

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA EM
FLUXOS AUTOMATIZADO PARA DETERMINAÇÃO
DE METAIS-TRAÇO EM MATRIZES AQUOSAS -
CÁDMIO COMO METAL TESTE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TIAGO FURLANETTO SOARES

GUARAPUAVA-PR
2011

TIAGO FURLANETTO SOARES

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA EM FLUXOS AUTOMATIZADO PARA
DETERMINAÇÃO DE METAIS-TRAÇO EM MATRIZES AQUOSAS – CÁDMIO
COMO METAL TESTE**

Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, área de concentração em Metodologias Analíticas e Aplicações, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Edgard Moreira Ganzarolli

Co-orientadora: Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia

GUARAPUAVA-PR
2011

TIAGO FURLANETTO SOARES

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA EM FLUXOS AUTOMATIZADO PARA
DETERMINAÇÃO DE METAIS-TRAÇO EM MATRIZES AQUOSAS – CÁDMIO
COMO METAL TESTE**

Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, área de concentração em Metodologias Analíticas e Aplicações, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2011;

Prof. Dr. Cláudio Celestino de Oliveira

Prof^a. Dr^a. Karin Cristiane Justin

Orientador: Prof. Dr. Edgard Moreira Ganzarolli

Co-orientadora: Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia

GUARAPUAVA-PR
2011

Dedico este trabalho à todos que me acompanharam durante sua realização e principalmente a minha família e especialmente a Angélica Camargo que é a melhor coisa que já me aconteceu.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela oportunidade de estar concretizando este trabalho.

Ao meu orientador e a quem eu considero uma grande amigo, Prof. Dr. Edgard Moreira Ganzarolli, pelos ensinamentos, intermináveis conversas e companheirismo.

Aos amigos e colegas aos quais fui agraciado com a companhia.

Aos meus pais pelo amor, carinho e ensinamentos, vocês são tudo pra mim.

A minha família pelo apoio e dedicação. E viva os Soares e viva os Furlanetto.

Aos meus padrinhos Artur e Airton de Oliveira Soares, os quais são grandes espelhos e com certeza serei muito honrado se um dia eu possuir a metade do bom coração que eles tem.

A Unicentro pela disponibilização dos meios necessários a conclusão deste trabalho.

E principalmente a quem tornou tudo isso possível, sempre me apoiando, incentivando e auxiliando nos melhores e piores momentos seja na vida profissional ou pessoal, a você Angélica Camargo muito obrigado por fazer parte da minha vida.

SUMÁRIO

Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Lista de Tabelas.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	2
2.1. Objetivos específicos.....	2
3. Referencial Teórico.....	3
3.1. Análise traços.....	3
3.2. Principais dificuldades encontradas nas análises de traços.....	3
3.3. Métodos analíticos utilizados para pré-concentração em análise de traços.....	4
3.3.1 Extração por solvente.....	4
3.3.2 Extração em fase sólida.....	4
3.3.3. Troca Iônica.....	6
3.4. Análise por injeção em fluxo.....	6
3.4.1. Configurações básicas do sistema.....	6
3.4.1.1. Sistema em linha.....	7
3.4.1.2. Sistema em confluência.....	8
3.4.1.3. Sistema com zonas coalescentes.....	8
3.4.2. Desempenho do sistema em fluxo.....	8
3.5. Aspectos relevantes sobre os metais.....	9
3.5.1. Cádmio.....	9
3.5.1.2. Toxicidade Cádmio.....	10
3.6. Espectroscopia por absorção atômica.....	10
4. Materiais e Métodos.....	12
4.1. Materiais.....	12
4.1.1. Preparação das amostras.....	12
4.1.2. Preparação da coluna adsorvente.....	12
4.1.3. Análise por Espectroscopia de Absorção Atômica.....	13
4.2. Métodos.....	14
4.2.1. Montagem do sistema de pré-concentração em fluxo.....	14
4.2.2. Programa de controle.....	15
4.2.3. Processo de pré-concentração.....	18
4.2.4. Procedimento de quantificação dos analitos.....	21
4.2.5. Sistema automático de injeção.....	21
5. Resultados e discussões.....	23
5.1. Método de injeção do volume coletado no espectrômetro de absorção atômica.....	23
5.2. Curva de eluição.....	24
5.3. Volume coletado.....	25

5.4. Vazões de amostra e eluição.....	27
5.5. Volume e concentração do complexante verde de bromocresol.....	27
5.6. Variação do volume de amostra injetado.....	29
5.7. Pré-concentração sem a utilização de complexante.....	31
5.8. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	32
5.9. Fator de enriquecimento.....	32
5.10. Determinação do pH ótimo de complexação dos íons Cd^{2+}	35
5.11. Determinação do fator de enriquecimento em pH 5.....	37
7. Conclusões.....	39
8. Referências Bibliográficas.....	40
Anexos.....	44

