

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

Mariana Amorim Sanchez

**Desenvolvimento de procedimentos analíticos em sistemas de
análises em fluxo empregando quimiluminescência em guia
de ondas**

São Paulo

Data do depósito na SPG: 03/05/2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Mariana Amorim Sanchez

Desenvolvimento de procedimentos analíticos em sistemas de análises em fluxo empregando quimiluminescência em guia de ondas

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química (Química Analítica)

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

São Paulo

2007

Mariana Amorim Sanchez

Desenvolvimento de procedimentos analíticos em sistemas de análises em fluxo empregando quimiluminescência em guia de ondas.

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Química Analítica*

Aprovada em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

“Os segredos das ciências foram dados aos homens para seu progresso, mas jamais ele poderá ultrapassar os limites estabelecidos por Deus.”

(Allan Kardec)

Dedico:

A Deus, por fazer da minha vida uma vitória a cada novo dia, por iluminar meu caminho, zelar por mim, me presentear com uma família extraordinária e amigos maravilhosos, me permitir sonhar, me dar forças para lutar em busca destes sonhos e por me auxiliar a manter inabalável a minha fé de que tudo acabará bem, mesmo com a iminência de grandes dificuldades.

Obrigada meu Deus!

Agradeço:

Aos meus amados pais, Juan e Sandra, meus super-heróis, meus cúmplices, meus verdadeiros mestres e amigos, que me ensinaram que, com amor, coragem, humildade e perseverança, conquistamos nossos objetivos, tornando-nos melhores a cada dia, aprendendo a arte de viver e ser feliz. Que compartilharam comigo as vitórias e os maus momentos, sempre com um sorriso de confiança, um abraço encorajador, palavras de incentivo e amor incondicional.

Aos meus amados irmãos, Bruno e Ivan, e à minha cunhada Fúlvia, pela confiança, cumplicidade e amizade constantes.

A todos os meus familiares pelo apoio e incentivo.

Ofereço a todos vocês esta vitória, pois tudo que fiz até agora foi receber.

Ao meu orientador e amigo, Fábio, pela paciência e competência com que me orientou. Uma pessoa incrível, pela qual tenho muita admiração e alegria em ter tido a oportunidade de conhecer e conviver. Pela sua dignidade e caráter admiráveis. Por sua amizade, e por não medir esforços na orientação deste trabalho. Um orientador que me deu ensinamentos não só para a vida acadêmica, mas também para a minha formação como ser humano. Costumamos chamar, carinhosamente, nosso orientador de “pai científico”, e hoje eu posso afirmar, com convicção, que ele realmente é um “pai” para seus orientandos, na mais ampla acepção da palavra.

Aos meus verdadeiros amigos, obrigada pelo carinho, paciência, amizade sincera e por estarem sempre ao meu lado.

Aos amigos do LABEQ, agradeço pelos conhecimentos compartilhados, pelos bons e maus momentos conseqüentes do convívio diário, pela amizade firmada e pelos inúmeros bolos, tortas, doces e outras guloseimas que compartilhamos, exceto a lenda do “bolo” de goiaba (que na verdade é rosca).

Aos amigos da “República Volúveis”, que sempre me receberam com carinho e me fizeram dar boas risadas, mesmo nos momentos mais difíceis da execução deste trabalho.

“A amizade é um sentimento mais nobre que o amor, pois permite que o objeto dela se divida em outros afetos, enquanto o amor tem intrínseco o ciúme, que não admite a rivalidade. E eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!”

(Vinícius de Moraes)

Agradecimentos gerais:

A todos que, direta ou indiretamente, me auxiliaram nesta caminhada.

À Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) pela formação acadêmica, e em especial aos Professores Doutores André Fernando de Oliveira e Astrea Filomena de Souza Silva, pelos conhecimentos compartilhados durante o período de iniciação científica.

À Universidade de São Paulo (USP) e aos funcionários do Instituto de Química (IQUSP), que contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP, pela bolsa concedida e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao Professor Doutor Lúcio Angnes pelo fornecimento do padrão de salbutamol, e à doutoranda Fabiana da Silva Felix pelas análises por eletroforese capilar.

Aos Professores Doutores Nina Coichev e Jorge César Masini, da banca do exame de qualificação, pelos comentários e sugestões apresentadas.

Resumo

SANCHEZ, M.A. **Desenvolvimento de procedimentos analíticos em sistemas de análises em fluxo empregando quimiluminescência em guia de ondas.** 2007. 67p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Procedimentos analíticos baseados em medidas de quimiluminescência caracterizam-se por apresentar alta sensibilidade, baixos limites de detecção, ampla faixa de resposta linear e instrumentação simples. Uma das principais dificuldades relacionadas a este tipo de medida é maximizar a quantidade de radiação detectada, já que a emissão ocorre em todas as direções, o que dificulta o posicionamento adequado da cela de medida em relação ao sistema de detecção. Uma alternativa consiste na utilização de guias de ondas, que são dispositivos que conduzem a radiação emitida, minimizando perdas durante o transporte, tal como ocorre nos cabos de fibras ópticas. O acoplamento de sistemas de análises em fluxo com detecção por quimiluminescência é bastante conveniente, já que a mistura entre amostras e reagentes precisa ser rápida e altamente reprodutível, além de ser realizada a uma distância muito pequena do sistema de detecção, devido ao curto tempo de vida dos intermediários no estado excitado. Neste trabalho, é apresentada a avaliação de uma cela constituída por um guia de ondas para medidas de quimiluminescência. Estas ferramentas foram aplicadas à determinação de hipoclorito em amostras de líquido de Dakin empregando a reação de oxidação do luminol. Também foi desenvolvido um procedimento analítico para a determinação de salbutamol, explorando a inibição da quimiluminescência da reação de oxidação de luminol por hipoclorito, caracterizando-se como uma alternativa promissora para a quantificação do fármaco. Em ambas as aplicações, os resultados foram concordantes com os obtidos por procedimentos de referência a nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: quimiluminescência, análises por injeção em fluxo, guia de ondas, hipoclorito, salbutamol.

Abstract

SANCHEZ, M.A. **Development of flow-based analytical procedures employing chemiluminescence in liquid-core waveguides.** 2007. 67p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Analytical procedures based on chemiluminescence are characterized by high sensitivity, low detection limits, wide linear response ranges and simple instrumentation. One of the main troubles is to increase the amount of detected radiation, because emission occurs in all directions, making difficult the positioning of the measurement cell in relation to the detection system. An alternative consists in the use of liquid-core waveguides, devices that constrain the emitted radiation, minimizing losses during the transport, in a similar way to optical fibers. Coupling flow analysis to chemiluminescence is attractive, because sample and reagents mixing needs to be fast, highly reproducible and accomplished close to the detector, in view of the short lifetime of the intermediates in the excited state. In this work, a cell constituted by a liquid-core waveguide was evaluated for chemiluminescence measurements. These tools were applied to the determination of hypochlorite in Dakin solution samples based on the oxidation of luminol. An analytical procedure for salbutamol determination, based on the inhibition of chemiluminescence of luminol oxidation by hypochlorite, was developed, characterizing as a promising alternative for the quantification of this pharmaceutical substance. In both applications, results were in agreement to those obtained by reference procedures at the 95% confidence level.

Keywords: chemiluminescence, flow-injection analysis, liquid-core waveguide, hypochlorite, salbutamol.

Lista de Tabelas

TABELA 1 - Tipos de luminescência.....	3
TABELA 2 - Comparação das características analíticas de procedimentos para determinação de H ₂ O ₂ por quimiluminescência.....	32
TABELA 3 - Condições otimizadas para determinação de ClO ⁻ por quimiluminescência.....	48
TABELA 4 - Comparação das características analíticas de procedimentos para determinação de ClO ⁻ por quimiluminescência.....	51
TABELA 5 - Resultados das análises de ClO ⁻ em amostras de líquido de Dakin por quimiluminescência e por titulação iodométrica.....	52
TABELA 6 - Valores rotulados e resultados das análises das amostras de salbutamol por diferentes procedimentos.....	62

Lista de Figuras

Figura 1 - Estruturas químicas de substratos de reações quimiluminescentes..	2
Figura 2 - Proposta mecanística de Albertin et al. para a reação quimiluminescente do luminol, empregando H_2O_2 como oxidante.....	8
Figura 3 - Estruturas químicas de alguns intermediários da reação quimiluminescente do luminol.....	9
Figura 4 - Reação quimiluminescente do luminol em meio alcalino empregando ClO^- e H_2O_2 como oxidantes.....	10
Figura 5 - Representação esquemática do funcionamento de um guia de ondas.....	14
Figura 6 - Levantamento bibliográfico realizado na base de dados <i>Web of Science</i> a respeito de artigos publicados sobre quimiluminescência em análises em fluxo.....	16
Figura 7 - Diagrama de fluxos para avaliação crítica do guia de ondas para medidas de quimiluminescência.....	20
Figura 8 - Diagrama de fluxos para determinação de ClO^- por quimiluminescência.....	21
Figura 9 - Diagrama de fluxos para a determinação de salbutamol por quimiluminescência.....	23
Figura 10 - Espectros de emissão do luminol quando oxidado por ClO^- ou por H_2O_2 na presença de hexacianoferrato(III) e espectro de absorção do hexacianoferrato(III).....	28
Figura 11 - Localização das saídas A e B no guia de ondas.....	29
Figura 12 - Efeito das fibras ópticas bifurcada e não-bifurcada na obtenção de espectros de emissão do luminol quando oxidado por H_2O_2 , na presença de hexacianoferrato(III).....	30

Figura 13 - Sinais transientes e curva de calibração para determinação de H_2O_2 por quimiluminescência.....	31
Figura 14 - Efeito do tempo de integração na intensidade de emissão.....	34
Figura 15 - Sinais transientes para tempos de integração de 500, 1000 e 2000 ms.....	35
Figura 16 - Efeito do tipo de fibra óptica empregada para o transporte da radiação emitida ao sistema de detecção.....	36
Figura 17 - Efeito da vazão do luminol na intensidade de emissão.....	37
Figura 18 - Efeito da vazão total na intensidade de emissão.....	39
Figura 19 - Influência da distância entre a confluência e a entrada da cela de fluxo na intensidade de emissão.....	40
Figura 20 - Efeito do volume de amostra na intensidade de emissão.....	41
Figura 21 - Efeito da concentração da solução de luminol na intensidade de emissão.....	42
Figura 22 - Efeito do pH da solução tampão na intensidade de emissão.....	43
Figura 23 - Sinais transientes demonstrando o efeito de parada de fluxo na intensidade de emissão.....	44
Figura 24 - Efeito da adição de surfactantes ao meio reacional na intensidade de emissão.....	46
Figura 25 - Efeito do tempo de preparo e das condições de armazenamento da solução de luminol na intensidade de emissão.....	47
Figura 26 - Sinais transientes e curva de calibração para determinação de ClO^- por quimiluminescência.....	49
Figura 27 - Sinais transientes para avaliação da repetibilidade do procedimento desenvolvido.....	50
Figura 28 - Estrutura molecular do sulfato de salbutamol.....	54
Figura 29 - Inibição da emissão de radiação na presença de salbutamol.....	55
Figura 30 - Efeito do comprimento do reator na diferença de intensidade de emissão.....	56
Figura 31 - Efeito do volume das alças de amostragem na diferença de intensidade de emissão.....	57

Figura 32 - Avaliação da resposta para determinação de salbutamol por quimiluminescência.....	58
Figura 33 - Curva de calibração para determinação de salbutamol por quimiluminescência.....	59
Figura 34 - Sinais transientes para a determinação de salbutamol por quimiluminescência.....	60
Figura 35 - Espectros de absorção das amostras 2 e 3 para a determinação de salbutamol.....	61

Lista de Abreviaturas e Siglas

CCD - dispositivo de acoplamento de carga (do inglês *charge coupled device*)

CENA/USP - Centro de Energia Nuclear na Agricultura/Universidade de São Paulo

CTAB - brometo de cetiltrimetilamônio

DNA - ácido desoxirribonucleico

DPD - N, N-dietil-*p*-fenilenodiamina

eq. - equação

IR - índice de refração

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LCW - guia de ondas com núcleo líquido (do inglês *liquid-core waveguide*)

LD - limite de detecção

PD - fotodiodo

PMT - fotomultiplicadora

q.s.p. - quantidade suficiente para

Triton X-100 - α -[4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil]- ω -hidroxipoli(oxi-1,2-etanodiil)

Triton X-114 - poli(oxietileno)-7,5-(*p*-tert-octilfenil) éter

Tween 60 - polietileno glicol sorbitol monostearato

UV - radiação ultravioleta

VIS - radiação visível

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Quimiluminescência.....	2
1.1.1. A reação quimiluminescente do luminol e suas aplicações analíticas.....	6
1.2. Análises por injeção em fluxo.....	11
1.3. Guias de ondas.....	13
1.4. Acoplamento de sistemas de análises em fluxo e quimiluminescência....	15
2. Objetivos.....	17
3. Parte Experimental.....	18
3.1. Equipamentos e acessórios.....	18
3.2. Reagentes e soluções.....	19
3.3. Diagramas de fluxos e procedimentos.....	20
3.3.1. Avaliação crítica do guia de ondas para medidas de quimiluminescência em fluxo.....	20
3.3.2. Procedimento analítico para a determinação de hipoclorito por quimiluminescência.....	21
3.3.3. Procedimento analítico para a determinação de salbutamol por quimiluminescência.....	22
3.4. Análise das amostras.....	23
4. Resultados e Discussão.....	26
4.1. Avaliação crítica do guia de ondas construído com Teflon® AF-2400 para medidas de quimiluminescência em fluxo.....	26
4.2. Procedimento analítico para a determinação de hipoclorito por quimiluminescência.....	33
4.2.1. Análise das amostras.....	51
4.3. Procedimento analítico para a determinação de salbutamol por quimiluminescência.....	53
4.3.1. Análise das amostras.....	59
5. Conclusões.....	63
6. Referências Bibliográficas.....	65

1. Introdução

Desde as mais antigas civilizações, cientistas e pesquisadores descreviam fenômenos de emissão de radiação na forma de luz que, por muito tempo, foram associados a mitos ou fantasmas. Em 1669, o médico H. Brandt, a partir da destilação de urina, produziu fósforo através de sua oxidação pelo O₂ do ar, gerando quimiluminescência¹.

O primeiro composto orgânico sintético luminescente descrito foi a lofina, 2,4,5-trifenilimidazol, obtida em 1887 por Radziszewski. A partir deste experimento, em 1888, Wiedemann conseguiu distinguir a quimiluminescência da incandescência, definindo-a como a *“emissão de luz que ocorre junto a processos químicos”*¹.

Desde então, as reações quimiluminescentes têm sido objeto de estudos para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na emissão de radiação e do efeito de outras espécies na quimiluminescência. Além das substâncias citadas, compostos como luminol, lucigenina, isoluminol, etanodioato de bis(2,4,6-triclorofenila), pirogalol e luciferina também participam como substratos de reações quimiluminescentes e suas estruturas químicas são apresentadas na Figura 1¹.

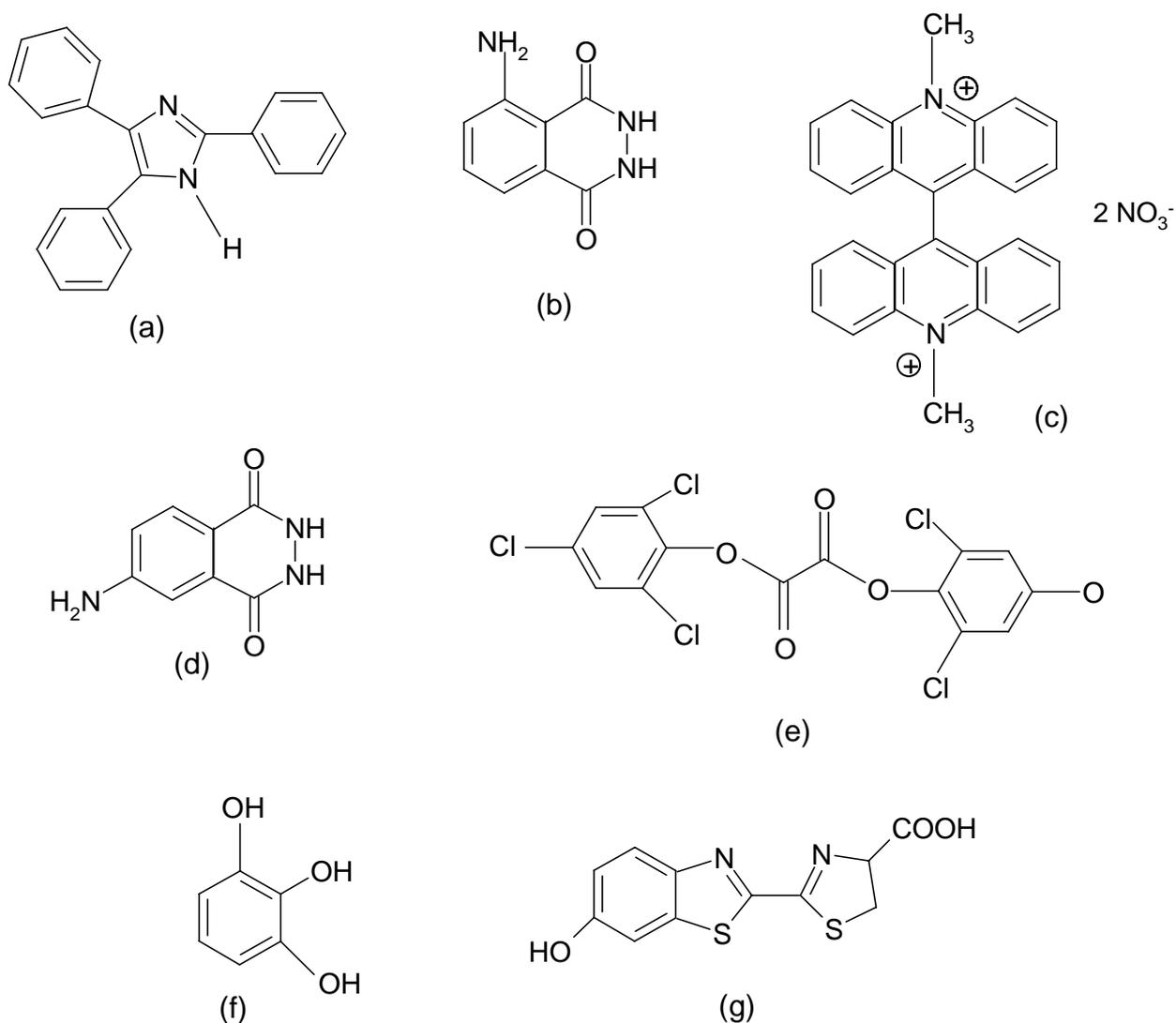


Figura 1 - Estruturas químicas de substratos de reações quimiluminescentes: (a) lofina, (b) luminol, (c) lucigenina, (d) isoluminol, (e) etanodioato de bis(2,4,6-triclorofenila), (f) pirogalol e (g) luciferina

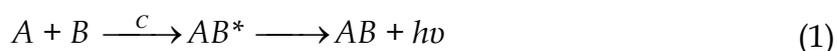
1.1. Quimiluminescência

Luminescência é um termo empregado para descrever a emissão de radiação quando uma molécula ou átomo no estado excitado decai para o estado fundamental². Os vários tipos de luminescência existentes são classificados de acordo com a fonte de energia que causa a excitação e suas características são apresentadas na TABELA 1, adaptada da Ref. 3.

TABELA 1 – Tipos de luminescência³

Processo	Características
Fluorescência	Luminescência de curto tempo de vida, produzida por um estado eletronicamente excitado formado por absorção de radiação UV, visível ou infravermelho próximo.
Fosforescência	Luminescência de longo tempo de vida, produzida por um estado eletronicamente excitado triplete formado por absorção de radiação UV, visível ou infravermelho próximo.
Quimiluminescência	Luminescência na qual o estado eletronicamente excitado resulta de uma reação química.
Bioluminescência	Tipo de quimiluminescência na qual radiação visível é produzida em organismos vivos.
Eletroquimiluminescência	Tipo de quimiluminescência no qual um ou mais reagentes são gerados <i>in situ</i> por um processo eletroquímico.
Eletroluminescência	Luminescência produzida por descargas elétricas.
Termoluminescência	Luminescência resultante de sólidos submetidos a aquecimento moderado.
Candoluminescência	Luminescência produzida por sólidos incandescentes.
Piroluminescência	Luminescência resultante de átomos metálicos excitados por chama.
Anodoluminescência	Luminescência produzida por bombardeamento com partículas α .
Catodoluminescência	Luminescência produzida por bombardeamento com partículas β .
Radioluminescência	Luminescência produzida por irradiação com raios-X ou raios- γ .
Triboluminescência	Luminescência resultante de rearranjos estruturais em um sólido.
Sonoluminescência	Luminescência gerada por sonicação de uma substância dissolvida.

Na quimiluminescência não há emprego de fonte de radiação, pois a energia necessária para a excitação provém de uma reação química, sendo a radiação emitida geralmente observada nas regiões do visível ou infravermelho próximo². O processo pode ser simplifiadamente representado pela eq. (1), na qual A e B representam os reagentes, AB^* o intermediário no estado excitado, AB o produto da reação química, $h\nu$ a radiação emitida e C um catalisador².



A quimiluminescência pode ser empregada para a determinação de A , B e C , bem como inibidores e ativadores. Algumas espécies podem ser determinadas indiretamente, como é o caso de substratos de reações enzimáticas que geram peróxido de hidrogênio².

Para que uma reação química produza quimiluminescência, ela deve obedecer a três condições principais³:

- liberar energia suficiente para produzir um estado eletronicamente excitado.

Na região do UV a energia do fóton varia de 44 a 71 kcal/mol. Variações de energia desta magnitude ocorrem em reações de oxidação, particularmente as que envolvem oxigênio, peróxido e outros oxidantes fortes.

- o sentido da reação deve favorecer o estado eletronicamente excitado.

- a espécie no estado excitado deve ser luminescente ou deve ser capaz de transferir sua energia para uma outra molécula, que produza luminescência. Entretanto, a maioria das espécies no estado excitado perde energia por processos não-radiativos.

