, mesmos valores de vazão e número de pulsos. Para se igualar aos volumes de cada pulso das bombas solenóide, o volume dos “plugs” para as soluções direcionadas por  $V_2$  e  $V_3$  foi calculado para  $8 \mu\text{l}$ , fixando-se o tempo de acionamento da válvula solenóide em  $0,6 \text{ s}$  com uma vazão de  $0,8 \text{ ml min}^{-1}$  (Fig.5, item 4.1). Desta forma,  $V_2$  e  $V_3$  eram acionadas simultaneamente, inserindo 10 “plugs” de  $8 \mu\text{l}$  de cada solução no percurso analítico e, a seguir,  $V_1$  era acionada transportando a mistura até o detector. A bomba peristáltica neste sistema permanecia ligada, bombeando continuamente as soluções reagentes, sendo que para  $R_1$  e  $R_2$  era realizado um reciclo das soluções quando a válvula solenóide permanecia desligada. Para uma melhor comparação, os reagentes foram inseridos a “volume infinito” (Krug et al., 1981) para uma verificação mais geral da influência da unidade propulsora. A influência da vazão do fluxo transportador foi avaliada de  $0,5$  a  $6,0 \text{ ml min}^{-1}$ .

Após a otimização das variáveis envolvidas, o sistema MP foi aplicado à análise de fármacos e os resultados comparados com aqueles obtidos pelo método oficial da farmacopéia européia, a titulação potenciométrica (Pharmacopée Européenne, 1990).

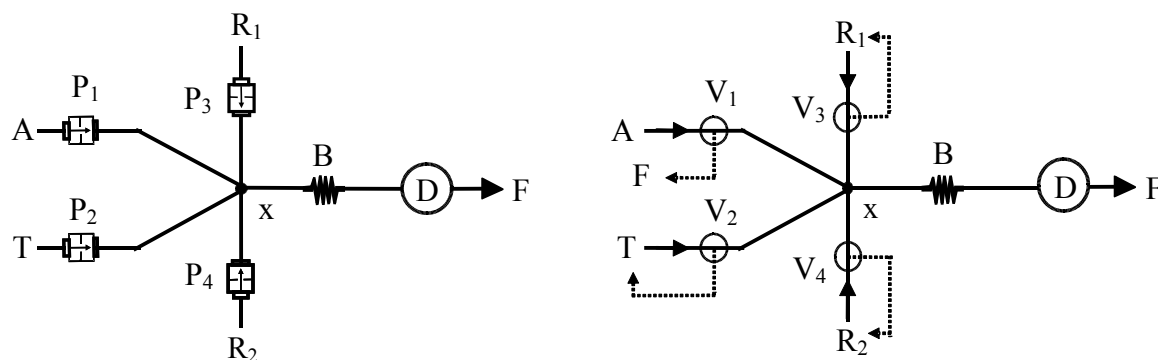
### **4.3. Determinação de fosfato em extratos de solos**

O método selecionado para a determinação de fosfato em extratos de solos

compreende a clássica reação de formação do azul de molibdênio (Dickman e Bray, 1940; Murphy, 1962), a qual já tem sido empregada desde a concepção do primeiro sistema de análises por injeção em fluxo (Ruzicka e Stewart, 1975). Esta reação foi escolhida devido à sua cinética reacional ser relativamente lenta e à sua ampla utilização nos mais diversos analisadores, resultando em uma metodologia bastante fundamentada e de fácil comparação. O método envolve inicialmente a formação do heteropoliácido fosfomolibdico (amarelo), resultante da reação do fosfato com Mo(VI) como heptamolibdato de amônio em meio ácido e, depois a redução dos heteropoliácidos com ácido ascórbico resultando no azul de molibdênio (Marckzenko, 1986). A estequiometria desta reação pode ser variada devido aos diferentes heteropoliácidos que podem ser formados entre Mo(VI) e fosfato, possibilitando a redução de até 6 elétrons equivalentes (van Staden e Taljaard, 1998). A reação de redução é a etapa determinante da velocidade reacional e seu melhor desenvolvimento ocorre em meio ácido. O azul de molibdênio possui máxima absorção na faixa de 650 - 850 nm (Motomizu e Li, 2005).

Este método foi implementado no sistema MP (Fig.8, esquerda) para a verificação da influência do fluxo pulsante na melhoria em sensibilidade analítica relativamente a um menor tempo reacional e menor consumo de reagentes. Como sistema comparativo, o sistema MC foi desenvolvido semelhantemente ao MP em todas as dimensões (Fig.8, direita). O sistema explorando fluxo pulsante compreendia quatro bombas solenóide, sendo três com volume de pulso de 8  $\mu$ l para A, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>, e uma de 25  $\mu$ l para a solução transportadora. O procedimento analítico envolvido está descrito na Tabela 4. Antes de seu início todas as bombas solenóide e linhas de transmissão eram preenchidas com as respectivas soluções reagentes e amostra. Após, a solução transportadora era inserida por um número adequado de pulsos a uma frequência de 6,0 Hz para limpeza e estabilização da linha base.





**Figura 8. Diagrama de fluxos do sistema MP (esquerda) e MC (direita) para a determinação de fosfato em extratos de solos.** A = 0,0 - 20,0 mg l<sup>-1</sup> P-PO<sub>4</sub> em Mehlich I (0,05 mol l<sup>-1</sup> HCl + 0,012 mol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); T = fluxo transportador (Mehlich I); R<sub>1</sub> = 5,0 x 10<sup>-3</sup> mol l<sup>-1</sup> heptamolibdato de amônio + 0,05 % (m/v) oxalato de potássio em 0,9 mol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; R<sub>2</sub> = 0,5 % (m/v) ácido ascórbico; x = ponto de confluência; P<sub>i</sub> = bombas solenóide; V<sub>i</sub> = válvulas solenóide; B = reator (50 cm); D = espectrofotômetro (617 nm); F = frasco coletor de resíduos.

Para a formação da zona de amostra, P<sub>1</sub> era acionada intercaladamente com P<sub>3</sub> + P<sub>4</sub> que eram acionadas em simultâneo, formando seções de amostra e reagentes (A/R<sub>1</sub>+R<sub>2</sub>) que foram inseridas em duplicata (etapa 1). Após a inserção da zona de amostra, as bombas solenóide P<sub>1</sub>, P<sub>3</sub> e P<sub>4</sub> eram desligadas e P<sub>2</sub> era acionada para transportar a mistura pelo reator até o detector (etapa 2). Para a substituição da amostra (etapa 3), P<sub>1</sub> era acionada 15 vezes para a inserção da nova amostra e depois P<sub>2</sub> a transportava em direção ao descarte passando pelo detector e realizando a limpeza do sistema (etapa 4).

**Tabela 4. Procedimento para a determinação de fosfato no sistema MP.**

Etapa	Operação	Bomba solenóide (volume/pulso)	Pulsos (n)	Frequência (Hz)
1	Inserção da zona de amostra	P <sub>1</sub> (8 µl)/ P <sub>3</sub> (8 µl) + P <sub>4</sub> (8 µl)	2	0,3
2	Transporte ao detector e aquisição do sinal analítico	P <sub>2</sub> (25 µl)	35	2,0
3	Troca de amostra	P <sub>1</sub> (8 µl)	15	6,0
4	Limpeza do percurso analítico e obtenção da linha base	P <sub>2</sub> (25 µl)	40	6,0

O sistema explorando multi-comutação desenvolvido para a comparação compreendia 4 válvulas solenóide de três vias que direcionavam as soluções de A, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> para o percurso analítico; estas soluções, com exceção da amostra, eram bombeadas continuamente por uma bomba peristáltica e, quando a válvula permanecia desligada, as soluções eram recicladas para o próprio frasco. Como descrito no item 4.1 os “plugs” foram mantidos como 8 µl, e para o fluxo transportador a vazão foi idêntica à utilizada no sistema MP. O procedimento analítico era análogo ao sistema com as bombas solenóide, as válvulas V<sub>1</sub>, V<sub>3</sub> e V<sub>4</sub> sendo acionadas na ordem V<sub>1</sub>/V<sub>3</sub>+V<sub>4</sub>, inserindo “plugs” de 8 µl, com duas repetições. Após a formação da zona de amostra, a válvula V<sub>1</sub> era acionada por 60 s e transportava a mistura até o detector e frasco coletor de resíduos. Desta forma, ambos os sistemas apresentaram as mesmas características físicas e temporais, com mudanças apenas na unidade propulsora de fluidos. As influências da vazão referente às duas unidades propulsoras foram avaliadas relativamente às condições de mistura, rapidez nas análises e consumo de reagentes.

Diferentes estratégias de amostragem tais como amostragem binária, zonas coalescentes e volume único foram exploradas. O volume total da zona de amostra também foi avaliado variando-se o número de pulsos e “plugs” de 2 a 10 para cada solução (48 a 240 µl de volume total). A frequência de pulsação do fluxo transportador e durante a inserção da zona de amostra no sistema MP foi avaliada de 0,3 a 4 Hz. Para o sistema MC, a vazão do fluxo transportador foi avaliada de 0,1 a 3,0 ml min<sup>-1</sup>. Espécies químicas interferentes em potencial foram testadas (item 3.2.3), bem como a adição de agentes mascarantes. Outros parâmetros, tais como concentração dos reagentes, pH e temperatura, não foram avaliados minuciosamente devido a esta reação já ter sido profundamente estudada e suas condições reacionais amplamente relatadas (Grassi et al., 2003; Estela e Cerda, 2005; Motomizu e Li, 2005). Desta forma, as melhores condições foram mantidas, em função de simplicidade e robustez, como pH reacional 1,5 e temperatura de 25°C mantida sob ar refrigerado. As

concentrações dos reagentes foram fixadas em  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  heptamolibdato de amônio +  $0,9 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  em  $R_1$  e em 0,5 % (m/v) de ácido ascórbico em  $R_2$ .

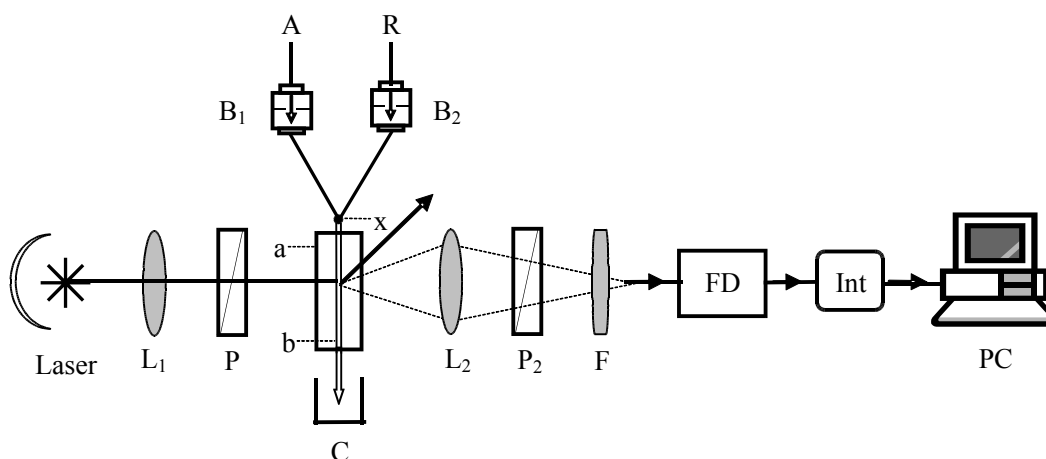
Após a otimização dos dois sistemas, as amostras de extratos de solos foram analisadas e os resultados comparados aos obtidos com o tradicional sistema de análises por injeção em fluxo. Este sistema é utilizado em rotina no Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho” (Zagatto et al., 1981).

#### **4.4. Visualização da amostra dispersa explorando PLF**

Para a visualização da dispersão da amostra do MP, o fluxo pulsante inerente às bombas solenóide foi explorado através da técnica de detecção de fluorescência induzida por “laser”, PLF (do inglês “Polarized Laser Fluorescence”), utilizando Rodamina B (RB) como amostra. As bombas solenóide foram empregadas no sistema explorando PLF desenvolvido previamente por Quintella et al. (2004) que visualizou a dispersão da amostra influenciada pelo posicionamento da cela em um sistema de análises em fluxo. A metodologia compreende a excitação da RB induzida por um feixe de “laser”, resultando na radiação de fluorescência que é analisada e quantificada em suas componentes vertical e horizontal, diferenciadas por um polarizador.

O sistema PLF está ilustrado na Figura 9. Previamente ao experimento, o feixe de “laser” (514,5 nm) era ajustado para incidir exatamente no ponto de início da leitura, ou seja, em uma extremidade do tubo (parede) por um conjunto de lentes  $L_1$  e por um polarizador  $P_1$  que garantia a polaridade vertical da radiação incidente. A cela de fluxo tubular correspondente ao tubo de borosilicato estava fixa em um suporte conectado a um motor de passo que proporcionava seu deslocamento. Um programa computacional QuickBasic 4.0, controlava o motor de passo e realizava a aquisição de dados. Uma varredura completa da cela de fluxo tubular foi realizada, iniciando-se na parede externa do mesmo e finalizando na

outra extremidade, resultando em um total de 40 pontos de incidência. No ponto de incidência o feixe de “laser” possuía uma área de  $0,031 \text{ mm}^2$  o que correspondeu a uma circunferência de  $0,01 \text{ mm}$  de raio.



**Figura 9. Diagrama do sistema de fluorescência induzida por “laser” polarizado.** Fonte de laser (514,5 nm);  $L_1$  e  $L_2$  = conjuntos de lentes;  $P_1$  e  $P_2$  = polarizadores; F = filtro óptico (550 nm); FD = fotomultiplicadora; Int = integrador; PC = microcomputador com interface; a = suporte do tubo; b = cela de fluxo tubular; x = ponto de confluência;  $B_1$  e  $B_2$  = bombas solenóide ( $8 \mu\text{l}$ ); A = solução  $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  RB; R = MEG; C = frasco coletor. Para detalhes, V. texto.

No início da varredura (primeiro ponto), o programa acionava a inserção simultânea de 10 pulsos de  $B_1 + B_2$  ( $160 \mu\text{l}$ ) no ponto de confluência x, que corresponde a solução de RB como amostra (A) e monoetileno glicol (MEG) como diluente. Após a inserção dos 10 pulsos, apenas  $B_2$  era acionada para limpar o percurso analítico. Em simultâneo ao acionamento das bombas solenóide, o programa iniciava a aquisição dos sinais referentes à fluorescência induzida, a qual era focalizada pela lente  $L_2$  para o polarizador  $P_2$  que coletava apenas a componente vertical. Após a análise em triplicata desta componente, posicionava-se o polarizador  $P_2$  na horizontal e realizavam-se mais três repetições. Essas duas medidas eram feitas em todos os pontos do tubo no sentido radial. A fluorescência discriminada pelo polarizador  $P_2$  era filtrada por F ( $\lambda = 550 \text{ nm}$ ) para bloquear a radiação incidente do “laser”, e atingia uma válvula fotomultiplicadora (FD) para transformação em corrente elétrica que era

integrada e enviada ao computador. Os dados obtidos eram arquivados para posterior tratamento.

Cinco experimentos para visualização da dispersão da amostra foram realizados, com o tubo na posição horizontal e na vertical. Desta forma, a influência da ação da gravidade pôde ser avaliado. Inicialmente, o tubo era posicionado na horizontal e o fluxo pulsante era estabelecido inserindo-se 10 pulsos de RB + MEG (160  $\mu$ l) a uma freqüência elevada (3,0 Hz) que corresponde ao primeiro experimento ( $E_1$ ). No segundo experimento ( $E_2$ ) estas condições foram mantidas, porém a freqüência foi reduzida para 0,5 Hz. No terceiro experimento ( $E_3$ ) um reator de 60 cm foi inserido entre o ponto de confluência e o tubo, para a visualização da dispersão da amostra após um percurso analítico fechado e sob pressão; com uma freqüência de pulsação de 3,0 Hz. Para os dois últimos experimentos ( $E_4$  e  $E_5$ ) o tubo foi posicionado na vertical e inseriram-se 10 pulsos de RB + MEG com freqüências de 3,0 Hz e 0,5 Hz, respectivamente. Em todos os experimentos o “laser” era incidido na mesma distância em relação à saída da confluência.

O tratamento dos dados consistiu basicamente em transformar os sinais de fluorescência adquiridos de suas componentes horizontal e vertical em um modelo. Através do programa Origin 6.0, foi possível montar uma matriz para cada experimento (Quintella et al., 2004). Os resultados analíticos foram transformados em gráficos de variação temporal da distribuição radial da concentração de RB e em gráficos da variação temporal da concentração de RB monitorada em três linhas de fluxo (parede, intermediário e centro do tubo). Estes gráficos foram analisados e retirados seus principais parâmetros analíticos, tais como largura do pico a meia altura (W) que define o comportamento da amostra em função do tempo, e a dispersão ( $D = C_0/C$ ) que define a relação da concentração da amostra inicial ( $C_0$ ) com a concentração da amostra dispersa (C).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Desempenho das bombas solenóide

A inserção de reagentes e de amostra pelas bombas solenóide constituintes do sistema MP proposto se mostrou muito simples, rápida e eficiente. De uma forma abrangente, a mistura entre as soluções já se inicia no ponto de confluência e pode ser melhorada durante o percurso analítico até o detector. Com estas características, o diagrama de fluxos pode ser bastante simplificado em seus parâmetros físicos. Como o volume dos pulsos e a frequência de pulsação desempenham um papel fundamental na admissão de todas as soluções envolvidas, a exatidão e a precisão dos volumes providos pelas bombas solenóide se constituem em aspectos muito importantes a serem considerados no projeto do sistema. Desta forma, antes de as bombas solenóide serem empregadas no sistema de análises em fluxo, a exatidão e precisão dos volumes envolvidos foram avaliadas para diferentes volumes de pulso e frequências de pulsação. A precisão dos volumes envolvidos foi expressa em termos de desvio padrão relativo (d.p.r.), e a exatidão, em termos de o erro relativo (e.r.), calculado como a diferença entre o valor esperado (teórico) e o mensurado (experimental), conforme preconizado por Skoog et al. (2002).

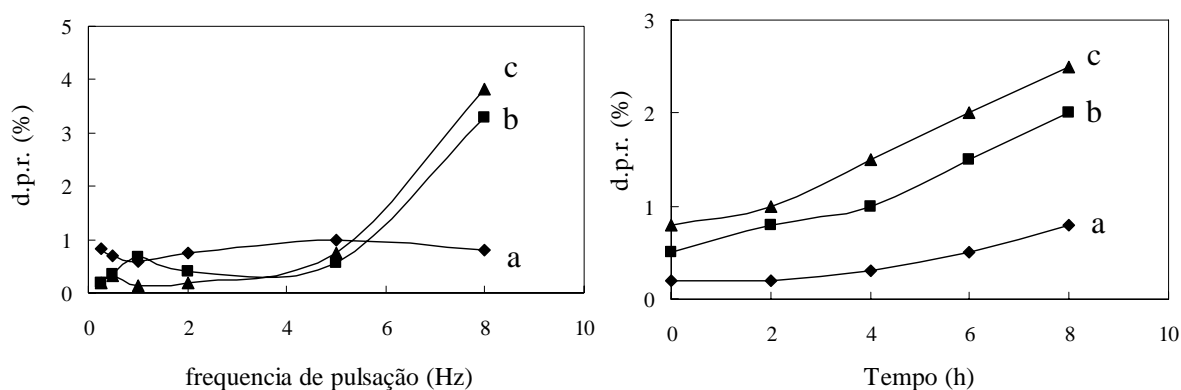
Observou-se uma boa precisão das medidas volumétricas (Tab. 5), pois o d.p.r. se situou dentro da margem de erro prevista pelo fabricante (d.p.r.<sub>fab</sub>), que corresponde a 3,0 % para as bomba solenóide de 25 e 50  $\mu$ l, e o valor correspondente à bomba solenóide de 8  $\mu$ l não sendo informado (BioChem Valve, 2005). Com relação à exatidão, os erros relativos se apresentaram baixos, conforme mostra a Tabela 5, o que demonstra a alta confiabilidade na utilização destas bombas solenóide. Deve-se salientar que estes valores de e.r. se referem a um curto período de tempo de utilização (< 2 h) e a uma frequência de pulsação relativamente baixa (1,0 Hz).