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABS	Absorbância
BS1	Bomba de Seringa simples
BS2	Bomba de Seringa dupla
Cd ²⁺	Cádmio II
CdS	Sulfeto de Cádmio
D	Desligada
FAAS	Espectrofotômetro de absorção atômica
FE	Fator de enriquecimento
FIA	Sistema de Injeção em Fluxo
Inj	Injeção
L	Ligado
LABGATI	Laboratório do Grupo de Análises de Traços e Instrumentação
LD	Limite de detecção
mg	Miligrama
mg. L ⁻¹	Miligrama / litro
mL	Mililitro
m/v	Massa / Volume
Pb	Chumbo
Sd	Desvio padrão
Suc	Sucção
V1-V6	Válvulas Solenóides
VC	Volume Coletado
VFE	Volume Frontal de Eluição
VPE	Volume Posterior de Eluição
v/v	Volume / Volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de um espectrômetro de absorção atômica.....	11
Figura 2. Representação da estrutura molecular do Amberlite XAD-16.....	13
Figura 3. Sistema de fluxos.....	14
Figura 4. “MENU” Visualizado pelo usuario.....	16
Figura 5. Adsorção do agente complexante.....	18
Figura 6. Complexação do íon metálico.	19
Figura 7. Eluição do íon metálico.....	20
Figura 8. Gráfico demonstrativo das frações do eluato: volume frontal de eluição (VFE), volume coletado (VC) e volume posterior de eluição (VPE)	20
Figura 9. Sistema injeção de amostra para quantificação.....	22
Figura 10. Gráfico variação VFE (Volume Frontal de Eluição).....	25
Figura 11. Gráfico variação volume coletado de eluição (VC).....	26
Figura 12. Formula estrutural do Verde de Bromocresol	27
Figura 13. Variação volume verde bromocresol 0,01% m/v.....	28
Figura 14. Variação da concentração verde bromocresol para 2 mL.....	29
Figura 15. Variação volume de amostra injetado.....	30
Figura 16. Saturação da coluna com 19 mg XAD-16.....	31
Figura 17. Fator de enriquecimento da primeira faixa de eluição.....	33
Figura 18. Fator de enriquecimento da segunda faixa de eluição.....	34
Figura 19. pH ótimo para complexação íon Cd ²⁺	35
Figura 20. Equilíbrio ácido-base Verde de Bromocresol	36
Figura 21. Volume frontal de eluição para pH 5.....	36
Figura 22. Fator de enriquecimento para pH 5	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificações da bomba de dois canais conforme manual.....	15
Tabela 2. Combinação de acionamento/desativação das bombas e válvulas para as principais etapas operacionais do sistema de fluxos.....	21
Tabela 3. Teste de avaliação do melhor método para realização de medidas.....	24

RESUMO

Tiago Furlanetto Soares. Desenvolvimento de um Sistema em Fluxos Automatizado para Determinação de Metais-traço em Matrizes Aquosas – Cádmiu como metal teste

Este trabalho apresenta a proposta de um sistema em fluxos automatizado para enriquecimento de amostras aquosas baseado na extração sólido-líquido. Duas bombas de seringa, impulsionam soluções de amostra, agente complexante (verde de bromocresol 0,01% m/v) e eluente (etanol 95 % v/v) através do sistema de fluxos, contendo basicamente seis válvulas solenóides de três vias (Cole-Parmer - USA), uma minicoluna empacotada com Amberlite XAD16 e um minifunil de amostragem. As seringas e as válvulas foram controladas a partir de um PC-AT386 contendo uma interface paralela (ACL 8111-Adlink) e uma interface serial RS232C. Também foi usada uma interface baseada no CI ULN2803A (SGS-Thomson Microelectronics). O sistema foi otimizado usando-se Cd^{2+} como metal teste, porém poderá ser empregado para qualquer íon metálico após definição dos parâmetros químicos como: tipo de metal, agente complexante, suporte sólido e eluente. A detecção foi realizada *off-line* por espectrometria de absorção atômica em chama. Para 10 mL de padrões de Cd^{2+} na faixa de 50 - 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 200 μL de eluato, obteve-se um fator de enriquecimento de 10,6 vezes com limite de detecção de 15 mgL^{-1} e velocidade analítica de 5 determinações /hora.

Palavras Chave: Pré-concentração, análise em fluxo, Automação Analítica

ABSTRACT

Tiago Furlanetto Soares. Development of a Automatic Flow System for Determination of trace metal in aqueous Matrices – Cadmium as a metal test

This work presents a automatic flow system for enrichment of aqueous samples based in solid-liquid extraction. Two syringe pumps, driven solutions of samples, complexation agent (bromocresol green 0.01%), eluent (ethanol), through a flow system, basicly formed by six three way solenoid valves (Cole-Parmer-USA), one mini-column loaded with Amberlite XAD16 and a sampler mini-funeel. The syringes and valves were controled from a PC - AT386 with a paralel interface (ACL 8111-Adlink) and a serial (RS232C) interface. Also was employed a interface based in IC ULN2803A (SGS-Thomson Microelectronics). The system was optimized for Cd²⁺ like test metal, however the proposed system may to be used for any metallic ion after definition of chemical parameter, as like: kind of metal, complexation agent, solid suport and eluent. The detection was performed off-line by flame atomic absorptiom spectrometry. For 10 mL of Cd²⁺ standards in 50 to 500µg L⁻¹ range and 200 µL of eluate was obtained a enrichment factor of 10.6 with a detection limit of 15 µgL⁻¹ and analytical frequency of five determinations/hour.

Key words: preconcentration, flow analysis, analytical automation

1. INTRODUÇÃO

A presença cada vez maior de metais tóxicos no meio ambiente, tem se tornado um transtorno para toda a sociedade moderna. Por outro lado, a quantificação destes metais pode ser problemática nos casos onde suas concentrações são muito baixas, visto que, isto exige equipamentos muito sensíveis e caros. Equipamentos usualmente disponíveis para quantificação de metais, como por exemplo, espectrômetros de absorção atômica em chama, não possuem sensibilidade suficiente para determinações em nível de traços [1].

A determinação quantitativa de metais-traço em amostras reais normalmente não é satisfatoriamente conduzida sem as etapas iniciais de separação e/ou pré-concentração, mesmo quando são aplicados métodos sensíveis. A complexidade das matrizes analisadas leva à necessidade da inserção dessas etapas no processo analítico, que aumentam a concentração da espécie de interesse e eliminam interferências contidas na amostra, tornando-a mais facilmente analisável [2, 3].

Para contornar este problema, pode-se recorrer a métodos de enriquecimento da amostra, com o objetivo de reduzir os limites de detecção/quantificação. Contudo, as metodologias para pré-concentração em batelada, como extração líquido-líquido ou sólido-líquido, geralmente são demoradas, além de apresentarem um elevado consumo de reagentes. Para redução de tempo e consumo de reagentes tem-se o sistema de análise por injeção em fluxo (FIA), proposta por Ruzicka e colaboradores em 1975 [4]. Esta metodologia apresenta várias vantagens em relação aos métodos tradicionais de batelada, tais como: reduzido consumo de reagentes, maior velocidade analítica, melhoria na precisão/exatidão das determinações e também uma redução no risco de contaminações [5]. Sistemas FIA controlados via computador, apresentam a vantagem adicional do controle automático do processo a partir de programas computacionais [5,6].