Dos quatro parâmetros que caracterizam a emissão por quimiluminescência: intensidade de emissão, faixa de comprimentos de onda, taxa de produção e taxa de decaimento, o primeiro é o mais útil para fins analíticos. A intensidade da radiação emitida depende da reação química empregada e da eficiência com que os estados excitados são gerados, como representado na eq. (2)³, onde I_{CL} é a intensidade de quimiluminescência (número de fótons emitidos por segundo); dP/dt representa a velocidade da reação química (número de moléculas que reagem por unidade de tempo, em segundos); ϕ_{CL} é o rendimento quântico de quimiluminescência (número

de fótons emitidos por molécula que sofre reação); ϕ_{EX} é o rendimento quântico de excitação (número de estados excitados formados por molécula que reage) e ϕ_{EM} é o rendimento quântico de emissão (número de fótons emitidos por estado excitado).

$$I_{CL} = \phi_{CL}(dP/dt) = \phi_{EX}\phi_{EM}(dP/dt) \quad (2)$$

As reações quimiluminescentes comumente utilizadas para fins analíticos possuem rendimentos quânticos em torno de 0,5. Porém, os baixos níveis de emissão de sinal de fundo tornam igualmente úteis os sistemas com rendimentos consideravelmente mais baixos³. Os máximos de emissão e o rendimento quântico podem ser fortemente afetados pela polaridade do solvente e temperatura do sistema. Em determinadas condições, a radiação emitida pelo estado excitado pode ser extinta³. Como exemplo, pode-se citar que o comprimento de onda de emissão máxima do intermediário formado na reação de oxidação do luminol varia de 431 nm em meio aquoso a 500 nm em acetonitrila¹.

As vantagens analíticas da quimiluminescência incluem alta sensibilidade, baixos limites de detecção, ampla faixa de resposta linear e instrumentação relativamente simples³. Os baixos limites de detecção resultam de uma série de fatores, sendo que o principal se deve ao fato de não necessitar de fonte de radiação, reduzindo a supressão por espalhamentos Raman e Rayleigh, e também ruídos de fundo provenientes da fonte de radiação. Isto permite o uso de fotomultiplicadoras com alta voltagem e implica em uma melhora significativa da razão sinal/ruído quando comparada à detecção fluorimétrica convencional. Assim, limites de detecção

da ordem de femtomol (ocasionalmente da ordem de attomol) são alcançados³. A ausência de fonte de radiação também evita problemas relacionados à excitação não-seletiva, atenuação da radiação por filtros ou monocromadores e instabilidade da fonte de radiação³. Entretanto a precisão e a sensibilidade das medidas estão fortemente relacionadas ao tipo de detector e ao sistema reacional empregados. Efeitos de matriz são freqüentemente relatados, pois as condições do meio reacional têm um efeito significativo na produção de quimiluminescência. O tempo de reação e a duração da emissão podem variar de períodos muito curtos (menores que 1 s) até muito longos (cerca de 1 dia)¹.

Processos quimiluminescentes podem ser classificados em diretos, nos quais o analito é o substrato da reação, e indiretos, nos quais o analito desempenha um papel diferente na reação quimiluminescente (e.g. catalisador ou inibidor)³.

As reações quimiluminescentes podem ocorrer tanto em fase gasosa, como nas fases sólida e líquida. Medidas de quimiluminescência em solução têm sido empregadas para a determinação de íons metálicos, ânions inorgânicos, biomoléculas, substâncias carcinogênicas e fármacos em diferentes matrizes, com predominância de amostras ambientais e clínicas⁴.

1.1.1. A reação quimiluminescente do luminol e suas aplicações analíticas

O primeiro trabalho sobre a reação do luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazina diona) foi realizado em 1928 por Albrecht. O luminol era oxidado por H₂O₂, em meio alcalino, na presença de um catalisador, gerando uma quimiluminescência azul com comprimento de onda em torno de 425 nm¹. As propriedades termodinâmicas e cinéticas desta reação continuam sendo estudadas até os dias de

hoje. Existem diversas propostas mecanísticas para a reação de oxidação do luminol, e algumas etapas já estão completamente estabelecidas. Porém, alguns aspectos envolvendo a formação de estados eletronicamente excitados ainda não estão totalmente elucidados¹.

Um dos possíveis mecanismos, apresentado na Figura 2, foi proposto por Albertin et al.¹.

Nesta proposta, a etapa de emissão de quimiluminescência está relacionada à formação do estado eletronicamente excitado do 3-aminofalato (**5**), que é dependente das condições reacionais, como pH, concentração dos reagentes e composição do sistema tampão. O produto final da reação (**6**) pode se formar diretamente sem quimiluminescência (Figura 2b) ou pela relaxação da espécie **5** com quimiluminescência (Figura 2a). Há importantes etapas intermediárias, como a formação da diazoquinona (**2**) a partir do luminol e a formação do ânion de H₂O₂ (**3**), que estabelecem relações entre as espécies envolvidas na formação do intermediário endo-peróxido (**4**), cuja decomposição pode ou não produzir quimiluminescência¹.

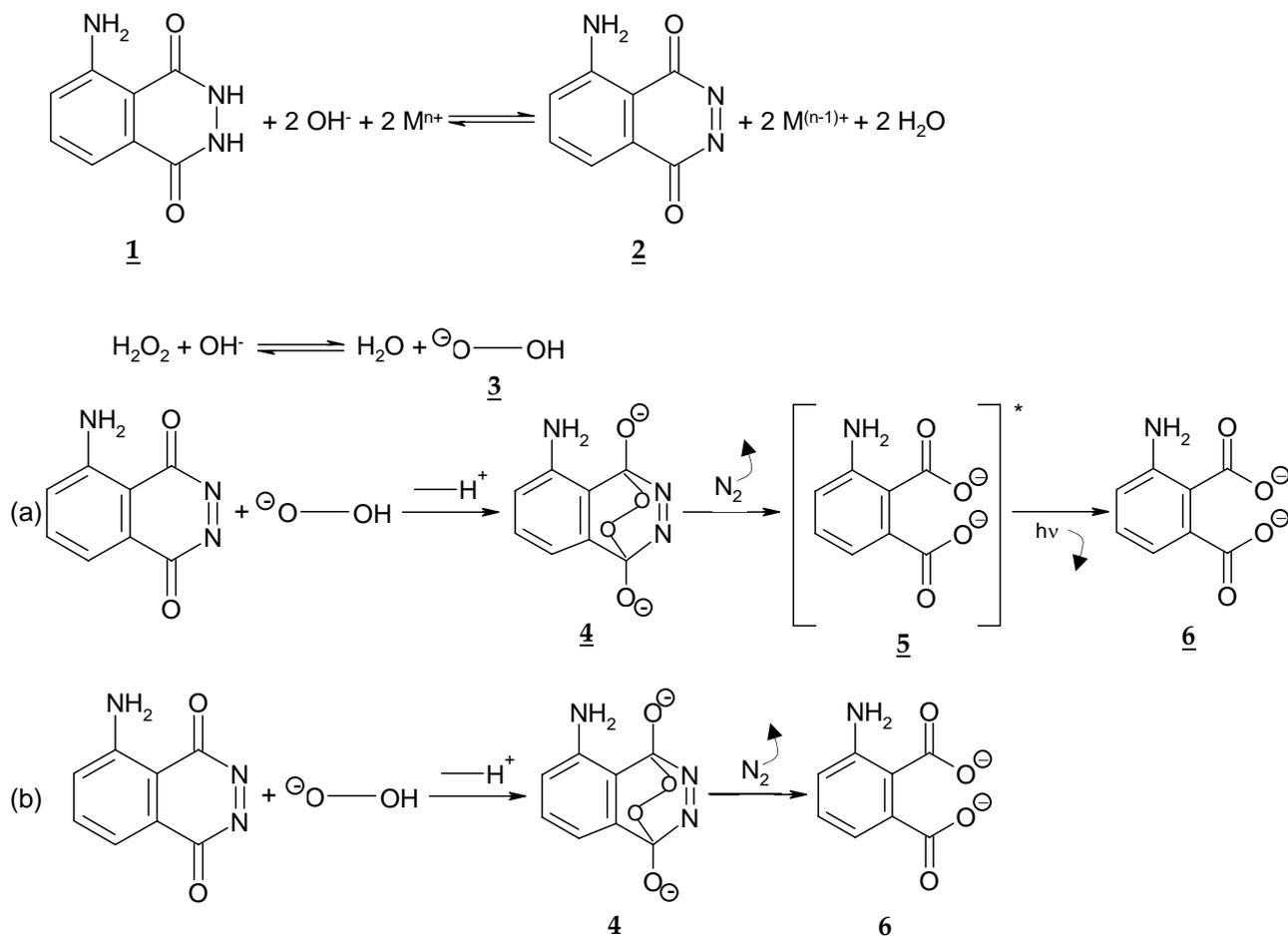


Figura 2 – Proposta mecanística de Albertin et al.¹ para a reação quimiluminescente do luminol em meio alcalino na presença de um íon de metal de transição (M^{n+}), empregando H_2O_2 como oxidante

Na década de 80, foram verificados e confirmados alguns intermediários, como a diazoquinona (**2**), e a produção da quimiluminescência pelo 3-aminofalato excitado (**5**), a partir da reação com o radical ClO_2^\ominus . Além disso, estudos com radicais N_3^\ominus e CO_3^\ominus indicaram novos possíveis intermediários na formação e decomposição do endo-peróxido (**4**), como o radical do luminol (**7**) e o *a*-hidroxihidroperóxido (**8**), cujas estruturas são apresentadas na Figura 3¹.

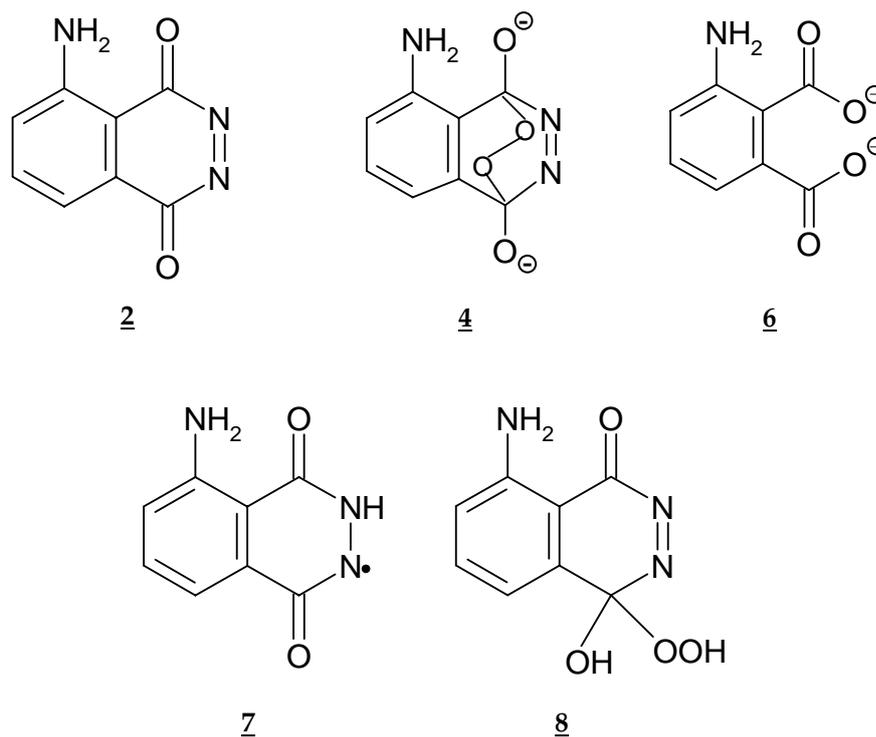


Figura 3 - Estruturas químicas de alguns intermediários da reação quimiluminescente do luminol: 2 - diazoquinona, 4 - endo-peróxido, 6 - diânion do ácido ftálico, 7 - radical do luminol e 8 - hidro-peróxido

Dentre as aplicações analíticas, destacam-se as determinações cinéticas de metais de transição, determinações de inibidores (compostos orgânicos e metais de transição) e a determinação de H_2O_2 produzido em reações enzimáticas, incluindo o uso em biossensores. Explorando-se esta alternativa, podem ser analisados substratos de enzimas oxidases, como aminoácidos, metanol, açúcares e DNA. Mais de 30 íons metálicos inibem ou catalisam a reação do luminol, destacando-se Co(II) , Co(III) , Cr(III) , Cr(IV) , Fe(II) , Cu(II) , Zn(II) e Cd(II) ¹.

A Figura 4 apresenta a reação de oxidação do luminol por H_2O_2 , na presença de hexacianoferrato(III), e por ClO_4^- . Convém ressaltar que o produto formado é o mesmo em ambas as reações.

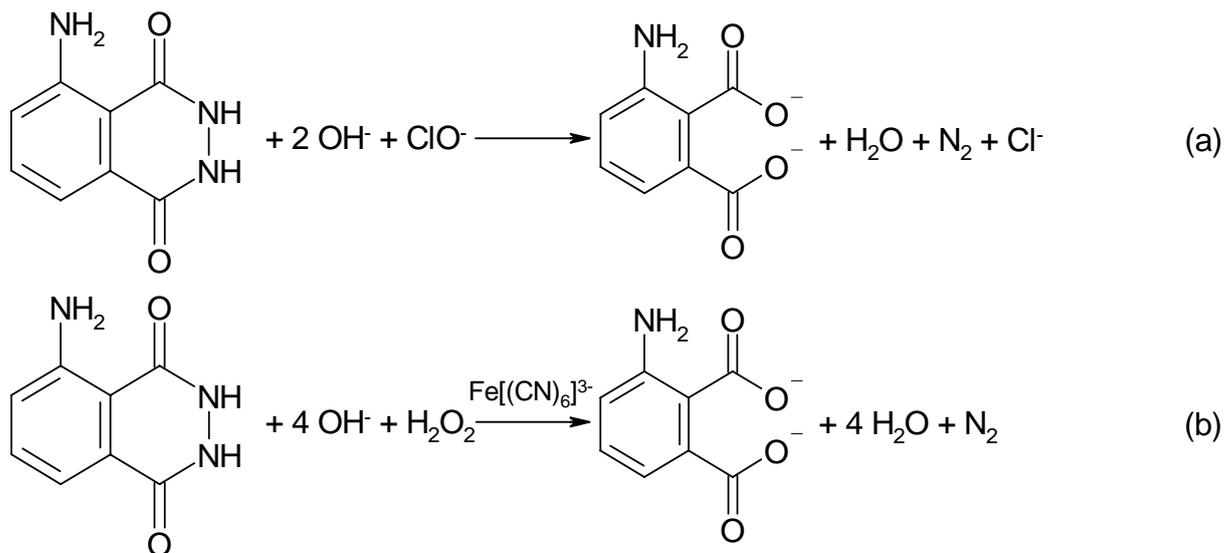


Figura 4 – Reação quimiluminescente do luminol em meio alcalino empregando (a) ClO^- e (b) H_2O_2 como oxidantes

Dentre as desvantagens da utilização do luminol como reagente quimiluminescente tem-se a sua alta susceptibilidade a diferentes variáveis experimentais. Por exemplo, a maioria dos autores sugere a preparação da solução de luminol com três dias de antecedência para sua “estabilização”, sem que nenhuma explicação plausível seja fornecida. Segundo Xiao et al.⁴, isto pode ocorrer devido à absorção de CO_2 pela solução. Os autores demonstraram que o CO_2 absorvido em meio aquoso é responsável por diversas observações, cujos mecanismos ainda não foram totalmente esclarecidos, como por exemplo, ganhos significativos de intensidade de radiação emitida quando as soluções são preparadas em tampão carbonato ao invés de tampão borato. De acordo com os autores, o CO_2 absorvido intensifica a emissão de radiação, pois reage com peróxidos em meio alcalino, formando o radical peroxicarbonato ($\text{CO}_4^{\cdot-}$). Este radical, por ser menos reativo que o radical hidroxila, reage seletivamente com o luminol, produzindo radicais de luminol que formarão intermediários excitados, os quais emitirão radiação ao retornar ao

estado fundamental. Por outro lado, o radical hidroxila ataca mais de um carbono do anel aromático do luminol, produzindo várias espécies que não necessariamente formarão intermediários excitados.

1.2. Análises por injeção em fluxo

A análise por injeção em fluxo foi proposta em 1975 e introduzida no Brasil em 1976 por pesquisadores do CENA/USP. Ela pode ser definida como *“um processo de automatização de procedimentos analíticos, no qual a amostra em solução aquosa (e eventualmente os reagentes) é introduzida em um fluxo contínuo e não-segmentado de um fluido transportador”*⁵. A zona de amostra sofre dispersão durante o transporte, sendo então misturada com as soluções transportadora e reagente. A zona de amostra resultante é conduzida em direção ao sistema de detecção, gerando um sinal transiente, que é registrado em um sistema de aquisição de dados e usualmente quantificado em relação à altura máxima. Durante o transporte, a amostra pode sofrer tratamentos em linha através de colunas contendo reagentes sólidos para separação e pré-concentração, ou conversão a outra espécie mais adequada para a quantificação⁵.

Um sistema de análises em fluxo típico consiste de quatro partes principais⁵:

- sistema de propulsão de fluidos, que pode ocorrer a vazão constante, empregando geralmente uma bomba peristáltica, ou a pressão constante, podendo ser empregados dispositivos de ação gravitacional. Porém, neste caso, o módulo de análise é usualmente limitado à configuração em linha única e a vazão depende da viscosidade das soluções e dimensões do percurso analítico.

- sistema de injeção, que é o dispositivo fundamental do sistema, pois além de introduzir amostras e reagentes, também pode ser empregado para selecionar diferentes vazões, introduzir componentes e redirecionar o fluxo, aumentando a versatilidade do processo. Existem vários tipos de injetores, mas os mais comuns são a válvula de seis vias e o injetor proporcional, ou injetor comutador (desenvolvido por pesquisadores do CENA/USP). Este último consiste em três partes de acrílico, sendo duas fixas e uma parte central móvel, que pode ser deslocada em relação às laterais, um passo para frente ou para trás. Por meio deste movimento, o injetor coleta uma alíquota da amostra e a insere no percurso analítico, podendo ser empregado também para inserção de reagentes e outras soluções que porventura sejam necessárias.

- percurso analítico, considerado todo o espaço pelo qual o fluido transportador conduz a zona de amostra desde o injetor até o sistema de detecção. É onde ocorrem as reações químicas necessárias à detecção do analito. Seu dimensionamento deve levar em consideração a cinética da reação química empregada, e conseqüentemente o tempo de residência da zona de amostra, definido também em função das vazões do transportador e dos reagentes.

- sistema de detecção, podendo ser empregados praticamente todos os detectores usuais em química analítica.

Os sistemas de análises por injeção em fluxo apresentam características peculiares como condições de análise altamente reprodutíveis, já que o tempo de trânsito entre o injetor e o sistema de detecção é exatamente o mesmo para amostras e soluções de referência. Em vista disso, as medidas podem ser feitas sem que as

reações químicas se completem⁵. Outras características incluem o baixo consumo de reagentes e amostras⁶ quando comparados aos procedimentos em batelada (alíquotas da ordem de microlitros) e elevada frequência de amostragem⁷. A manipulação das soluções é realizada através de bombas, injetores e tubulações apropriadas, minimizando o envolvimento do analista, melhorando a precisão e reduzindo contaminações, visto que a reação ocorre em sistema fechado⁵.

1.3. Guias de ondas

Em análises que envolvem emissão de radiação é necessário maximizar a detecção da radiação emitida e minimizar sinais de fundo e ruído⁸. Esta é uma das maiores dificuldades na aplicação de metodologias que envolvem este tipo de detecção, já que a radiação é emitida em todas as direções, sendo necessário adequar a geometria da cela e seu posicionamento em relação ao sistema de detecção. Os equipamentos usualmente empregados para medidas de quimiluminescência utilizam celas em espiral posicionadas em frente à janela de uma fotomultiplicadora, fazendo com que apenas uma fração da radiação seja detectada⁹.

Um dispositivo capaz de maximizar a quantidade de radiação que alcança o detector, dispensando óptica complexa, envolve a utilização de guias de ondas. Um guia de ondas funciona de maneira análoga a uma fibra óptica, tendo um núcleo e um revestimento, cujo índice de refração é menor que o do núcleo⁸. Desta forma, a radiação se propaga pelo núcleo com reflexão total interna, como mostra a Figura 5, sendo conduzida ao sistema de detecção com o mínimo de perdas. A extensão da refração é dada pela Lei de Snell¹⁰, apresentada na eq. (3):

$$n_1 \sin \theta_i = n_2 \sin \theta_r \quad (3)$$

onde n_1 é o índice de refração do núcleo, n_2 é o índice de refração do tubo, θ_i é o ângulo de incidência da radiação e θ_r é o ângulo de refração.

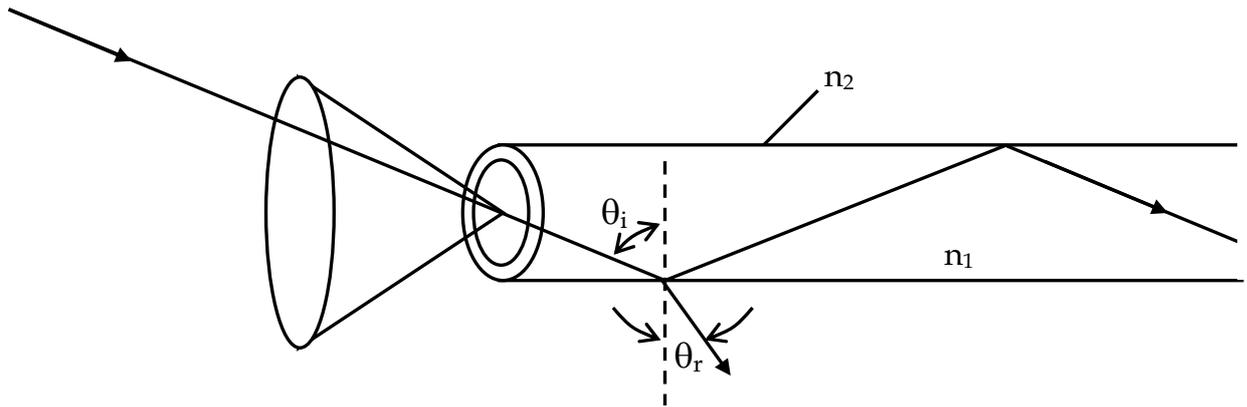


Figura 5 – Representação esquemática do funcionamento de um guia de ondas

Um guia de ondas com geometria tubular apresenta-se como uma cela de fluxo ideal por exercer simultaneamente a função de componente óptico e condutor de fluidos⁸.

A água tem $IR \cong 1,33$ e até aproximadamente 1980 não existia nenhum material disponível que possuísse um índice de refração inferior a este valor. O emprego de vidro ou tubos poliméricos para construção de guias de ondas implicava na utilização de fluidos não-aquosos ou de soluções aquosas concentradas em um soluto inerte, de forma a aumentar o índice de refração do núcleo. Alternativamente, foram empregados tubos de vidro recobertos com materiais capazes de refletir a radiação, como prata, por exemplo⁸. Uma alternativa foi apresentada quando a DuPont introduziu no mercado uma série de fluoropolímeros amorfos com índices de refração adequados para este tipo de aplicação. A família do Teflon® AF (2,2-bistrifluorometil-4,5-difluoro-1,3-dioxol) possui uma faixa de índices de refração

entre 1,29 e 1,31. A primeira implementação do Teflon® AF em guias de ondas foi como recobrimento da superfície de capilares de vidro. Além de possuir índice de refração mais baixo que o da água, o Teflon® AF tem outras propriedades desejáveis como flexibilidade, permitindo a construção de espirais e tornando os equipamentos mais compactos, transparência para radiações com comprimentos de onda entre 200 e 2000 nm, estrutura porosa, tornando-o permeável a gases e natureza hidrofóbica, que torna a permeação seletiva. Sua geometria tubular facilita o acoplamento a sistemas de análises em fluxo⁸.