**Tabela 5. Precisão e exatidão referentes aos volumes providos pelas diferentes bombas solenóide.** Valores se referem a 50 pulsos de água destilada a uma frequência de 1,0 Hz, para três repetições.

Volume de pulso ( $\mu\text{l}$ )	Gravimetria ( $\mu\text{l}$ )	d.p.r. (%)	Teórico ( $\mu\text{l}$ )	(d.p.r.) <sub>fab</sub> (%)	e.r. (%)
8	402 $\pm$ 4	0,57	400	-	0,5
25	1242 $\pm$ 4	0,31	1250	3,0	-0,6
50	2562 $\pm$ 6	0,25	2500	3,0	2,5

Para averiguação da precisão e exatidão das bombas solenóide quando aplicadas em análises de rotina, as mesmas foram acionadas durante um período de 8 h a uma frequência de 4,0 Hz e a mensuração dos volumes correspondentes a 50 pulsos foi realizada por gravimetria em intervalos de 2 h, com três repetições (Fig. 10, direita). Observaram-se aumentos em d.p.r. para maiores tempo de utilização, mas os valores relatados pelo fabricante não foram superados. Com relação à exatidão, apenas a bomba de 50  $\mu\text{l}$  apresentou um erro relativo maior do que o preconizado (e.r. > 5,0 %). Isto provavelmente ocorreu devido ao seu maior consumo de energia provocar um aquecimento no solenóide para maiores períodos de tempo de utilização, prejudicando seu funcionamento, o que se reflete diretamente na exatidão.

Outro parâmetro que influenciou a precisão volumétrica das bombas solenóide foi a frequência de pulsação, a qual foi avaliada como descrito no item 4.1. Variações deste parâmetro não resultaram em alterações pronunciadas na repetibilidade, para frequências até 5,0 Hz (d.p.r. < 1,5 %) para todas as bomba solenóide testadas. Acima desta frequência apenas a bomba solenóide de 8  $\mu\text{l}$  apresentou boa repetibilidade (d.p.r. < 1,0 %), já com as de 25 e 50  $\mu\text{l}$  uma piora (d.p.r. > 3,0 %) foi observada (Fig. 10, esquerda). Isto também se deve ao aquecimento interno do solenóide influenciar no desempenho destas unidades propulsoras.



**Figura 10. Influência da frequência de pulsação (esquerda) e do tempo de operação (direita) das bombas solenóide na precisão volumétrica.** Curvas a, b e c correspondem a volumes de pulsos de 8, 25 e 50  $\mu\text{l}$ . Medidas realizadas em triplicata.

As medidas gravimétricas descritas acima foram realizadas com as bombas solenóide fora do sistema analítico, pois o percurso analítico e cela de fluxo poderiam proporcionar uma pressão hidrodinâmica contrária e interferir no volume de pulso a ser inserido. Para esta verificação, os volumes de água bombeados foram gravimetricamente avaliados, sendo o frasco coletor colocado ou imediatamente após o bombeamento (ponto z – Fig. 2), ou após um percurso analítico de 250 cm e uma cela de fluxo de 120  $\mu\text{l}$  (F - Fig. 2). Pouca influência foi observada na exatidão dos volumes (e.r. < 1,5%), mesmo para a bomba solenóide de 8  $\mu\text{l}$ , que apresentou e.r. < 0,8 %. Entretanto, foram notadas alterações no modo como o líquido saía da tubulação em direção ao frasco coletor, em função da variação de pressão hidrodinâmica.

Em geral, o líquido atingia o frasco coletor em forma de jatos de solução, cada um correspondendo a uma pulsação da bomba solenóide. O estabelecimento destes jatos se deve à súbita pressão hidrodinâmica correspondente à alta velocidade linear média do fluxo durante a etapa de admissão do volume de pulso no sistema. Este efeito determinava ainda a movimentação das linhas de transmissão e do conector x (Fig. 2) a cada pulso gerado, sendo mais evidente para menores percursos analíticos. Para um percurso analítico de 250 cm, incluindo ainda a cela de fluxo de 120  $\mu\text{l}$ , a pressão dos jatos foi amenizada, resultando em



um gotejamento semelhante àquele observado para fluxos constantes. Deve-se salientar que, em menor extensão, este efeito tem sido observado em relação a bombas peristálticas empregadas sob condições de maiores pressões hidrodinâmicas. Como estas bombas operam de forma contínua, em geral ocorre rompimento nos conectores após o estabelecimento da movimentação das linhas de transmissão. No caso de bombas solenóide, rompimento do percurso analítico não é em geral observado por existir um intervalo de tempo durante o qual não ocorre bombeamento, o que permite acomodação de pressão.

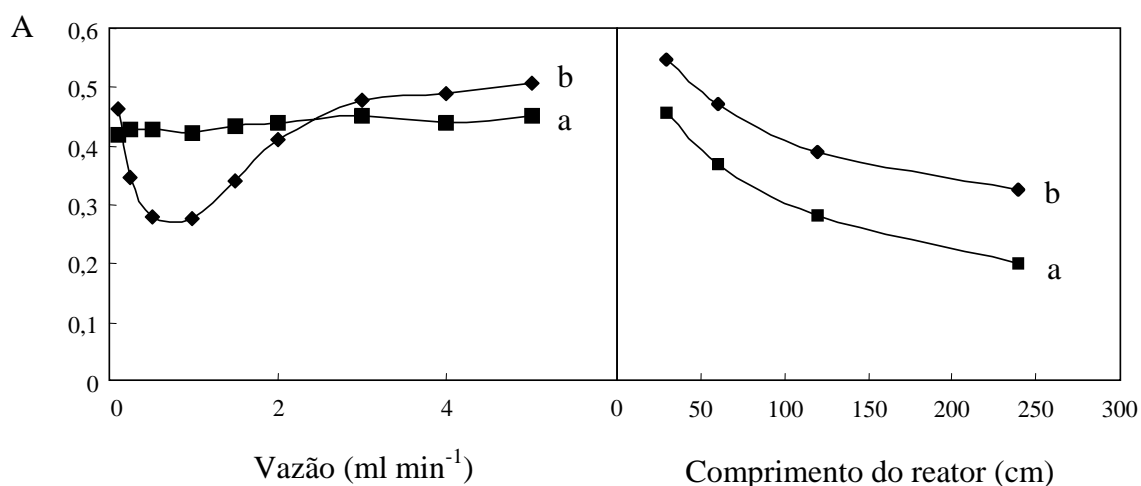
O efeito acima mencionado (ocorrência de jatos de soluções) é em geral benéfico para as condições de mistura das soluções. Desta forma, as linhas de transmissão entre a saída da bomba solenóide e o ponto de confluência devem ser as menores possíveis.

O efeito foi mais relevante em relação às bombas solenóide de 25 e 50  $\mu\text{l}$  acionadas simultaneamente. Entretanto, a pressão resultante não prejudicou a inserção de pulsos de 8  $\mu\text{l}$ , o que foi verificado inserindo-se individual ou simultaneamente a solução colorida no ponto de confluência. Contaminação entre as soluções confluentes também não foi observada resultando em uma eficácia da “check-valve”, cujo objetivo é evitar o retorno das soluções para o interior da bomba solenóide.

Com a inserção simultânea de uma solução colorida e um diluente em confluência empregando-se bombas solenóide um tipo de mistura caótica foi estabelecido, onde as soluções se movimentavam de maneira desordenada, efeito este bastante distinto relativamente ao emprego de fluxo constante. Neste sentido, avaliou-se a homogeneização das soluções no ponto de confluência estudando-se a influência da frequência de pulsação e do comprimento do reator na dispersão de uma solução colorida. Como método comparativo, o sistema MC foi também utilizado (Fig. 4, item 4.1). Todos os parâmetros físicos foram mantidos para ambos os sistemas, à exceção da unidade propulsora.

Com relação à influência da frequência de pulsação, nenhuma variação em magnitude

do sinal analítico foi observada relativamente ao sistema MP (Fig.11, esquerda) para as vazões estudadas (0,1 a 6,0 ml l<sup>-1</sup>). Neste sentido, o tempo de condicionamento da amostra dentro do percurso analítico não influenciou na dispersão da solução corante quando o fluxo pulsante foi aplicado. Isto pode ser explicado pelo fato de este fluxo prover uma rápida homogeneização das soluções já no ponto de confluência, e a parada do fluxo entre cada pulso durante o transporte no percurso analítico não influir na dispersão. A influência quase desprezível do tempo de parada na dispersão pode ser explicada considerando-se que a dispersão é resultado da ação conjunta da convecção e da difusão (Vanderslice et al., 1986; Ruzicka e Hansen, 1988) e que a convecção cessa durante a parada do fluxo.



**Figura 11. Influência da vazão (esquerda) e do comprimento do reator (direita) na dispersão da solução de VBC.** A Figura se refere à inserção de 8 pulsos de 30,0 mg l<sup>-1</sup> VBC nos sistemas MP (a) e MC (b).

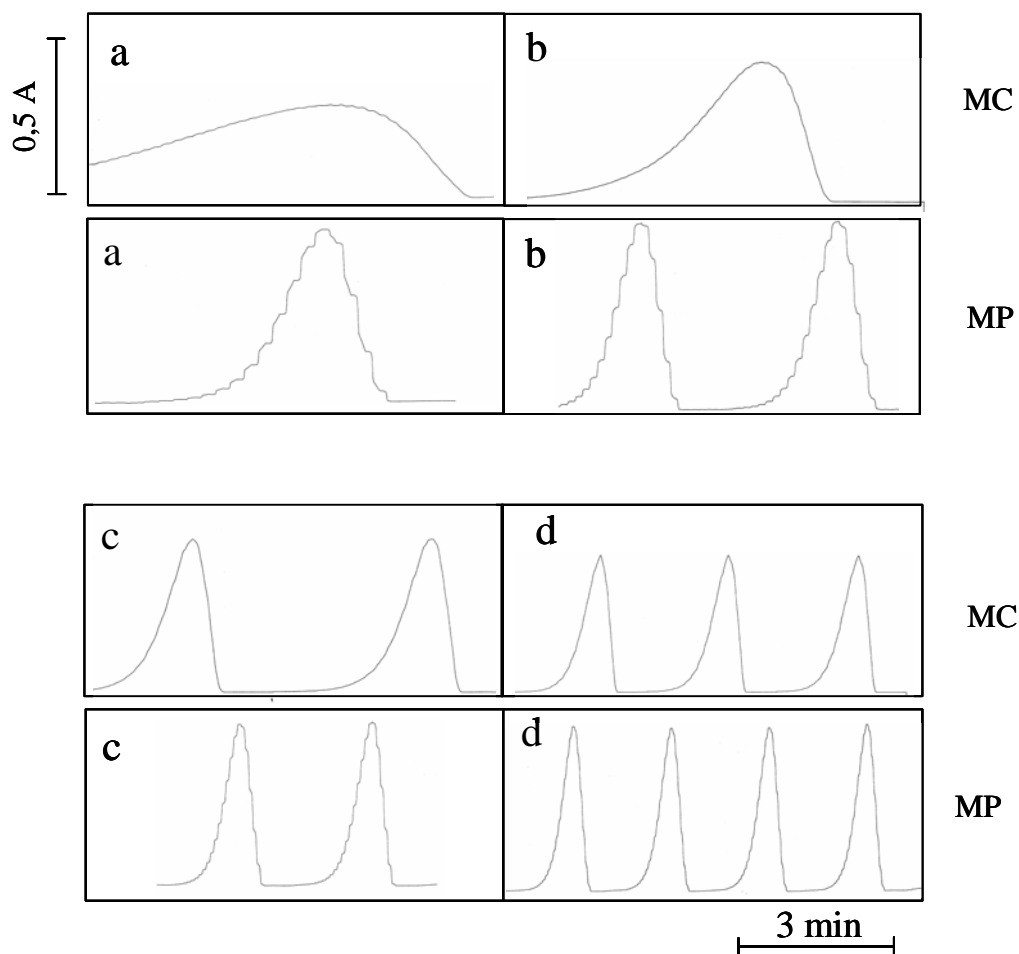
A baixa influência da frequência de pulsação na dispersão (Fig. 11, esquerda) pode ser exemplificada para vazões muito baixas como 0,1 ml min<sup>-1</sup>, que corresponde a uma frequência de pulsação de 0,2 Hz para a bomba solenóide de 8 µl, ou seja, uma parada entre pulsos de 5 s. Neste período o transporte dos elementos de fluido é mínimo, dependente apenas dos processos difusivos; como não há reação química envolvida, a dispersão se torna dependente apenas do número de pulsos e do volume de pulso, no caso constante. Este

resultado confirma que a dispersão ocorre mais efetivamente quando a zona de amostra está em movimento através do percurso analítico, e praticamente cessa quando a zona de amostra é parada. O processo de dispersão neste sistema se torna então dependente do número de pulsos que é proporcional a distância percorrida. É interessante observar que a ausência de dispersão durante o período entre pulsos das bombas solenóide já foi relatada quando as estratégias “stopped-flow” (Ruzicka e Hansen, 1979) e injeção hidrodinâmica (Zagatto et al., 1986a) foram implementadas em sistemas de análises por injeção em fluxo. A parada no fluxo entre cada pulso é inerente ao sistema MP, e pode ser claramente notada nos registros dos sinais analíticos para uma solução colorida (Fig. 12).

Com relação ao sistema com fluxo constante, observou-se um valor de vazão correspondente à mínima dispersão da amostra, o que foi também relatado para sistemas de análises por injeção em fluxo (Ruzicka e Hansen, 1979; Ruzicka e Hansen, 1988). Assim, quando a vazão foi aumentada até  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ , uma diminuição do sinal analítico foi observada; com um aumento da vazão para valores acima daquele, ocorreu uma dispersão menos pronunciada (Fig. 11, esquerda). Estes resultados demonstram uma maior influência da variação temporal no deslocamento dos elementos de fluido no fluxo constante, já demonstrados em muitos modelos matemáticos devido à sua característica de regime de escoamento laminar (Vanderslice et al., 1981). A dispersão sob fluxo constante se mostrou mais dependente da vazão quando esta era menor do que  $3,0 \text{ ml min}^{-1}$ . Sob fluxo laminar, a presença de lâminas vizinhas escoando a diferentes velocidades lineares leva a uma dispersão axial maior relativamente ao sistema MP. Neste sentido, os picos resultantes do sistema MP não apresentaram um alargamento tão grande quanto os do MC, salientando as diferenças destes dois tipos de fluxos (Fig. 12).

Para a avaliação da influência do comprimento do reator na dispersão do corante (30, 150 e 250 cm), fixou-se a vazão da solução transportadora em  $2,2 \text{ ml min}^{-1}$ . A dispersão do

corante no sistema MP aumentou com o percurso analítico, sendo este efeito mais pronunciado relativamente ao sistema MC (Fig.11, direita). Este fato pode ser explicado considerando-se que o fluxo pulsante possibilita uma excelente homogeneização em virtude de suas características de escoamento. Este efeito foi observado para todos os comprimentos de reator testados.



**Figura 12. Influência da vazão nos sinais de VBC.** A Figura se refere a inserção de  $30,0 \text{ mg l}^{-1}$  VBC nos sistemas MP e MC (Figs. 2 e 4); a, b, c e d correspondem a vazões de  $0,7$ ,  $1,4$ ,  $2,7$  e  $4,6 \text{ ml min}^{-1}$  com um reator de  $30 \text{ cm}$ .

A flexibilidade das bombas solenóide em um sistema MP permitiu a implementação eficiente de diferentes estratégias de amostragem sem a necessidade de mudanças na arquitetura do módulo de análises. Desta forma, estratégias tais como amostragem binária (Reis et al., 1994), zonas coalescentes (Carneiro et al., 2002b) e amostragem em volume único

foram estudadas empregando-se solução colorida como amostra. A dispersão da zona de amostra para as três estratégias foi similar, não ocorrendo variações pronunciadas na largura e altura dos picos registrados. Desta forma, as interações amostra/fluxo transportador inerentes a estas diferentes estratégias de amostragem podem ser melhor verificadas quando o sinal monitorado depender da ocorrência de uma reação química em linha, como descrito no item a seguir.

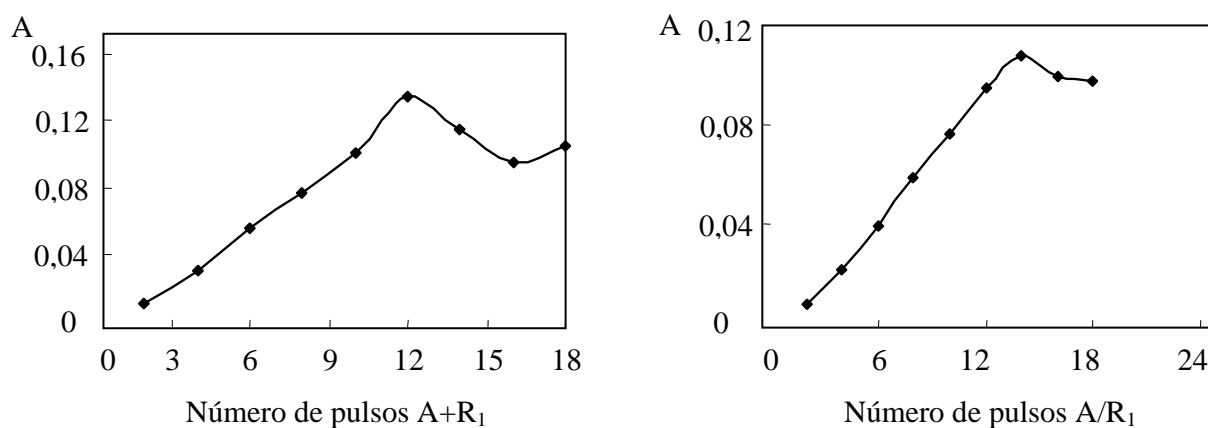
Como um compromisso entre precisão e exatidão analíticas, a frequência de pulsação foi selecionada como até 5,0 Hz para as bombas de 25 e 50  $\mu\text{l}$  e até 10 Hz para a de 8  $\mu\text{l}$ . Entretanto, sob condições de análises de rotina, frequências mais baixas devem ser usadas para bombas de 8  $\mu\text{l}$  (até 5,0 Hz). Nestas condições, erros relacionados com o tempo de operação se encontraram dentro do intervalo indicado pelo fabricante. A utilização das bombas solenóide em sistemas portáteis já se encontram em desenvolvimento e os resultados obtidos por Rocha et al. (2005) se mostraram bastantes confiáveis para seu acionamento por um longo período.