Com relação aos metais tóxicos, merece destaque o cádmio (Cd), pelo fato de apresentar alta toxicidade em baixas concentrações e elevada disseminação ambiental, além disto, não possuir qualquer função nutricional ao organismo humano. É um metal com efeito acumulativo no organismo, podendo causar diversos tipos de enfermidades [7].

Através destas informações e sabendo das necessidades da sociedade por novos e melhores produtos e bens de consumo, cada dia mais torna-se necessário o aperfeiçoamento e desenvolvimento de procedimentos analíticos mais eficientes para determinação e quantificação de elementos em concentrações cada vez mais baixas.

2. OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de um sistema automatizado para pré-concentração de metais-traço.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

2.1.1. Desenvolvimento da parte mecânica e programa de controle (*software*);

2.1.2. Determinação de metais-traço, usando cádmio como metal teste, em concentrações situadas abaixo dos limites de detecção do espectrômetro de absorção atômica em chama;

2.1.3. Definição e avaliação de desempenho das diversas variáveis mecânicas envolvidas no sistema de fluxos, tais como: diâmetros internos e comprimentos dos tubos condutores de soluções, vazões das soluções (amostra, complexante e eluente), quantidade de adsorvente sólido contido na minicoluna, entre outros;

2.1.4. Definição e avaliação de desempenho das diversas variáveis químicas envolvidas, tais como: pH das soluções, limites de saturação do adsorvente sólido com complexante e/ou amostra, entre outras.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Análise de traços

O termo análise de traços tem sido cada dia mais utilizado em Química Analítica para descrever determinados procedimentos analíticos nos quais a quantidade da substância a ser medida (analito) encontra-se em concentrações muito baixas. Sendo que atualmente a IUPAC recomenda que este termo seja empregado para determinações na qual a concentração do analito não ultrapasse $100 \mu\text{g g}^{-1}$, o que devido aos crescentes avanços nos processos de automação analítica e desenvolvimento de novos equipamentos para quantificação de micro quantidades se tornou perfeitamente possível [8-10].

Este tipo de análise tem se tornado cada dia mais importante, devido à possibilidade de quantificar analitos na ordem de partes por bilhão ou menos. A presença cada vez maior de inúmeras substâncias tóxicas que mesmo em baixas concentrações apresentam risco ao meio ambiente é um dos fatores que justifica esta busca por métodos mais sensíveis.

3.2. Principais dificuldades encontradas nas análises de traços

De um modo geral, são inúmeras as dificuldades em conduzir uma análise de traços que ofereça resultados confiáveis. Estas análises são atividades extremamente exigentes no que diz respeito ao conhecimento do sistema, requerendo portanto habilidade e experiência do analista [11].

Os principais problemas encontrados em uma análise de traços podem ser resumidos como segue:

- (a) a concentração do analito a ser determinado é muito mais baixa que os demais componentes da matriz;
- (b) contaminação proveniente de reagentes, aparatos ou ambiente laboratorial;
- (c) perdas do analito por adsorção, degradação, ou durante operações analíticas;
- (d) interferência dos componentes da matriz com o sistema de determinação usado, podendo conduzir a falsos valores;
- (e) dificuldade em conferir confiabilidade ao método devido à relativamente baixa disponibilidade de materiais de referência [8-11].

3.3 Métodos analíticos utilizados para pré-concentração em análise de traços

Para contornar alguns problemas e tornar as determinações de metais em baixas concentrações mais eficiente, existem diversas técnicas para enriquecer amostras, tais como:

3.3.1. Extração por solvente

Esta técnica fundamenta-se na distribuição do analito entre dois solventes imiscíveis, ou seja, é a transferência de íons específicos de uma solução aquosa pouco concentrada até outra mais concentrada por meio de uma solução orgânica. Nos procedimentos que empregam a extração líquido-líquido, as duas fases distintas do sistema, determinadas pelos solventes, devem ser mantidas em contato íntimo para permitir que ocorra uma transferência quantitativa do material. Vale destacar que em processos de extração, as duas fases têm normalmente densidades diferentes. O procedimento de extração de metais requer preferencialmente a formação de complexos neutros [12].

3.3.2. Extração em fase sólida (EFS)

Na EFS o extrator é um sólido que tem uma grande massa superficial disponível para interação com a amostra na solução. As partículas sólidas são usualmente empacotadas em uma coluna e a amostra aquosa é passada através dela.

A técnica é baseada na adsorção do analito num adsorvente. Os analitos são “presos” no adsorvente, enquanto íons com pouca ou nenhuma afinidade pela fase passam através dela. Posteriormente o analito é removido e eluído com um volume de solvente adequado, resultando em concentração e purificação dos constituintes da amostra. [13]

A retenção do analito na fase sólida pode ocorrer pela interação direta da espécie com a fase sólida, pela retenção do produto da reação entre o analito e um reagente, ou pela retenção do analito por um reagente previamente imobilizado no suporte sólido. A aplicação de uma dessas estratégias dependerá da espécie química a ser analisada, do suporte sólido e da reação envolvida [14]

A rápida extração do soluto da amostra depende do equilíbrio entre a solução amostra e o extrator. Este equilíbrio é deslocado mais fortemente para o sólido à medida que a área superficial se torna maior. A área superficial maior que $100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ é geralmente necessária para extração efetiva. As partículas mais utilizadas atualmente têm área superficial entre 200

e $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ [15].

Para o bom desenvolvimento da EFS dois requisitos são de fundamental importância:

- 1- Um percentual elevado e reproduzível do analito deve ser retido no adsorvente;
- 2- O analito deve ser facilmente e completamente eluído do adsorvente.

Os passos envolvidos no processo de extração em fase sólida são:

Condicionamento – O objetivo desta etapa é ativar a fase sólida a fim de promover melhor interação entre a fase sólida e os analitos de forma que forneça um sistema reproduzível. Isto pode ser feito utilizando um solvente apropriado.

Sorção – Promove-se o contato da amostra com a fase sólida resultando na extração do analito presente na amostra.

Lavagem – Quando necessário, a fase sólida deve ser lavada com um solvente apropriado capaz de remover as espécies químicas indesejáveis, sem a dessorção dos analitos.