1.4. Acoplamento de sistemas de análises em fluxo e quimiluminescência

O acoplamento de sistemas de análises em fluxo e quimiluminescência proporciona diversas vantagens, pois esta última implica necessariamente em derivatização química e freqüentemente em separação prévia do analito, processos que podem ser convenientemente implementados em sistemas em fluxo. A mistura entre amostras e reagentes em sistemas em fluxo é rápida e altamente reprodutível¹¹, podendo ser realizada a uma distância muito pequena do sistema de detecção. Este é um atrativo interessante, já que os intermediários no estado excitado têm tempo de vida curto¹¹. Tal acoplamento pode ser empregado para a determinação de diversos analitos em diferentes matrizes, devido à elevada sensibilidade e seletividade alcançadas com certas reações¹². De acordo com um levantamento bibliográfico realizado na base de dados *Web of Science*, apresentado na Figura 6, houve um crescimento substancial no número de artigos publicados que empregam o acoplamento de análises em fluxo e quimiluminescência, o que confirma o interesse da comunidade científica em pesquisas neste campo.

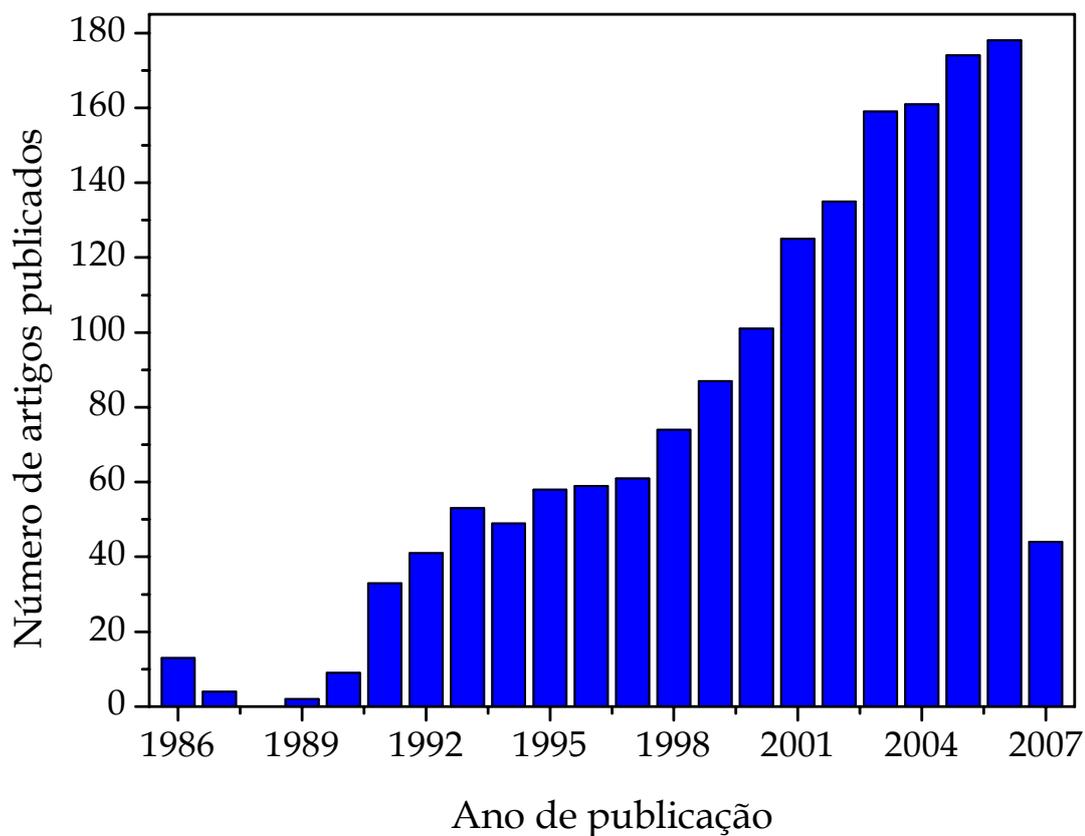


Figura 6 – Levantamento bibliográfico realizado em abril de 2007 na base de dados Web of Science a respeito de artigos publicados sobre quimiluminescência em análises em fluxo. Palavras-chave: (FI or FIA or FLOW INJECTION or FLOW INJECTION ANALYSIS) and (CHEMILUMINESCENCE or CL)

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho é a avaliação crítica de uma cela constituída por um guia de ondas de Teflon® AF-2400 para medidas de quimiluminescência em fluxo e o desenvolvimento de procedimentos analíticos para a determinação de hipoclorito e de salbutamol por quimiluminescência.

3. Parte Experimental

3.1. Equipamentos e acessórios

Os sistemas de análises em fluxo foram construídos com um injetor proporcional, tubos de polietileno de 0,7 mm de diâmetro interno e confluências de acrílico. Uma bomba peristáltica (Ismatec, modelo IPC-8) e tubos de Tygon de diferentes diâmetros foram empregados para a propulsão dos fluidos. A cela de medida consistiu de um capilar de sílica fundida de 100 cm de comprimento, 0,6 mm de diâmetro interno e volume de 250 μL , recoberto com Teflon® AF-2400 (Ocean Optics). Para o transporte da radiação emitida até o sistema de detecção foram empregadas fibras ópticas de 2 m de comprimento (Ocean Optics) com núcleos de 600 μm . O sistema de detecção empregado para medida dos sinais analíticos consistiu de um arranjo linear de 2048 fotodetectores do tipo CCD (Ocean Optics, USB 2000), conectado ao microcomputador (AMD Athlon™) através de uma das portas USB. Para a aquisição de dados, foi empregado o programa fornecido pelo fabricante do equipamento, que permitia a alteração do tempo de integração, o tratamento dos dados por meio de médias de espectros e médias móveis, o armazenamento dos dados em arquivos e a apresentação gráfica dos espectros de emissão e do sinal analítico em função do tempo, para comprimentos de onda pré-definidos.

3.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e reagentes de grau analítico, exceto as soluções de hipoclorito, preparadas a partir de uma solução comercial (Super Cândida). Soluções de referência de 0,3 - 11,2 $\mu\text{mol/L}$ de H_2O_2 foram preparadas por diluição de uma solução estoque 0,1 mol/L, padronizada por titulação com permanganato de potássio. Soluções 5 mmol/L e $1,5 \times 10^{-4}$ mol/L de hexacianoferrato(III) de potássio foram preparadas por diluição de uma solução estoque 0,05 mol/L. A concentração da solução comercial de hipoclorito foi determinada em 21,3 g/L (0,290 mol/L) de cloro ativo, por titulação iodométrica. Soluções de hipoclorito foram preparadas por diluição da solução estoque, nas concentrações de 9,6 mg/L de ClO^- ($1,3 \times 10^{-4}$ mol/L) para a otimização do procedimento analítico para a determinação de hipoclorito; 0,2 - 3,8 mg/L de ClO^- ($2,7 \times 10^{-6}$ - $5,1 \times 10^{-5}$ mol/L) para a construção da curva de calibração e 5,5 mg/L de ClO^- ($7,4 \times 10^{-5}$ mol/L) para o desenvolvimento do procedimento analítico para a determinação de salbutamol. Soluções de luminol 4,5 mmol/L foram preparadas em tampão carbonato/bicarbonato 0,2 mol/L, com pH ajustado para 10,5.

As soluções de surfactantes foram preparadas por dissolução em água, em concentrações cinco vezes maiores do que a concentração micelar crítica (CMC): Triton X-114 0,56 g/L, Triton X-100 0,78 g/L, CTAB 0,36 g/L e Tween 60 0,4 g/L.

As soluções de referência de salbutamol 1×10^{-6} - 1×10^{-4} mol/L foram preparadas por diluição de uma solução estoque 1×10^{-3} mol/L, obtida por dissolução de um padrão em água.

3.3. Diagramas de fluxos e procedimentos

Em todos os procedimentos, a resposta dos detectores na ausência de radiação (*dark current*) era medida imediatamente antes do início das medidas. Em todas as medidas de quimiluminescência, estes valores foram subtraídos dos sinais gerados por cada um dos fotodetectores. Os sinais transientes produzidos foram quantificados com relação à altura máxima. Os comprimentos de onda de medida foram estabelecidos com base nos espectros de emissão para cada uma das reações empregadas.

3.3.1. Avaliação crítica do guia de ondas para medidas de quimiluminescência em fluxo

O diagrama de fluxos apresentado na Figura 7, adaptado da Ref. 9, foi empregado para avaliação crítica do guia de ondas para medidas de quimiluminescência através da reação de oxidação do luminol por H_2O_2 em meio alcalino, catalisada por hexacianoferrato(III).

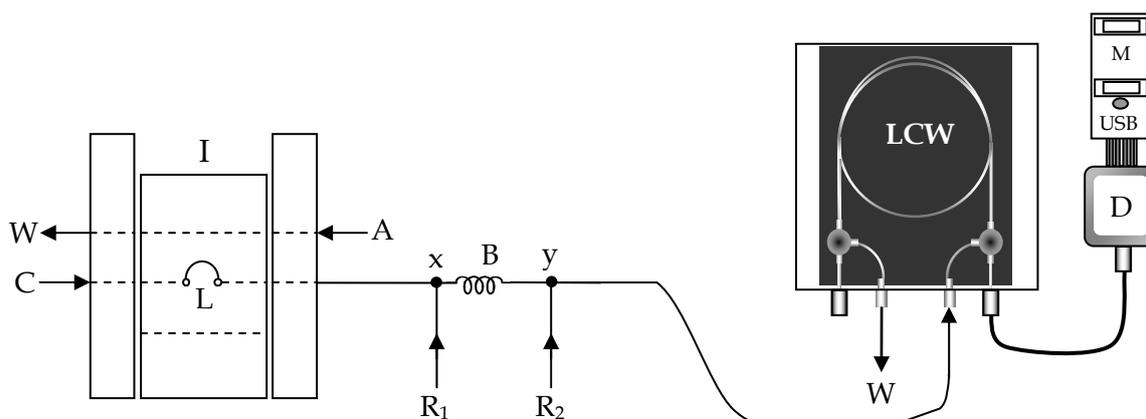


Figura 7 - Diagrama de fluxos para avaliação crítica do guia de ondas para medidas de quimiluminescência. I = injetor proporcional; A = amostra; L = alça de amostragem (100 μL); C = transportador (H_2O), 4,6 mL/min; R_1 = 4,5 mmol/L luminol em tampão carbonato/bicarbonato 0,2 mol/L pH 10,5, 1,6 mL/min; R_2 = 0,05 mol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1,6 mL/min; B = reator helicoidal (20 cm); LCW = guia de ondas de Teflon® AF-2400 (100 cm); W = descarte; D = sistema de detecção; USB = conexão do sistema de detecção ao microcomputador (M)

Na posição do injetor ilustrada na Figura 7, a amostra de H_2O_2 é inserida no fluido transportador (C), recebe por confluência a solução de luminol (R_1), passa por um reator helicoidal (B) e, por fim, recebe a solução do catalisador (R_2), sendo então transportada à cela de fluxo. As medidas foram realizadas em triplicata em 503 nm.

3.3.2. Procedimento analítico para a determinação de hipoclorito por quimiluminescência

O diagrama de fluxos apresentado na Figura 8 foi empregado para determinação de ClO^- por quimiluminescência. Para a otimização, foi empregada uma solução 9,6 mg/L de ClO^- .

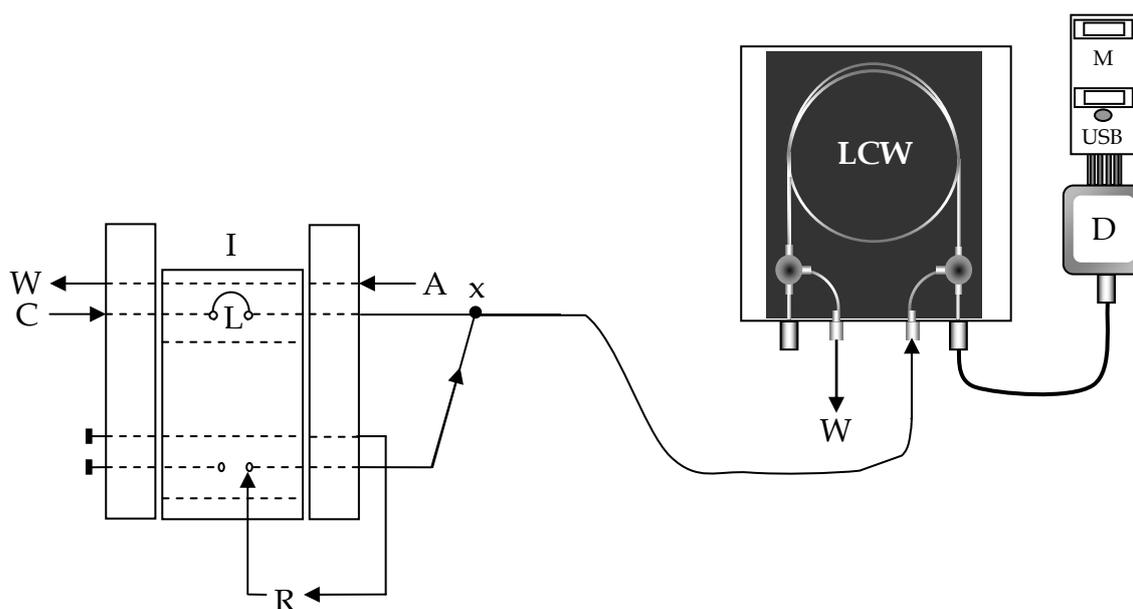


Figura 8 - Diagrama de fluxos para determinação de ClO^- por quimiluminescência. I = injetor proporcional; A = amostra; L = alça de amostragem (250 μL); C = transportador (H_2O), 2,3 mL/min; R = 4,5 mmol/L luminol em tampão carbonato/bicarbonato 0,2 mol/L pH 10,5, 0,7 mL/min; LCW = guia de ondas de Teflon® AF-2400 (100 cm); W = descarte; D = sistema de detecção; USB = conexão do sistema de detecção ao microcomputador (M)

Na posição do injetor mostrada na Figura 8, a amostra de ClO^- é inserida no fluido transportador (C), recebendo por confluência a solução de luminol (R), cujo fluxo é intermitente, a fim de reduzir seu consumo. A zona de amostra é

transportada à cela de fluxo. As medidas foram realizadas em quintuplicata em 439,5 nm. O injetor é movido de volta à posição de amostragem após alcançar o sinal máximo (ca. 10 s após a inserção de amostra). Os parâmetros hidrodinâmicos otimizados foram vazão do luminol, volume de amostra, vazão total e distância entre o ponto x e a entrada da cela de medida (Figura 8). Também foi avaliado o efeito da parada de fluxo sobre o sinal de quimiluminescência. Dentre os parâmetros instrumentais, foram avaliados o tempo de integração e o tipo de fibra óptica (bifurcada e não-bifurcada), incluindo a avaliação de fibras de diferentes diâmetros. Já os parâmetros químicos compreenderam a composição da solução transportadora, efeito do emprego de surfactantes, pH da solução tampão carbonato/bicarbonato na solução de luminol, concentração e tempo de preparação prévia e condições de armazenamento da solução de luminol.

3.3.3. Procedimento analítico para a determinação de salbutamol por quimiluminescência

Para a determinação de salbutamol foi empregado o diagrama de fluxos apresentado na Figura 9.

Na posição do injetor ilustrada na Figura 9, a amostra de salbutamol (A) e a solução de ClO^- são inseridas nos fluidos transportadores (C), encontrando-se no ponto de confluência indicado por x . As soluções passam por um reator helicoidal (B) e recebem, na confluência y , a solução de luminol (R), cujo fluxo é intermitente, a fim de reduzir seu consumo (o injetor é movido de volta à posição de amostragem ca. 10 s após a inserção da amostra). A zona de amostra é então conduzida à cela de fluxo. As medidas foram realizadas em quintuplicata em 441 nm. O deslocamento de 1,5

nm no comprimento de onda de máxima emissão em relação ao observado nas medidas de hipoclorito deve-se à alteração da calibração do sistema de detecção (relação entre o número do fotodetector e o comprimento de onda).

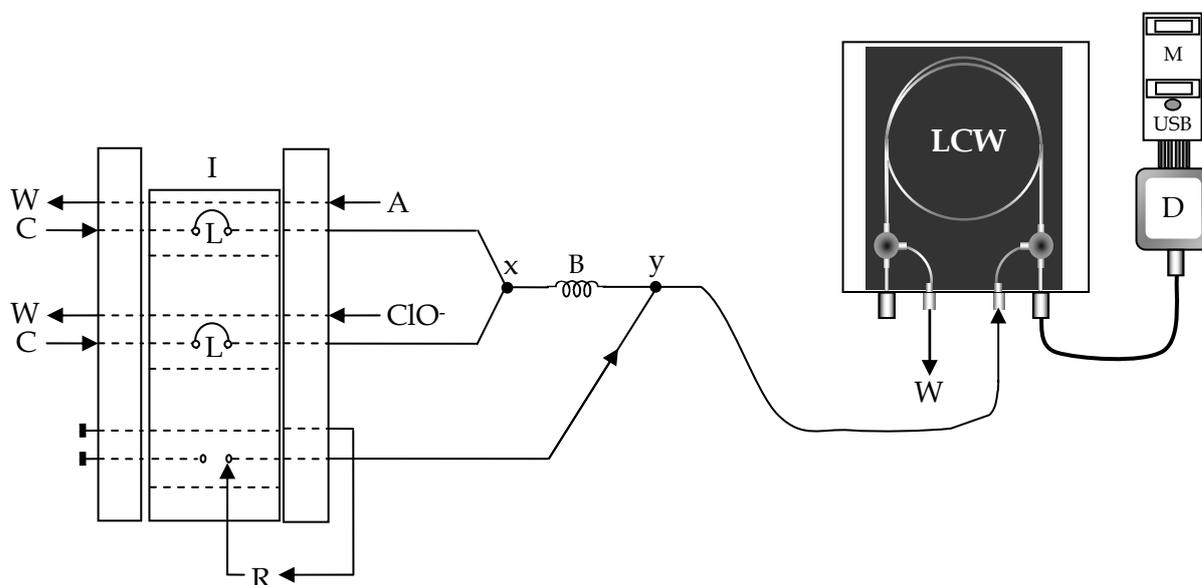


Figura 9 - Diagrama de fluxos para a determinação de salbutamol por quimiluminescência. I = injetor proporcional; A = amostra; ClO⁻ = solução de 5,5 mg/L de hipoclorito; L = alças de amostragem (300 μL); C = transportadores (H₂O), 2,3 mL/min; R = 2,5 mmol/L luminol em tampão carbonato/bicarbonato 0,2 mol/L pH 10,8, 0,7 mL/min; B = reator helicoidal (30 cm); LCW = guia de ondas de Teflon® AF-2400 (100 cm); W = descarte; D = sistema de detecção; USB = conexão do sistema de detecção ao microcomputador (M)

Os sinais analíticos foram quantificados de acordo com a diferença entre as intensidades máximas de quimiluminescência obtidas na ausência (alça de amostra preenchida com água) e presença de salbutamol. Foram otimizados os parâmetros comprimento do reator (B) e comprimento das alças de amostragem (L).

3.4. Análise das amostras

Amostras de líquido de Dakin e salbutamol foram adquiridas em drogarias locais.

As amostras de líquido de Dakin foram analisadas pelo procedimento proposto e por titulação iodométrica¹³. A composição das amostras é descrita a seguir:

Amostras 1 e 2 - solução de hipoclorito de sódio 0,400 a 0,480 g de cloro ativo por 100 mL. Demais constituintes não informados.

Amostra 3 - 119 mL de solução de hipoclorito de sódio a 4%, 11 g de ácido bórico, água deionizada q.s.p. 1000 mL.

Amostras 4 e 5 - hipoclorito de sódio 4,76% e veículo q.s.p. 1 mL.

As amostras de salbutamol foram analisadas por quimiluminescência, pelo procedimento proposto por Dol & Knochen¹⁴ e por eletroforese capilar¹⁵. Dentre as amostras de salbutamol, três estavam sob a forma de xarope (1 a 3) e uma sob a forma de comprimidos (4), cujas composições são descritas a seguir:

Amostra 1 - sulfato de salbutamol 2,4 mg (equivalente a 2,0 mg de salbutamol) e veículo q.s.p. 5 mL (ácido cítrico, água purificada, aroma de laranja, benzoato de sódio, citrato de sódio, cloreto de sódio, hidroxipropilmetilcelulose e sacarina sódica).

Amostra 2 - salbutamol 2,0 mg (na forma de sulfato) e veículo q.s.p. 5 mL (ácido cítrico, água purificada, aroma de morango, ciclamato de sódio, corante vermelho Ponceaux 4R, metilparabeno, propilparabeno e sacarina sódica).

Amostra 3 - sulfato de salbutamol 2,4 mg (equivalente a 2,0 mg de salbutamol) e veículo q.s.p. 5 mL (ácido cítrico, água purificada, álcool etílico, ciclamato de sódio, corante vermelho Ponceaux, essência de framboesa, hidróxido de sódio, hidroxietilcelulose, metilparabeno, propilparabeno e sacarina sódica).

Amostra 4 - sulfato de salbutamol 2,4 mg (equivalente a 2,0 mg de salbutamol) e excipientes q.s.p. 1 comprimido (amido de milho, estearato de magnésio e lactose).

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação crítica do guia de ondas construído com Teflon® AF-2400 para medidas de quimiluminescência em fluxo

Procedimentos que envolvem detecção por quimiluminescência apresentam como dificuldade o posicionamento da cela de medida em relação ao sistema de detecção, já que a radiação é emitida em todas as direções. Usualmente, uma fração significativa da radiação emitida não é detectada, havendo então redução de sensibilidade⁹. Neste contexto, foi proposto o emprego de um guia de ondas construído com Teflon® AF-2400 como cela de medida, a fim de maximizar a quantidade de radiação detectada⁸.