## **5.2. Determinação espectrofotométrica de bromexina**

Inicialmente, testes em “batch” envolvendo a variação da ordem de adição dos reagentes, agitação mecânica e obtenção de espectros do produto reacional formado foram realizados. Verificou-se que a formação do produto depende de ambos os fatores relacionados à mistura dos reagentes e o comprimento de onda correspondente à máxima absorção foi o de 550 nm. Maior sensibilidade foi verificada quando MBTH era misturado primeiramente com a amostra, e depois com o agente oxidante Ce(IV). Nestas condições, o tempo para se obter a formação quantitativa do produto colorido foi de 10 min sem agitação. Com agitação manual o tempo diminuía para 5 min, o que fez desta reação um excelente exemplo para a verificação das potencialidades das bombas solenóide no sistema de análises em fluxo envolvendo

reações químicas relativamente lentas.

A implementação desta reação no sistema MP teve início com aplicação de diferentes estratégias de amostragem, tais como amostragem binária, zonas coalescentes e volume único, as quais realizavam a inserção intercalada, simultânea e seqüencial de A e R<sub>2</sub>, respectivamente. Para as três estratégias, os números de pulsos de A e R<sub>2</sub> foram variados de 2 a 18 (32 a 288 µl de zona de amostra), os quais eram inseridos no percurso analítico no ponto de confluência x (Fig.7, esquerda) e posteriormente misturados com R<sub>1</sub> durante a passagem pelo reator. As estratégias de amostragem binária e de zonas coalescentes apresentaram boa capacidade de homogeneização até 14 pulsos, e para esta última, um maior sinal analítico foi observado. Após esse valor, houve uma diminuição em magnitude do sinal analítico resultando em picos duplos característicos de mescla deficiente entre as zonas reagentes envolvidas (Fig.13). Como o comprimento do reator foi mantido em 50 cm, a condição selecionada para a continuidade do trabalho foi a inserção de 10 pulsos de A+R<sub>2</sub> explorando zonas coalescentes, como um compromisso com sinal analítico e consumo de reagentes. Esta estratégia levou à melhor repetibilidade analítica (d.p.r. < 0,8%) com relação à amostragem binária (d.p.r. < 1,5%).



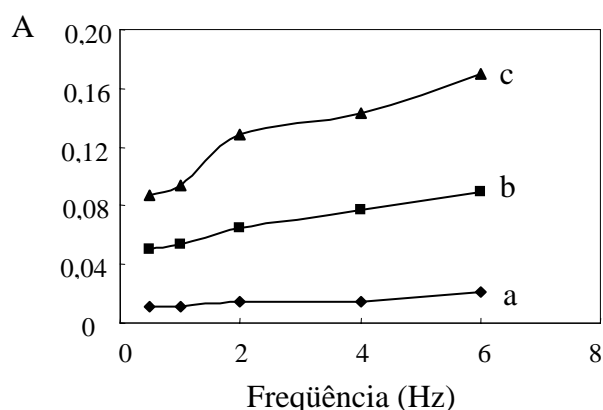
**Figura 13. Influência do volume da zona de amostra.** A figura se refere a 100,0 mg l<sup>-1</sup> bromexina introduzida por amostragem binária (direita) ou explorando zonas coalescentes (esquerda) nos sistema MP (Fig.7, esquerda).

Para a estratégia explorando volume único, a amostra foi inserida semelhantemente ao sistema com alça de amostragem de um sistema de análises por injeção em fluxo. Neste experimento, a seqüência  $R_2/A/R_2$  foi estabelecida e os números de pulsos de amostra e de reagentes foram variados. Entretanto, aplicação desta estratégia resultou em má interação amostra/reagentes já com um baixo volume de zona de amostra (80  $\mu$ l), verificando-se o estabelecimento de picos duplos quando o reator de 50 cm era empregado. Melhorias nesta condição foram observadas quando reatores maiores foram empregados (> 100 cm), porém a freqüência analítica era comprometida. Desta forma, a melhor condição de trabalho para esta reação foi a exploração de zonas coalescentes entre A e  $R_2$  (10 pulsos) que eram inseridas no percurso analítico preenchido com a solução transportadora que também realizava o papel de reagente oxidante.

Desta forma, o reagente  $R_1$  foi mantido como solução transportadora. A decisão de se utilizar o reagente oxidante como solução transportadora foi devido a uma maior simplificação do sistema e ao fato de a sensibilidade analítica ser bastante dependente da ordem de adição das soluções. Para isto, foi desenvolvido um sistema com uma bomba adicional de 8  $\mu$ l para a propulsão de uma solução transportadora a 0,36 mol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, que também foi ligada ao ponto de confluência. As três estratégias de amostragem acima descritas foram aplicadas nesta situação, bem como a variação do número de pulsos. Dentre as três estratégias aplicadas, apenas a de volume único apresentou resposta em sinal analítico, porém com menor magnitude relativamente ao experimento anterior (com  $R_1$  na solução transportadora). Com a inserção de mais uma bomba de mesmo volume de pulso no ponto de confluência, a amostra foi diluída, comprometendo o desenvolvimento reacional. Entretanto, mesmo com um aumento no número de pulsos, não houve melhoria em magnitude do sinal, devido provavelmente à ordem de adição das soluções ser um fator importante para o desenvolvimento desta reação.

Para os experimentos acima envolvendo as diversas estratégias de amostragem foram utilizadas bombas com volume de pulsos de 8  $\mu\text{l}$  ( $P_1$ ,  $P_2$  e  $P_3$ , Fig.7) para as três soluções, objetivando-se uma melhor homogeneização das soluções com menor volume de pulso. Outros volumes como 25 e 50  $\mu\text{l}$  poderiam ter sido utilizados, porém com estes volumes de pulsos, um reator mais longo era necessário para efetuar uma adequada homogeneização para zonas de amostra acima de 2 pulsos para cada solução. Desta forma, como um compromisso entre consumo de reagentes, homogeneização das soluções e frequência analítica todas as bombas foram de 8  $\mu\text{l}$  por pulso.

Como a solução reagente  $R_1$  obteve também a função de solução transportadora, a influência da frequência de pulsação (vazão) foi avaliada de 0,5 a 6 Hz, resultando em sinais analíticos bastante semelhantes até 2,0 Hz. Entretanto, acima deste valor observou-se um aumento na magnitude do sinal analítico, resultando em melhores condições reacionais com maiores frequências de pulsação (Fig.14). Estes resultados foram concordantes com aqueles realizados em “batch”, o que demonstra a melhoria no desenvolvimento reacional através da agitação mecânica. Neste sentido, com o aumento da frequência de pulsação, um aumento na agitação dos elementos de fluido foi observado, ocasionando melhor interação entre as espécies químicas envolvidas. Desta forma, a frequência de 6,0 Hz foi selecionada.



**Figura 14. Influência da frequência de pulsação da solução transportadora.** A figura se refere à inserção de 10 pulsos de  $A+R_2$  no sistema da Fig.7, a b e c correspondem a 0, 100 e 200  $\text{mg l}^{-1}$  bromexina.



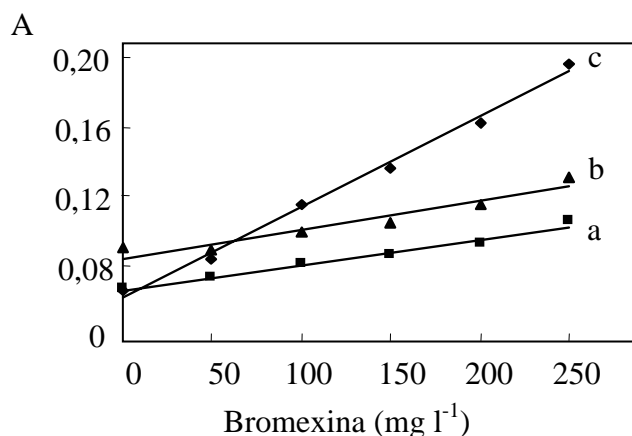
O comprimento do reator foi avaliado de 25 a 300 cm, resultando em uma leve diminuição do sinal analítico com o aumento do reator, sendo então selecionada o mais curto como um compromisso com a frequência analítica.

Para se obter mais informações referentes à cinética reacional, aplicou-se a estratégia de "stopped-flow" (Ruzicka e Hansen, 1979), parando-se a bomba P<sub>1</sub> do transportador quando o pico máximo era atingido. Observou-se um sinal analítico crescente a partir de 10 min, resultando em uma reação relativamente lenta. Com a parada de fluxo realizada no reator, pouca melhoria em sensibilidade foi notada, demonstrando então que esta reação não é afetada por um efeito difusivo dos elementos de fluido e sim pela agitação provocada pelo fluxo pulsante. Isto foi também comprovado quando os reagentes foram propulsionados a "volume infinito" descrito a seguir.

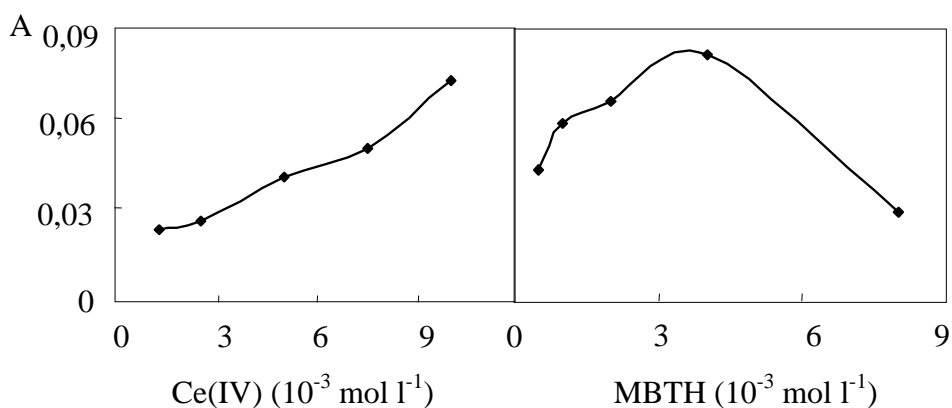
Com relação à acidez do ambiente reacional, a concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi variada de 0,09 a 1,44 mol l<sup>-1</sup> em R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> (Fig.15) e já no preparo de soluções observou-se uma precipitação de sulfato de cério (IV) em menores concentrações (0,09 e 0,18 mol l<sup>-1</sup>) inviabilizando o estudo nesses valores. Acima de 0,20 mol l<sup>-1</sup> (0,36 e 0,72 mol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), foi possível solubilizar totalmente o sulfato de cério (IV) e empregar no sistema MP, obtendo-se melhores resultados analítico com 0,36 mol l<sup>-1</sup> (r = 0,995, n=3). Acima de 0,5 mol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a elevada acidez torna a reação mais lenta, diminuindo o sinal analítico, resultando também em efeito Schlieren pronunciado (Dias et al., 2006).

Quanto à concentração de R<sub>1</sub>, esta foi variada entre 1,2 x 10<sup>-3</sup> e 5,0 x 10<sup>-2</sup> mol l<sup>-1</sup>, e observou-se a formação de precipitado de sulfato de cério (IV) para concentrações acima de 2,0 x 10<sup>-2</sup> mol l<sup>-1</sup>. Abaixo deste valor, houve resposta linear apenas nas concentrações entre 7,5 x 10<sup>-3</sup> e 10 x 10<sup>-3</sup> mol l<sup>-1</sup> (r > 0,997, n = 3), as quais resultaram em adequados valores de absorvância, sendo então selecionado o menor valor (Fig.16, direita). Sob condições mais amenas (< 7,5 x 10<sup>-3</sup> mol l<sup>-1</sup>) a pouca quantidade de reagente não permitiu um bom

desenvolvimento reacional ( $r < 0,710$ ,  $n = 3$ ). Com relação à concentração de  $R_2$ , o sinal analítico aumentou até  $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  MBTH e então diminuiu pronunciadamente, resultando esta condição a mais apropriada (Fig. 16, esquerda).

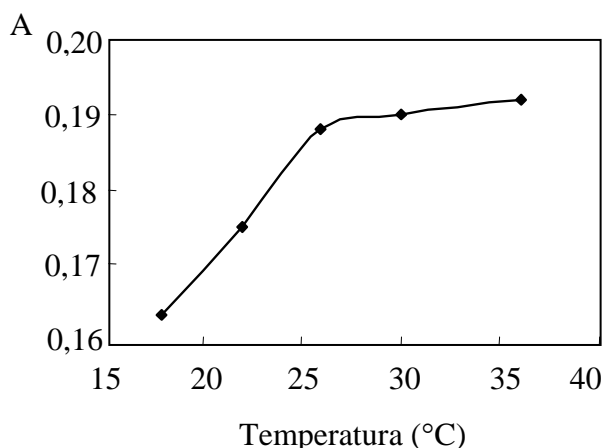


**Figura 15. Influência da concentração do ácido sulfúrico.** A figura se refere à inserção de 10 pulsos de  $A+R_1$  no sistema da Fig.3; a, b e c correspondem a 0,72, 0,50 e 0,36  $\text{mol l}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  em  $R_1$  e  $R_2$ , respectivamente.



**Figura 16. Influência da concentração dos reagentes Ce(IV) e MBTH.** A figura se refere a inserção de 10 pulsos de  $100,0 \text{ mg l}^{-1}$  bromexina no sistema da Fig.7.

A temperatura reacional foi aumentada de 18 a 60 °C, resultando em uma leve melhora de sinal analítico até 30 °C e depois estabilizando (Fig.17). Deste modo foi escolhida a temperatura ambiente de 25 °C devido à facilidade de operação e boa sensibilidade analítica ( $r > 0,995$ ,  $n = 3$ ). Ainda, acima de 50 °C, aparecimento de algumas bolhas no percurso analítico prejudicava o monitoramento da reação.



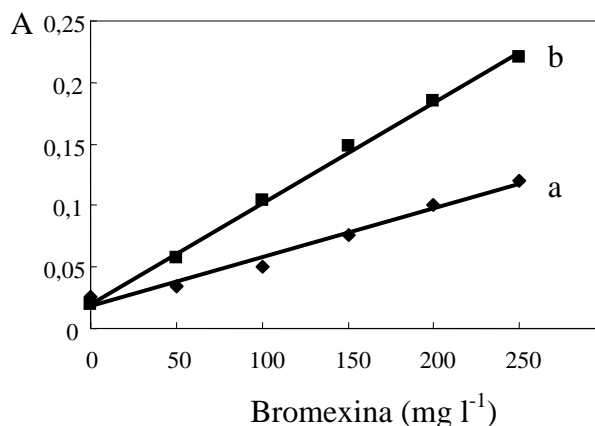
**Figura 17. Influência da temperatura na determinação de bromexina.** A figura se refere à inserção de 10 pulsos de 200,0 mg l<sup>-1</sup> bromexina no sistema da Fig.7.

Após a otimização de todos os parâmetros do sistema MP, o fluxo pulsante foi então comparado ao sistema MC que emprega fluxo constante. Para esta avaliação, as melhores condições resultantes dos experimentos envolvendo os parâmetros físicos e temporais foram empregadas no sistema MC (Fig.7, direita). A única modificação foi o tipo de unidade propulsora, a qual foi avaliada sem mudanças na arquitetura do sistema, no procedimento operacional e nas condições reacionais (item 4.2).

Neste sentido, as curvas analíticas de bromexina (0,0 - 250,0 mg l<sup>-1</sup>) foram obtidas para ambos os sistemas nas mesmas condições e observou-se uma pior sensibilidade analítica para o sistema MC (Fig.18), mostrando que o fluxo constante não influencia tanto o desenvolvimento reacional como acontece com o fluxo pulsante. Isto demonstra que o tipo de fluxo proveniente das bombas realmente provoca agitação dos elementos de fluido, ao passo que o fluxo laminar não impõe essa condição e não favorece a mistura dos reagentes.

Para uma verificação mais direta da influência do tipo de unidade propulsora, as soluções reagentes e amostra foram inseridas a “volume infinito” nos dois sistemas. Observou-se que o sinal analítico para o sistema MP dobrou em magnitude, entretanto, mínimas variações foram observadas para o sistema MC. Estes resultados demonstram a

excelente condição de mistura proveniente do fluxo pulsante das bombas solenóide, bastante diferenciado do fluxo laminar. As diferenças em sensibilidade analítica estão descritas na Tabela 6.



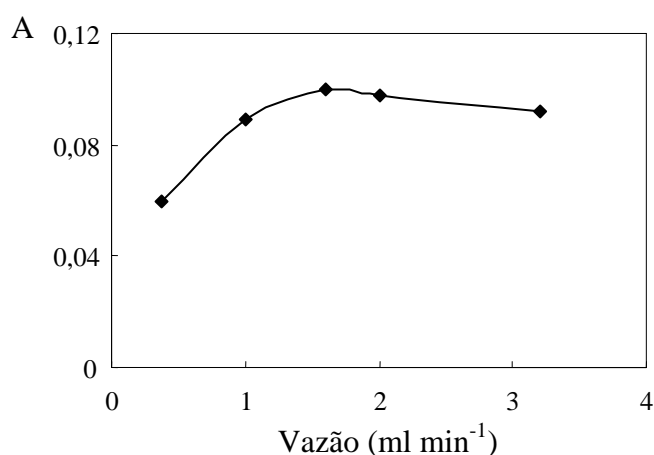
**Figura 18. Curvas analíticas.** Na figura a e b representam sistemas MC e MP.

**Tabela 6. Coeficientes das curvas analíticas para a determinação de bromexina nos sistemas multi-impulsão e multi-comutação.** A tabela se refere às medidas realizadas em triplicata. Sistema analítico e “volume infinito” se referem ao procedimento analítico descrito na Tab.3 e à inserção dos reagentes e amostra a volume infinito.

Parâmetros	Sistema analítico		Volume infinito	
	MP	MC	MP	MC
Coeficiente angular	0,0008	0,0004	0,0019	0,0004
Coeficiente linear	0,0201	0,0181	0,0426	0,0107
Coeficiente de correlação	0,9989	0,9781	0,9985	0,9696

A agitação dos elementos de fluido causados pelo aumento da frequência de pulsação das bombas solenóide demonstrou uma melhoria no desenvolvimento desta reação. Para verificar esta condição no sistema MC, a influência da vazão da solução transportadora foi avaliada entre 0,38 e 3,0 ml min<sup>-1</sup>, analogamente ao que foi avaliado no sistema MP (Fig.14). A partir da Figura 19 pode-se concluir que com o aumento da vazão não ocorre melhoria no

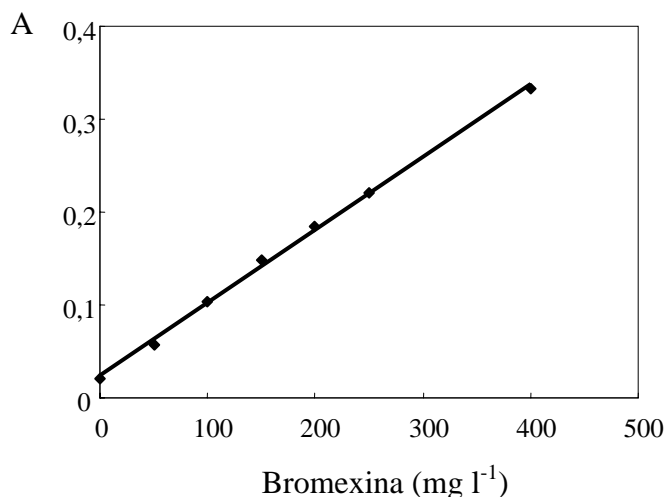
desenvolvimento reacional. Como este tipo de fluxo possui regime de escoamento laminar, os elementos de fluido contendo as espécies químicas foram apenas redistribuídos no sentido axial com pouca interação radial, não realizando um transporte mais agitado e desordenado como acontece no fluxo pulsante. Pode-se então concluir que o regime laminar para reações que necessitem agitação não é eficaz. Em geral, as melhores condições de mistura do sistema MP e seu comportamento bastante diferenciado relativamente ao sistema MC demonstrados claramente nos experimentos acima levam ao questionamento sobre o tipo de fluxo envolvido, o que será discutido no item 5.4.