Eluição - Nesta etapa utiliza-se um solvente ou mistura capaz de extrair os analitos da fase sólida.

A extração pode ser feita no modo batelada no qual o sólido extrator é colocado em contato com a amostra e o sistema é mantido sob agitação até que o equilíbrio entre as fases seja atingido. Em seguida, as fases são separadas por filtração, decantação ou centrifugação [15,16].

Um outro modo é a extração em fluxo na qual a amostra passa por um tubo pequeno empacotado com uma fase sólida, pré-condicionada, em seguida passa-se um determinado solvente para eluição das espécies de interesse. A amostra é passada pela coluna por meio de sucção, força gravitacional ou por uma bomba peristáltica [17,18].

Nestes procedimentos, a fase sólida é usualmente empacotada em uma micro-coluna através da qual a amostra é bombeada. Ao passar pela resina o elemento de interesse é retido e, conseqüentemente, pré-concentrado. Se as condições operacionais forem satisfatoriamente escolhidas, podem ser empregadas colunas para pré-concentrar a maioria dos metais [17,18].

Os procedimentos de pré-concentração em fase sólida também podem envolver a troca iônica e a adsorção.

3.3.3. Troca iônica

As resinas de troca têm um importante papel nas determinações de compostos em níveis traços, são basicamente polímeros orgânicos contendo grupos funcionais quimicamente reativos. Os íons trocados saem em três principais categorias: cátion, ânion e trocadores quelantes. Os copolímeros de estirenodivinilbenzeno contendo grupos sulfônico ($-\text{SO}_3^-\text{H}^+$) tais como as resinas catiônicas Amberlite IR-120 e Dowex-50, ou grupos de amônio quaternário ($-\text{NR}_3^+\text{OH}^-$), como as resinas aniônicas Dowex-1 e Amberlite IRA-400 têm sido amplamente empregados em análise de traços. As resinas quelantes de troca iônica são bastante utilizadas quando existe uma elevada razão entre íons de metais alcalinos e o analito [19-23].

3.4. Análise por injeção em fluxo

Proposta inicialmente por Ruzicka e Hansen em 1975 a técnica está baseada na injeção de um volume definido da amostra em um fluxo contínuo de uma solução carregadora, que é transportada através do percurso analítico. Durante o processo, a amostra sofre dispersão na solução transportadora, produzindo uma *zona de amostra* definida pela existência de gradientes de concentração que produzem durante a detecção um sinal transiente, onde a altura pode ser relacionada à concentração inicial da espécie de interesse. Eventualmente, processos químicos e físicos podem ocorrer durante o transporte da zona de amostra em direção ao sistema de detecção [5, 24].

3.4.1. Configurações básicas do sistema

Os sistemas FIA são constituídos basicamente por uma unidade propulsora de fluídos, de inserção da amostra, de reação/mistura e de detecção. Que também podem ser controladas por um sistema gerenciador e de aquisição de dados, a qual pode estar acoplada a uma unidade de processamento.

A unidade propulsora na maior parte dos sistemas é constituída de uma bomba peristáltica. Outras formas de propulsão incluem as bombas tipo seringa de pistão, através de pressão por gases e mesmo por gravidade. Sua função é movimentar constante e uniformemente os reagentes, amostras e fluidos carregadores. Caso se utilize como unidade de propulsão uma bomba peristáltica, a escolha dos tubos de bombeamento é muito importante. Diferentes materiais para os tubos são oferecidos, dependendo do tipo de

solvente e concentração das soluções. Tubos de Tygon são adequados para soluções aquosas ácidas ou alcalinas diluídas [24-26].

O injetor é constituído por três peças de acrílico, sendo duas fixas e uma central móvel, que por meio de movimentos para frente e para trás, ou vice-versa, o injetor coleta a amostra e a insere no percurso analítico.

O percurso analítico é a unidade do sistema FIA onde ocorrem as etapas de reação e/ou mistura. O dimensionamento do percurso deve se levar em conta, o tempo de residência da amostra e, portanto, as vazões do transportador e dos reagentes, que estão intimamente ligados à frequência de amostragem. O aumento do percurso analítico implica na diminuição do sinal analítico, o que ocorre devido ao processo de dispersão da zona da amostra. O processo de dispersão da amostra, intrínseco aos sistemas de análise por injeção em fluxo, é dependente das características físico-químicas das soluções (*e.g.* viscosidade), bem como das dimensões dos componentes do sistema [26,27]

Usualmente, as medidas são efetuadas com esses parâmetros mantidos constantes, permitindo a obtenção de resultados caracterizados por alta repetibilidade. As vazões, volumes do percurso analítico e da amostra devem ser definidos considerando-se a dispersão e o tempo de residência necessário para a ocorrência das reações químicas [24-27].

A unidade de detecção deve possuir baixa histerese, alta repetibilidade e reprodutibilidade dos sinais. De acordo com a espécie a ser quantificada, tem sido empregadas, praticamente, todas as técnicas usuais em química analítica: espectrofotometria de ultravioleta-vísivel, absorção e emissão atômica, potenciometria, amperometria, entre outros [28].

As técnicas analíticas baseadas em fluxo podem ser classificadas em uma das quatro categorias: segmentação por ar, fluxo contínuo não-segmentado, análise por injeção em fluxo e análise por injeção sequencial [29]. Sistemas de análises em fluxo devem ser caracterizados pela indicação do tipo de fluxo (segmentado, não-segmentado), pela forma como a amostra (-teste) é introduzida (aspiração, injeção) e, no caso de injeção ser utilizada, se a amostra ou o reagente é injetado. Para métodos em fluxo segmentado, esclarecimento adicional deve ser fornecido quando o segmentador não for a ar. [30]

A seguir veremos os métodos e configurações usualmente utilizadas:

3.4.1.1. Sistema em Linha

O fluido carregador, é em geral, uma solução quimicamente inerte, cuja função

principal é transportar a amostra injetada até a unidade de detecção, promovendo dispersão controlada da amostra e posteriormente lavando o percurso analítico.