Dasgupta et al.^{7, 8, 16} demonstraram que a utilização de guias de ondas para medidas de quimiluminescência proporciona um aumento de sensibilidade, quando comparada a procedimentos que envolvem outras geometrias de celas de fluxo. O limite de detecção obtido para determinações de hipoclorito por quimiluminescência em fluxo empregando um guia de ondas de Teflon® AF-2400 foi de 15 nmol/L, enquanto para luminômetros convencionais foi de 4 a 161 nmol/L¹⁶. Em todos os casos, uma fotomultiplicadora foi empregada como detector.

Com o propósito de avaliar a viabilidade da utilização deste dispositivo, alguns experimentos foram realizados empregando como sistemas-modelo as reações de oxidação do luminol por peróxido de hidrogênio ou hipoclorito. Os resultados foram comparados com os obtidos em artigos que empregaram estratégias distintas para a quantificação das espécies.

Inicialmente, foram obtidos espectros de emissão do luminol quando oxidado por ClO^- 9,6 mg/L ($1,3 \times 10^{-4}$ mol/L) e por H_2O_2 54,7 $\mu\text{mol/L}$, na presença de hexacianoferrato(III) em duas concentrações 5 mmol/L e 50 mmol/L, além de um espectro de absorção do hexacianoferrato(III) $1,5 \times 10^{-4}$ mol/L, apresentados na Figura 10.

De acordo com as equações químicas mostradas na Figura 4, o mesmo produto é formado em ambas as reações, e sabe-se que o mesmo intermediário no estado excitado é responsável pela emissão de radiação⁴. Porém, nota-se na Figura 10 que há um deslocamento no máximo de emissão de quimiluminescência quando H_2O_2 é empregado como oxidante em comparação com ClO^- . Observa-se também a atenuação na intensidade de quimiluminescência. Através do espectro na Figura 10 d pode-se observar que há uma intensa absorção de radiação pelo hexacianoferrato(III) no comprimento de onda de máxima emissão do luminol (439,5 nm), o que explica a atenuação da radiação emitida e o deslocamento do máximo de emissão para uma região em que o catalisador não absorve pronunciadamente. A atenuação da radiação emitida torna-se mais significativa devido à geometria da cela de medida, pois a radiação deve percorrer um caminho maior até atingir o detector, aumentando a probabilidade de interação com espécies absorventes. Este efeito torna-se mais crítico quando a concentração do catalisador é aumentada (Figura 10 b e 10 c), sendo também verificado o deslocamento do máximo de emissão. Cabe ressaltar que a concentração da solução de hexacianoferrato(III) empregada para a obtenção do espectro de absorção foi ca. 33 vezes inferior à menor concentração empregada nos estudos de quimiluminescência.

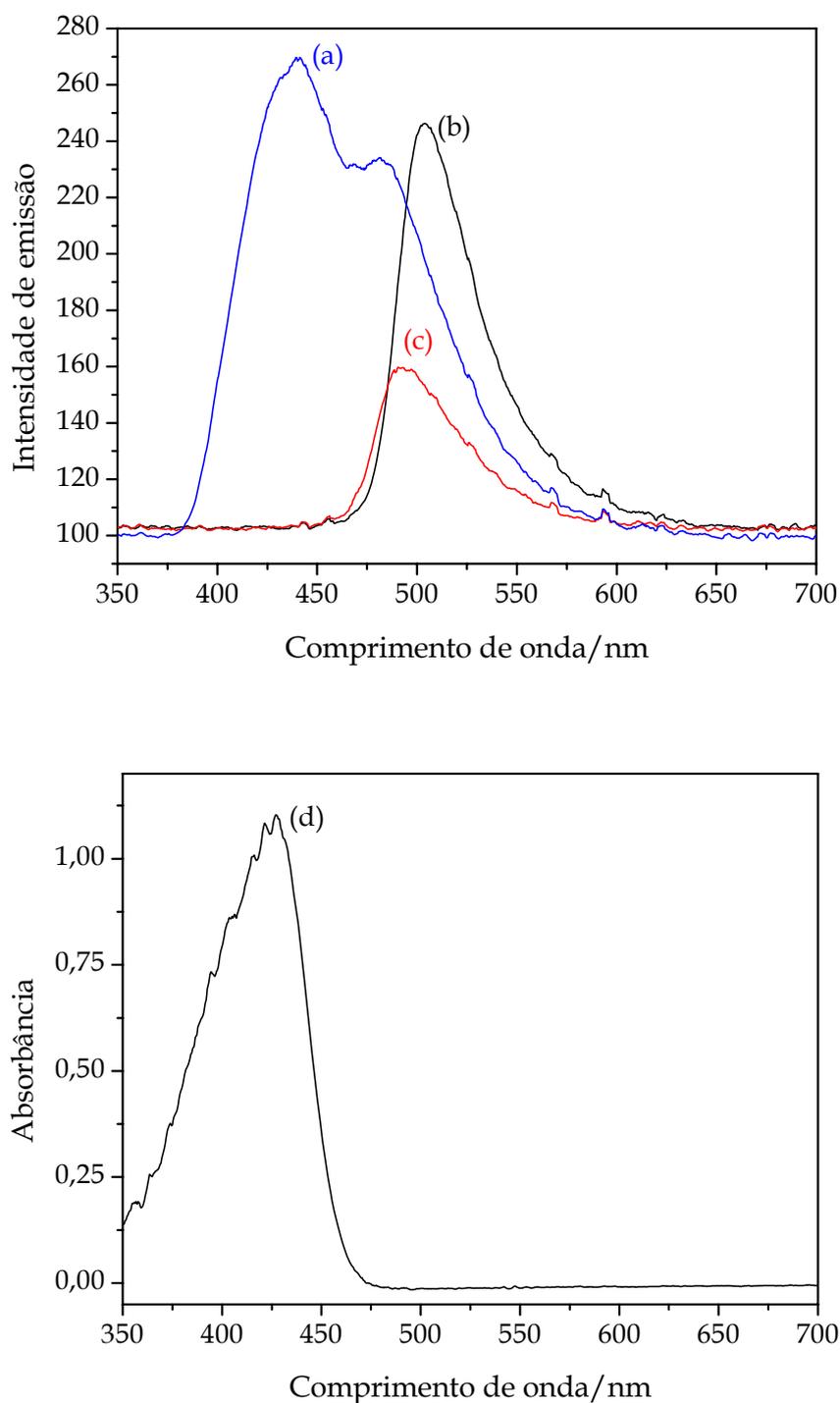


Figura 10 – Espectros de emissão do luminol quando oxidado por ClO^- (a) e por H_2O_2 na presença de hexacianoferrato(III) 50 mmol/L (b) ou 5 mmol/L (c). Espectro de absorção do hexacianoferrato(III) $1,5 \times 10^{-4}$ mol/L (d)

O emprego de soluções de catalisador mais diluídas, a fim de minimizar o efeito de absorção da radiação emitida, poderia comprometer a sensibilidade do

procedimento. Estes resultados ilustram uma limitação da cela com guia de ondas para medidas de quimiluminescência, quando espécies absorventes estão presentes no meio.

Como a oxidação do luminol por ClO^- é rápida, não é necessário empregar hexacianoferrato(III) como catalisador e estes efeitos não são observados. Entretanto, efeitos de perda de linearidade por auto-absorção (emprego de soluções de luminol mais concentradas) também devem ser mais críticos para a cela com guia de ondas.

Foi avaliado o efeito do tipo de fibra óptica empregado para condução da radiação emitida ao sistema de detecção, comparando-se uma fibra bifurcada com núcleo de 600 μm conectada às saídas A e B simultaneamente, e uma fibra não-bifurcada com núcleo de 1000 μm , ora conectada à saída A e ora à saída B, como mostra a Figura 11.

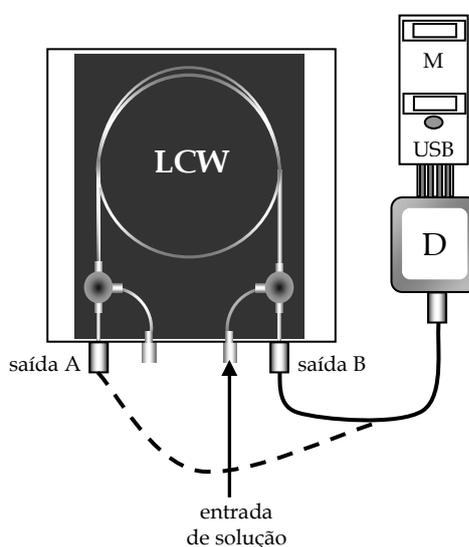


Figura 11 – Localização das saídas A e B no guia de ondas

De acordo com a Figura 12, verifica-se que a maior intensidade de radiação foi detectada com a utilização da fibra óptica bifurcada, já que a radiação emitida é coletada nas duas extremidades do guia de ondas. Verifica-se também que a

intensidade de radiação é praticamente a mesma, independentemente se a fibra óptica não-bifurcada é conectada à saída A ou B. O sinal medido com a fibra bifurcada é maior que a soma dos sinais medidos com a fibra não-bifurcada, provavelmente devido às diferenças na qualidade óptica das fibras e ao alinhamento destas com o guia de ondas.

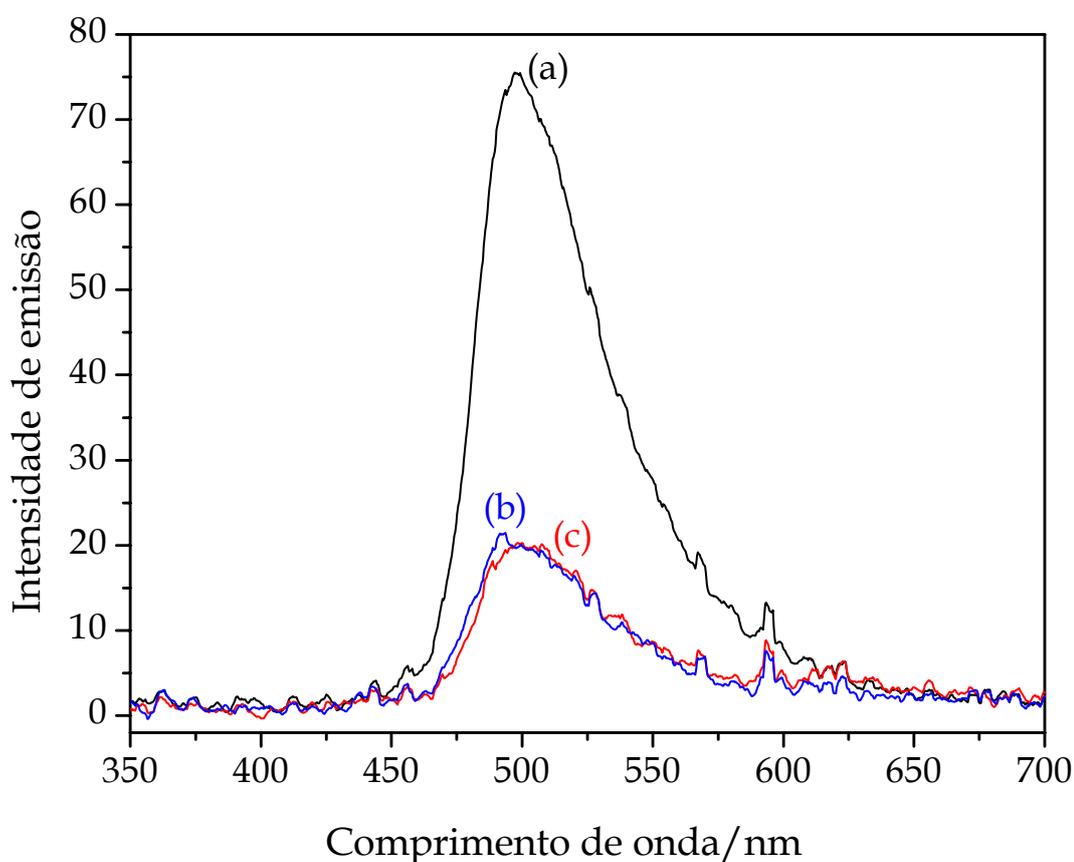


Figura 12 – Efeito das fibras ópticas bifurcada (a) e não-bifurcada, conectadas à saída A (b) e à saída B (c), Figura 11, na obtenção de espectros de emissão do luminol quando oxidado por H_2O_2 $54,7 \mu\text{mol/L}$ na presença de hexacianoferrato(III) $5 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$

Foi obtida uma curva de calibração para a determinação de H_2O_2 , que apresentou uma relação linear entre a intensidade de emissão (I) e a concentração de H_2O_2 (c), entre $0,3 - 11,2 \mu\text{mol/L}$, representada pela equação $I = -22,7 + 156 c$ ($r^2 = 0,996$), apresentada na Figura 13.

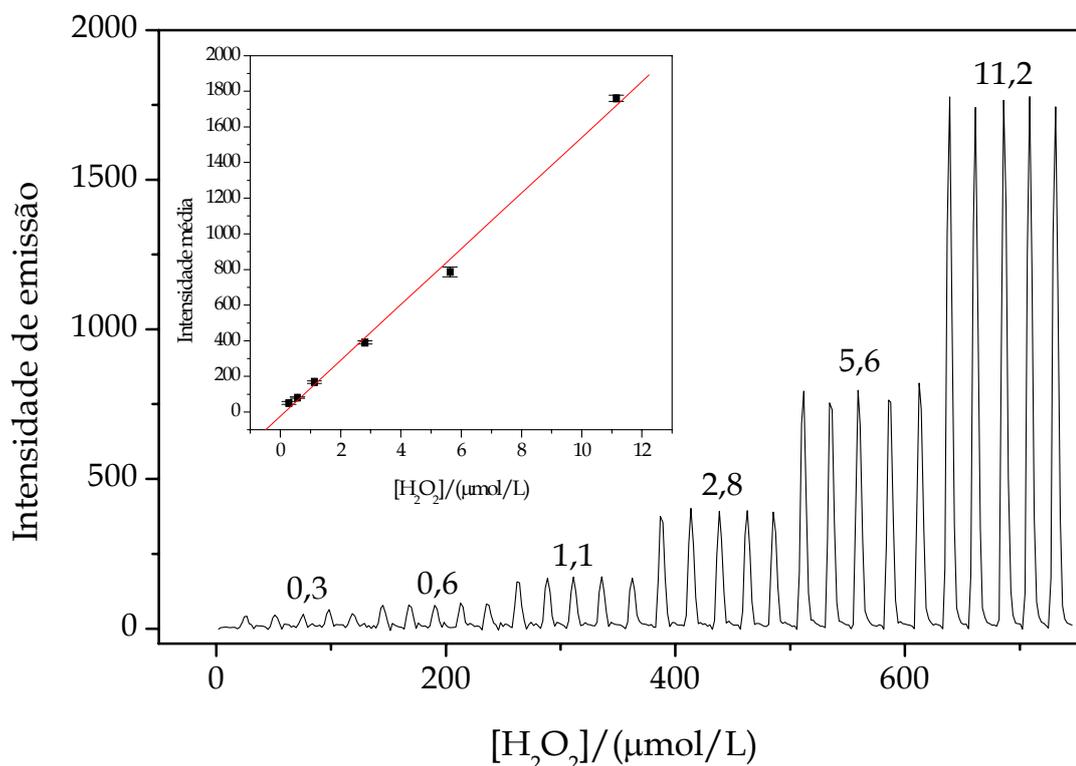


Figura 13 - Sinais transientes e curva de calibração para determinação de H_2O_2 por quimiluminescência. Os números no topo dos sinais transientes indicam concentrações em $\mu\text{mol/L}$. Vazões e concentrações dos reagentes como descrito na legenda da Figura 7. Tempo de integração - 2 s, fibra óptica de 600 μm conectada à saída B (Figura 11), distância da confluência à entrada da cela de fluxo - 2 cm

O limite de detecção foi estimado, de acordo com recomendações da IUPAC, em $0,11 \mu\text{mol/L}$, empregando a eq. (4)¹⁰, onde LD é o limite de detecção, $k = 3$ (para nível de confiança de 99,7%) e a é o coeficiente angular da curva de calibração. As variações na linha base para um conjunto de 30 medidas foram empregadas para estimativa do desvio padrão do branco (s_{bco}).

$$LD = k \cdot \frac{s_{bco}}{a} \quad (4)$$

Os resultados para determinações de H₂O₂ foram comparados com os obtidos em artigos da literatura (TABELA 2). Na *Ref. 17* a enzima peroxidase foi empregada como catalisador, enquanto os resultados relatados nas demais referências^{2, 9} foram obtidos com o mesmo sistema químico empregado neste experimento.

TABELA 2 – Comparação das características analíticas de procedimentos para determinação de H₂O₂ por quimiluminescência

Parâmetro	Sistema proposto	Ref. 2	Ref. 9	Ref. 17
Limite de detecção (nmol/L)	110	1000	800	1000
Frequência de amostragem (determinações/h)	96	70	150	65
Faixa linear (µmol/L)	0,3 – 11,2	2,5 – 315	2,5 – 500	10 – 1000
Sistema de detecção	CCD ^a	1 PD ^b	2 PD ^b	1 PD ^b
Catalisador	[Fe(CN) ₆] ³⁺	[Fe(CN) ₆] ³⁺	[Fe(CN) ₆] ³⁺	peroxidase

a. dispositivo de acoplamento de carga; b. fotodiodo

As condições experimentais empregadas foram as mesmas adotadas na *Ref. 9* para que a comparação das características analíticas fosse possível e as diferenças obtidas nos resultados pudessem ser atribuídas somente ao guia de ondas e o sistema de detecção. O sistema proposto apresenta um limite de detecção aproximadamente 7,3 vezes mais baixo quando comparado ao reportado na *Ref. 9*, que emprega detecção com dois fotodiodos com área sensível de 50 mm², e 9,1 vezes mais baixo que o relatado nas demais referências. Apesar das diferenças de sensibilidade dos diferentes detectores e da atenuação da radiação emitida no sistema óptico e nas fibras ópticas empregados nas medidas com o arranjo de sensores, os menores limites de detecção são um indicativo da maior eficiência da cela de medida para direcionar a radiação emitida ao sistema de detecção.

Avaliando-se a frequência de amostragem, o sistema proposto apresenta um valor 1,5 vezes mais elevado que na *Ref. 17*, 1,4 vezes mais elevado que na *Ref. 2* e 1,6 vezes mais baixo do que na *Ref. 9*. O aumento da frequência de amostragem é consequência da geometria tubular da cela empregada neste trabalho, que reduz o tempo de limpeza. A cela de fluxo empregada na *Ref. 9* apresenta volume interno ca. 3 vezes menor (250 μL para a cela proposta, 78 μL para a cela utilizada na *Ref. 9*). A diferença encontrada na frequência de amostragem deve-se também ao maior volume da alça de amostragem (250 μL e 100 μL para o procedimento proposto e para a *Ref. 9*, respectivamente).

O intervalo de resposta linear é comparável aos reportados na literatura. Entretanto, com o sistema empregado neste trabalho, o intervalo de resposta pode ser ampliado alterando-se o tempo de integração. Por exemplo, resposta linear foi observada entre 5,5 e 273,4 $\mu\text{mol/L}$, quando as medidas foram efetuadas com tempo de integração de 300 ms.

4.2. Procedimento analítico para a determinação de hipoclorito por quimiluminescência

Parâmetros químicos, instrumentais e hidrodinâmicos foram otimizados para a determinação de ClO^- . O efeito do tempo de integração na magnitude do sinal analítico foi avaliado, variando-se de 50 - 2000 ms. Este parâmetro representa o tempo no qual o sistema de detecção acumula carga devido à exposição à radiação emitida. Para medidas de quimiluminescência, quanto mais elevado o tempo de integração, maior a sensibilidade das medidas¹⁰. Porém, tempos de integração muito elevados não são adequados, pois podem acarretar em perda de informação dos

sinais transientes obtidos, visto que a radiação emitida tem tempo de vida curto. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 14. A relação entre a intensidade de emissão (I) e o tempo de integração (t , ms) é descrita pela equação $I = -5,09 + 0,828 t$ ($r^2 = 0,999$).

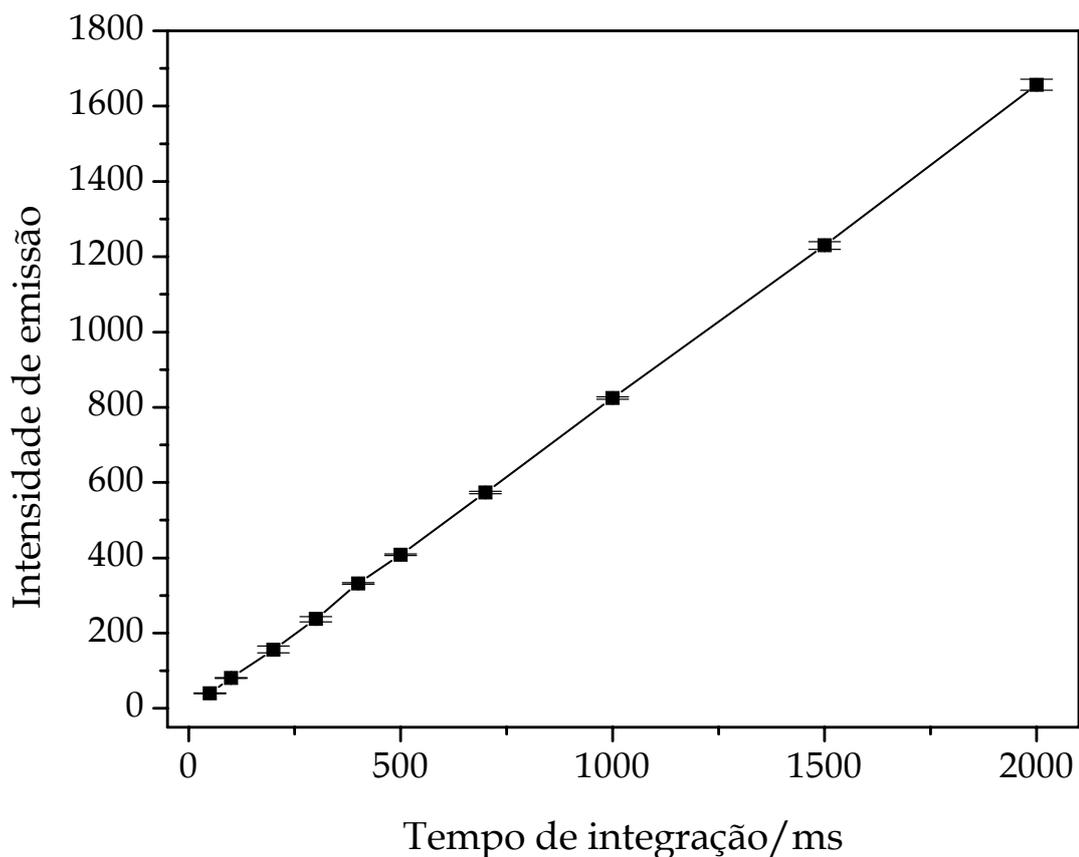


Figura 14 – Efeito do tempo de integração na intensidade de emissão. $[ClO^-] = 9,6$ mg/L; vazão do transportador (H_2O) 2,3 mL/min; vazão do luminol (4,5 mmol/L, pH 10,5) 0,7 mL/min

Um parâmetro que pode ser empregado para verificar se houve perda de informação é o número de pontos que determinam o perfil do sinal transiente produzido, como mostra a Figura 15. Cada uma das medidas requer 20 s para ser realizada. Com um tempo de integração de 500 ms, tem-se então 40 pontos que determinam o perfil do sinal transiente, para 1000 ms este valor é reduzido a 20

pontos, e finalmente, para 2000 ms são apenas 10 pontos. Diante disso, pode haver uma perda de informação quando se emprega 2000 ms, portanto o tempo de integração adotado para medidas posteriores foi 1000 ms.