**Figura 19. Influência da vazão de R<sub>1</sub> no sistema MC.** Na figura, os sinais analíticos correspondem a inserção de 10 “plugs” de 100,0 mg l<sup>-1</sup> bromexina no sistema da Fig.7, direita.

Após todas as avaliações e verificações de suas condições de mistura através de experimentos comparativos, as amostras de fármacos foram processadas apenas no sistema MP devido à limitação em sensibilidade analítica do sistema MC nas condições de trabalho otimizadas (Tab.7). Espécies interferentes usualmente utilizadas como excipientes em comprimidos e xaropes, tais como sacarose, lactose, galactose, amido, benzoato de sódio e estereato de magnésio foram adicionados a uma concentração de 1,0 g l<sup>-1</sup>. Nenhuma influência destes compostos foi observada, considerando um desvio relativo de 1,5 % em

absorbância. A curva analítica se apresentou linear ( $y = 0,0008x + 0,0235$ ,  $r = 0,9978$ ,  $n = 6$ ) até  $400,0 \text{ mg l}^{-1}$  de bromexina (Fig.20) e o limite de detecção foi estimado em  $2,0 \text{ mg l}^{-1}$  bromexina como  $3\sigma$  do branco (Skoog et al., 2002).



**Figura 20. Curva analítica para a determinação de bromexina.**

**Tabela 7. Resultados obtidos na determinação de bromexina em formulações farmacêuticas.** Dados analíticos realizados em triplicata.

Amostra	Formulação	Resultados obtidos	
		Sistema MP	Método oficial
Lisomucin (solução) ( $\text{mg ml}^{-1}$ )	2,0	$2,09 \pm 0,01$	$2,03 \pm 0,01$
Lisomucin (xarope) ( $\text{mg ml}^{-1}$ )	1,6	$1,65 \pm 0,05$	$1,59 \pm 0,04$
Bisolvon (comprimidos) (mg)	8,0	$8,30 \pm 0,18$	$7,98 \pm 0,22$

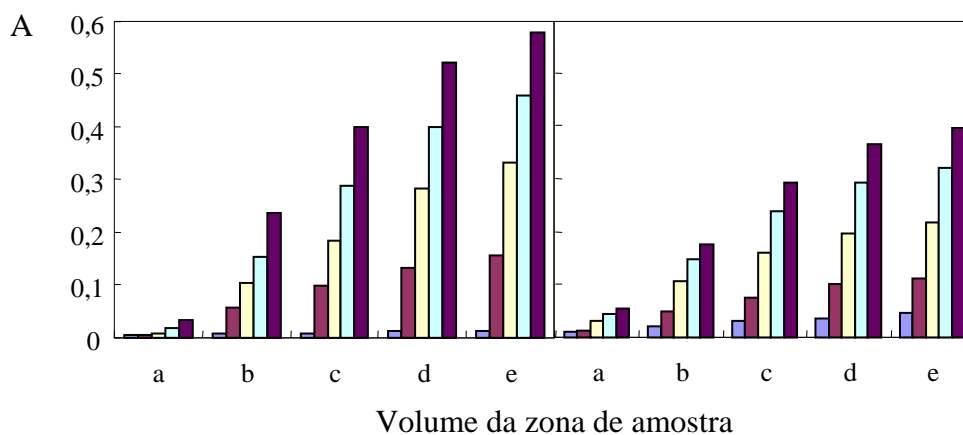
Como método comparativo, o doseamento do cloridrato de bromexina por titulação potenciométrica com hidróxido de sódio (Pharmacopée Européene, 1990) foi realizado. Para a comprovação da exatidão analítica foi aplicado o teste  $t$  de Student, obtendo-se  $t_{\text{exp}} (1,382) < t_{\text{tab}} (4,303)$  para um nível de confiança de 95% ( $n = 3$ ). O sistema foi estável apresentando uma frequência analítica de  $300 \text{ h}^{-1}$ , (d.p.r.  $< 1,5\%$ ;  $n=10$ ), com deriva de linha base  $< 0,01$

absorbância por hora. As bombas solenóide foram testadas em uma situação de rotina sem apresentar alterações, chegando a apresentar um tempo de vida bastante extenso (> 6 meses).

### 5.3. Determinação espectrofotométrica de fosfato em extratos de solos

A avaliação do fluxo pulsante na determinação de fosfato envolvendo a formação do azul de molibdênio teve início com a comparação com o fluxo constante (sistema MC), conforme descrito no item 4.3. O sistema MP foi desenvolvido com todas as bombas solenóide ligadas ao ponto de confluência (Fig.8), onde amostra e reagentes era admitidos para inserção no percurso analítico. Assim, os volumes de pulsos das bombas foram selecionados como 8  $\mu$ l para amostra e reagentes como um compromisso com homogeneização das soluções e consumo de reagentes; para o fluxo transportador uma bomba solenóide de 25  $\mu$ l foi utilizada para prover rapidez na etapa de limpeza do sistema. Estas mesmas condições foram implementadas no sistema MC.

Diferentes estratégias de amostragem foram avaliadas nos dois sistemas da Figura 8, como amostragem binária, zonas coalescentes e volume único, objetivando um compromisso com sensibilidade analítica, condições de mistura e repetibilidade analítica (d.p.r. < 1,0%). Neste sentido, amostragem binária envolvendo amostra e reagentes resultou em sinais analíticos de maior magnitude com boa repetibilidade para ambos os sistemas. Nesta estratégia um pulso de amostra era inserido entre pulsos de  $R_1+R_2$  (inseridos simultaneamente) resultando em uma porção de zona de amostra. Esta porção poderia se repetir quantas vezes necessárias até a formação da zona de amostra desejada. Este parâmetro avaliado, variando-se de 2 a 10 pulsos de  $A/R_1+R_2$ , resultando em zonas de amostra de 48 a 240  $\mu$ l. Observou-se melhoria em sensibilidade analítica ( $r > 0,998$ ,  $n = 3$ ) com o aumento do volume da zona de amostra para o sistema MC; para o sistema MP, a mesma tendência foi observada, mas não com a mesma magnitude em sinal analítico (Fig.21).



**Figura 21. Influência do volume da zona de amostra nos sistemas MC (esquerda) e MP (direita).** A figura se refere ao sistema da Fig. 8; a – e correspondem a 48, 96, 144, 192 e 240 µl; sinais analíticos se referem a 0,0 - 5,0 - 10,0 - 15,0 e 20,0 mg l<sup>-1</sup> P-PO<sub>4</sub>.

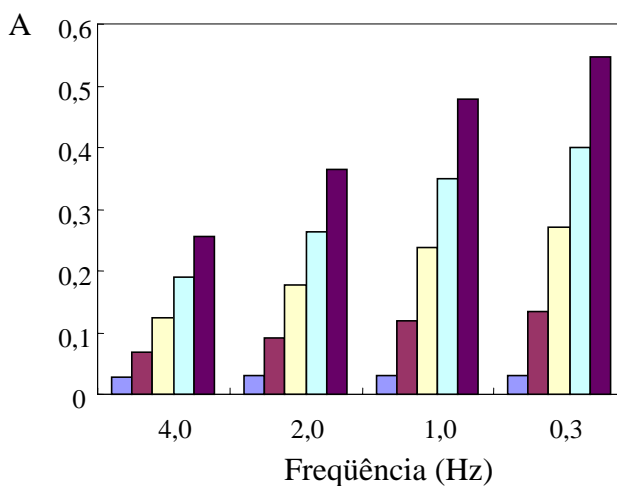
Para o sistema MP, não houve muita variação em sensibilidade analítica e magnitude do sinal para valores acima de 144 µl, provavelmente devido ao fato de que o coeficiente de dispersão já era próximo a 1,0. Acima deste valor pouca influência do fluxo pulsante foi observada. Neste sentido, o tempo de residência no sistema MP se torna muito prejudicado pela sua característica fluídica de parada de fluxo entre cada pulso gerado. Considerando então esta característica como um fator positivo para o desenvolvimento reacional, o intervalo de tempo entre cada pulso foi variado através de ajustes na frequência de pulsação. Esta foi variada de 0,3 a 5,0 Hz em experimento envolvendo a inserção de 8 pulsos (192 µl).

Os resultados mostram que à medida em que se diminui a frequência, ou seja, se aumenta o tempo de parada do fluxo entre cada pulso, a sensibilidade analítica melhora e os sinais analíticos se pronunciam (Fig.22). Com um maior tempo de parada do fluxo, as espécies químicas contidas nos elementos de fluidos puderam se difundir e se converter em produtos de maneira mais pronunciada relativamente a uma maior frequência de pulsação. Assim, o sistema explorando MP proporcionou uma excelente condição de mistura para esta reação envolvendo uma outra característica de seu tipo de fluxo, a parada entre os pulsos.

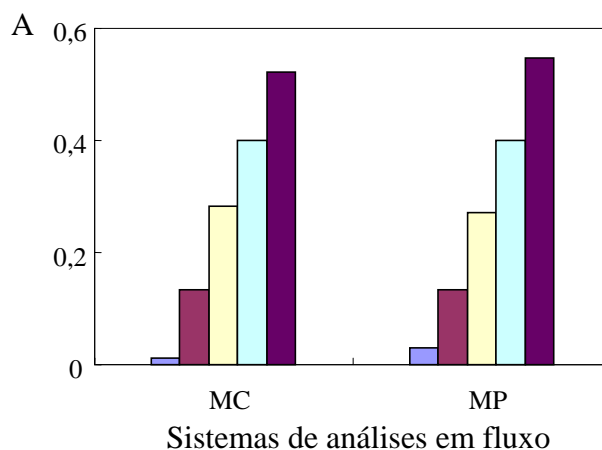
Para a comparação da melhoria resultante da parada no fluxo do sistema MP, as duas



curvas analíticas resultantes do mesmo volume de zona de amostra (192  $\mu\text{l}$ ) nos sistemas MP e MC foram plotadas (Fig.23). Para o sistema MP a única modificação foi na frequência de pulsação durante a inserção de amostra e reagentes (0,3 Hz).



**Figura 22. Influência da frequência de pulsação durante a inserção da zona de amostra.** A figura se refere a curvas analíticas com inserção de 8 pulsos (0,0 - 5,0 - 10,0 - 15,0 - 20,0  $\text{mg l}^{-1}$  P-PO<sub>4</sub>) obtidas com o sistema MP da Fig.8, esquerda.



**Figura 23. Curvas analíticas para determinação de fosfato em extratos de solos.** A figura se refere a curvas analíticas (0,0 - 5,0 - 10,0 - 15,0 - 20,0  $\text{mg l}^{-1}$  P-PO<sub>4</sub>) com inserção de 8 pulsos a frequência de pulsação de 0,3 Hz para sistema MP. Detalhes V.texto.

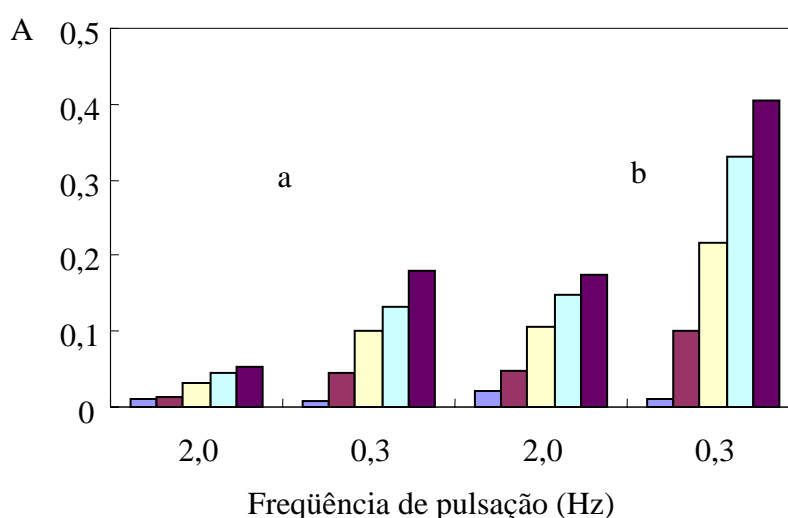
Com este resultado pode-se inferir que a frequência de pulsação durante a inserção da zona de amostra pode realmente melhorar o desenvolvimento da reação através do período de

parada do fluxo entre cada pulso. Esta característica pode ser empregada no sistema MC através do desligamento da bomba peristáltica por um determinado período de tempo após a mistura entre reagentes e amostra já ter sido realizada. Outro parâmetro que também pode influenciar no desenvolvimento reacional no sistema MC é a vazão, pois à medida que a vazão diminui, uma maior dispersão dos elementos de fluido ocorre proporcionando uma maior interação entre as espécies químicas reativas. Para o fluxo pulsante em geral isto também ocorreu, mas resultante de uma outra condição fluídica, onde o principal fator está relacionado com a parada de fluxo entre os pulsos.

A frequência de pulsação do fluxo transportador foi avaliada de 0,3 a 4,0 Hz e pouca variação em magnitude do sinal analítico e sensibilidade foi notada. Isto pode estar relacionado com a menor dispersão que este fluxo provoca e pelo fato de a bomba do fluxo transportador fornecer volumes de pulso de 25  $\mu$ l, o que acarreta em uma agitação muito maior durante o seu acionamento. Bomba solenóide de 8  $\mu$ l foi testada para o transporte da zona de amostra, mas pouca variação foi observada além de uma diminuição da frequência analítica. Como a bomba solenóide da solução transportadora era de 25  $\mu$ l, melhores condições em repetibilidade foram notadas para frequências abaixo de 3,0 Hz (d.p.r. < 2,0 %), sendo então selecionada 2,0 Hz para o procedimento de transporte da zona de amostra ao detector. Para as etapas que envolviam a substituição da amostra e limpeza do percurso analítico, frequência de 6,0 Hz foi empregada.

O percurso analítico não sofreu modificações no decorrer dos experimentos devido aos resultados obtidos terem apresentado adequada sensibilidade analítica, boa repetibilidade, associado a baixo consumo de reagente e alta frequência analítica. E como o objetivo destes experimentos foi a comparação entre as características fluídicas provenientes das diferentes unidades propulsoras nos dois sistemas, um reator de menor comprimento se mostrou mais eficaz. Neste sentido, o reator de 50 cm foi suficiente para todos os experimentos.

Com o vislumbre de se variar a frequência de pulsação durante a injeção da amostra e dos reagentes, e possibilitar um melhor desenvolvimento reacional, este parâmetro foi avaliado em função do consumo de reagentes. Desta forma, zonas de amostras < 96  $\mu\text{l}$  foram novamente avaliadas aplicando-se uma frequência de pulsação de 0,3 Hz na injeção (Fig.24). Os resultados demonstraram uma melhora em sensibilidade analítica e um aumento em magnitude do sinal (100 % em relação ao anterior).

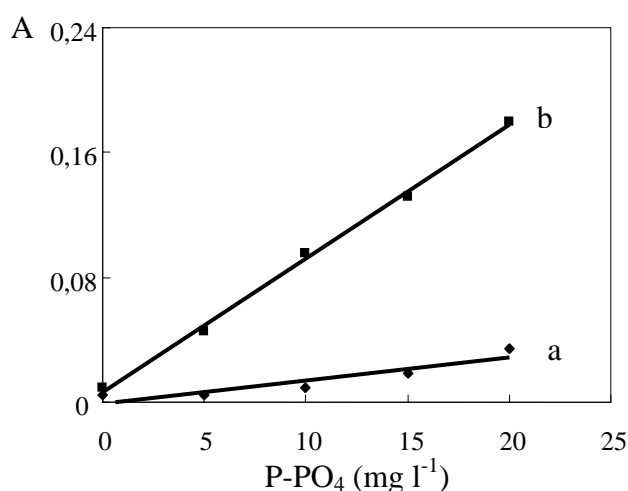


**Figura 24. Influência da frequência de pulsação durante a inserção da zona de amostra para sistema MP.** Na figura, curvas analíticas correspondem a 0,0 - 5,0 - 10,0 - 15,0 e 20,0  $\text{mg l}^{-1}$  P- $\text{PO}_4$ ; a e b correspondem a volumes de 48 e 96  $\mu\text{l}$ .

Para efeito de comparação, as curvas analíticas referentes à zona de amostra de 48  $\mu\text{l}$  (2 pulsos) nos sistemas MC e MP estão demonstradas na Fig.25. Com a aplicação de uma frequência de pulsação mais baixa (0,3 Hz) no sistema MP foi possível diminuir a quantidade de reagentes e amostra, obtendo-se ainda adequada sensibilidade analítica, o que não ocorreu com o sistema MC.

Com relação ao fluxo constante, melhorias no desenvolvimento reacional podem ser conseguidas variando-se a vazão da solução transportadora, a qual foi estudada no intervalo de 0,1 a 3,0  $\text{ml min}^{-1}$  para zonas de amostras de 48 e 96  $\mu\text{l}$ . Para o menor volume de zona de

amostra, melhoria em sensibilidade analítica foi observada com vazões  $< 0,5 \text{ ml min}^{-1}$  ( $r > 0,999$ ;  $n=5$ ), e para o maior volume, aumento em sinal analítico foi observado para  $< 1,5 \text{ ml min}^{-1}$ . Isto refletiu diretamente no processo de análises através de um comprometimento com a frequência analítica. Isto não se refletiu no sistema MP, pois as melhores condições para o desenvolvimento reacional foram observadas nas etapas de inserção de amostra e reagentes, as quais são realizadas durante pequeno intervalo de tempo. Ainda, a frequência do fluxo transportador foi elevada ( $2,0 \text{ Hz} - 3,0 \text{ ml min}^{-1}$ ), o que não prejudicou o ritmo de amostragem.



**Figura 25. Curvas analíticas para determinação de fosfato em extratos de solos.** Na figura, a e b representam os sistemas MC e MP; curvas analíticas para  $48 \mu\text{l}$  de zona de amostra. Detalhes V.texto.