Eventualmente, o fluido carregador pode ser uma solução reagente, o qual reage com a amostra devido ao fenômeno de dispersão. Entretanto, nessa situação o reagente não é idealmente utilizado.[24-27].

3.4.1.2. Sistema em Confluência

Nos sistemas por confluência a amostra é injetada em um fluido carregador quimicamente inerte, o qual apresenta características matriciais semelhantes à amostra. A adição de reagentes ocorre via pontos de confluência. As limitações dos sistemas em linha única foram resolvidas, adotando-se a adição do reagente por confluência. O reagente adicionado por confluência, logo após o injetor, permite que cada fração da amostra receba a mesma quantidade de reagente.

A partir da confluência somam-se as vazões do carregador e do reagente, então a amostra é distribuída em um espaço maior que o ocupado anteriormente, o que corresponde a uma diluição. Neste caso, a amostra ocupa uma maior fração do percurso analítico, o que é equivalente ao emprego de uma alça de amostragem mais longa, e isso aumenta a dispersão. É conveniente que se conheça em que extensão a vazão confluyente afeta a magnitude da medida.[26]

3.4.1.3. Sistema com Zonas Coalescentes

Nestes sistemas, tanto a amostra como o reagente são introduzidos simultaneamente, com sua interação ocorrendo por um ponto de confluência dos respectivos fluidos carregadores [26].

O emprego de zonas coalescentes leva a uma economia significativa de reagentes, em comparação com os sistemas em linha única e por confluência, uma vez que o reagente somente é consumido em presença da amostra, sendo recuperado durante a lavagem do percurso analítico pelos fluidos carregadores.[5,24]

3.4.2 Desempenho do sistema em fluxo

A análise por injeção em fluxo é uma metodologia que permite automatizar a

manipulação de soluções, visando economizar tempo, minimizar o consumo de reagentes e amostras, diminuir ou eliminar contaminação da amostra e/ou analista durante a operação, minimizar a instabilidade de produtos e/ou reagentes, aumentar a precisão e diminuir o custo operacional. Além disso, é caracterizada por alta simplicidade, versatilidade e pode ser implementada com instrumentação de baixo custo em qualquer laboratório analítico [5,24]

Partindo destas informações o presente projeto foi baseado em trabalho anterior no qual foram utilizadas duas bombas de seringa (*laboratory made*), com acionamento independente, para executar todas as etapas do processo de pré-concentração e eluição do íon metálico [31].

3.5 Aspectos relevantes sobre os metais

Os metais apresentam um importante papel no sistema biológico dos seres vivos. Muitos destes elementos são indispensáveis e essenciais para a vida em concentrações em nível de traço, mas podem se tornar tóxicos em altas concentrações. Alguns metais não são essenciais e em baixas concentrações já apresentam alta toxicidade. Devido a este fato, o monitoramento destes elementos, em diversos tipos de amostras, tem despertado grande interesse em química analítica [32].

Um dos fatores importantes que distingue metais de outros poluentes é que eles não são biodegradáveis, e seu potencial de toxicidade depende de sua forma química. Com a crescente atividade industrial, grandes quantidades de metais que se apresentavam em suas formas inertes na natureza têm sido mobilizadas para a biosfera, causando a contaminação de diversos ecossistemas [33].

3.5.1 Cádmio

O cádmio é um metal de transição, quase sempre bivalente em todos os seus compostos estáveis, sendo que o mais comum é o sulfeto de cádmio (CdS), entretanto é raro e sem importância comercial. Geralmente, este metal é encontrado com zinco na calamina e na blenda de zinco (ZnS). O cádmio como contaminante, pode ser encontrado nos animais e vegetais, nos alimentos e na atmosfera de centros industrializados. Sua concentração na água, solo, ar e alimentos varia dependendo dos depósitos naturais e poluição ambiental [34-35].

3.5.1.2. Toxicidade do Cádmio

Este metal é extremamente tóxico apresentando risco a saúde se a exposição é superior a $5 \mu\text{gL}^{-1}$, pois a esta concentração, provoca interferência na fosforização oxidativa e em concentrações ainda maiores causa a inibição completa da respiração mitocondrial dos macrófagos alveolares. Vários experimentos identificam o cádmio como um inibidor do sistema enzimático a nível hepático e o íon Cd^{+2} tem capacidade de deslocar metais metaloenzimáticos retirando este de suas funções específicas. Ele permanece no organismo por longo tempo e pode se acumular depois de anos de baixa exposição, pois possui lenta excreção pelo organismo humano. Este metal possui uma vida biológica de aproximadamente 10 a 30 anos, causando assim, grandes riscos à saúde, sendo também considerado carcinogênico. O cádmio entra na corrente sanguínea por absorção no estômago ou nos intestinos logo após a ingestão do alimento ou da água, ou por absorção nos pulmões após a inalação. Uma quantidade muito pequena de cádmio é absorvida pela sendo que o sangue absorve pelo aproximadamente 1 a 5% do cádmio quando este é ingerido por via oral, entretanto quando o cádmio é inalado absorção do mesmo chega a ser 30 a 50% . Uma vez absorvido, o cádmio é transportado pela corrente sanguínea até o fígado, onde se une as proteínas de baixo peso molecular. Pequenas quantidades desse complexo proteína - cádmio passam continuamente do fígado para a corrente sanguínea, para ser transportado até os rins e filtrado através dos glomérulos, para posteriormente ser reabsorvido e armazenado nas células tubulares dos rins. Este último órgão excreta de 1 a 2% do cádmio obtido diretamente das fontes ambientais. A concentração do metal nos rins é aproximadamente 10 mil vezes mais alta que a da corrente sanguínea. A excreção fecal do metal representa uma mínima quantidade do cádmio não absorvido no sistema gastrontestinal. [34, 35].

3.6. Espectroscopia por absorção atômica

Essa técnica de análise instrumental para determinação de metais foi proposta no início de 1955 por Walsh. A técnica de FAAS é uma importante ferramenta para a química analítica, pois possibilita determinações em concentrações na ordem de mg L^{-1} com elevada seletividade. A técnica baseia-se na quantidade de radiação absorvida pelos átomos neutros no estado fundamental do elemento de interesse, os quais são produzidos na chama, ou outro tipo de atomizador. Uma vez atomizado, os átomos no estado fundamental absorvem energia radiante em comprimentos de onda bem característicos de cada elemento. Então se a radiação no comprimento de onda de ressonância passa pela chama que contenha átomos no

estado gasoso, parte desta radiação é absorvida, sendo esta parte, proporcional à quantidade de átomos presentes [36, 37].