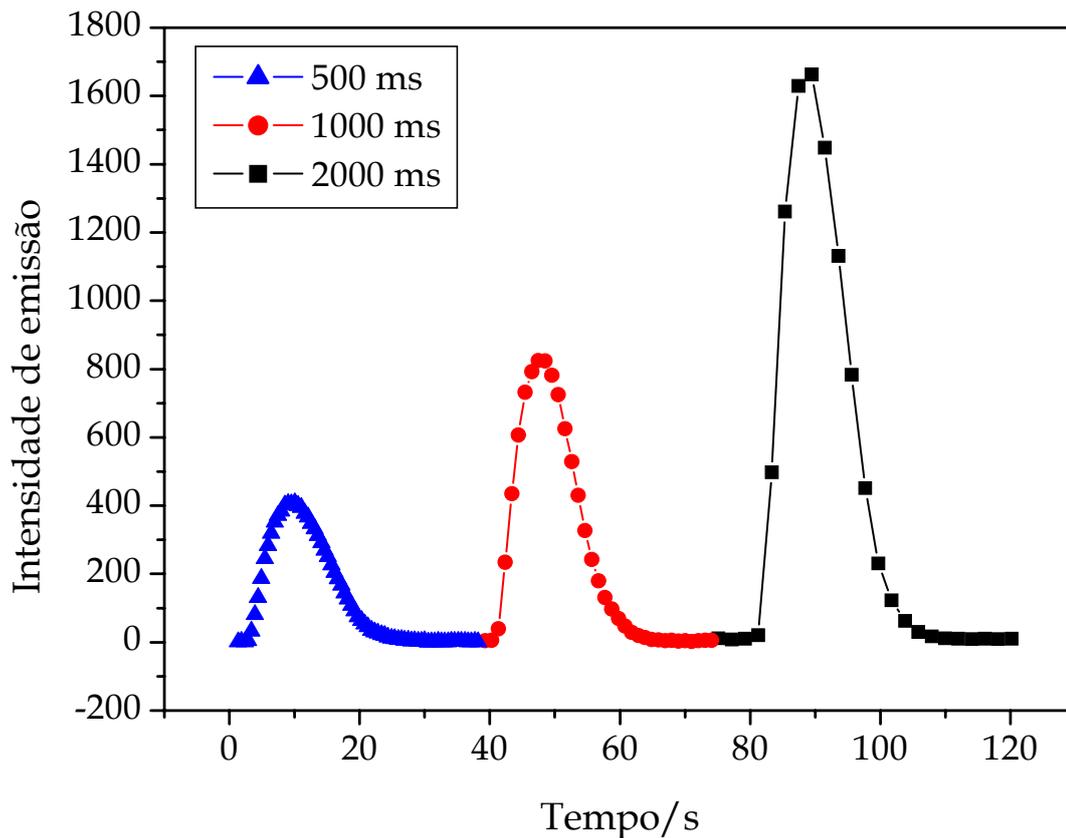


Figura 15 – Sinais transientes para tempos de integração de 500, 1000 e 2000 ms

Foram avaliadas fibras ópticas bifurcadas e não-bifurcadas, com núcleos de diferentes diâmetros para o transporte da radiação emitida ao sistema de detecção. A fibra óptica bifurcada possui um núcleo de 600 μm . Dentre as fibras ópticas não-bifurcadas, duas possuem núcleo de 600 μm (identificadas pelos números 1 e 2) e uma possui núcleo de 1000 μm . Estas fibras foram conectadas ora à saída A, ora à saída B, como mostra a Figura 11. Os resultados são apresentados na Figura 16.

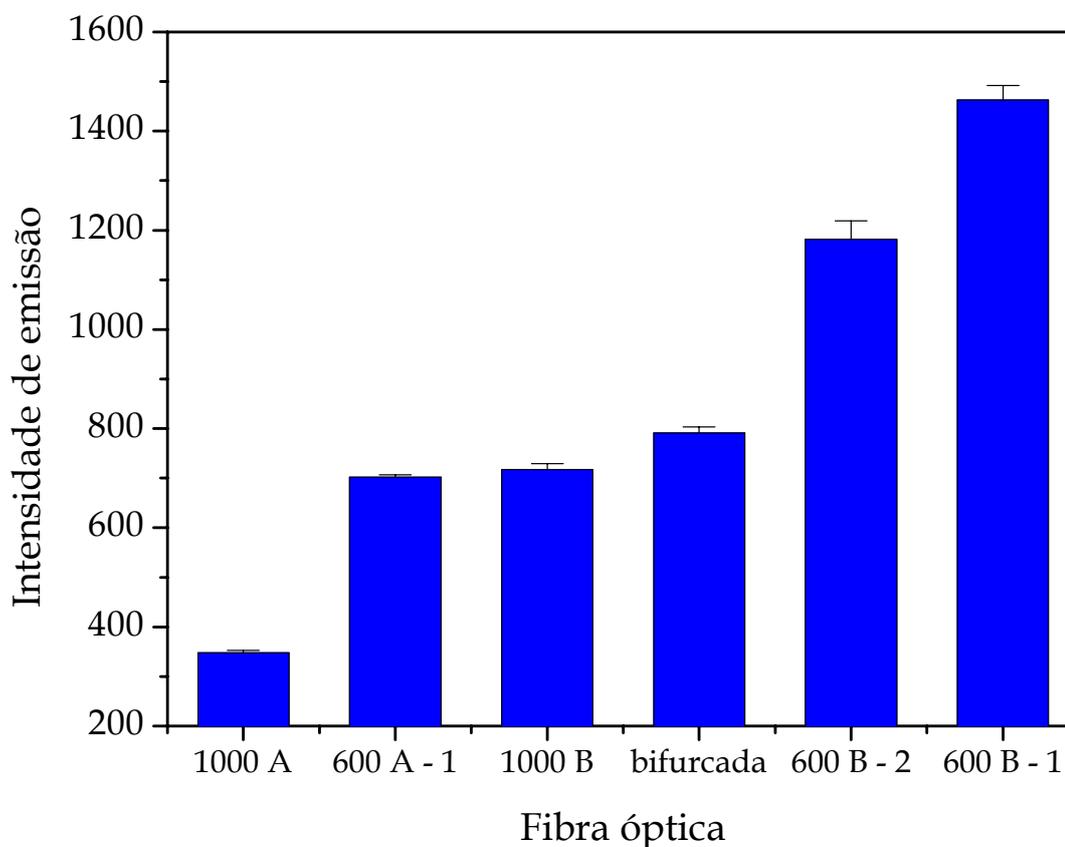


Figura 16 – Efeito do tipo de fibra óptica empregada para o transporte da radiação emitida ao sistema de detecção. Tempo de integração 1 s; demais condições experimentais apresentadas na legenda da Figura 14

Maior intensidade de emissão foi obtida com a utilização da fibra óptica de 600 μm identificada pelo número 1, conectada à saída B, que se encontra mais próxima à entrada de solução na cela de fluxo. Esperava-se que a fibra bifurcada proporcionasse melhores resultados, como observado para a determinação de H_2O_2 (item 4.1.), já que, neste caso, a radiação emitida é coletada nas duas extremidades da cela de fluxo. Foram realizados experimentos a fim de verificar a qualidade das fibras, constatando-se que uma das extremidades da fibra bifurcada não mais estava transportando radiação e que a fibra óptica com núcleo de 1000 μm possui qualidade inferior à de 600 μm , o que justifica os resultados obtidos. Diferentemente do

observado nos experimentos com H_2O_2 , maior sensibilidade foi observada quando a fibra óptica foi conectada à saída B, próxima à entrada das soluções na cela de fluxo. Isto provavelmente se deve à maior velocidade da reação de oxidação do luminol quando hipoclorito é empregado como oxidante.

Dentre os parâmetros hidrodinâmicos, o primeiro a ser otimizado foi a vazão do luminol, avaliada na faixa de 0,3 a 2,4 mL/min (Figura 17).

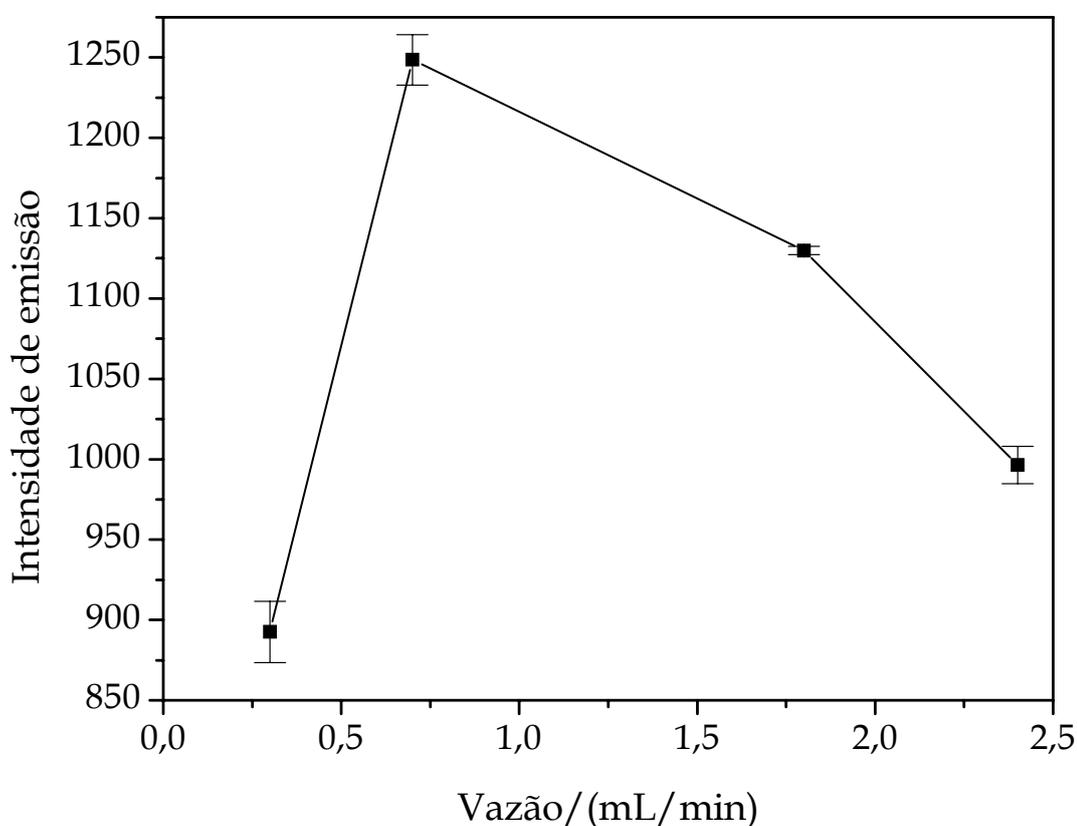


Figura 17 – Efeito da vazão do luminol na intensidade de emissão. Fibra óptica de $600\mu\text{m}$ conectada à saída B (Figura 11; tempo de integração – 1 s; demais condições experimentais apresentadas na legenda da Figura 14)

Os resultados obtidos devem ser interpretados com base na diluição da amostra e quantidade de reagente disponível na zona de amostra. A partir da confluência somam-se as vazões dos fluidos transportador e reagente, sendo a zona de amostra distribuída em um espaço maior que o ocupado em um sistema em linha

única, o que corresponde a uma diluição. Por outro lado, a dispersão diminui, pois a zona de amostra ocupa uma maior fração do percurso analítico, o que é equivalente ao emprego de uma alça de amostragem mais longa, compensando parcialmente o efeito da diluição. Em experimentos com soluções coloridas⁵, foi observada atenuação de 20 a 30% do valor da leitura obtida com sistema em linha única, para vazão do fluxo confluyente correspondente a 50% da vazão do transportador. A vazão da solução de luminol também afeta a quantidade de reagente disponível na zona de amostra. Observa-se que a curva na Figura 17 apresenta um máximo na vazão de luminol de 0,7 mL/min, que corresponde a 30% da vazão do transportador. Em vazões menores, a quantidade de luminol na zona de amostra é insuficiente, enquanto para vazões maiores a intensidade de emissão diminui em consequência da diluição e possivelmente do processo de auto-absorção, ou seja, o excesso de luminol faz com que a radiação emitida no processo de quimiluminescência seja absorvida por moléculas do substrato¹⁰.

A vazão total afeta o tempo de residência da amostra e, conseqüentemente, a magnitude dos sinais analíticos. A influência exercida por este parâmetro depende do sistema químico empregado. No caso de reações quimiluminescentes rápidas, cujos produtos possuem tempo de vida curto (e.g. reação de oxidação do luminol por hipoclorito) não convém empregar vazões muito baixas, que implicariam na emissão de fração significativa da radiação previamente à entrada da cela de medida⁵. Esta observação justifica os resultados apresentados na Figura 18, obtidos variando-se a rotação nominal da bomba peristáltica.

Após este estudo a vazão adotada foi de 4,5 mL/min, pois com 6,0 mL/min a sensibilidade é somente 4,5% mais elevada, porém o consumo de luminol aumentaria em 25%. Nestas condições, as vazões do transportador e do luminol são 3,45 mL/min, e 1,05 mL/min, respectivamente.

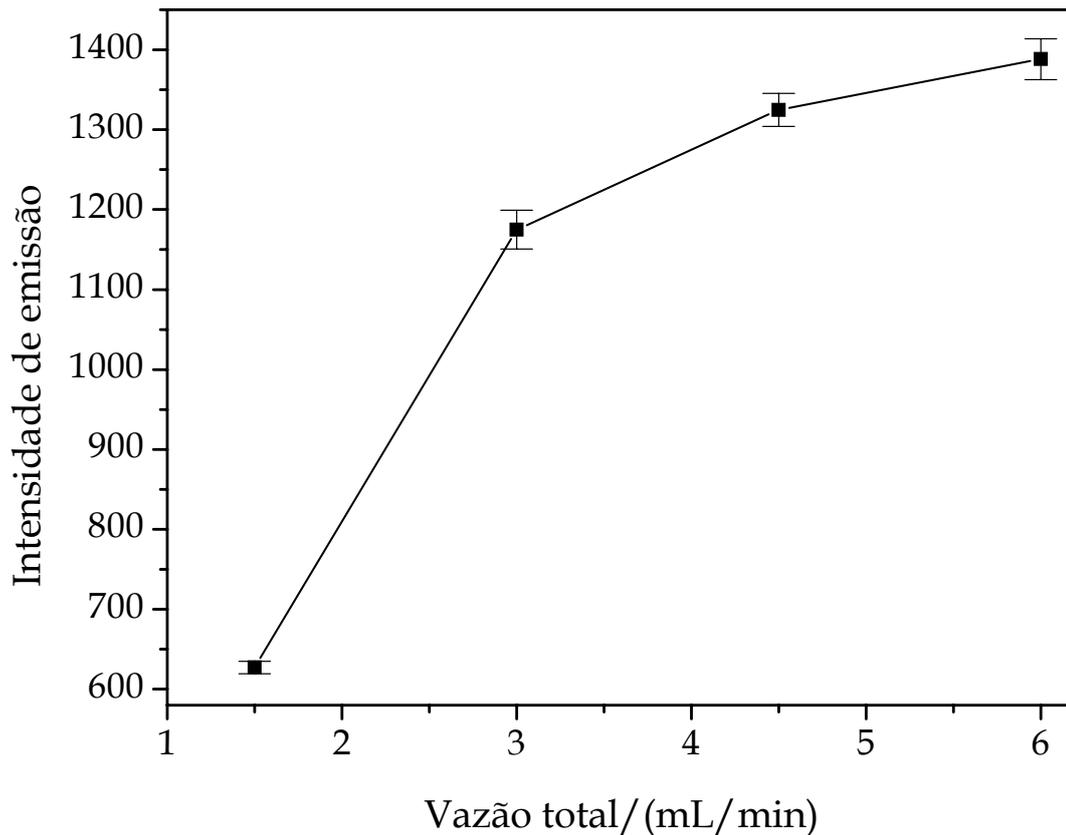


Figura 18 – Efeito da vazão total na intensidade de emissão. Razão entre vazão do transportador e do luminol mantida em 3,3. Tempo de integração – 1 s. Demais condições experimentais apresentadas na legenda da Figura 17

A distância da confluência à entrada da cela de fluxo (distância entre os pontos x e LCW na Figura 8) é um parâmetro extremamente importante. Como mencionado anteriormente, a radiação produzida tem tempo de vida curto e quando se emprega uma distância muito elevada, a radiação poderá se extinguir antes mesmo de atingir a cela de medida. Para distâncias muito curtas, e vazão total

elevada, o máximo de emissão pode ocorrer após a passagem pela cela de medida e as condições de mistura podem ser inadequadas. Com base nisto, esta distância foi otimizada, variando-se de 1 a 10 cm, e os resultados são mostrados na Figura 19.

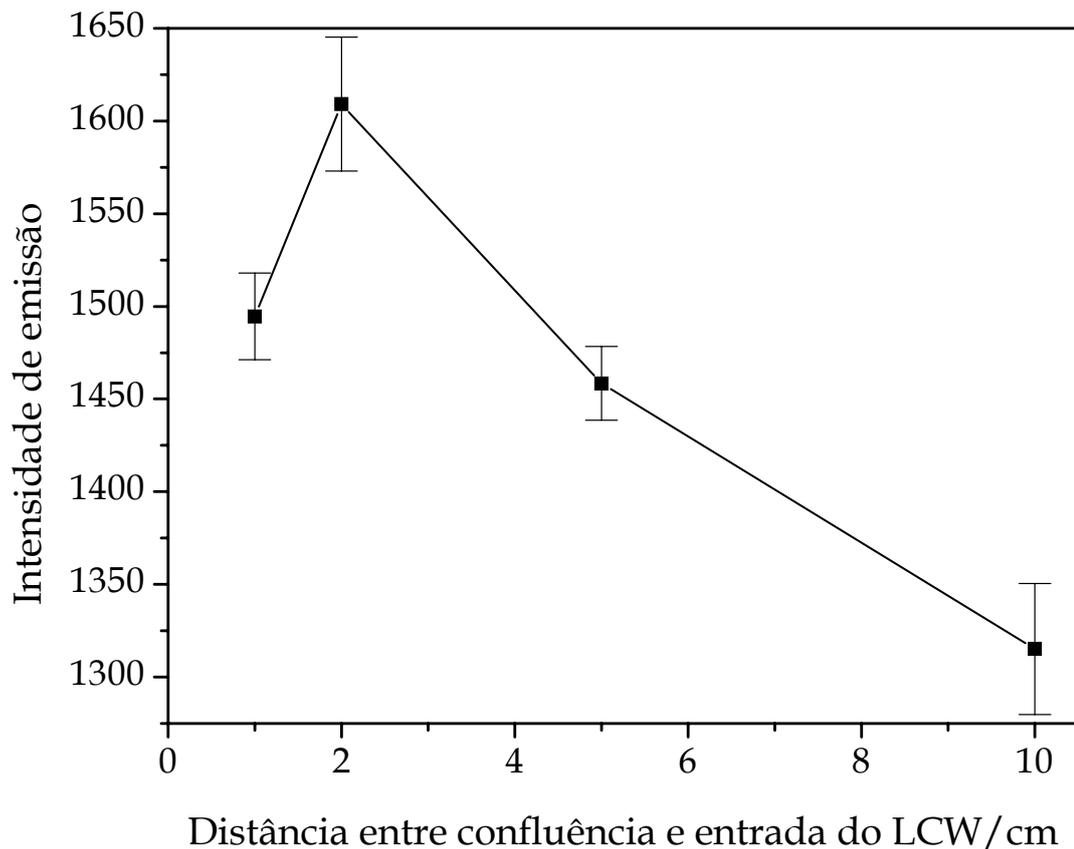


Figura 19 – Influência da distância entre a confluência e a entrada da cela de fluxo na intensidade de emissão. Vazão do transportador (H_2O) 3,45 mL/min e do luminol 1,05 mL/min. Tempo de integração – 1 s. Demais condições experimentais apresentadas na legenda da Figura 17

Conclui-se que a distância ideal é de 2 cm, que corresponde a um curto tempo de residência antes da entrada da cela de medida (ca. 130 ms), em função dos aspectos discutidos anteriormente. A geometria tubular da cela de medida, entretanto, contribui para a mistura entre amostra e reagente, de forma que a precisão não é criticamente afetada para os reatores menores.

Foram realizadas medidas com volumes de amostra entre 100 e 750 μL (Figura 20), variando-se o comprimento da alça de amostragem. Sabe-se que aumentando o volume de amostra, a magnitude do sinal também deve aumentar devido à minimização da dispersão na porção central da zona de amostra, tendendo a um limite máximo, que corresponde à situação em que a dispersão da amostra é desprezível (amostra em volume infinito). O volume de amostra selecionado foi 250 μL , que já vinha sendo empregado nos estudos anteriores e que é igual ao volume da cela de medida. Com um volume de 500 μL , o aumento na intensidade de emissão é de apenas 13%, o que não justifica o maior consumo de amostra e a diminuição da frequência de amostragem.