Após a comparação entre os dois sistemas, selecionaram-se as melhores condições de trabalho para o processamento das amostras, visando baixo consumo de reagentes, repetibilidade, frequência analítica e sensibilidade analítica. Neste sentido, foi escolhido 2 pulsos de  $A/R_1+R_2$  para o sistema MP a uma frequência de pulsação de  $0,3 \text{ Hz}$  para a inserção de amostra e reagentes e de  $2,0 \text{ Hz}$  para transportador. Para o sistema MC, 4 pulsos a uma vazão de  $1,5 \text{ ml min}^{-1}$  para o transportador foi viável. Espécies químicas potencialmente interferentes foram estudadas e a presença de Si resultou em uma interferência relativamente

pequena nos dois sistemas a qual foi suprimida adicionando-se 0,05 % (m/v) de oxalato de sódio em R<sub>1</sub>.

As amostras de extratos de solo foram processadas, e os resultados estão apresentados na Tabela 8. O sistema MP apresentou maior frequência analítica (67 h<sup>-1</sup> para MC e 144 h<sup>-1</sup> para MP). Nestas condições, as curvas analíticas se mostraram lineares ( $r > 0,999$ ;  $n = 6$ ) para os dois sistemas (Fig.8). O limite de detecção foi estimado como 1,0 e 0,6 mg kg<sup>-1</sup> P-PO<sub>4</sub> para MC e MP, respectivamente. Ambos os sistemas forneceram resultados precisos (d.p.r. < 0,5 %;  $n = 10$ ) e concordantes (95 % de confiança) com o sistema comparativo empregado na linha de análises de rotina do laboratório de Química Analítica do CENA/USP (Zagatto et al., 1981).

**Tabela 8. Resultados obtidos na determinação de fosfato em extrato de solos.** Valores P-PO<sub>4</sub> em extratos de solos determinados por MP, MC e FIA. Dados (mg l<sup>-1</sup>) baseados em triplicata.

Amostra	MP	MC	FIA
1	8,13 ± 0,23	9,03 ± 0,31	8,50 ± 0,28
2	6,31 ± 0,21	6,01 ± 0,11	6,38 ± 0,19
3	4,40 ± 0,11	4,34 ± 0,15	4,50 ± 0,18
4	1,79 ± 0,12	1,80 ± 0,54	1,77 ± 0,16
5	12,10 ± 0,61	11,71 ± 1,01	11,51 ± 0,51
6	1,72 ± 0,31	1,76 ± 0,22	1,81 ± 0,15
7	2,15 ± 0,18	2,09 ± 0,14	2,10 ± 0,21
8	3,32 ± 0,15	3,45 ± 0,20	3,55 ± 0,11

#### 5.4. Visualização da amostra dispersa explorando PLF

Com os resultados obtidos nas aplicações analíticas, pôde-se observar que a mistura das soluções envolvidas ocorre já no ponto de confluência, sendo dependente da frequência de pulsação. Este parâmetro se tornou então importante para o adequado condicionamento da zona de amostra e, posteriormente, para o desenvolvimento reacional. A dispersão da amostra e o desenvolvimento das reações químicas se mostraram bastante diferenciados em função de o fluxo ser pulsante ou constante. Isto se deve principalmente às diferenças de agitação entre os elementos de fluido, como demonstrado em relação à determinação de bromexina. Outra característica observada foi a condição de parada de fluxo entre os pulsos, a qual pôde ser variada para prover um tempo de contato maior entre as espécies reativas, conforme demonstrado na determinação de fosfato.

Estes resultados já tinham sido observados nos estudos envolvendo solução colorida (item 4.1): a dispersão da amostra não era dependente do tempo de residência da amostra no percurso analítico, efeito este bastante diferente relativamente ao emprego de fluxo constante, e com algumas peculiaridades. Estas foram ressaltadas nas duas aplicações analíticas, e sua exploração permitiu melhoria em sensibilidade analítica e redução do consumo de reagentes, devidos às boas condições de mistura em comparação com o fluxo constante. Entretanto, não foi possível caracterizar o fluxo pulsante como caótico (desordenado), turbulento ou laminar. Desta forma, para uma melhor visualização do que ocorre com a amostra quando inserida por bomba solenóide no sistema de análises em fluxo, a técnica PLF (item 4.4).

Os resultados dos cinco experimentos conduzidos permitiram a obtenção de gráficos de variação temporal da distribuição radial da concentração de RB (V. *e.g.* Fig. 26) e em gráficos da variação temporal da concentração de RB monitorada em três linhas de fluxo específicas (V. *e.g.* Fig. 27). Estes últimos são análogos ao registro clássico sinal analítico vs tempo (FIAgrama, Valcarcel e Castro, 1987), porém se referindo a algumas linhas de fluxo

em particular. Com estes gráficos, foi possível visualizar a redistribuição de massas da amostra decorrente de seu transporte, bem como o sentido de sua propagação. Ainda, foi possível se verificar as intensidades dos sinais analíticos (no caso normalizado como  $C_0/C$ ) em função do tempo para três linhas do tubo localizadas próximo à parede, no centro do tubo e em situação intermediária (entre parede e centro) do tubo. Nestes gráficos, o sentido das abscissas (tempo) foi invertido por motivos pedagógicos. Desta forma, a zona de amostra fluía da esquerda para a direita e, nos gráficos referentes aos experimentos com o tubo na vertical, o fluxo seguia de cima para baixo.

Nos gráficos resultantes dos cinco experimentos realizados, algumas diferenças no diâmetro interno do tubo foram verificadas. As figuras referentes a  $E_1$ ,  $E_3$  e  $E_5$  apresentaram diâmetro de 2,0 mm, ao passo que as referentes a  $E_2$  e  $E_4$  apresentaram a diâmetro de 1,1 mm. Esta aparente discrepância em diâmetros se deveu à dispersão da amostra no sentido radial em direção a parede do tubo, a qual é côncava e faz com que a intensidade da fluorescência induzida pelo feixe de “laser” se disperse, aparentemente aumentando aparentemente o diâmetro interno do tubo.

O coeficiente de dispersão  $D$  (Ruzicka e Hansen, 1988) é a razão entre a concentração inicial de amostra e a concentração do elemento de fluido considerado na zona dispersa da amostra. Os valores  $D$  referentes aos diferentes elementos de fluido permitem uma avaliação numérica da extensão da dispersão no elemento de fluido considerado e sua análise permitiu se avaliar as condições de mistura entre as soluções envolvidas. Com base nos valores  $D$  para as três linhas de fluxo consideradas (axial, intermediária e periférica) pode-se inferir que as condições de mistura inerentes ao fluxo pulsante foram sempre boas, pois não se notaram descontinuidades importantes nas curvas  $D$  vs tempo.

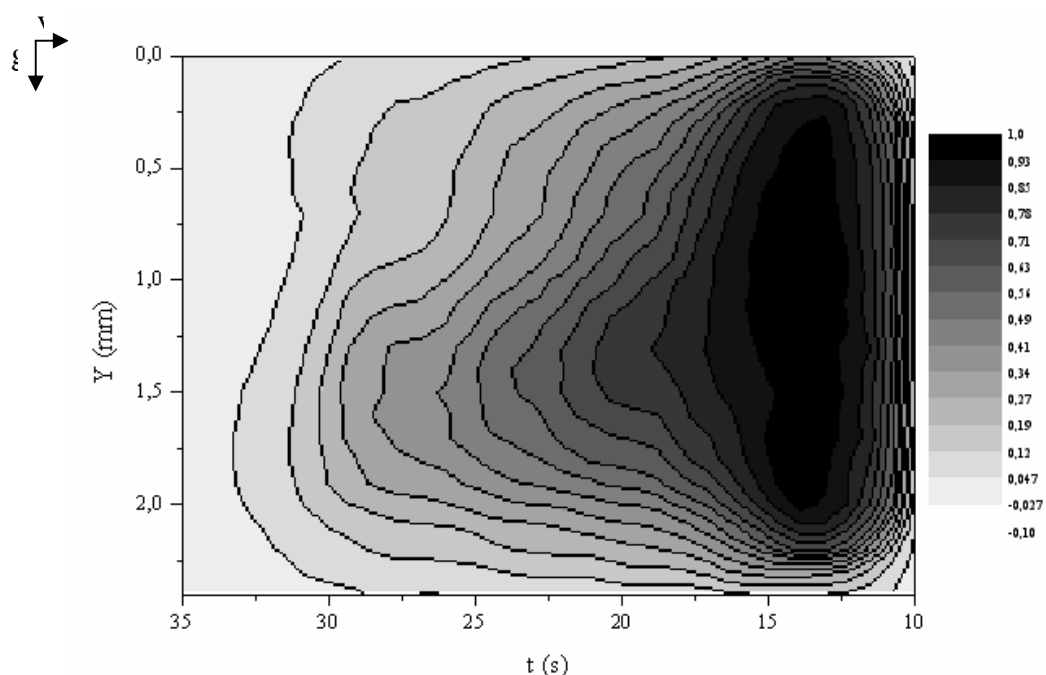
Especialmente importante como índice para se expressar a dispersão total é o valor  $D_{\max}$ , que corresponde ao máximo valor  $D$  para um sinal analítico monitorado. Este valor se

refere aos máximos das curvas a – c nas Fig.s 27, 29, 31, 33 e 35. Uma comparação entre valores correspondentes às linhas de fluxo a, b, e c fornece informação adicional sobre a redistribuição de massas no sentido radial.

Com relação a  $E_1$ , que compreendia a inserção de 10 pulsos de A+R a uma frequência elevada (3,0 Hz), diretamente na cela tubular, os resultados são apresentados na Figura 26. Com relação à porção frontal da zona de amostra, pôde-se observar que houve uma redistribuição de massas muito maior no sentido radial do que no sentido axial. Desta forma, a porção mais concentrada da amostra dispersa se apresentou sob forma de uma mistura mais homogênea. Esta parte dianteira da zona de amostra não apresentou a distribuição de concentrações inerentes ao perfil parabólico das velocidades axiais típico do regime laminar de escoamento (Vanderslice et al., 1986; Wada et al., 1986). De fato, a homogeneidade desta porção permite se inferir que a velocidade linear de cada elemento de fluido tende à velocidade média linear, o que é associado ao estabelecimento de fluxo turbulento e/ou de vórtices. A presença das maiores concentrações na região frontal da zona de amostra explica também o rápido incremento em sinal analítico (Fig. 27), frequentemente relatado em relação a sistemas de análises em fluxo explorando multi-impulsão (Lima et al., 2004).

Na parte posterior da zona de amostra, verificou-se a presença de gradientes de concentração, demonstrando o decréscimo gradual da concentração da amostra. Entretanto, nota-se a presença de linhas de isoconcentração contrárias e muito menos pronunciadas relativamente ao regime de escoamento em fluxo laminar. O efeito pode ser devido à alta pressão exercida quando da inserção de cada pulso da amostra ou da solução transportadora. Pode-se então inferir que a interação da amostra com a solução transportadora decorre principalmente sob forma axial.





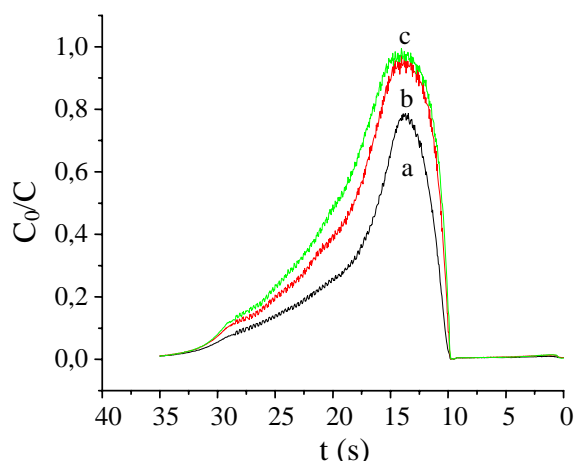
**Figura 26. Variação temporal da distribuição radial da concentração de RB (Experimento E<sub>1</sub>).** A figura se refere à inserção de 10 pulsos de A+R a 3,0 Hz, ao tubo na posição horizontal e à ausência de reator anterior ao detector;  $v$  = sentido do fluxo;  $g$  = aceleração da gravidade.

Desta forma, a interação radial, frequentemente salientada como a mais importante em outros sistemas de análises em fluxo (Ruzicka e Hansen, 1989), se torna menos relevante. Ainda, deve ser salientada a ocorrência de efeitos de parede (Figs. 26 e 27). De fato, a presença de um filme de solução transportadora é sempre notada, mesmo durante a passagem da solução mais concentrada da zona de amostra.

A aceleração da gravidade exerce também um leve efeito no transporte de massas. Foi possível verificar um pequeno deslocamento do final da zona de amostra no sentido vertical (gravidade). Isto não alterou a possível influência da parede, nem tampouco diminuiu a velocidade média do fluido de maneira pronunciada.

Os aspectos acima mencionados se mostraram concordantes com os experimentos realizados conforme item 5.1, nos quais foram observados jatos na saída dos tubos. Isto confirma também a boa mistura das soluções no ponto de confluência. Análise da Fig. 27

permite se concluir que ocorreu pouca dispersão da amostra no centro do tubo, toda a massa de RB se concentrando na porção central do volume pulsado e se dirigindo até as proximidades da parede. Isto é devido às altas pressões que provavelmente determinam o estabelecimento de vórtices no interior do tubo, o que resulta em boas condições de mistura.



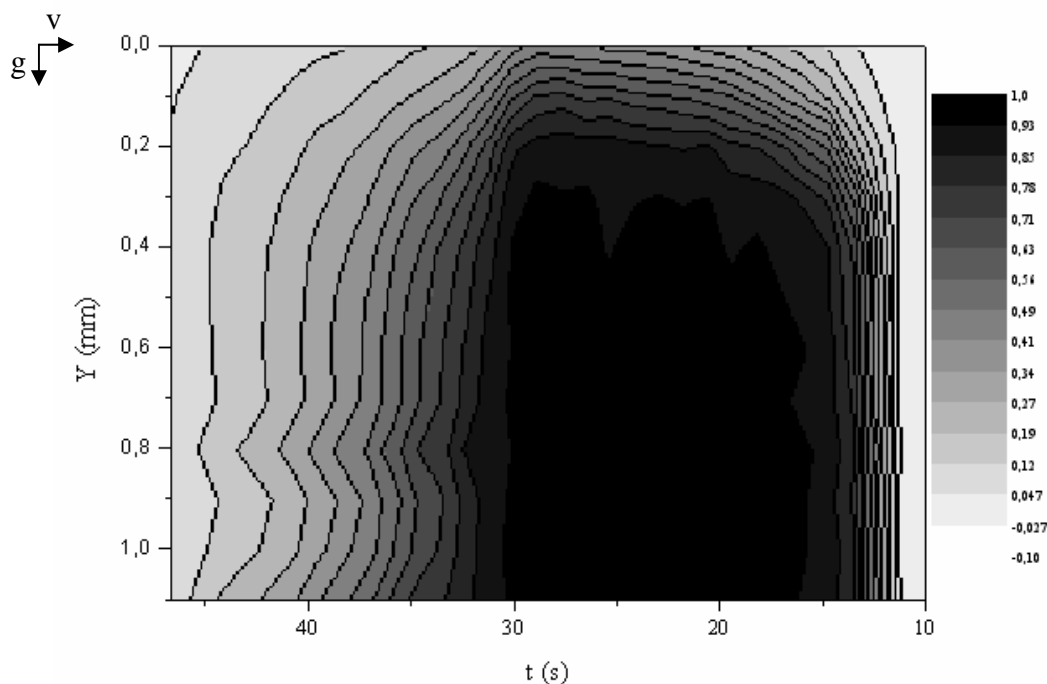
**Figura 27. Variação temporal da concentração de RB em três linhas de fluxo (Experimento E<sub>1</sub>).** A figura se refere à inserção de 10 pulsos de A+R a 3,0 Hz, ao tubo na posição horizontal e à ausência de reator anterior ao detector;  $v$  = sentido do fluxo;  $g$  = aceleração da gravidade. Registros a, b e c representam parede, posição intermediária e centro do tubo, onde  $a = 0,05$  mm;  $b = 0,3$  e  $c = 0,6$  mm.

Este comportamento se mostrou benéfico relativamente à determinação de bromexina (item 5.2.), cuja sensibilidade se mostrou bastante dependente da frequência de pulsação. Quando maiores frequências eram aplicadas, os elementos de fluido contendo as espécies químicas reativas eram bastante agitados, possibilitando um maior contato entre as espécies, favorecendo o desenvolvimento da reação, a qual é dependente da agitação (Fig. 14). Ainda, melhoria no desenvolvimento reacional foi observada quando o reagente oxidante era empregado como solução transportadora, o que pode ser também confirmado analisando-se a Fig. 26, que se refere à interação entre zona de amostra e solução transportadora.

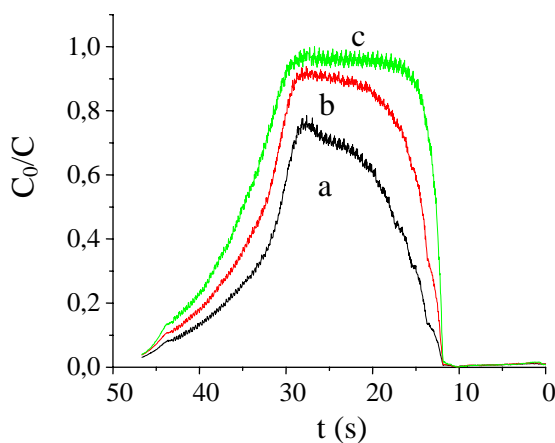
Com relação ao experimento E<sub>2</sub>, onde diminuiu-se apenas a frequência de pulsação para 0,5 Hz, houve uma melhor redistribuição de massas, tanto no sentido radial quanto axial

(Fig. 28). Isto pode ser explicado considerando-se que RB se transloca durante o intervalo de tempo correspondente à parada do fluxo entre a inserção de cada pulso. O aumento deste intervalo de tempo possibilita então uma maior difusão da RB para regiões de menor concentração, determinando uma maior re-distribuição de massas. O efeito é também visualizado na Figura 29, cuja análise permite se concluir que ele é mais pronunciado na linha de fluxo central da zona da amostra. Assim, o centro da amostra apresentou um maior alargamento de pico relativamente àquele verificado para maiores frequências de pulsação (Fig. 27). Esta baixa frequência fez com que as espécies químicas reativas originalmente concentradas no centro da zona da amostra ( $E_1$ ) se distribuíssem mais nos dois sentidos em que estavam sendo favorecidos, os quais se referem ao efeito da gravidade e à difusão radial. Deve-se mencionar que a ausência de filme de solução transportadora na amostra não está evidente na Figura 28 porque com o incremento da concentração de RB muito próxima à parede do tubo (inferior), e devido a efeitos ópticos próximos à parede côncava, a fluorescência era aumentada. Este efeito, entretanto não se constituiu em fator limitante para a interpretação dos resultados do experimento  $E_2$ .