A figura 1 mostra o esquema da técnica de espectroscopia de absorção atômica.

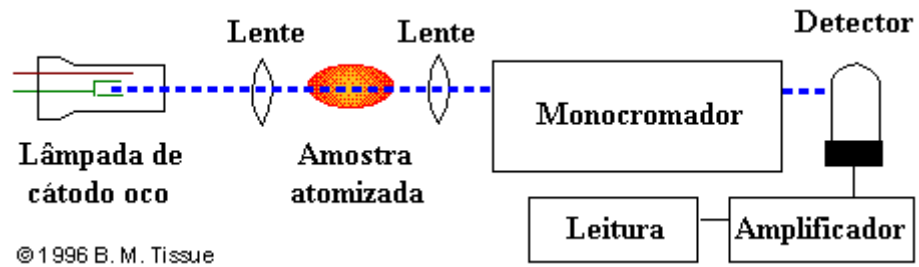


Figura 1. Esquema de um espectrômetro de absorção atômica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Para implementação do sistema de fluxos microcontrolado foi utilizada a combinação dos equipamentos e acessórios disponíveis no Laboratório do Grupo de Análise de Traços e Instrumentação (LABGATI). Entre estes, merecem destaque os seguintes: Microcomputador AT386 equipado com a placa conversora ACL8111; uma bomba de seringa com duplo canal (BS2) (Cole-Parmer instruments-USA) controlada via interface serial RS232C; uma bomba de seringa monocanal (BS1) (*laboratory made*) controlada a partir da interface paralela da placa conversora ACL8111, 6 válvulas solenóides de três vias microcontroladas (Cole Parmer instruments-USA); interface de acionamento para as válvulas e motor de passo da BS1 baseada no circuito integrado ULN 2803A . Além destes, foram utilizados alguns acessórios, tais como: sensores de posição recuperados de "mouses" danificados, mini-coluna confeccionada com ponteira de micropipeta, confluência de 4 vias confeccionada em Teflon, mini-funil de amostragem confeccionado com ponteira de micropipeta e tubos de polietileno com diâmetros internos variados.

4.1.1. Preparação das amostras

As amostras sintéticas foram preparadas partindo-se de uma solução estoque de 1000 mg L⁻¹ Cd²⁺ Biotec, utilizando-se micropipetas de 10 a 100 µL LABMATT e balões volumétricos de 50 mL VITREX, completando-se o volume com água deionizada (18.2 MΩ cm) obtida por sistema Human UP 900.

Todas as vidrarias foram estocadas em solução de ácido nítrico 10% por 24 horas. Após esse período foram lavadas com água deionizada.

4.1.2. Preparação da coluna adsorvente

Na preparação da mini-coluna utilizou-se uma ponteira de micropipeta de 1 mL, tubos de tygon de diversos diâmetros e Amberlite XAD-16 [38], uma resina não iônica, macro porosa com área de contato igual à 800 m²g⁻¹ devido a disposição de contínuas fases poliméricas e porosas conforme observado na figura 2.

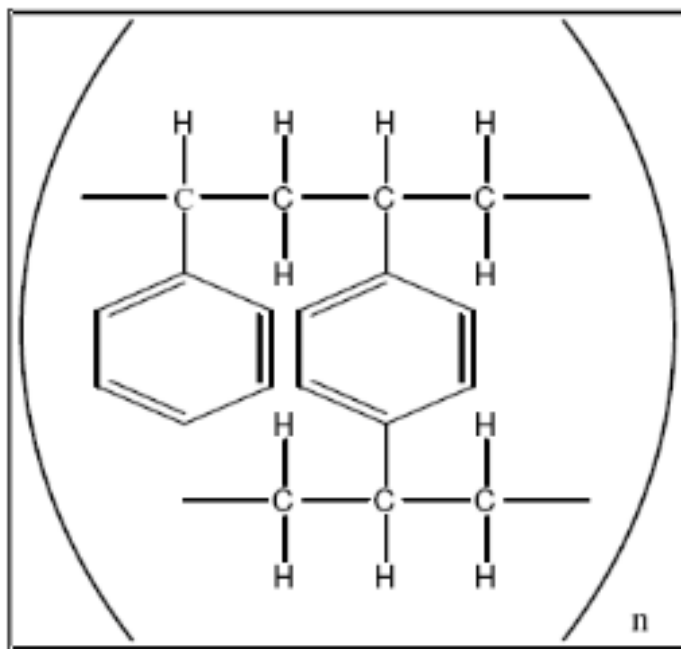


Figura 2. Representação da estrutura molecular do Amberlite XAD-16

Inicialmente cortou-se a ponteira ate obtenção das dimensões necessárias ao sistema, sendo a mesma devidamente pesada.

O procedimento de empacotamento da resina foi efetuado em um béquer de 1 L contendo água deionizada (18.2 MΩ cm) obtida por sistema Human UP 900. Logo após a mesma foi seca em temperatura ambiente e novamente pesada, sendo que a massa de XAD-16 encontrada foi de 46 mg.

Para evitar vazamentos a mini-coluna foi vedada com tubos de tygon e uma resina inerte de modo que os tubos de polietileno se encaixassem perfeitamente sem causar entupimento e permitindo vazões maiores ao sistema.

4.1.3. Análise por Espectroscopia de Absorção Atômica

Na determinação de íon Cádmio utilizou-se um espectrômetro de absorção atômica Varian AA-220, equipado com lâmpada de catodo oco de deutério como corretor de fundo. A chama utilizada foi ar-acetileno. Foi utilizado acetileno grau absorção atômica (White Martins, São Paulo, Brasil).

Todas as vidrarias foram estocadas em solução de ácido nítrico 10% por uma noite. Após esse período foram lavadas com água deionizada. Os solventes utilizados foram de

grau analítico. Soluções estoque foram preparadas a partir de concentrações $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$.