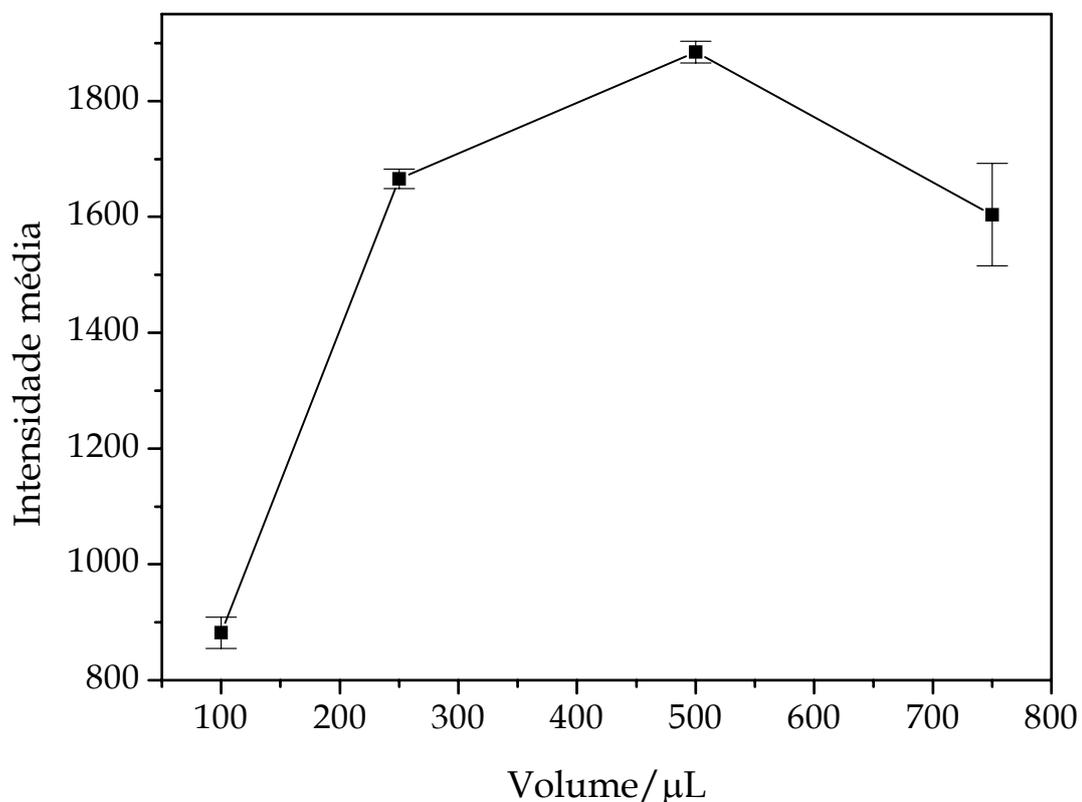


Figura 20 – Efeito do volume de amostra na intensidade de emissão. Distância da confluência à entrada da cela de fluxo – 2 cm; demais condições experimentais apresentadas na Figura 19

Foi também avaliado o efeito da concentração da solução de luminol preparada em tampão carbonato/bicarbonato 0,2 mol/L, pH 10,5, na faixa de 1,0 a 9,0 mmol/L, como mostra a Figura 21.

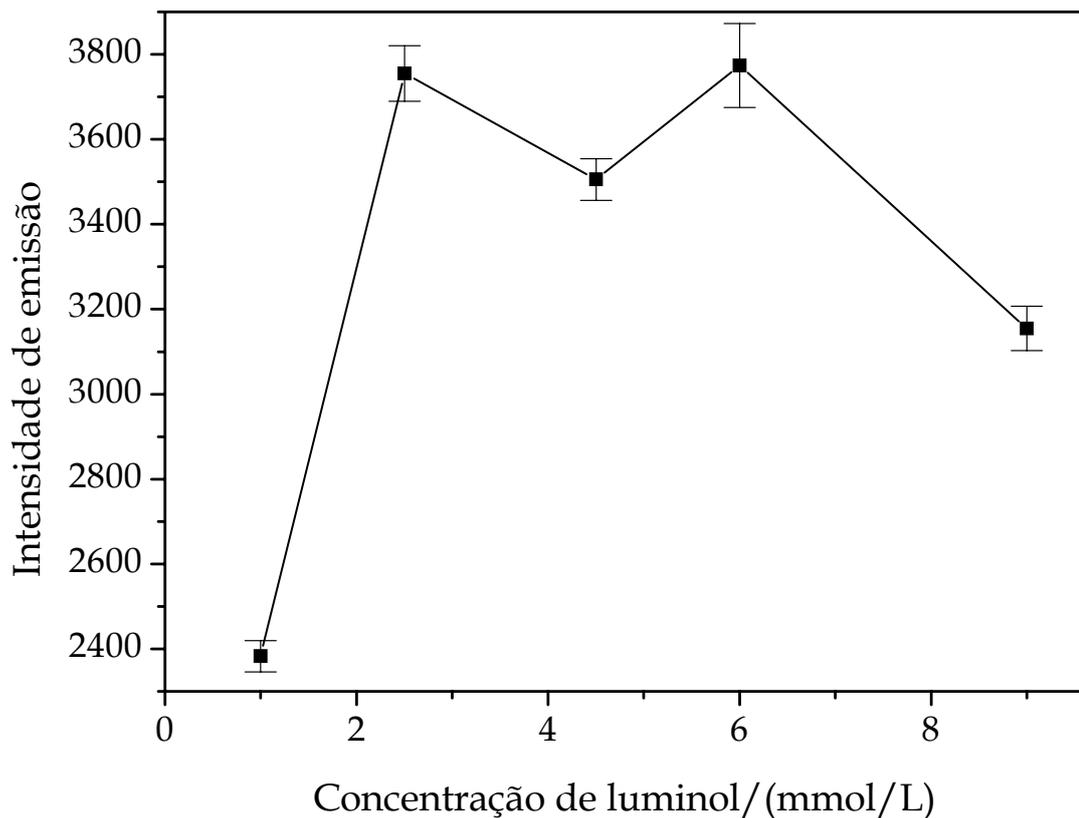


Figura 21 – Efeito da concentração da solução de luminol na intensidade de emissão. Volume de amostra 250 μ L; demais condições experimentais apresentadas na legenda da Figura 19

A concentração ótima foi 2,5 mmol/L. Enquanto a sensibilidade para concentrações abaixo deste valor foi afetada pela escassez de luminol, para concentrações acima de 6,0 mmol/L, a intensidade de emissão diminuiu devido ao fenômeno de auto-absorção, já discutido anteriormente. Isto está de acordo com o observado quando a vazão de luminol foi aumentada (Figura 17). Considerando as diluições no ponto de confluência, o fenômeno de auto-absorção passa a ocorrer quando a concentração de luminol na zona de amostra está em torno de 1,4 mmol/L.

Foi avaliado o efeito do pH do tampão carbonato/bicarbonato no qual foi preparada a solução de luminol. Sabe-se que os íons OH^- participam da formação do intermediário diazoquinona e do ânion de H_2O_2 , que são etapas determinantes para a emissão de quimiluminescência e, portanto, o pH do meio reacional deve ser alcalino¹. Em vista disto, foram considerados valores entre 9,0 e 11,5 (Figura 22), concluindo-se que o pH que resulta em maior intensidade de emissão é 10,8, concordando com os valores da literatura^{2, 3, 9}.

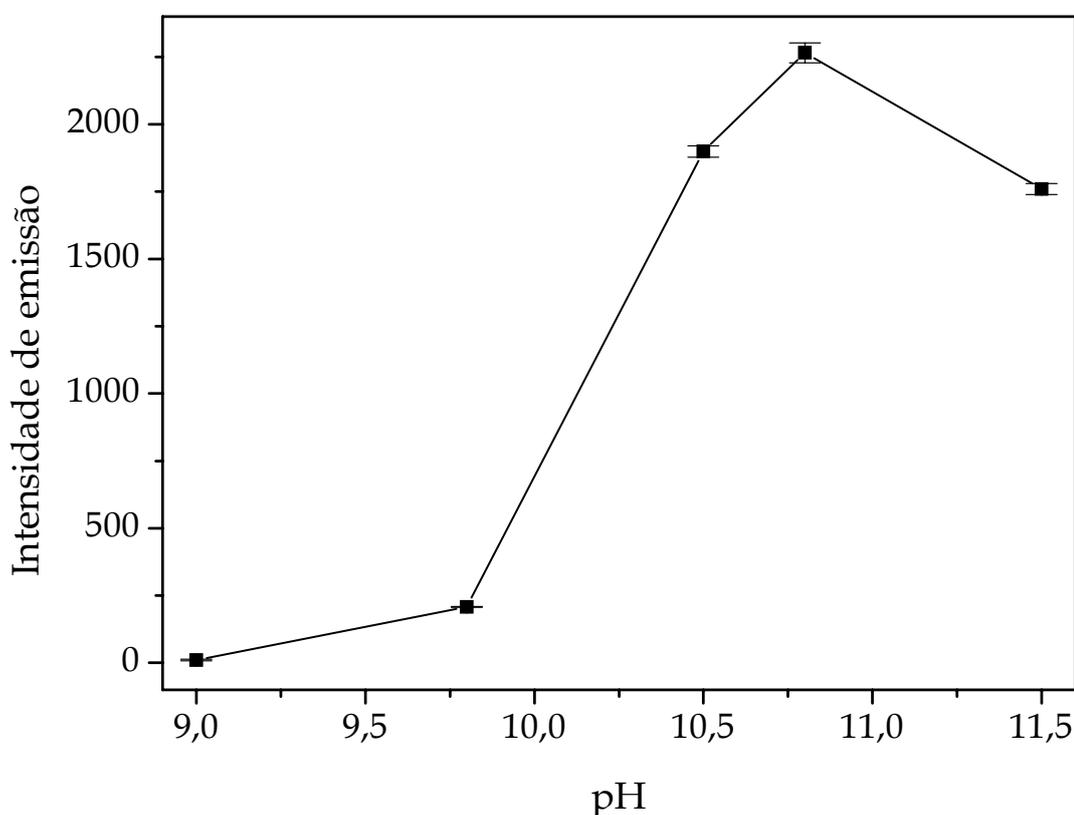


Figura 22 – Efeito do pH da solução tampão na intensidade de emissão. Concentração de luminol 2,5 mmol/L; demais condições experimentais apresentadas na Figura 21

Em sistemas de análises em fluxo envolvendo reações lentas, é possível a utilização do recurso da parada de fluxo, para aumento do tempo de residência sem alteração significativa da dispersão da amostra. Em sistemas envolvendo detecção

por quimiluminescência, é possível com este recurso monitorar a emissão de radiação a partir da porção central da zona de amostra. Foi medida a intensidade de emissão de radiação, desligando-se a bomba peristáltica no instante em que a zona de amostra encontrava-se totalmente no interior da cela de fluxo.

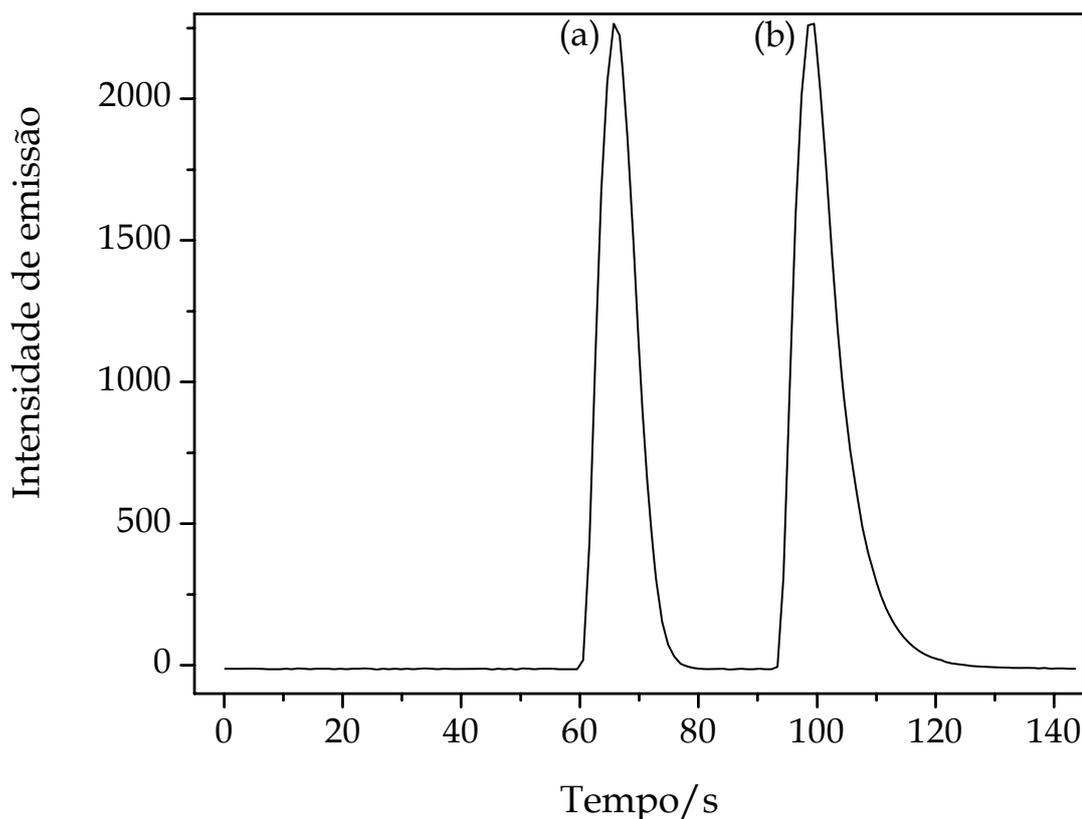


Figura 23 – Sinais transientes demonstrando o efeito de parada de fluxo na intensidade de emissão: (a) sem parada de fluxo, (b) com parada de fluxo, após atingir o sinal máximo. Solução de 2,5 mmol/L luminol com pH 10,8; demais condições experimentais apresentadas na legenda da Figura 21

Comparando-se os resultados obtidos com e sem parada de fluxo (Figura 23), conclui-se que não houve variação significativa de sensibilidade. Esta observação está de acordo com o esperado considerando que a reação ocorre rapidamente, que o intermediário no estado excitado possui tempo de vida curto e que o volume da zona de amostra é aproximadamente igual ao volume da cela de fluxo.

Foi avaliado o efeito do emprego de tampão carbonato/bicarbonato 0,2 mol/L pH 10,8 como solução transportadora em relação à utilização de água. As intensidades de emissão foram 2457 ± 53 e 2188 ± 52 empregando a solução tampão e água, respectivamente, o que corresponde a um aumento de apenas 12% na intensidade do sinal de quimiluminescência. Portanto, optou-se pela utilização de água como fluido transportador, a fim de reduzir a quantidade de resíduos gerados e custos, além de simplificar a implementação do procedimento.

Os surfactantes têm propriedades de solubilizar e concentrar espécies, alterar propriedades eletroquímicas e mecanismos de emissão de radiação¹⁸. Em algumas situações, na presença de surfactantes, é possível reduzir perdas de energia por processos não-radiativos, aumentando então a intensidade de quimiluminescência. Em vista disto, foi avaliado o efeito da utilização de quatro surfactantes, adicionados ao fluido transportador (Figura 24). Os surfactantes avaliados foram CTAB (catiônico), Triton X-114, Triton X-100 e Tween 60 (não-iônicos).

Observa-se que o emprego de água como fluido transportador proporciona maior intensidade de emissão. Supõe-se que as moléculas de luminol devam ter interagido com as moléculas de surfactante, permanecendo na região central (hidrofóbica) das micelas, dificultando a reação com hipoclorito e reduzindo a intensidade de quimiluminescência.

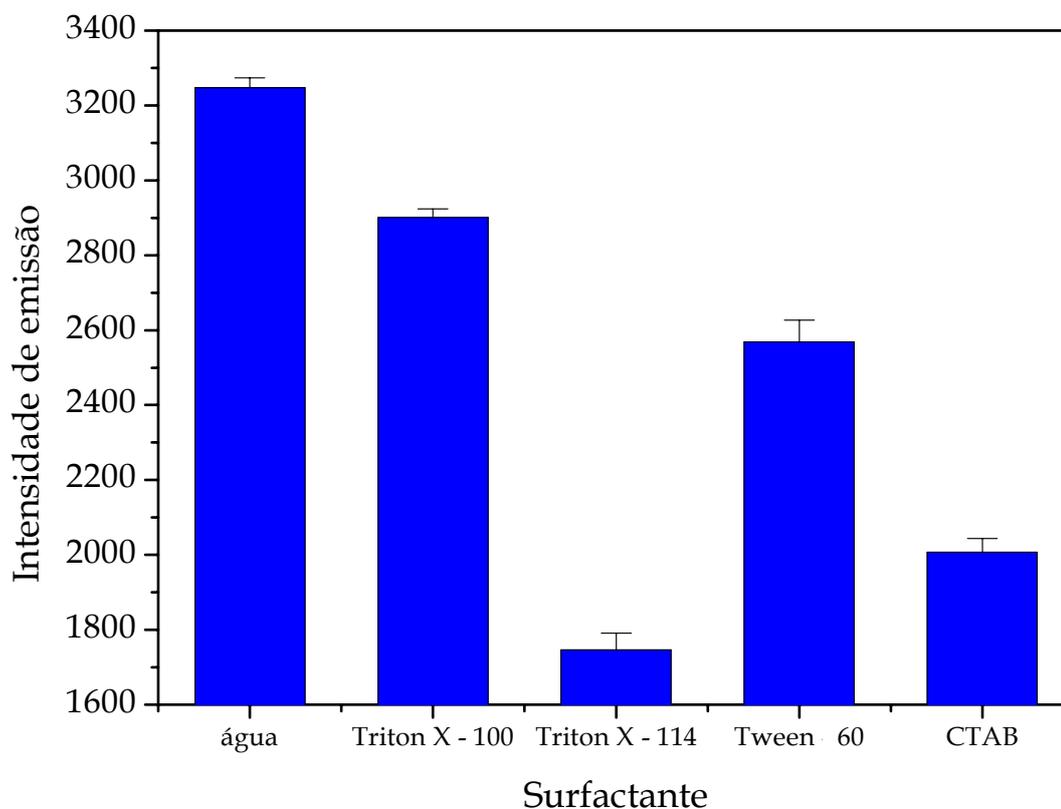


Figura 24 – Efeito da adição de surfactantes ao meio reacional na intensidade de emissão. Condições experimentais apresentadas na legenda da Figura 21

A maioria dos artigos que emprega luminol como reagente sugere a preparação da solução com alguns dias de antecedência para sua “estabilização”. Como mencionado no item 1.1.2.1., usualmente há uma maior intensidade de emissão para soluções preparadas alguns dias antes do uso⁴. Em vista disto, foram realizados experimentos para avaliar o efeito do tempo de preparo e da forma de armazenamento da solução, se sob refrigeração ou temperatura ambiente. Observa-se na Figura 25 que melhores resultados foram obtidos quando a solução foi preparada 3 dias antes da utilização e armazenada à temperatura ambiente.

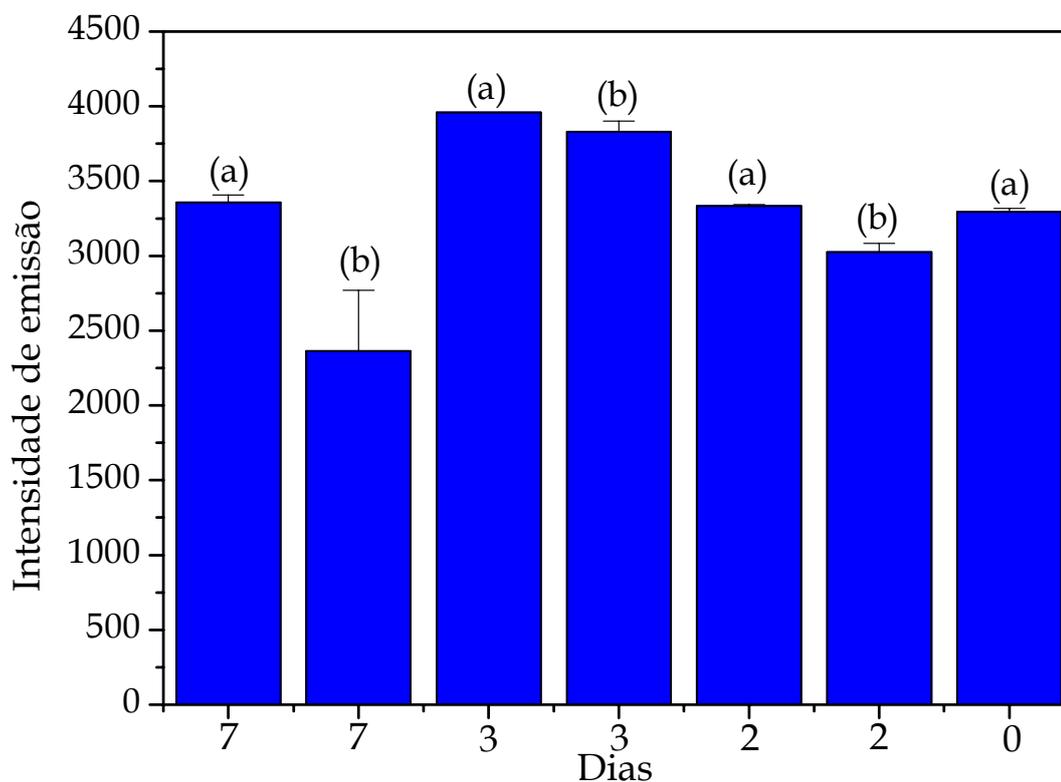


Figura 25 – Efeito do tempo de preparo e das condições de armazenamento da solução de luminol 2,5 mmol/L na intensidade de emissão. (a) temperatura ambiente, (b) sob refrigeração. Condições experimentais apresentadas na legenda da Figura 21

A TABELA 3 apresenta uma síntese dos parâmetros otimizados no desenvolvimento do procedimento analítico.

TABELA 3 - Condições otimizadas para determinação de ClO^- por quimiluminescência

Parâmetro	Faixa estudada	Valor ótimo
Tempo de integração (ms)	50 a 2000	1000
Tipo de fibra óptica	Bifurcada e não-bifurcada	Não-bifurcada
Vazão do luminol (mL/min)	0,3 a 2,4	0,7
Vazão total do sistema (mL/min)	1,5 a 6,0	4,5
Distância da confluência à entrada da cela (cm)	1 a 10	2
Volume de amostra (μL)	100 a 750	250
Concentração do luminol (mmol/L)	1,0 a 9,0	2,5
pH da solução de luminol	9,0 a 10,8	10,8
Parada de fluxo	Com e sem parada	Sem parada
Composição da solução transportadora	Tampão pH 10,8, água, surfactante	Água
Tempo de preparo da solução de luminol	Recém preparado - até 7 dias	3 dias

Após a otimização dos parâmetros analíticos construiu-se uma curva de calibração para a determinação de ClO^- , com medidas de intensidade de emissão em 439,5 nm. Relação linear entre a intensidade de emissão (I) e a concentração de ClO^- (c) foi observada na faixa de 0,2 - 3,8 mg/L (2,7 - 51 $\mu\text{mol/L}$), representada pela equação $I = -258 + 911 c$ ($r^2 = 0,997$), Figura 26.