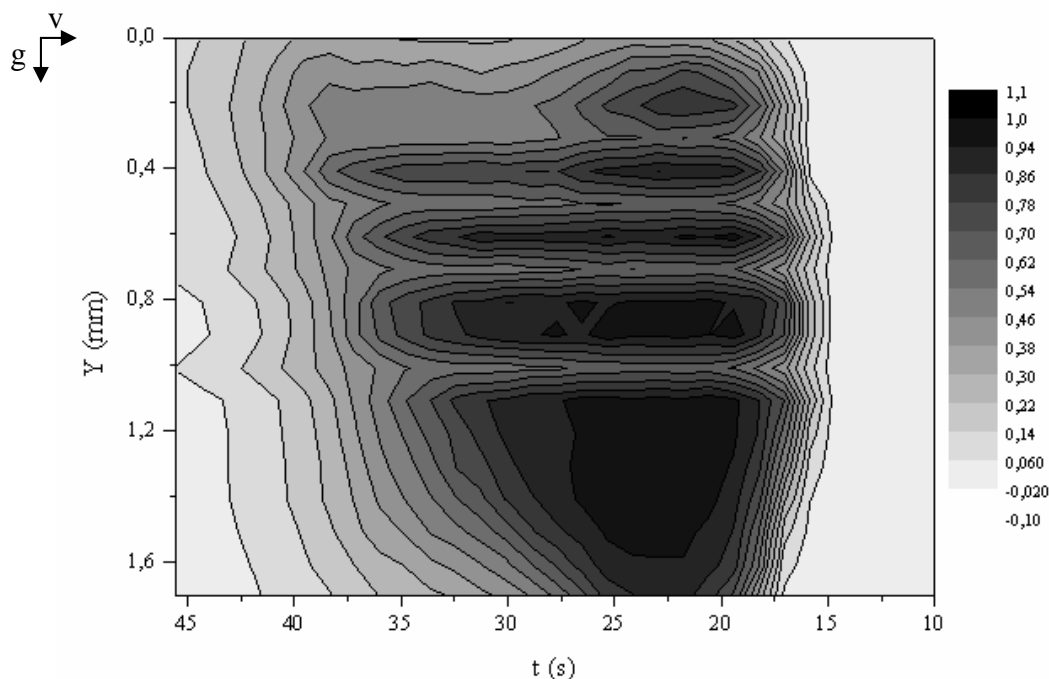
Este comportamento da zona de amostra para menores frequências foi salientado na determinação de fosfato. Melhoria no desenvolvimento reacional e conseqüente melhoria em sensibilidade foram verificadas quando a frequência de pulsação foi diminuída (item 5.3). Isto demonstra novamente que a redistribuição de massas no sentido axial e radial do tubo permitiu realmente um melhor contato entre os reagentes. Pode-se salientar que essa redistribuição pode ter sido causada por vórtices que já se estabeleciam no interior da zona de amostra quando maiores frequências foram aplicadas; neste caso, apenas se deslocaram e aumentaram, provocando uma ampla redistribuição dos elementos de fluido. Por ter se dispersado mais, as moléculas de RB se espalharam mais pelo tubo, aumentando o tempo para limpeza relativamente ao experimento anterior ( $E_1$ ).



**Figura 28. Variação temporal da distribuição radial da concentração de RB (Experimento E<sub>2</sub>).** A figura se refere à inserção de 10 pulsos de A+R a 0,5 Hz, ao tubo na posição horizontal e à ausência de reator anterior ao detector;  $v$  = sentido do fluxo;  $g$  = aceleração da gravidade.



**Figura 29. Variação temporal da concentração de RB em três linhas de fluxo (Experimento E<sub>2</sub>).** A figura se refere à inserção de 10 pulsos de A+R a 0,5 Hz, ao tubo na posição horizontal e à ausência de reator anterior ao detector;  $v$  = sentido do fluxo;  $g$  = aceleração da gravidade. Registros a, b e c representam parede, posição intermediária e centro do tubo, onde  $a = 0,05$  mm;  $b = 0,3$ ;  $c = 0,6$  mm.



**Figura 30. Variação temporal da distribuição radial da concentração de RB (Experimento E<sub>3</sub>).** A figura se refere à inserção de 10 pulsos de A+R a 3,0 Hz, ao tubo na posição horizontal e com reator de 60 cm anterior ao tubo;  $v$  = sentido do fluxo;  $g$  = aceleração da gravidade.

Para o experimento E<sub>3</sub>, que envolveu a inserção de uma bobina de 60 cm anteriormente a cela de fluxo tubular, e uma frequência de pulsação elevada (3,0 Hz), observou-se uma redistribuição radial de massas resultando em vórtices localizados em regiões específicas da zona de amostra (Fig. 30).

Estes vórtices demonstram que, também nesta situação, ocorre uma mistura entre as soluções envolvidas bastante diferenciadas relativamente ao emprego de fluxo constante. Estes vórtices já foram relatados por (Wada et al., 1986) em relação a sistemas de análises por injeção em fluxo (fluxo laminar). Os autores desenvolveram um modelo matemático para descrever a dispersão da zona de amostra, e verificaram um aumento na componente radial da difusão quando o reator em tubo reto era substituído por um reator em espiral. Neste último caso, a presença de vórtices foi devida ao estabelecimento de fluxos secundários perpendiculares à direção de escoamento.

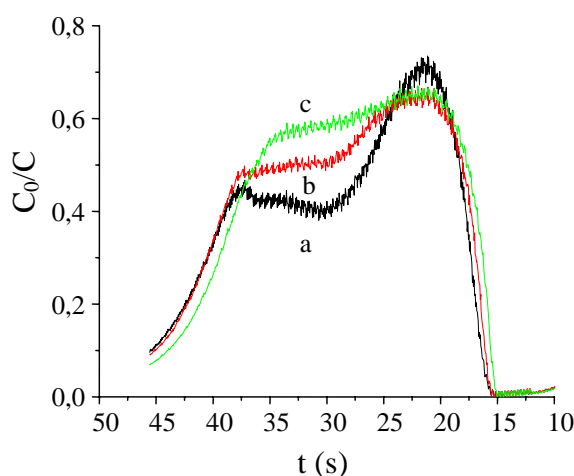
Relativamente ao experimento E<sub>3</sub>, observou-se formação de lâminas ao longo da zona de amostra, enfatizando a tendência de o regime de escoamento se tornar laminar na medida em que se aumenta o percurso analítico. Os vórtices formados, observados claramente na Figura 30, refletem uma redistribuição radial de massas, bastante influenciada pelo tamanho do reator, e pelo fato de o reator ser espiralado. Estes vórtices são menos evidentes na parte inferior do tubo, devido à ação da gravidade e à força centrífuga inerente ao reator espiralado. Deve-se destacar ainda, que mesmo com esta influência da gravidade na formação de vórtices maiores e localizados na parte inferior do tubo, o fluxo pulsante apresentou uma elevada redistribuição radial mesmo após um reator de 60 cm, possibilitando a transferência de massa para a parte superior do tubo.

Na Figura 31, pode-se observar um aumento em intensidade do sinal monitorado próximo à parede do tubo na parte frontal da zona de amostra, onde predominou a redistribuição de massa no sentido radial. A largura do pico registrado foi mantida, independentemente da região monitorada (eixo, intermediária, parede), salientando que os vórtices de mistura estabelecidos determinam efeitos localizados. Ainda, os valores de dispersão se apresentaram menores do que os experimentos anteriores para o centro e intermediário do tubo, resultando em uma maior distribuição dos elementos de fluidos, o que pode ser comprovado também em presença de uma reação química que depende de um maior contato entre os reagentes. Isto foi comprovado relativamente à determinação de fosfato.

Pode-se então concluir que o fluxo pulsante proveniente de bombas solenóide determina uma redistribuição de massas no sentido radial muito mais intensa do que o fluxo constante.

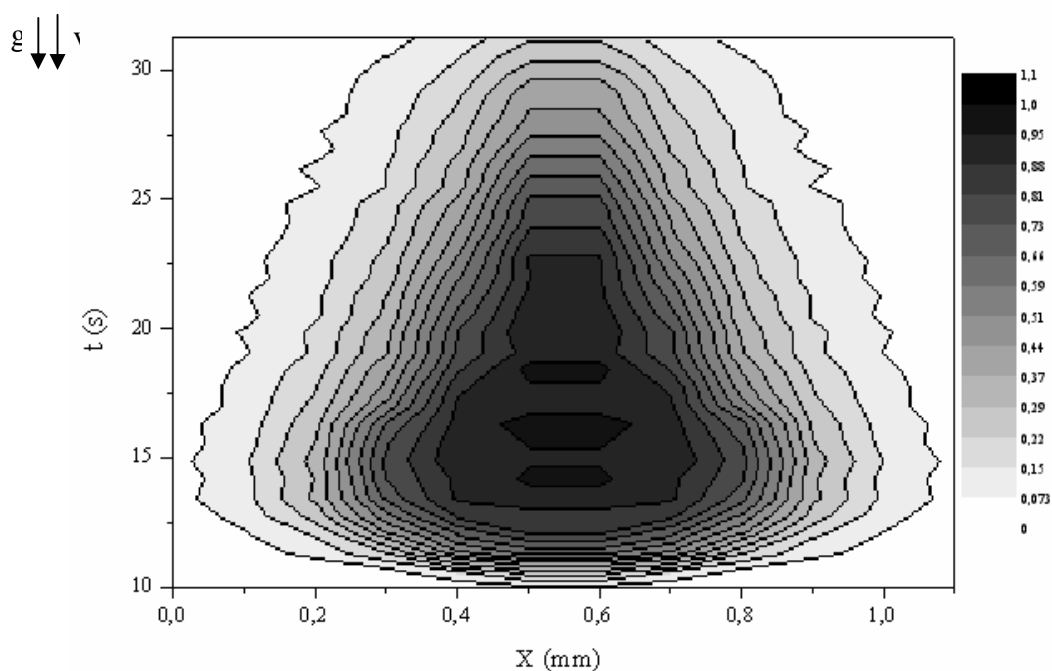
Devido à importância da velocidade média para o projeto de sistemas analíticos, as velocidades de fluxo foram avaliadas. Para regime laminar, a velocidade média é aproximadamente a metade daquela correspondente à linha de fluxo central e muito maior do

que aquela referente à linha de fluxo próxima a parede, a qual tende a ser estacionária (Zagatto e Worsfold, 2005). Nos experimentos  $E_1$ ,  $E_2$  e  $E_3$  a velocidade média foi considerada quase igual àquela das diferentes linhas de fluxo, sendo levemente reduzida para linhas próximas a parede do tubo. Isto é inerente a regime turbulento de escoamento. Este aspecto se constitui em uma das principais características vantajosas dos sistemas MP.

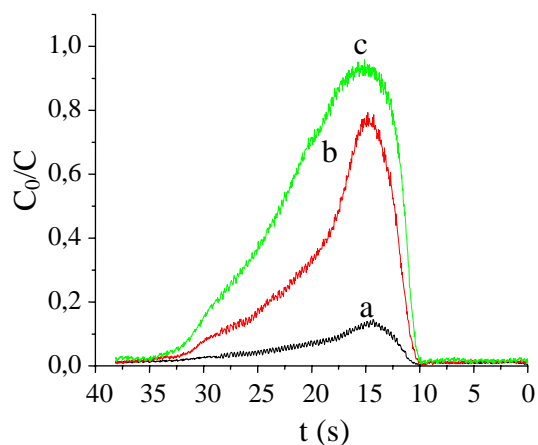


**Figura 31. Variação temporal da concentração de RB em três linhas de fluxo (Experimento  $E_3$ ).** A figura se refere à inserção de 10 pulsos de A+R a 3,0 Hz, ao tubo na posição horizontal e com reator de 60 cm anterior ao tubo;  $v$  = sentido do fluxo;  $g$  = aceleração da gravidade. Registros a, b e c representam parede, posição intermediária e centro do tubo, onde  $a = 0,05$  mm;  $b = 0,3$  mm;  $c = 0,6$  mm.

O efeito da aceleração da gravidade no sistema MP foi verificado em dois experimentos ( $E_4$  e  $E_5$ ), onde as bombas e a cela de detecção tubular eram posicionados verticalmente com relação à bancada do laboratório. A inserção da amostra a alta frequência ( $E_4$ ) resultou em uma pequena distribuição de massas no sentido radial, e uma centralização dos elementos de fluido, efeitos estes facilitados pela ação da gravidade (Fig. 32). Percebe-se nitidamente o maior acúmulo de RB na porção inferior do tubo. Pouca RB foi detectada em regiões próximas à parede do tubo, o que se verifica também na Figura 33 (curva a).



**Figura 32. Variação temporal da distribuição radial da concentração de RB (Experimento E<sub>4</sub>).** A figura se refere à inserção de 10 pulsos de A+R a 3,0 Hz, ao tubo na posição vertical e à ausência de reator anterior ao detector;  $v$  = sentido do fluxo;  $g$  = aceleração da gravidade.



**Figura 33. Variação temporal da concentração de RB em três linhas de fluxo (Experimento E<sub>4</sub>).** A figura se refere à inserção de 10 pulsos de A+R a 3,0 Hz, ao tubo na posição vertical e à ausência de reator anterior ao detector;  $v$  = sentido do fluxo;  $g$  = aceleração da gravidade. Registros a, b e c representam parede, posição intermediária e centro do tubo, onde  $a = 0,05$  mm;  $b = 0,3$  mm;  $c = 0,6$  mm.

Uma comparação entre os resultados obtidos com o tubo na horizontal (Experimento E<sub>1</sub>) e na vertical (Experimento E<sub>4</sub>) permite se concluir que o tempo de residência da amostra



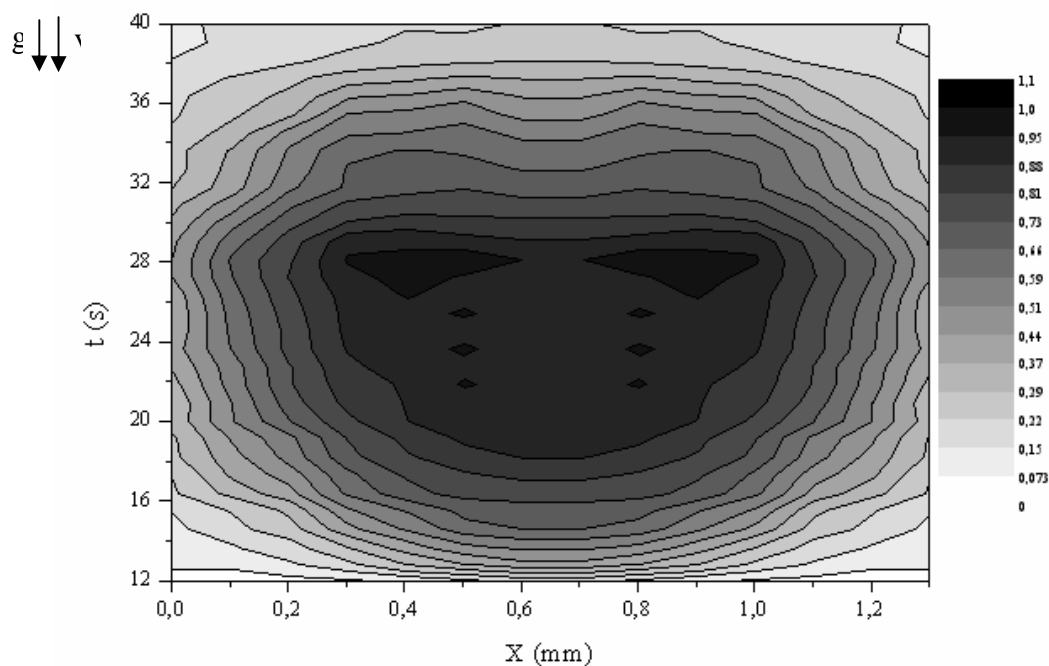
no interior do tubo foi pouco afetado pela ação da gravidade. Como este parâmetro foi levemente menor em relação ao posicionamento na vertical, infere-se que a ação gravitacional exerce um efeito positivo relativamente ao transporte da RB.

Com a frequência de pulsação mais baixa (experimento E<sub>5</sub>), a zona de amostra atingiu a região periférica de forma mais eficiente, em função do maior intervalo de tempo de parada de fluxo entre cada pulso possibilitar maior movimentação da amostra no sentido radial (Fig. 34). Pode-se também observar a formação de vórtices na porção central da zona de amostra.

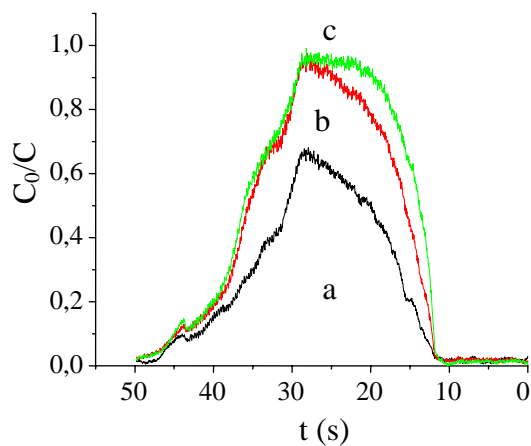
Estes aspectos levam a uma melhor distribuição da RB, possibilitando um melhor contato entre as espécies químicas reativas. Comparando-se os resultados dos experimentos com a cela de fluxo tubular na posição vertical, verifica-se que redução da frequência de pulsação causa um aumento na intensidade de fluorescência nas regiões próximas às paredes do tubo (Fig.35), bem como um maior alargamento do pico registrado.

A ação da gravidade se mostrou também influente na distribuição de RB quando a cela de fluxo era posicionada horizontalmente (Experimento E<sub>2</sub>). Este parâmetro foi especialmente importante em relação ao sentido radial de migração, promovendo então maior dispersão axial. Uma tendência a estabelecimento de escoamento laminar, bem como a formação de vórtices mais localizados no centro da amostra foram também observados.

Em todos os experimentos foi notada a formação de possíveis vórtices, os quais provocaram uma mistura diferenciada neste tipo de fluxo, resultando em eficiente interação entre as soluções envolvidas em função principalmente da agitação. Para uma avaliação quantitativa, os parâmetros de dispersão foram obtidos a partir dos gráficos da intensidade de fluorescência e se constituem na Tabela 9.



**Figura 34. Variação temporal da distribuição radial da concentração de RB (Experimento E<sub>5</sub>).** A figura se refere à inserção de 10 pulsos de A+R a 0,5 Hz, ao tubo na posição vertical e à ausência de reator anterior ao detector;  $v$  = sentido do fluxo;  $g$  = aceleração da gravidade.



**Figura 35. Variação temporal da concentração de RB em três linhas de fluxo (Experimento E<sub>5</sub>).** A figura se refere à inserção de 10 pulsos de A+R a 0,5 Hz, ao tubo na posição horizontal à ausência de reator anterior ao detector;  $v$  = sentido do fluxo;  $g$  = aceleração da gravidade. Registros a, b e c representam parede, posição intermediária e centro do tubo, onde  $a = 0,05$  mm;  $b = 0,3$  mm;  $c = 0,6$  mm.

Para todos os experimentos, os coeficientes de dispersão se situaram com valores próximos a 1,0 com exceção de E<sub>3</sub> onde maior dispersão foi notada devido à influência do

reator adicionado entre o ponto de confluência e o detector. Deve-se, entretanto salientar que a dispersão referente à  $E_3$  é bem menor do que aquela verificada em sistemas de análises em fluxo explorando escoamento laminar. Isto permite se concluir que a natureza pulsante do fluxo é um fator decisivo em reduzir a dispersão. O maior valor de coeficiente de dispersão ( $E_4$  - posição da parede do tubo) indica que realmente a ação da gravidade auxilia no escoamento do fluido pela parte central do tubo.