4.2. Métodos

4.2.1. Montagem do sistema de pré-concentração em fluxo

A figura 3 apresenta um esquema geral do sistema de fluxos proposto, constituído basicamente por: uma bomba de seringa mono-canal (*laboratory made*), acionada por um motor de passos via porta digital da interface ACL8111 (Adlink); uma bomba de seringa duplo canal (*cole-parmer*) acionada a partir da interface serial RS232C; seis válvulas solenoides de três vias, também acionadas via porta digital da interface ACL 8111(*cole-parmer*); uma mini-coluna contendo o suporte sólido confeccionada a partir de ponteira de micropipeta; um mini-funil de amostragem também confeccionado a partir de ponteira de micropipeta; outros acessórios como tubos de polietileno, confluência de Teflon e conexões feitas com tubos de Tygon.

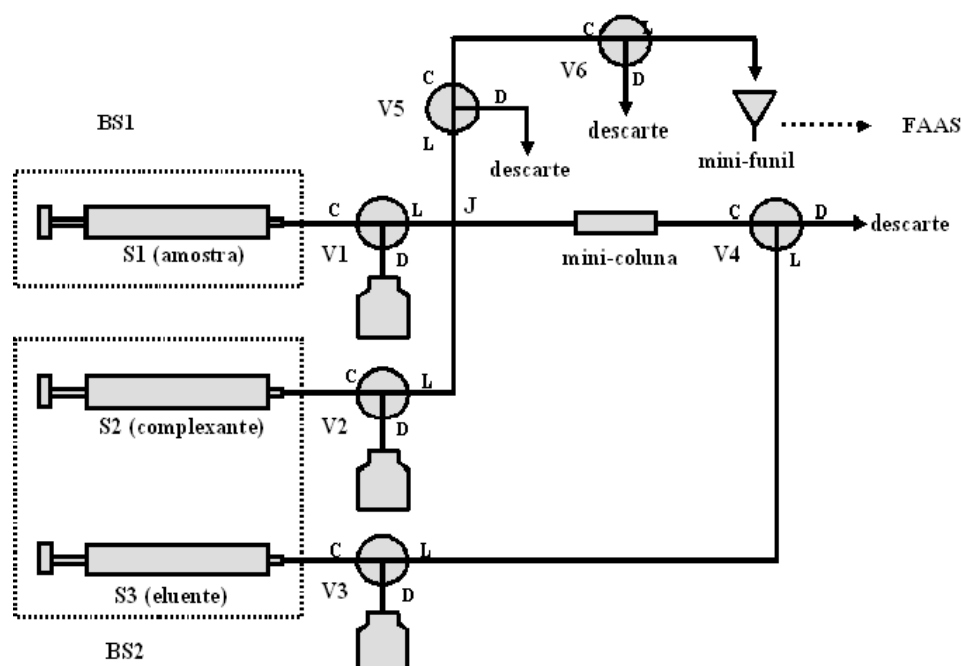


Figura 3. Sistema de fluxos. Sendo: V1-V6 = válvulas solenóides de três vias, C= canal comum; D = canal desligado; L = canal ligado; J = confluência de Teflon; FAAS = espectrometria de absorção atômica em chama; S1, S2 e S3 = seringas; BS1 = bomba de seringa de um canal e BS2 = bomba de seringa de 2 canais.

Uma interface de acionamento baseada no circuito integrado ULN2803A foi utilizada para acionamento das válvulas solenóides e a seringa monocanal. Esta interface permitiu a conversão dos sinais TTL provenientes da saída digital da ACL 8111 em sinais de 12 volts (≈ 400 mA) para as válvulas solenóides e 5 volts (≈ 600 mA) para o motor de passos da seringa monocanal.

As duas bombas de seringa também foram dotadas de sensores ópticos de fim de curso, cujos sinais foram lidos pela entrada digital da ACL8111.

Para acionamento da bomba de seringa duplo canal utilizou-se o protocolo de comunicação serial especificado em seu manual de operação. Este protocolo é utilizado quando a bomba é colocada no modo de operação "REMOTE". A tabela 1 apresenta algumas especificações desta bomba [39].

Tabela 1. Especificações da bomba de dois canais conforme manual

Especificações	
Tamanho aceito de seringa	10 μ L - 140 mL
Vazão	0,001 μ l h ⁻¹ -147mL min ⁻¹ (seringa de 60mL).
Velocidade linear	5,7x10 ⁻⁵ cm h ⁻¹ – 12,69cm min ⁻¹
Força linear	40 lb/sq. in
Exatidão	$\pm 0,5\%$
Reprodutibilidade	$\pm 0,2\%$

4.2.2. Programa de controle

A adição de novas ferramentas, etapas e metodologias para a realização do processo completo de pré-concentração exigem um mecanismo de controle adequado e funcional, para gerenciar cada etapa sem que ocorra qualquer anomalia durante o processo.

Desta forma, utilizou-se um programa escrito intuitivamente na linguagem Quick-Basic 4.5 (Microsoft), anexo I, para controlar todo o processo de pré-concentração e eluição do analito.

Este programa é composto de um gerenciador e diversos subprogramas que são acionados conforme as etapas do processo.

Para permitir a interação com o usuário foi elaborado um “MENU PRINCIPAL”, o qual é apresentado quando o programa é acionado, conforme figura 4.

```
(1) Volume do Complexante Injetado Atual = 2.0 mL
(2) Vazão de Complexante atual =2.0 mL/min
(3) Volume de Amostra Injetado Atual =2.8 mL
(4) Vazão de amostra atual = 2.0 mL/ min
(5) Volume de Eluente Frontal Atual = 0.30 mL
(6) Volume de Eluente Coletado Atual = 0.20 mL
(7) Volume de Eluente Posterior Atual = 1.0 mL
(8) Vazão de Eluição Atual = 1.5 mL/min
(9) Nova Amostra = n
(10) Zerar Seringas = n
(11) Carga da seringa 2/3 = n
(12) Primeira medida = n

=>>> <enter> para continuar
=>>> Número + <enter> para alterar parâmetro
=>>> ?_
```

Figura 4. “MENU PRINCIPAL” visualizado pelo usuário

Quando o programa é executado pode-se fazer alterações de diversos parâmetros e o acionamento de diversas funções. Com base na figura 4 serão descritas abaixo as principais opções e suas correspondentes ações no transcorrer do processo de pré-concentração:

(1) Volume complexante injetado atual

Esta opção permite que seja especificado o volume em mililitros de complexante a ser injetado no sistema.