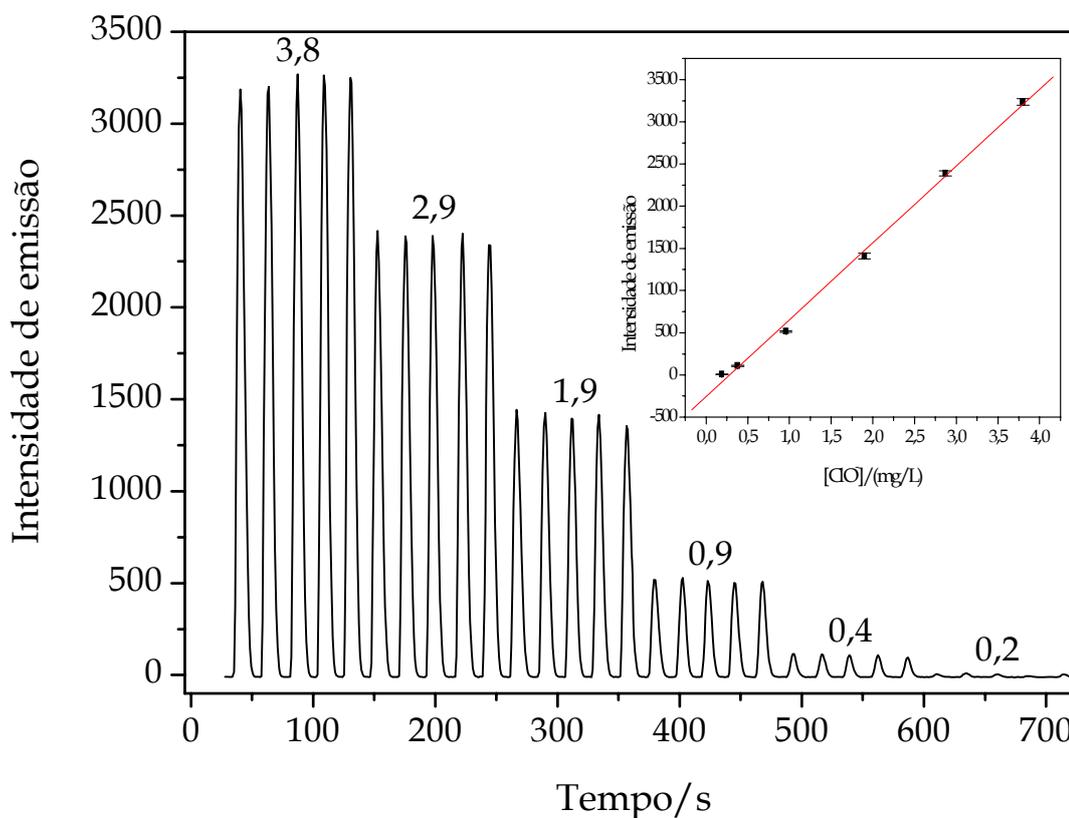


Figura 26 - Sinais transientes e curva de calibração para determinação de ClO^- por quimiluminescência. Os números no topo dos sinais transientes indicam concentrações em mg/L. Experimento realizado com condições experimentais otimizadas (TABELA 3)

Para a avaliação da repetibilidade foram realizadas 20 medidas com soluções de referência em concentrações de 0,4 e 1,9 mg/L ClO^- , sendo os sinais transientes apresentados na Figura 27. Os valores dos coeficientes de variação foram 3,3% e 1,6% para as soluções de referência de 0,4 e 1,9 mg/L, respectivamente. O limite de detecção foi estimado em 48 $\mu\text{g/L}$ (0,64 $\mu\text{mol/L}$), com 99,7% de confiança, empregando eq. (4). O consumo de luminol para cada determinação foi de 50 μg .

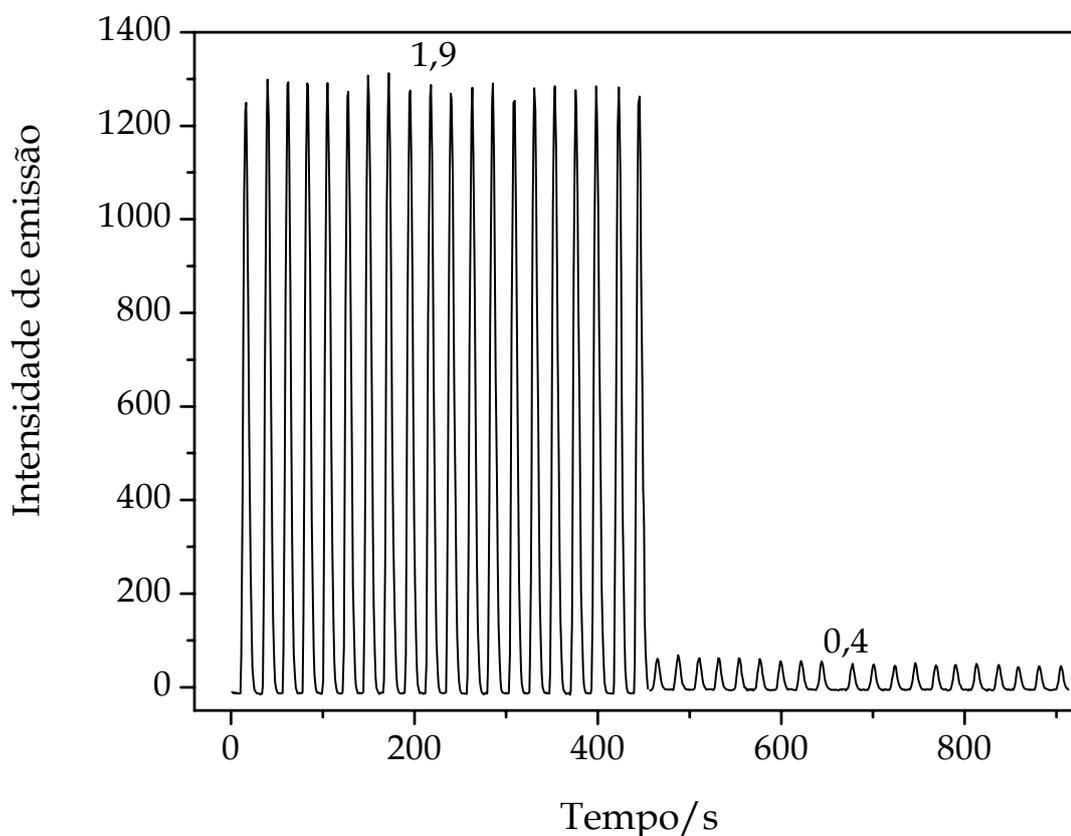


Figura 27 – Sinais transientes para avaliação da repetibilidade do procedimento desenvolvido. Os números no topo dos sinais transientes indicam concentrações de hipoclorito em mg/L. Experimento realizado com condições experimentais otimizadas (TABELA 3)

Os resultados obtidos para determinações de ClO^- , assim como no caso das determinações de H_2O_2 , foram comparados com os obtidos em procedimentos descritos na literatura (TABELA 4). O primeiro emprega o mesmo sistema químico e um guia de ondas construído com Teflon® AF-2400 de 40 cm de comprimento e 0,79 mm de diâmetro interno¹⁶. O segundo emprega bis(2,4,6-(triclorofenil)oxalato) como reagente e 9,10-difenilantraceno como fluoróforo¹⁹. O terceiro emprega um sistema em fase sólida, com uranina imobilizada em uma resina de troca aniônica²⁰. Sistemas de análises em fluxo foram empregados em todos os procedimentos.

TABELA 4 – Comparação das características analíticas de procedimentos para determinação de ClO^- por quimiluminescência

Parâmetro	Sistema proposto	Ref. 16	Ref. 19	Ref. 20
Limite de detecção ($\mu\text{g/L}$)	48	140	103	154
Frequência de amostragem (determinações/h)	164	90	----	96
Faixa linear ($\mu\text{mol/L}$)	2,7 – 51,0	$5,8 \cdot 10^{-3}$ – $2,3 \cdot 10^{-1}$	2 – 30	2 – 1000
Tipo de detector	CCD ^a	PD ^b	PMT ^c	PMT ^c

a. dispositivo de acoplamento de carga; b. fotodiodo; c. fotomultiplicadora

Comparando-se os valores de limite de detecção, observa-se que o procedimento desenvolvido apresenta um valor aproximadamente 3 vezes menor do que o reportado na *Ref. 16*; 2,1 vezes menor do que na *Ref. 19* e 3,2 vezes menor do que na *Ref. 20*. Já no caso da frequência de amostragem, observa-se um valor 1,7 vezes maior do que na *Ref. 20* e 1,8 vezes maior do que na *Ref. 16*. A *Ref. 19* não apresenta dados sobre frequência de amostragem.

4.2.1. Análise das amostras

O procedimento proposto foi aplicado a amostras de líquido de Dakin, que são soluções de hipoclorito de sódio amplamente empregadas em procedimentos odontológicos, bem como em outras áreas da saúde²⁵. A utilização deste tipo de solução teve início em 1792 com a água de Javelle, que consistia de uma solução de hipoclorito de sódio e potássio. Em 1820 surgiu o licor de Labaraque, uma solução de hipoclorito de sódio a 5% de cloro ativo. Dakin²⁶ salientou que para se fazer a escolha de um anti-séptico para tratamento de feridas infectadas devem ser considerados diversos fatores em adição à atividade germicida, tais como propriedades irritantes das substâncias, toxicidade, solubilidade, capacidade de penetração e absorção dos

tecidos, e ainda as reações químicas com proteínas ou outros constituintes dos tecidos vivos²⁴.

Dakin propôs a utilização de uma solução de hipoclorito de sódio de 0,5 a 0,6% de cloro ativo, com ácido bórico para reduzir o pH, deixando a solução com o pH próximo ao neutro, proporcionando uma maior eficiência como desinfetante e menor quantidade de OH⁻ livre, diminuindo assim o efeito irritante do hipoclorito de sódio²⁶.

O hipoclorito de sódio apresenta um amplo espectro de atividade e baixo custo, justificando a sua vasta utilização. Seu poder desinfetante está relacionado à concentração de cloro ativo presente, que varia de acordo com o tempo de preparação, devido à instabilidade do princípio ativo. Portanto é necessário quantificar o cloro presente em solução²⁶.

Foram analisadas 5 amostras, sendo as amostras 2 e 5 abertas um ano antes das análises. Os resultados obtidos por quimiluminescência, bem como por titulação iodométrica encontram-se na TABELA 5.

TABELA 5 - Resultados obtidos para as análises de ClO⁻ em amostras de líquido de Dakin por quimiluminescência e por titulação iodométrica

Amostra	Quimiluminescência (%)	Titulação iodométrica (%)
1	0,140 ± 0,005	0,179 ± 0,004
2	0,138 ± 0,004	0,279 ± 0,001
3	0,622 ± 0,023	0,629 ± 0,013
4	0,835 ± 0,019	0,720 ± 0,001
5	0,711 ± 0,030	0,560 ± 0,010

Foi realizado um teste *t* (Student)²⁷ para avaliar os resultados obtidos por ambos os procedimentos, concluindo-se que, com 95% de confiança, não existem

diferenças significativas entre os resultados obtidos pelo procedimento proposto e titulação iodométrica.

4.3. Procedimento analítico para a determinação de salbutamol por quimiluminescência

A quimiluminescência da reação entre luminol e hipoclorito é inibida na presença de amônia, aminas e espécies contendo grupos tiol, pois estas substâncias reagem com o hipoclorito, indisponibilizando-o para a oxidação do luminol^{3, 7, 21}.

O sulfato de salbutamol, sulfato de 2-(tert-butilamino)-1-(4-hidroxi-3-hidroximetilfenil)etanol, também conhecido como sulfato de albuterol, é um broncodilatador que exerce ação estimulante seletiva sobre os adrenorreceptores β_2 da musculatura brônquica. É amplamente empregado no tratamento de asma brônquica, suprimindo a tosse espasmódica sem causar efeitos colaterais cardiovasculares, podendo também ser empregado como descongestionante nasal e para o bloqueio de parto prematuro²². Este fármaco é comercializado sob diversas formas incluindo comprimidos, xaropes, aerossóis, soluções para inalação e injeções^{15, 23}. O salbutamol, cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 28, é uma amina secundária, que deve reagir com hipoclorito formando uma cloramina, suprimindo a quimiluminescência²⁴. Esta reação é favorecida em meio alcalino como o empregado na reação entre luminol e hipoclorito.

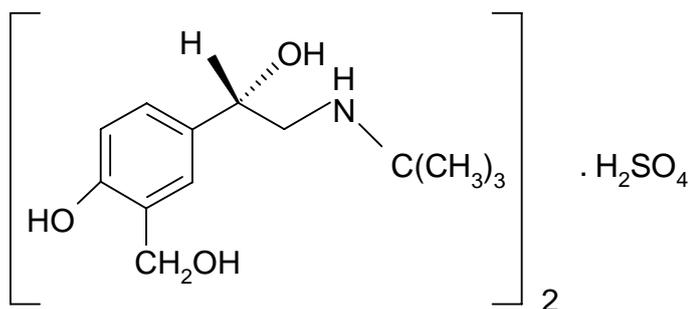


Figura 28 – Estrutura molecular do sulfato de salbutamol

Em vista disto, avaliou-se o efeito da inibição da quimiluminescência da reação do luminol com hipoclorito, na presença de salbutamol. Para isto, foi realizado um estudo variando-se a concentração de hipoclorito entre 0,7 e 2,7 mg/L. Este estudo foi realizado em duas concentrações de salbutamol 1×10^{-5} e 1×10^{-6} mol/L, bem como na ausência de salbutamol, empregando o diagrama de fluxos com zonas coalescentes apresentado na Figura 9. Os resultados obtidos, apresentados na Figura 29, confirmam a supressão da quimiluminescência pelo salbutamol, pois aumentando-se sua concentração a intensidade de quimiluminescência é reduzida.

Como o procedimento é baseado na medida do excesso de hipoclorito após a reação com salbutamol, a maioria das condições experimentais otimizadas para a determinação de hipoclorito foi mantida.

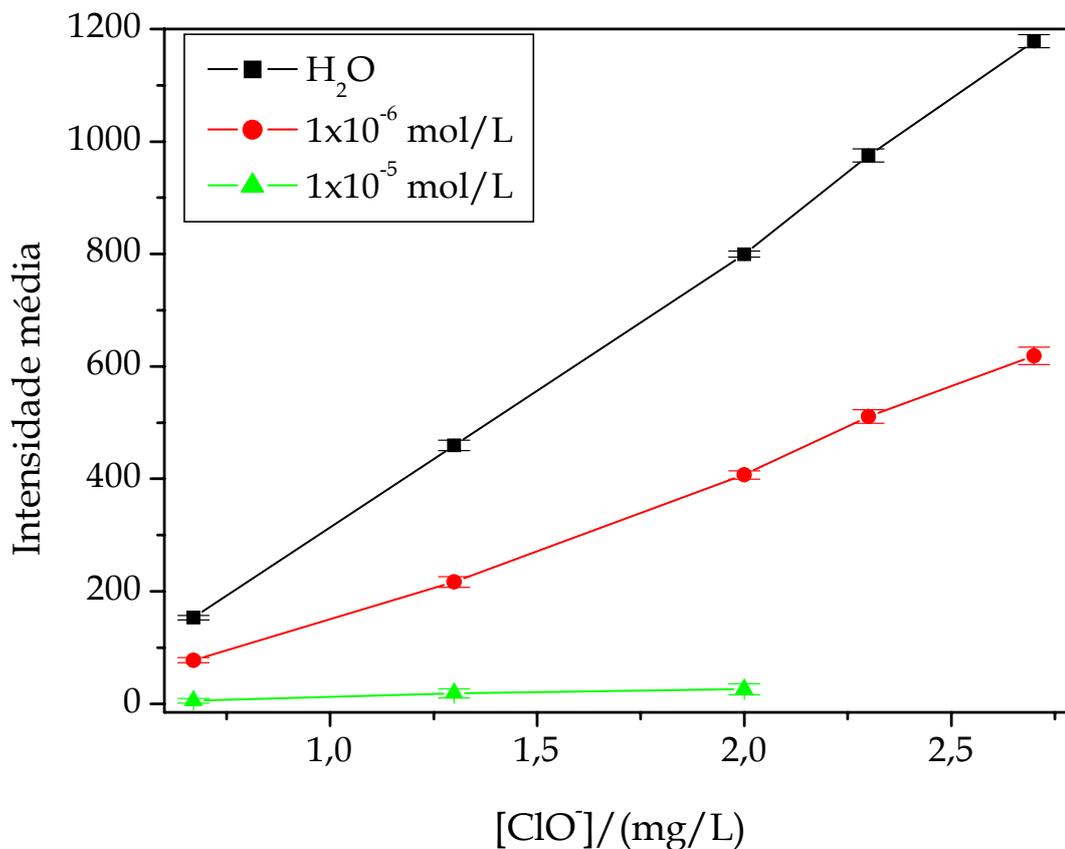


Figura 29 – Inibição da emissão de radiação na presença de salbutamol. Experimento realizado com condições experimentais otimizadas para a determinação de ClO^- (TABELA 3)

Para a determinação de salbutamol, foram otimizados o comprimento do reator (B , Figura 9) e o comprimento das alças de amostragem (L , Figura 9). O efeito da variação do comprimento do reator sobre o sinal analítico (diferença entre as intensidades de emissão na ausência e presença de salbutamol) é mostrado na Figura 30.

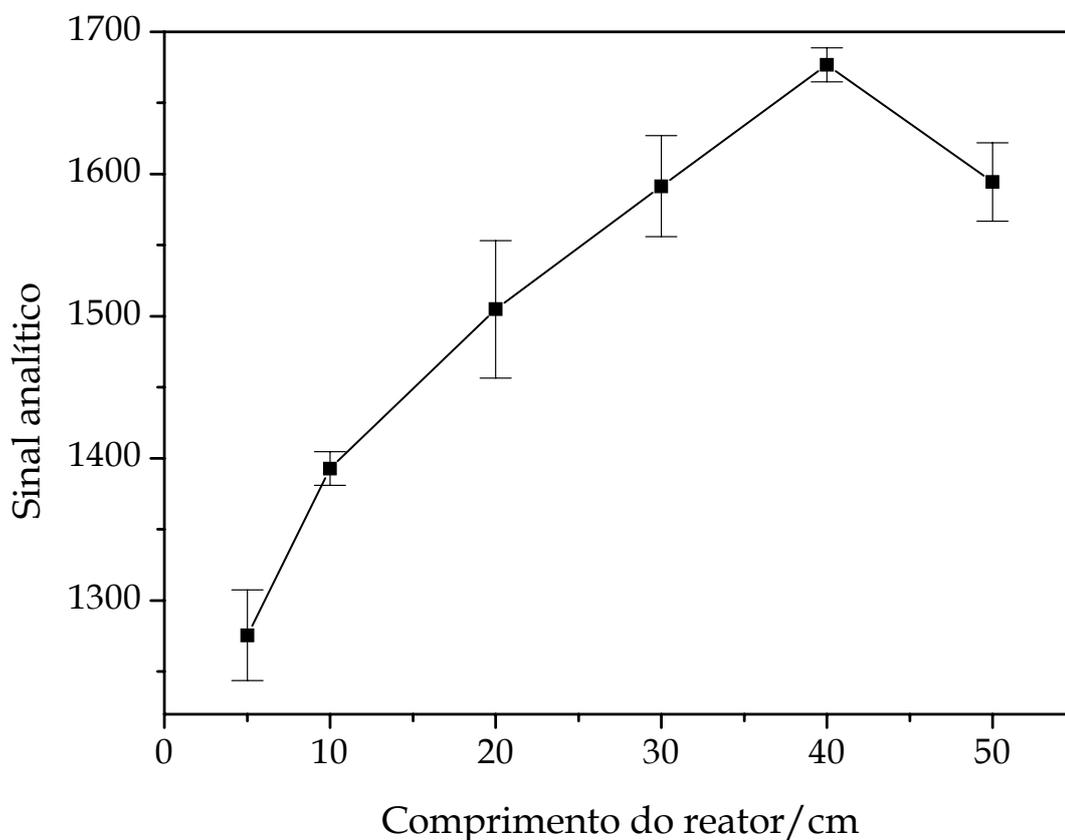


Figura 30 – Efeito do comprimento do reator no sinal analítico para salbutamol. Experimento realizado com condições experimentais otimizadas para a determinação de ClO^- (TABELA 3). $[\text{ClO}^-] = 5,5 \text{ mg/L}$; $[\text{salbutamol}] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

Observa-se que o comprimento ideal é de 40 cm, pois proporcionou maior diferença na intensidade de quimiluminescência com menor desvio entre as medidas.

O volume de ambas as alças de amostragem (L , Figura 9) foi simultaneamente variado, visando promover a completa sobreposição entre as zonas de amostra de salbutamol e hipoclorito. Os resultados são apresentados na Figura 31. Melhor sensibilidade foi obtida para alças de amostragem de 300 μL .

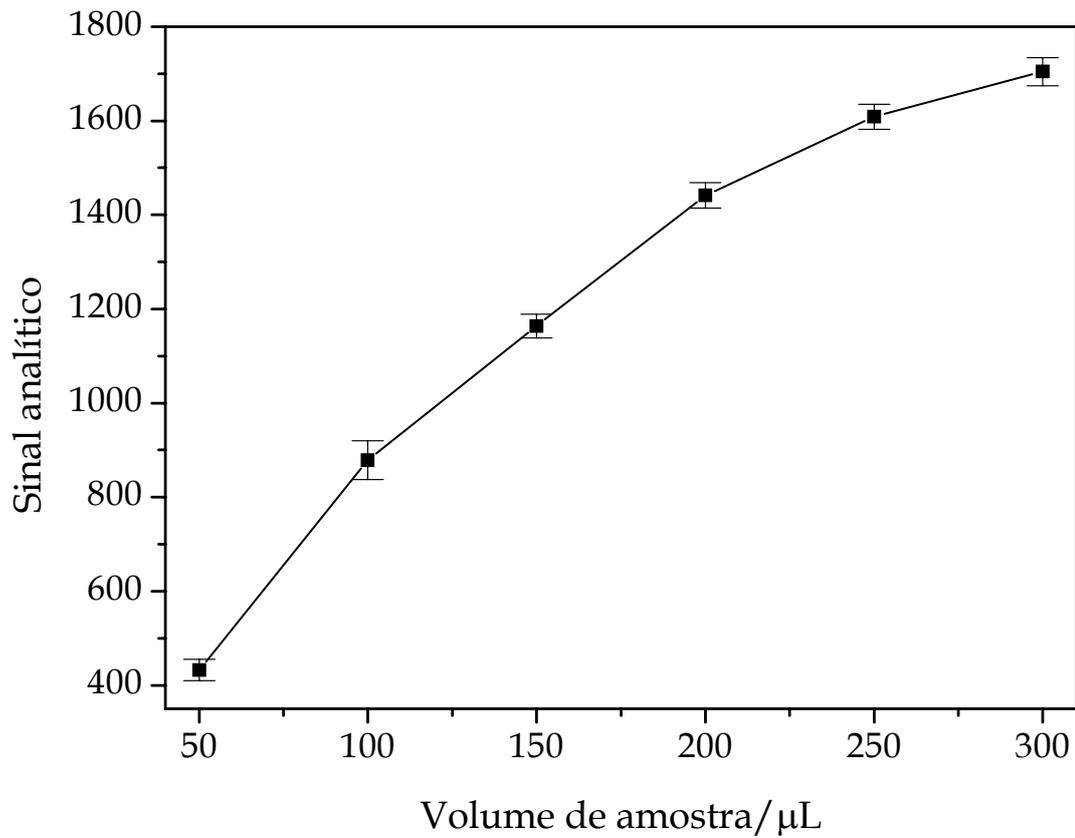


Figura 31 – Efeito do volume das alças de amostragem no sinal analítico para salbutamol. Reator de 40 cm, demais condições experimentais apresentadas na Figura 30

Avaliou-se a resposta para a quantificação de salbutamol no intervalo de concentrações entre 1×10^{-6} e $3,5 \times 10^{-5}$ mol/L. Os resultados são apresentados na Figura 32.