O parâmetro  $W$  (largura de pico a meia altura) permitiu se avaliar a distribuição de RB em função do tempo para as linhas de fluxo consideradas. Comparação entre valores correspondentes a, b, e c forneceu informação adicional sobre a redistribuição de massas no sentido axial. Dentre todos os experimentos, o que apresentou maior valor  $W$  foi o  $E_3$ , devido ao maior percurso analítico envolvido. O reator adicionado permitiu uma maior redistribuição da amostra, já que os valores foram idênticos para os três pontos avaliados. Nos demais experimentos, as larguras corresponderam ao esperado e suas avaliações já foram relatadas.

**Tabela 9. Parâmetros de dispersão.** Dados obtidos para fluxo pulsante nas celas horizontal ( $E_1$ ,  $E_2$  e  $E_3$ ) e vertical ( $E_4$  e  $E_5$ ).  $D$  = coeficiente de dispersão;  $C_0$  = concentração da amostra não dispersada;  $C_{max}$  = concentração do elemento de fluido correspondente ao máximo sinal registrado;  $W$  = largura de pico à meia altura; colunas a, b, c se referem às linhas de fluxo próximas à parede da cela de fluxo, intermediária e central.

Experimento	$D_{max} (C_0/C_{max})$			$W (s)$		
	a	b	c	a	b	c
$E_1$	1,3	1,0	1,0	6,1	7,6	9,2
$E_2$	1,3	1,1	1,0	15	17	19
$E_3$	1,4	1,5	1,5	22	23	23
$E_4$	6,9	1,3	1,0	6,7	6,6	12
$E_5$	1,5	1,0	1,0	14	16	17

Os resultados acima indicam que não existe uma redução importante em velocidade de escoamento para as linhas de fluxo próximas às paredes. Um aumento no parâmetro  $W$  referente a estas linhas comprovaria a baixa velocidade linear dos elementos de fluido periféricos, o que é típico de fluxo laminar. Como os valores  $W$  se mantiveram similares, pode-se concluir que a dispersão da amostra é mais semelhante àquela ocorrendo em sistemas de análises em fluxo segmentado ou mesmo em regime de escoamento turbulento.

Através das interpretações dos gráficos de dispersão da amostra pode-se concluir que o fluxo pulsante possui características de preservação da amostra e baixa dispersão axial. A caracterização deste tipo de fluxo como laminar não pode ser confirmado, mas mostrou tendências após um tempo maior de percurso analítico. A turbulência pode ser inferida pelo fato da velocidade linear dos elementos de fluido ser semelhante a velocidade média linear. Ainda, a provável formação de vórtices garante a este fluxo uma rápida redistribuição de massas no sentido radial, resultando em excelentes condições de mistura. De fato, a partir destas características fluídicas, o emprego das bombas solenóide nos sistemas de análises em fluxo possibilitou minimizar a geração de resíduos e simplificar os módulos de análises.

## 6. CONCLUSÕES

As características favoráveis do fluxo pulsante provido por bombas solenóides foram demonstradas, e os procedimentos de análises em fluxo propostos apresentaram figuras de mérito superiores àqueles análogos envolvendo fluxo laminar.

Estas bombas se constituíram em excelentes unidades propulsoras de fluidos, apresentando robustez e flexibilidade, o que leva à expansão da faixa de aplicabilidade analítica. Suas potencialidades e limitações foram ressaltadas em relação aos sistemas de análises em fluxo com detecção espectrofotométrica. Sua flexibilidade em condicionar diferentes estratégias analíticas apenas com pequenas mudanças na programação faz destas bombas excelentes unidades para análises multi-paramétricas. Deve ainda ser mencionada a sua portabilidade, que permite uma simplificação no projeto de módulos para análises *in situ*.

Algumas limitações se evidenciaram para maiores tempo de uso e frequências de pulsação, especialmente em relação às bombas de maiores volumes de pulsos, as quais exigem uma corrente elétrica mais intensa que provoca aquecimento, prejudicando a precisão e exatidão volumétrica.

Os sistemas de análises em fluxo desenvolvidos para a determinação espectrofotométrica de bromexina e de fosfato se mostraram mais eficazes, e apresentaram melhor sensibilidade analítica, associada às melhores condições de mistura comparativamente ao sistema com fluxo constante. O fluxo pulsante foi benéfico para as duas situações analíticas devido às suas características intrínsecas: agitação referente à pulsação e parada do fluxo entre os pulsos (baixa frequência de pulsação). Figuras de mérito superiores foram conseguidas com o fluxo pulsante para análises de bromexina em fármacos e fosfato em extratos de solos.

Com o auxílio da técnica de despolarização da fluorescência induzida por laser, foi

possível visualizar e compreender o comportamento das soluções que se dispersam em um fluxo pulsante. Neste sentido, foi possível avaliar de uma forma visual e concisa os resultados das duas aplicações analíticas. Com isto, foi confirmado que o fluxo pulsante possui características superiores em mistura de fluidos comparativamente ao fluxo com regime laminar. Foi comprovado que a dispersão da amostra no fluxo pulsante é similar àquela prevista para ocorrer sob condições de fluxo turbulento. Ainda, as condições de mistura foram superiores relativamente ao sistema envolvendo fluxo laminar e a dispersão total foi bastante reduzida. Isto sem dúvida resulta em uma diminuição pronunciada no volume de amostra (e de reagentes) requerido por determinação.

O desenvolvimento da pesquisa permitiu a obtenção de resultados expressivos, porém recomenda-se fortemente a consecução de experimentos adicionais envolvendo a técnica PLF a outras modalidades de sistemas de análises em fluxo. Ainda, influência do tipo e geometria do reator, da estratégia de amostragem, da viscosidade, do coeficiente de difusão (substituição da solução RB), etc devem ser criticamente examinados de forma a se obter uma descrição quantitativa da dispersão sob condições de fluxo pulsante.

## REFERÊNCIAS

ALBERTUS, F.; HORSTKOTTE, B.; CLADERA, A.; CERDA, V. A robust multisyringe system for process flow analysis - Part I. On-line dilution and single point titration of protolytes. **The Analyst**, Cambridge, v.124, p.1373-1381, 1999.

ALBERTUS, F.; CLADERA, A.; CERDA, V. A robust multisyringe system for process flow analysis-Part II. A multi-commuted injection system applied to the photometric determination of free acidity and iron(III) in metallurgical solutions. **The Analyst**, Cambridge, v.125, p.2364-2371, 2000.

ALMEIDA, M.I.G.S.; SEGUNDO, M.A.; LIMA, J.L.F.C.; RANGEL, A.O.S.S. Multi-syringe flow injection system for the determination of available phosphorus in soil samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Abingdon, v.85, p.51-62, 2005.

AMORNTHAMMARONG, N.; ANUJARAVAT, P.; SEREENONCHAI, K.; CHAISUWAN, P.; SASTRANURAK, P.; WILAIRAT, P.; NACAPRICHA, D. Method development on all injection analysis for the determination of phosphorus in soil and sediment extracts. **Talanta**, Amsterdam, v.68, p.480-487, 2005.

ARNOLD, D.P.; PEACHEY, R.M.; PETTY, J.D.; SWEATMAN, D.R. Automated titrations using a discontinuous programmed flow analyzer. **Analytical Chemistry**, Washington, v.61, p.2109-2116, 1989.

ATKINS, P.W. **Physical Chemistry**. 5ed. Cambridge: Oxford, 1994, 1031pp.

BAADENHUIJSEN, H.; SEUREN-JACOBS, H.E.H. Determination of total CO<sub>2</sub> in plasma by automated flow injection analysis. **Clinical Chemistry**, Washington, v.25, p.443-445, 1979.

BARNETT, N.W.; LENEHAN, C.E.; LEWIS, S.W. Sequential injection analysis: an alternative approach to process analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v.18, p.346-353, 1999.

BECKWITH, P.M.; CROUCH, S.R. Automated stopped-flow spectrophotometer with digital sequencing for millisecond analyses. **Analytical Chemistry**, Washington, v.44, p.221-227, 1972.

BERGAMIN FILHO, H.; MEDEIROS, J.X.; REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G. Solvent extraction in continuous flow injection analysis. Determination of molybdenum in plant material. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.101, p.9-16, 1978a.

BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G.; KRUG, F.J.; REIS, B.F. Merging zones in flow injection analysis.1. Double proportional injector and reagent consumption. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.101, p.17-23, 1978b.

BETTERIDGE, D.; MARCZEWSKI, C.Z.; WADE, A.P. A random walk simulation of flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.165, p.227-236, 1984.

BIOCHEM VALVE INCORPORATION. Disponível em: <[www.biochemvalve.com/productline.asp?id=3](http://www.biochemvalve.com/productline.asp?id=3)>. Acesso em: 29 mar. 2005.

BLACK, C.A.; McLEAN, E.O. **Methods of soil analysis**. Madison: ASA, 1965.

BLAEDEL, W.J.; HICKS, G.P. Continuous analysis by measurement of the rate of enzyme catalyzed reactions. **Analytical Chemistry**, Washington, v.34, p.388-394, 1962.

BLAEDEL, W.J.; OLSON, C. Continuous analysis by the amperometric measurement of reaction rate. **Analytical Chemistry**, Washington, v.36, p.343-347, 1964.

BOWERS, C.P.; FOGELMAN, K.D.; NAGY, J.C.; RIDLEY, T.Y.; WANG, Y.L.; EVETTS, S.W.; MARGERUM, D.W. Rate measurements by the pulsed-accelerated-flow method. **Analytical Chemistry**, Washington, v.69, p.431-438, 1997.

BRITISH PHARMACOPOEIA, London: HMSO, 1993.

BRUNO, H.; ANDRADE F.; INON, F.; TUDINO, M.; TROCCOLI, O. Oscillatory control of sample dispersion in a continuous flow system. **The Analyst**, Cambridge, v.126, p.394-398, 2001.

BURGUERA, M.; BURGUERA, J.L.; ALARCON, O.M. Flow-injection and microwave-oven sample decomposition for determination of copper, zinc and iron in whole-blood by



atomic-absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.179, p.351-357, 1986.

CARLSSON, K.; JACOBSEN, H.S.; JENSEN, A.L.; STENSTROM, T.; KARLBERG, B. Micro-continuous flow system for wet chemical analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.354, p.35-42, 1997.

CARLSSON, K.; KARLBERG, B. Monosegmented micro-volume liquid-liquid flow-extraction system based on intermittent pumping and spectroscopic detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.415, p.1-7, 2000a.

CARLSSON, K.; KARLBERG, B. Determination of octanol-water partition coefficients using a micro-volume liquid-liquid flow extraction system. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.423, p.137-144, 2000b.

CARLSSON, K.; KARLBERG, B. Micro-volume flow titration and screening the dissociation constants ( $pK(a)$ ) of weak acids. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.434, p.149-156, 2001.

CARNEIRO, J.M.T.; DIAS, A.C.B.; ZAGATTO, E.A.G.; HONORATO, R.S. Spectrophotometric catalytic determination of Fe(III) in estuarine waters using a flow-batch system. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.455, p.327-333, 2002a.

CARNEIRO, J.M.T.; ZAGATTO, E.A.G.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. Spectrophotometric determination of phytic acid in plant extracts using a multi-pumping flow systems. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.474, p.161-166, 2002b.

CARNEIRO, J.M.T.; DIAS, A.C.B.; ZAGATTO, E.A.G.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. An improved sampling approach in multi-pumping flow systems applied to the spectrophotometric determination of glucose and fructose in syrups. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.531, p.279-284, 2005.

CERDA, V.; ESTELA, J.M.; FORTEZA, R.; CLADERA, A.; BECERRA, E.; ALTIMIRA, P.; SITJAR, P. Flow techniques in water analysis, **Talanta**, Amsterdam, v.50, p.695-705, 1999.

CHANCE, B. The accelerated flow method for rapid reactions. Part II. Design, Construction, and Tests. I. Apparatus Construction. **Journal of the Franklin Institute**, Oxford, v.229, p.737–766, 1940.

CHANCE, B. Photoelectric colorimeter for rapid reactions. **Review of Scientific Instruments**, Woodbury, v.13, p.158-161, 1942.

CHANCE, B. Rapid and sensitive spectrophotometry.1.The accelerated and stopped-flow methods for the measurement of the reaction kinetics and spectra of unstable compounds in the visible region of the spectrum. **Review of Scientific Instruments**, Woodbury, v.22, p.619-627, 1951.

CHANCE, B. The stopped-flow method and chemical intermediates in enzyme reactions – a personal essay. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v.80, p.387–400, 2004.

CHAPIN, T.P.; WANTY, R.B. Development of a solenoid pumped in situ zinc analyzer for environmental monitoring. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.543, p.199-208, 2005.

COUTINHO, J. The molybdate/ascorbic acid blue method for the phosphorus determination in very dilute and colored extracts by segmented flow analysis. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.27, p.1363-1375, 1996.

CROUCH, S.R.; HOLLER, F.J.; NOTZ, P.K.; BECKWITH, P.M. Automated stopped-flow for fast reaction-rate methods. **Applied Spectroscopy Reviews**, New York, v.13, p.165-259, 1977.

CROWE, C.D.; LEVIN, H.W.; BETTERIDGE, D.; WADE, A.P. A random walk simulation of flow-injection systems with merging zones. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.194, p.49-60, 1987.

DANIEL, T.C.; SHARPLEY, A.N.; LEMUNYON, J.L. Agricultural phosphorus and eutrophication: A symposium overview. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.27, p.251-257, 1998.

DIAS, A.C.B.; CARNEIRO, J.M.T.; GRASSI, V.; ZAGATTO, E.A.G. High-sensitivity methods for sequential injection determination of the main constituents of alloys. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.514, p.253-257, 2004.

DIAS, A.C.B.; BORGES, E.P.; ZAGATTO, E.A.G.; WORSFOLD, P.J. A critical examination of the components of the Schlieren effect in flow analysis. **Talanta**, Amsterdam, v.68, p.1076-1082, 2006.

DICKMAN, S.R.; BRAY, R.H. Colorimetric determination of phosphate. **Analytical Chemistry**, Washington, v.15, p.665-668, 1940.

EISMAN, M.; GALLEGU, M.; VALCARCEL, M. Automatic-determination of amylocaine and bromhexine by atomic-absorption spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.11, p.301-305, 1993.

EL-KOMMOS, M.E.; EMARA, K.M. Spectrophotometric determination of certain local anaesthetics using 3-methylbenzothiazolin-2-one hydrazone. **The Analyst**, Cambridge, v. 112, p.1253-1256, 1987.

ESTELA, J.M.; CERDA, V. Flow analysis techniques for phosphorus: an overview. **Talanta**, Amsterdam, v.66, p.307-331, 2005.

EUROPEAN CO-OPERATION FOR ACCREDITATION. Guidelines on the calibration of nonautomatic weighing instruments, EA-10/18. Disponível em: <<http://www.european-accreditation.org/content/documentation/fics.mpi?rebase=%5C0004%5FA Advisory%20and%20specific%20calibration%20documents%5CSpecific%20calibration%20documents%5C>>.

Acesso em: 22 out. 2005.

FERNDANDES, R.N.; REIS, B.F. Flow system exploiting multicommutation to increase sample residence time for improved sensitivity. Simultaneous determination of ammonium and ortho-phosphate in natural water. **Talanta**, Amsterdam, v.58, p.729-737, 2002.

FRANCIS p.s.; LEWIS, S.W.; LIM, K.F.; CARLSSON, K.; KARLBERG, B. Flow analysis based on a pulsed flow of solution: theory, instrumentation and applications. **Talanta**, Amsterdam, v.58, p.1029-1042, 2002.

GALA, B.; GOMEZ-HENS, A.; PEREZ-BENDITO, D. Direct kinetic determination of bromhexine hydrochloride in pharmaceutical formulations. **Analytical Letters**, New York, v.26, p.2607-2617, 1993.

GALHARDO, C.X.; MASINI, J.C. Spectrophotometric determination of phosphate and silicate by sequential injection using molybdenum blue chemistry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.417, p.191-200, 2000.

GARCIA, M.P.; PLA, R.P.; CATALA, A.M. Determination of assimilable phosphorus in soil by reversed flow injection analysis. **Soil Science**, Baltimore, v.151, p.349-354, 1991.

GOICOECHEA, H.C.; OLIVIERI, A.C. Determination of bromhexine in cough-syrups by absorption spectrophotometry and multivariate calibration using partial least-squares and hybrid linear analyses. Application of a novel method of wavelength selection. **Talanta**, Amsterdam, v.49, p.793-800, 1999.

GRADY, H.; LAMAR, M.A. Glucose determination by automatic chemical analysis. **Clinical Chemistry**, Washington, v.5, p.542-550, 1959.

GRASSI, V. **Sistemas de análises em fluxo envolvendo ensaios prévios**. 2003. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

GRASSI, V.; DIAS, A.C.B.; ZAGATTO, E.A.G. Flow systems exploiting in-line prior assays. **Talanta**, Amsterdam, v.64, p.1114-1118, 2004.

GRUDPAN, K. Some recent developments on cost-effective flow-based analysis. **Talanta**, Amsterdam, v.64, p.1084-1090, 2004.

GUBELI, T.; CHRISTIAN, G.D.; RUZICKA, J. Fundamentals of sinusoidal flow sequential injection spectrophotometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v.63, p.2407-2413, 1991.

HANNA, J.G.; SIGGIA, S. Differential kinetic analysis of mixtures using a continuous flow method. **Analytical Chemistry**, Washington, v.36, p.2022-2023, 1964.

HARTRIDGE, H.; ROUGHTON, F.J.W. A method of measuring the velocity of very rapid chemical reactions. **Royal Society Proceedings**, London, v.A104, p.376-394, 1923.

HILL, J.B. Automated fluorimetric method for determination of serum calcium. **Clinical Chemistry**, Washington, v.11, p.122-130, 1965.

HULL, R.D.; MALICK, R.E.; DORSEY, J.G. Dispersion phenomena in flow-injection systems. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.267, p.1-24, 1992.

ICARDO, M.C.; MATEO, J.V.G.; CALATAYUD, J.M. Multicommutation as a powerful new analytical tool. **Trends in Analytical Chemistry**, London, v.21, p.366-378, 2002

IVASKA, A.; RUZICKA, J. From flow injection to sequential injection: comparison of methodologies and selection of liquid drives. **The Analyst**, Cambridge, v.118, p.885-889, 1993.

JACOBS, S.A.; NEMETH, M.T.; KRAMER, G.W.; RIDLEY, T.Y.; MARGERUM, D.W. Pulsed-accelerated-flow spectrometer with integrating observation for measurements of rapid rates of reaction. **Analytical Chemistry**, Washington, v.56, p.1058-1065, 1984.

JANNASCH, H.W.; JOHNSON, K.S.; SAKAMOTO, C.M. Submersible, osmotically pumped analyzers for continuous determination of nitrate in situ. **Analytical Chemistry**, Washington, v.66, p.3352-3361, 1994.

KARLBERG, B.; THELANDER, S. Extraction based on the flow injection principle. Part 1. Description of the extraction system. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.98, p.1-7, 1978.

KORENAGA, T.; SHEN, F.; YOSHIDA, H.; TAKAHASHI, T. Study of sample dispersion in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.214, p.97-105, 1988.