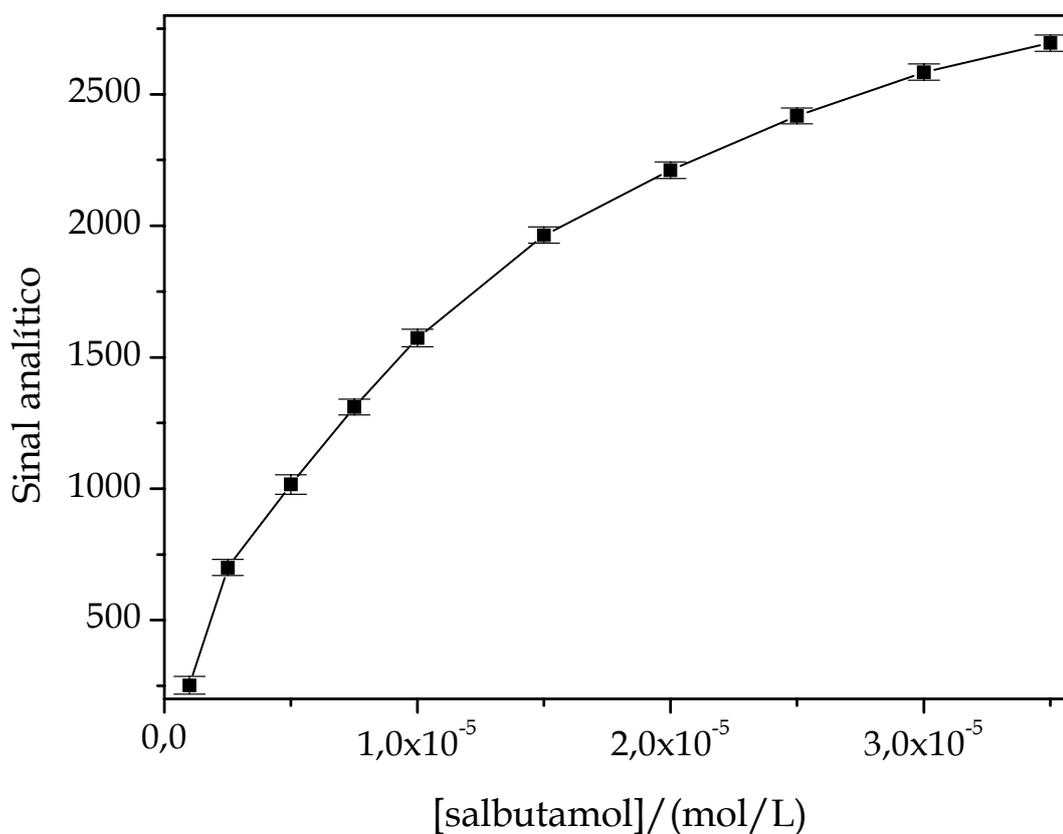


Figura 32 - Avaliação da resposta para determinação de salbutamol por quimiluminescência. Volume de amostra 300 μL ; $[\text{ClO}^-] = 5,5 \text{ mg/L}$; comprimento do reator = 5 cm

Conclui-se que existem duas faixas de resposta linear compreendidas entre $2,5 \times 10^{-6}$ e 1×10^{-5} mol/L, e entre $1,5 \times 10^{-5}$ e 3×10^{-5} mol/L, porém a primeira faixa de resposta linear proporciona maior sensibilidade, bem como um melhor coeficiente de correlação quando empregado o modelo de regressão linear para ajuste dos pontos. A curva de calibração (Figura 33) é representada pela equação $I = 421 + 1,17 \times 10^8 c$ ($r^2 = 0,998$), onde I é a intensidade de emissão e c é a concentração de salbutamol em mol/L.

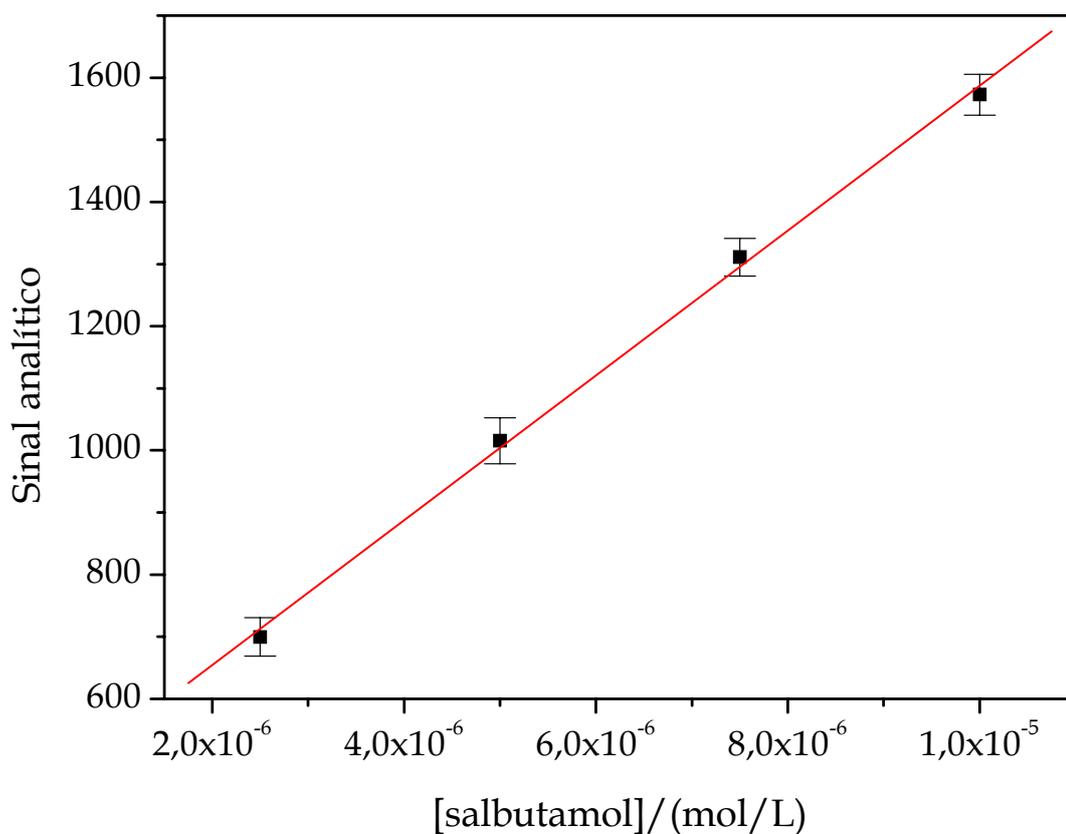


Figura 33 – Curva de calibração para determinação de salbutamol por quimiluminescência. Comprimento do reator 5 cm; volume de amostra 300 μ L; $[\text{ClO}^-] = 5,5 \text{ mg/L}$ ($1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$); demais condições experimentais empregadas foram otimizadas para a determinação de ClO^- (TABELA 3)

4.3.1. Análise das amostras

Para a determinação de salbutamol, as amostras foram diluídas considerando o valor rotulado ($6,9 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$), de modo que a concentração de salbutamol fosse $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 34.

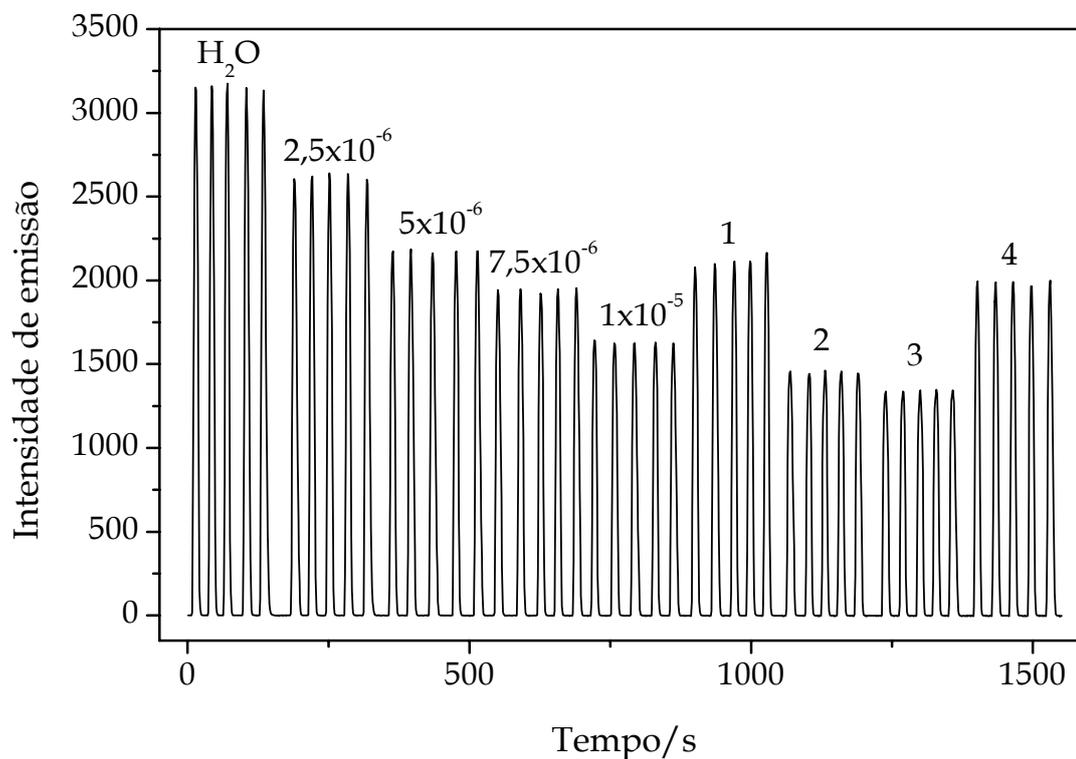


Figura 34 – Sinais transientes para a determinação de salbutamol por quimiluminescência. Os números 1 – 4 indicam as amostras e os demais indicam concentrações de salbutamol em mol/L. Condições experimentais apresentadas na legenda da Figura 33

Observa-se que a intensidade de emissão das amostras 2 e 3 foi inferior ao esperado. Acredita-se que estes resultados se devem ao fato de as amostras conterem corante em sua composição. Baseando-se nisto, foram obtidos espectros de absorção das amostras, apresentados na Figura 35.

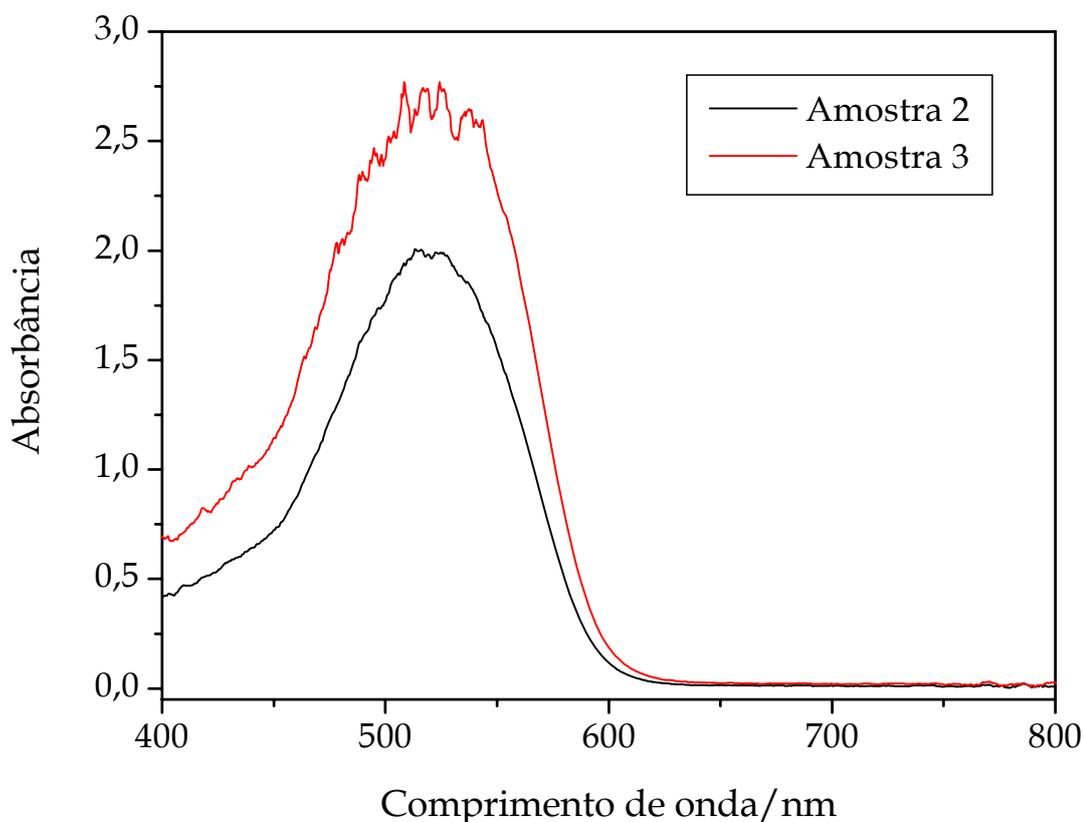


Figura 35 – Espectros de absorção das amostras 2 e 3 diluídas para a determinação de salbutamol, empregando cela de medida com caminho óptico de 100 cm

Conclui-se que há intensa absorção de radiação por ambas as soluções no comprimento de onda de medida (441 nm).

Realizou-se a análise das amostras 2 e 3 com uma diluição maior (1:230) para que o efeito de absorção da radiação emitida, pelo corante contido nas mesmas, fosse menos pronunciado. As amostras também foram analisadas pelo procedimento espectrofotométrico em fluxo, proposto por Dol & Knochen¹⁴, empregando os reagentes 4-aminoantipirina e hexacianoferrato(III) de potássio, e pelo procedimento proposto por Felix et al.¹⁵, empregando eletroforese capilar. Os resultados obtidos pelos 3 procedimentos e os valores rotulados são apresentados na TABELA 6.

TABELA 6 – Valores rotulados e resultados das análises das amostras de salbutamol por diferentes procedimentos

Amostra	Valor rotulado	Procedimento proposto	Espectrofotometria ¹⁴	Eletroforese capilar ¹⁵
1	0,4	0,41 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,48 ± 0,02
2	0,4	0,29 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,47 ± 0,04
3	0,4	0,46 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,56 ± 0,04
4	19,1	21,48 ± 0,32	10,25 ± 0,23	—

concentrações em mg/mL (amostras 1 - 3) ou mg/g (amostra 4)

Os resultados foram comparados por meio de *teste t (Student)*²⁷. Considerando as amostras 1 - 3, com 95% de confiança, não há diferença significativa entre os valores obtidos pelo procedimento proposto e: (i) os valores rotulados, (ii) os obtidos pelo procedimento espectrofotométrico¹⁴ e (iii) os obtidos por eletroforese capilar¹⁵. Também não há diferenças significativas entre os valores obtidos por eletroforese capilar¹⁵ e os valores rotulados. Entretanto, foram verificadas diferenças significativas a nível de confiança de 95% entre os valores rotulados e os obtidos pelo procedimento empregando 4-aminoantipirina¹⁴. Para a amostra 4 (comprimido), o resultado obtido pelo procedimento proposto é mais próximo do valor rotulado que o obtido pelo procedimento espectrofotométrico. Porém, existem diferenças significativas a nível de confiança de 95%.

5. Conclusões

O presente trabalho apresenta uma comparação crítica de uma cela de fluxo constituída por um guia de ondas de Teflon® AF-2400 para medidas de quimiluminescência. Celas de fluxo similares têm sido bastante empregadas para aumento de sensibilidade em espectrofotometria, porém o emprego para medidas de quimiluminescência é ainda incipiente. Nos trabalhos apresentados na literatura, o desempenho analítico é avaliado somente em função dos limites de detecção alcançados para sistemas-modelo.

Baseando-se nos resultados obtidos, pode-se concluir que o guia de ondas mostrou-se uma ferramenta bastante adequada para medidas de quimiluminescência em fluxo, pois proporcionou a melhoria dos limites de detecção em comparação a procedimentos utilizando detectores com sensibilidade similar. A geometria tubular da cela favorece o acoplamento a sistemas de análises em fluxo, desempenhando o papel de condutor de fluidos (contribuindo para mistura e reação) e cela de medida. Com o arranjo instrumental empregado, a faixa de resposta pode ser alterada modificando-se o tempo de integração. Outras características favoráveis incluem elevação da frequência de amostragem, redução do consumo de reagentes e da geração de efluentes. Porém, existe uma limitação da utilização do guia de ondas para medidas de quimiluminescência quando espécies absorventes estão presentes no meio, aspecto que se torna mais pronunciado devido à geometria da cela de medida. Desta forma, a concentração do substrato deve ser cuidadosamente avaliada, visando evitar perdas de linearidade por processos de auto-absorção.

Os procedimentos analíticos desenvolvidos apresentam características analíticas favoráveis, tais como elevada frequência de amostragem, precisão satisfatória e baixo consumo de reagentes e amostras. Resultados obtidos na determinação de hipoclorito em amostras de líquido de Dakin e de salbutamol em amostras de medicamentos foram concordantes com os obtidos em procedimentos de referência. A elevada sensibilidade dos procedimentos permite que sejam exploradas diluições a fim de minimizar efeitos de matriz.

6. Referências Bibliográficas

1. FERREIRA, E.C.; ROSSI, A.V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise, **Química Nova**, 25, p. 1003 - 1011, 2002.
2. LEITE, O.D.; FATIBELLO FILHO, O.; ROCHA, F.R.P. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência, **Química Nova**, 27, p. 337 - 341, 2004.
3. MESTRE, Y.F.; ZAMORA, L.L.; CALATAYUD, J.M. Flow-chemiluminescence: a growing modality of pharmaceutical analysis, **Luminescence**, 16, p. 213 - 235, 2001.
4. BORGES, E.P. **Desenvolvimento de instrumentos e procedimentos analíticos automáticos com detecção quimiluminescente e espectrofotométrica**, 120p. Tese de Doutorado, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.
5. REIS, B.F.; GINÉ, M.F.; KRONKA, A.M. A análise química por injeção em fluxo contínuo, **Química Nova**, 12, p. 82 - 91, 1989.
6. LEWIS, S.W.; PRICE, D.; WORSFOLD, P.J. Flow injection assays with chemiluminescence and bioluminescence detection - a review, **Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence**, 8, p. 183 - 199, 1993.
7. LI, J.; DASGUPTA, P.K. Chemiluminescence detection with a liquid core waveguide. Determination of ammonium with electrogenerated hypochlorite based on the luminol-hypochlorite reaction, **Analytica Chimica Acta**, 398, p. 33 - 39, 1999.
8. DALLAS, T.; DASGUPTA, P.K. Light at the end of the tunnel: recent analytical applications of liquid-core waveguides, **Trends in Analytical Chemistry**, 23, p. 385 - 392, 2004.
9. REIS, B.F. et al. Desenvolvimento de um dispositivo de baixo custo para medidas por quimiluminescência, **Química Nova**, 25, p. 1191 - 1193, 2002.

10. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.
11. MORAIS, I.P.A.; TÓTH, I.V.; RANGEL, A.O.S.S. An overview on flow methods for the chemiluminescence determination of phosphorus, *Talanta*, 66, p. 341 - 347, 2005.
12. COSTIN, J.W.; BARNETT, N.W.; LEWIS, S.W. Determination of proline in wine using flow injection analysis with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection, *Talanta*, 64, p. 894 - 898, 2004.
13. VOGEL, A. **Química Analítica Qualitativa**, 5. ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981. 665p.
14. DOL, I.; KNOCHEN, M. Flow-injection spectrophotometric determination of salbutamol with 4-aminoantipirine, *Talanta*, 64, p. 1233 - 1236, 2004.
15. FELIX, F.S. et al. Determination of salbutamol in syrups by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection (CE-C⁴D), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, p. 1288 - 1292, 2006.
16. DASGUPTA, P.K. et al. Luminescence Detection with a Liquid Core Waveguide, *Analytical Chemistry*, 71, p. 1400 - 1407, 1999.
17. SPOHN, U. et al. Photodiode-based chemiluminometric biosensors for hydrogen peroxide and L-lysine, *Biosensors and Bioelectronics*, 9, p. 543 - 549, 1994.
18. LIAWRUANGRATH, S. et al. Flow-injection determination of cinnarizine using surfactant-enhanced permanganate chemiluminescence, *Analytica Chimica Acta*, 499, p. 223 - 233, 2003.
19. COICHEV, N. et al. Flow-injection investigation of the chemiluminescent reaction of bis(2,4,6-(trichlorophenyl)oxalate) with free chlorine, *Analytica Chimica Acta*, 484, p. 101 - 109, 2003.

-
20. NAKAGAMA, T.; YAMADA, M.; HOBBO, T. Chemiluminescence sensor with uranine immobilized on an anion-exchange resin for monitoring free chlorine in tap water, *Analytica Chimica Acta*, 231, p. 7 - 12, 1990.
21. ZHANG, Z. et al. Chemiluminescence flow system for the determination of ammonium ion, *Talanta*, 48, p. 225 - 229, 1999.
22. QUINTINO, M.S.M. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas**, 112p. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
23. SADLER, N.P.; JACOBS, H. Application of the Folin-Ciocalteu reagent to the determination of salbutamol in pharmaceutical preparations, *Talanta*, 42, p. 1385 - 1388, 1995.
24. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução, RDC nº 73, de 13 de abr. de 2004. **Sulfato de salbutamol**. Brasília.
25. PÉCORRA, J.D. et al. Estudo sobre o shelf life da solução de Dakin, *Revista de Odontologia da USP*, 1, p. 3 - 7, 1987.
26. GUIMARÃES JUNIOR, J.; ADDE, C. A., Manual de biossegurança odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), 2006.
27. HARRIS, D. **Análise Química Quantitativa**, 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 782p.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)