KORENAGA, T.; ZHOU, X.; MORIWAKE, T.; MURAKI, H.; NAITO, T.; SANUKI, S. Computer-controlled micropump suitable for precise microliter delivery and complete in-line mixing. **Analytical Chemistry**, Washington, v.66, p.73-78, 1994.

KRONKA, E.A.M.; REIS, B.F.; KORN, M.; BERGAMIN, H. Multicommutation in flow analysis .5. Binary sampling for sequential spectrophotometric determination of ammonium and phosphate in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.334, p.287-293, 1996.

KRUG, F.J.; MORTATTI, J.; PESSEDA, L.C.R.; ZAGATTO, E.A.G.; BERGAMIN, H. Flow-injection spectrophotometric determination of boron in plant-material with Azomethine-H. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.125, p.29-35, 1981.

KRUG, F.J.; REIS, B.F.; GINE, M.F.; ZAGATTO, E.A.G.; FERREIRA, J.R.; JACINTHO, A.O. Zone trapping in flow-injection analysis. Spectrophotometric determination of low-levels of ammonium ion in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.151, p.39-48, 1983.

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

LAU, O.W.; MOK, C.S. High-performance liquid-chromatographic determination of active ingredients in cough cold syrups with indirect conductometric detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.693, p.45-54, 1995.

LAVORANTE, A.F.; MORALES-RUBIO, A.; de la GUARDIA, M.; REIS, B.F. Micro-pumping flow system for spectrophotometric determination of anionic surfactants in water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.381, p.1305-1309, 2005.

LAZARO, F.; DECASTRO, M.D.L.; VALCARCEL, M. Stopped-flow injection determination of copper (II) at the  $\text{ng ml}^{-1}$  level. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.165, p.177-185, 1984.

LEWIS, S.W.; FRANCIS, P.S.; LIM, K.F.; JENKINS, G.E.; WANG, X.D. Pulsed flow chemistry: a new approach to solution handling for flow analysis coupled with chemiluminescence detection. **The Analyst**, Cambridge, v.125, p.1869-1874, 2000.

LEWIS, S.W.; FRANCIS, P.S.; LIM, K.F.; JENKINS, G.E. Monitoring urea levels during haemodialysis with a pulsed-flow chemiluminescence analyser. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.461, p.131-139, 2002.

LIMA, J.L.F.C.; SA, S.M.O.; SANTOS, J.L.M.; ZAGATTO, E.A.G. Multi-pumping flow system for the spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.32, p.1011-1017, 2003.

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

LIU, Y.Z.; KIM, B.J.; SUNG, H.J. Two-fluid mixing in a microchannel. **International Journal of Heat and Fluid Flow**, New York, v.25, p.986-995, 2004.

LUCA, G.C.; REIS, B.F. Simultaneous photometric determination of albumin and total protein in animal blood plasma employing a multicommutated flow system to carried out on line dilution and reagents solutions handling. **Spectrochimica Acta Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Oxford, v.60, p.579-583, 2004.

LUECK, C.H.; BOLTZ, D.F. Spectrophotometric study of modified heteropoly blue method for phosphorus. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, p.1168-1171, 1956.

MAGNI, D.M.; OLIVIERI, A.C.; BONIVARDI, A.L. Artificial neural networks study of the catalytic reduction of resazurin: stopped-flow injection kinetic-spectrophotometric determination of Cu(II) and Ni(II). **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.528, p.275-284, 2005.

MARCZENKO, Z. **Separation and spectrophotometric determination of elements**. Chichester: Ellis Horwood, 1986. 678p.

MARQUES, K.L.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. A catalytic multi-pumping flow system for the chemiluminometric determination of metformin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.382, p.452-457, 2005.

MATOS, R.C.; GUTZ, I.G.R.; ANGNES, L.; FONTENELE, R.S.; PEDROTTI, J.J. Propulsor pneumático versátil e isento de pulsação para sistemas de análises em fluxo. **Química Nova**, São Paulo, v.24, p.795-798, 2001.

McKELVIE, I. Flow injection analysis: thirty years on and going strong. **Journal of Flow Injection Analysis**, Toyota, v.22, p.1, 2005.

MENESES, S.R.P.; MARQUES, K.L.; PIRES, C.K.; SANTOS, J.L.M.; FERNANDES, E.; LIMA, J.L.F.C.; ZAGATTO, E.A.G. Evaluation of the total antioxidant capacity by using a multipumping flow system with chemiluminescent detection. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v.345, p.90-95, 2005.

MIRO, M.; CERDA, V.; ESTELA, J.M. Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications. **Trends in Analytical Chemistry**, London, v.21, p.199-210, 2002.

MOTOMIZU, S.; LI, Z.H. Trace and ultratrace analysis methods for the determination of phosphorus by flow-injection techniques, **Talanta**, Amsterdam, v.66, p.332-340, 2005.

MUNOZ, A.; MAS-TORRES, F.; ESTELA, J.M.; CERDA, V. Evaluation of spectrophotometric methods for determination of orthophosphates by sequential injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.350, p.21-29, 1997.

MURPHY, J.; RILEY, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.27, p.31-36, 1962.

NEMETH, M.T.; FOGELMAN, K.D.; RIDLEY, T.Y.; MARGERUM, D.W. Rapid rate measurements by the pulsed-accelerated-flow method. **Analytical Chemistry**, Washington, v.59, p.283-291, 1987.

NERIN, C.; CACHO, J.; GARNICA, A. Indirect determination of bromhexine by atomic-absorption spectrophotometry. **Analytical Letters Part B- Clinical and Biochemical Analysis**, New York, v.18, p.1887-1896, 1985.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 399p.

NOVOZAMSKY, I.; van DIJK, D.; van der LEE, J.J.; HOUBA, V.J.G. Automated determination of trace amounts of phosphate in soil extracts using malachite green. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.24, p.1065-1076, 1993.

OLIVEIRA, C.C.; SARTINI, R.P.; REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G. Multicommutation in flow analysis .4. Computer-assisted splitting for spectrophotometric determination of copper and zinc in plants. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.332, p.173-178,1996.

OWENS, G.D.; TAYLOR, R.W.; RIDLEY, T.Y.; MARGERUM, D.W. Pulsed-flow instruments for measurements of fast reactions in solution. **Analytical Chemistry**, Washington, v.52, p.130-138, 1980.



PASQUINI, C.; OLIVEIRA, W.A. Monosegmented System for Continuous Flow Analysis. Spectrophotometric Determination of Chromium(VI), Ammonia, and Phosphorus. **Analytical Chemistry**, Washington, v.57, p.2575-2579, 1985.

PEREZ-RUIZ, T.; MARTINEZ-LOZANO, C.; SANZ, A.; MONDEJAR, S. Flow-injection extraction-spectrophotometric determination of bromhexine with orange IV. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.13, p.1101-1106, 1995.

PEREZ-RUIZ, T.; MARTÍNEZ-LOZANO, C.; SANZ, A.; BRAVO, E. Determination of bromhexine and ambroxol in pharmaceutical dosage forms, urine and blood serum. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.692, p.199-205, 1997.

PHARMACOPÉE EUROPEËNNE, Conseil de l'Europe, Maisonneuve SA. 10. ed. Saint-Ruffine, 1990.

PINTO, P.C.A.G.; SARAIVA, M.L.M.F.S.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. A pulsed sequential injection analysis flow system for the fluorimetric determination of indomethacin in pharmaceutical preparations. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.539, p.173-179, 2005.

PIRES, C.K.; MARQUES, K.L.; SANTOS, J.L.M.; LAPA, R.A.S.; LIMA, J.L.F.C.; ZAGATTO, E.A.G. Chemiluminometric determination of carvedilol in a multi-pumping flow system. **Talanta**, Amsterdam, v.68, p.239-244, 2005.

PONS, C.; FORTEZA, R.; CERDA, V. Multi-pumping flow system for the determination, solid-phase extraction and speciation analysis of iron. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.550, p.33-39, 2005.

POSPISILOVA, M.; POLASEK, M.; JOKL, V. Determination of ambroxol or bromhexine in pharmaceuticals by capillary isotachopheresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.24, p.421-428, 2001.

PRADOS-ROSALES, R.C.; LUQUE-GARCIA, J.L.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Propelling devices: the heart of flow injection approaches. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.461, p.169-180, 2002.

PRIOR, J.A.V.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. Sampling strategies exploiting multi-pumping flow systems. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.375, p.1234-1239, 2003.

QUINTELLA, C.M.; MUSSE, A.P.S.; GONÇALVES, C.C.; McCAFFERY, A.J. Fluorescence depolarisation monitoring of liquid flow before and after exiting a slit nozzle. **Experiments in fluids**, Nova York, v.35, p.41-48, 2003.

QUINTELLA, C.M.; WATANABE, Y.N.; LIMA, A.M.V.; KORN, M.; EMBIRUÇU, M.; MUSSE, A.P.S. Evaluation of transversal and longitudinal dispersion in a flow injection system by exploiting laser induced fluorescence: influence of flow-cell positioning. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.523, p.293-300, 2004.

RAO, E.V.; RAO, G.R.; RAGHUVeer, S.; KHADGAPATHI, P. Gas-liquid-chromatographic and ion-pair high-performance liquid-chromatographic determination of pseudoephedrine hydrochloride and bromhexine hydrochloride in pharmaceuticals. **The Analyst**, Cambridge, v.112, p.871-874, 1987.

RAUHA, J.; SALOMIES, H.; AALTO, M. Simultaneous determination of bromhexine hydrochloride and methyl and propyl *p*-hydroxybenzoate and determination of dextromethorpan hydrobromide in cough-cold syrup by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.15, p.287-293, 1996.

REIJN, J.M.; van der LINDEN, W.E.; POPPE, H. Transport phenomena in flow injection analysis without chemical reaction. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.126, p.1-13, 1981.

REIS, B.F.; JACINTHO, A.O.; MORTATTI, J.; KRUG, F.J.; ZAGATTO, E.A.G.; BERGAMIN, H.; PESSEDA, L.C.R. Zone-sampling processes in flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.123, p.221-228, 1981.

REIS, B.F.; GINÉ, M.F.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C.; LAPA, R.A.S. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.293, p.129-138, 1994.

REIS, B.F.; KNOCHEN, M.; PIGNALOSA, G.; CABRERA, N.; GIGLIO, J. A multicommutated flow system for the determination of copper, chromium, iron and lead in lubricating oils with detection by flame AAS. **Talanta**, Amsterdam, v.64, p.1220-1225, 2004.

RIBEIRO, M.F.T.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C.; DIAS, A.C.B.; ZAGATTO, E.A.G. Single interface in flow analysis. **Talanta**, Amsterdam, v.68, p.351-358, 2005.

RIBONE, M.E.; PAGANI, A.P.; OLIVIERI, A.C. Determination of the minor bromhexine in cotrimoxazole-containing tablets by absorption spectrophotometry and partial least-squares (PLS-1) multivariate calibration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v.23, p.591-595, 2000.

RIOS, A.; VALCARCEL, M. Exploiting the hydrodynamics aspects of continuous-flow systems. **Talanta**, Amsterdam, v.38, p.1359-1368, 1991.

ROCHA, F.R.P.; REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C.; LAPA, R.A.S.; SANTOS, J.L.M. Multicommutation in flow analysis: concept, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.468, p.119-131, 2002.

ROCHA, F.R.P.; RODENAS-TORRALBA, E.; MORALES-RUBIO, A.; de la GUARDIA, M. A clean method for flow injection spectrophotometric determination of cyclamate in table sweeteners. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.547, p.204-208, 2005a.

ROCHA, F.R.P.; RODENAS-TORRALBA, E.; REIS, B.F.; MORALES-RUBIO, A.; de la GUARDIA, M. A portable and low cost equipment for flow injection chemiluminescence measurements. **Talanta**, Amsterdam, v.67, p.673-677, 2005b.

RODENAS-TORRALBA, E.; MORALES-RUBIO, A.; de la GUARDIA, M. Determination of phenols in waters using micro-pumped multicommutation and spectrophotometric detection: an automated alternative to the standard procedure. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.383, p.138-144, 2005.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection analyses. 1. New concept of fast continuous-flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.78, p.145-157, 1975.

RUZICKA, J.; STEWART, J.W.B. Flow injection analysis. 2. Ultrafast determination of phosphorus in plant material by continuous-flow spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.79, p.79-91, 1975.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection analysis. Part IX. A new approach to continuous flow titrations. **Analytica Chimica Acta**, v.92, p.235-249, 1977.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Stopped flow and merging zones - New approach to enzymatic assay by flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.106, p.207-224, 1979.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection analysis. Principles, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.114, p.19-44, 1980.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. **Flow injection analysis**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1988. 498 p.

RUZICKA, J.; MARSHALL, G.D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.237, p.329-343, 1990a.

RUZICKA, J.; MARSHALL, G.D.; CHRISTIAN, G.D. Variable flow rates and sinusoidal flow pump for flow injection analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, v.62, p.1861-1866, 1990b.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection: from beaker to microfluidics. **Analytical Chemistry**, Washington, v.72, n.5, p.212-217A, 2000.

RUZICKA, J. Lab-on-valve: universal microflow analyser based on sequential and bead injection. **The Analyst**, Cambridge, v.125, p.1053-1060, 2000.

SANTOS, J.L.M.; CLAUSSE, A.; LIMA, J.L.F.C.; SARAIVA, M.L.F.S.; RANGEL, A.O.S. Determination of ambroxol in an automated multi-pumping pulsed flow system. **Analytical Sciences**, Tokyo, v.21, p.461-464, 2005.

SAWICKI, E.; STANLEY, T.W.; HAUSER, T.R.; ELBERT, W.; NOE, J.L. Spot test detection and colorimetric determination of aromatic amines and imino heteroaromatic

compounds with 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone. **Analytical Chemistry**, Washington, v.33, p.722-725, 1961.

SKEGGS JUNIOR, L.T. An automatic method for colorimetric analysis. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v.28, p.311-322, 1957.

SKEGGS JUNIOR, L.T.; HOCHSTRASSER, H. Multiple automatic sequential analysis. **Clinical Chemistry**, Washington, v.10, p.918, 1964.

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

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. Tradução Ignez Caracelli; Paulo Celso Isolani; Regina Helena de Almeida Santos; Regina Helena Porto Francisco. 5<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

STONE, D.C.; TYSON, J.F. Models for dispersion in flow-injection analysis. 1. Basic requirements and study of factors affecting dispersion. **The Analyst**, Cambridge, v.112, p.515-521, 1987.

TANTISHAIYAKUL, V.; POEAKNAPO, C.; SRIBUN, P.; SIRISUPPANON, K. Simultaneous determination of dextromethorphan HBr and bromhexine HCl in tablets by first-derivative spectrophotometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.17, p.237-243, 1998.

TAYLOR, G. Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube. **Proceedings Royal Society**, London, v.219, p.186-203, 1953.

TOMÉ Jr., J.B. **Manual para interpretação de análise de solo**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária Ltda, 1997. 247p.

TUMANG, C.A.; TOMAZZINI, M.C.; REIS, B.F. Automatic procedure exploiting multicommutation in flow analysis for simultaneous spectrophotometric determination of nonstructural carbohydrates and reducing sugar in forage materials. **Analytical Sciences**, Tokyo, v.19, p.1683-1686, 2003.

TURNER, B.L.; CADE-MENUN, B.J.; CONDRON, L.M.; NEWMAN, S. Extraction of soil organic phosphorus. **Talanta**, Amsterdam, v.66, p.294-306, 2005.

TYSON, J.F.; IDRIS, A.B. Flow-injection sample introduction for atomic-absorption spectrometry - Applications of a simplified model for dispersion. **The Analyst**, Cambridge, v.106, p.1125-1129, 1981.

VALCARCEL, M.; LUQUE de CASTRO, M.D. **Flow injection analysis**. Principles and applications. Chichester: Ellis Horwood, 1987.

van AKKER, E.B.; BOS, M.; van der LINDEN, W.E. Continuous, pulsed and stopped flow in a  $\mu$ -flow injection system (numerical vs experimental). **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.378, p.111-117, 1999.

van STADEN, J.F.; TALJAARD, R.E. On-line monitoring of phosphate in natural water and effluent streams using sequential injection analysis. **Mikrochimica Acta**, Vienna, v.128, p.223-228, 1998.

van STADEN, J.F. Solving the problems of sequential injection systems as process analyzers. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.467, p.61-73, 2002.

VANDERSLICE, J.T.; STEWART, K.K.; ROSENFELD, A.G.; HIGGS, D.J. Laminar dispersion in flow-injection analysis. **Talanta**, Amsterdam, v.28, p.11-18, 1981.

VANDERSLICE, J.T.; ROSENFELD, A.G.; BREECHER, G.R. Laminar-flow bolus shapes in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.179, p.119-129, 1986.

VIEIRA, J.A.; RAIMUNDO, I.M.; REIS, B.F. Turbidimetric determination of sulphate employing gravity flow-based systems. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.438, p.1-2, 2001.

WADA, H.; HIRAOKA, A.; YUCHI, A. NAKAGAWA, G. Sample dispersion with chemical reactions in a flow injection system. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.179, p.181-188, 1986.

WANG, X.D.; CARDWELL, T.J.; CATTRALL, R.W.; JENKINS, G.E. Pulsed flow chemistry. A new approach to the generation of concentration profiles in flow analysis. **Analytical Communications**, Cambridge, v.35, p.97-101, 1998.

WANG, R.Y.; JARRATT, J.A.; KEAY, P.J.; HAWKES, J.J.; COAKLEY, W.T. Development of an automated on-line analysis system using flow injection, ultrasound filtration and CCD detection. **Talanta**, Amsterdam, v.52, p.129–139, 2000.

WARRELL, L.A.; MOODY, P.W. Automated determination of micro amounts of phosphate in dilute calcium chloride extracts of soils. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.15, p.779-785, 1984.

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

WHITE, A.J.; DRABBLE, K.; WHARTON, C.W. Stopped-flow apparatus for infrared-spectroscopy of aqueous-solutions. **Biochemical Journal**, London, v.306, p.843-849, 1995.

ZAGATTO, E.A.G.; JACINTHO, A.O.; REIS, B.F.; KRUG, F.J.; BERGAMIN F<sup>o</sup>, H; PESSEDA, L.C.R.; MORTATTI, J.; GINÉ, M.F. **Manual de análises de plantas e águas empregando sistemas de injeção em fluxo**. Piracicaba: CENA/USP, 1981.

ZAGATTO, E.A.G.; BAHIA, O.; GINE, M.F.; BERGAMIN, H. A simple procedure for hydrodynamic injection in flow-injection analysis applied to the atomic-absorption spectrometry of chromium in steels. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.181, p.265-270, 1986a.

ZAGATTO, E.A.G.; BAHIA F<sup>o</sup>, O.; BERGAMIN, F<sup>o</sup>, H. Recording the real sample distribution and concentration time functions in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.193, p309-314, 1986b.

ZAGATTO, E.A.G.; WORSFOLD, P.J. **Flow analysis: overview**. In: WOESFOLD, P.J.; TOWNSHEND, A.; POOLE, C.F. (Eds.). **Encyclopedia of Analytical Science**, 2<sup>nd</sup> Edn, Oxford, Elsevier, p.24-31, 2005.