(2) Vazão de complexante atual

Determina a vazão com que o complexante é injetado na minicoluna.

(3) Volume amostra atual

É a quantidade de amostra que irá ser injetada na minicoluna.

(4) Vazão de amostra atual

Determina a vazão com que a amostra será injetada na minicoluna.

(5) Volume de eluente frontal

Corresponde ao volume inicial do eluato, fazendo parte do processo de eluição. Este volume é descartado através da válvula V6 (figura 3).

(6) Volume de eluente coletado atual

Corresponde a parte do eluato coletado para quantificação do analito, fazendo parte do processo de eluição. Este volume é coletado no mini-funil de amostragem e submetido à determinação no espectrômetro.

(7) Volume de eluente posterior atual

Corresponde a parte final do eluato que será descartada, fazendo parte do processo de eluição.

(8) Vazão de eluição atual

É a vazão com que o processo de eluição ocorrerá.

(9) Nova amostra = "s" ou "n"

Quando a resposta para esta função for positiva o programa assumirá que existe uma amostra com características diferentes da anterior e inicializa a ambientalização do sistema. Um exemplo de sua utilização é quando forem realizadas múltiplas análises do mesmo íon metálico variando a concentração.

(10) Zerar seringas = "s" ou "n"

Quando a resposta para esta função for positiva (s) o programa assumirá que existe uma amostra ou padrão com características diferentes da anterior e inicializa a ambientalização do sistema. O caso de resposta negativa (n) é utilizado quando estão sendo feitas as replicatas de uma mesma amostra ou padrão.

(11) Cargas seringas 2/3 - correspondente à bomba duplo canal = "s" ou "n"

Aciona o processo de sucção da bomba duplo canal preenchendo as seringas S2 e S3 com um volume pré-estabelecido no programa. Nesta operação, deve-se levar em consideração a capacidade máxima de 20 mL das seringas. Este processo pode ser interrompido pelo usuário caso ele considere adequado o volume já coletado, bastando para isso, acionar qualquer tecla.

(12) Primeira medida = "s" ou "n"

Procedimento utilizado para retirada de resíduos de soluções ou bolhas de ar presentes nos tubos condutores quando o trabalho é iniciado.

4.2.3. Processo de pré-concentração

O processo de pré-concentração envolveu três etapas básicas, sendo estas:

ETAPA(1) adsorção do agente complexante, verde de bromocresol ($C_{21}H_{14}Br_4O_5S$), na mini-coluna contendo o adsorvente sólido, Amberlite XAD-16.

Este procedimento inicia-se com o acionamento da bomba duplo canal que injeta o complexante no sistema. As válvulas V2 e V4 ficam ligadas, enquanto que as demais permanecem desligadas. Esta combinação de acionamentos faz com que o eluente da seringa S3 retorne ao frasco de armazenamento e o resíduo do complexante seja descartado (figura 5).

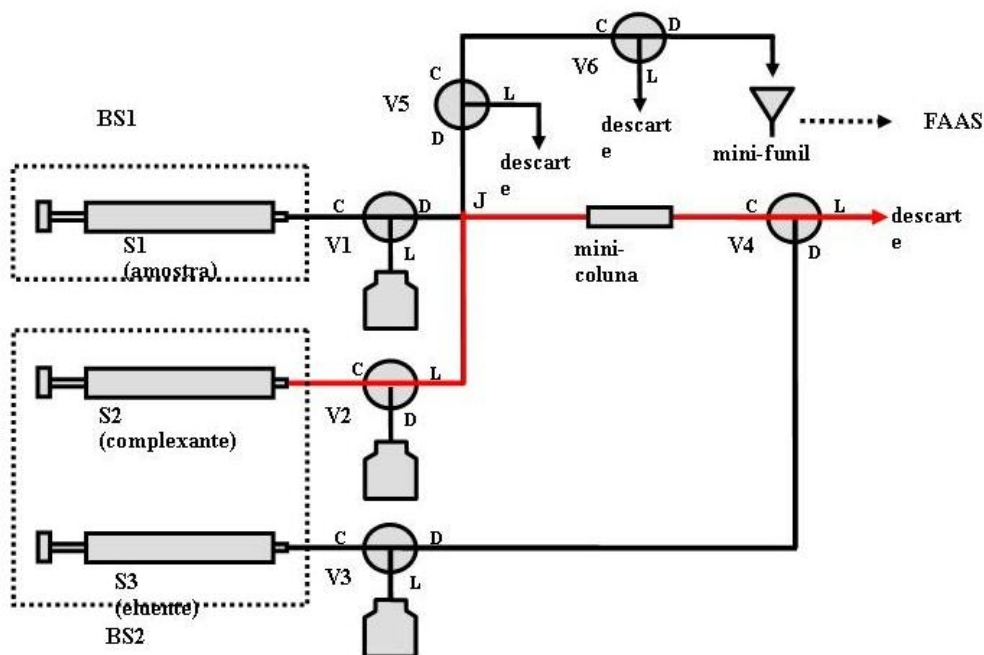


Figura 5. Adsorção do agente complexante na mini-coluna.

Enquanto o processo transcorre o usuário tem o acompanhamento desta etapa através da tela do micro, onde é descrito a vazão, volume injetado e tempo decorrido.

ETAPA(2) Complexação do íon metálico, Cd^{2+} , pelo agente complexante imobilizado na mini-coluna.

Nesta etapa ocorre a inserção da amostra no sistema, a partir da bomba monocanal.

Durante este processo são acionadas as válvulas V1 e V4, enquanto que as demais permanecem desligadas conforme figura 6. O usuário também possui o acompanhamento do processo através da tela do micro.

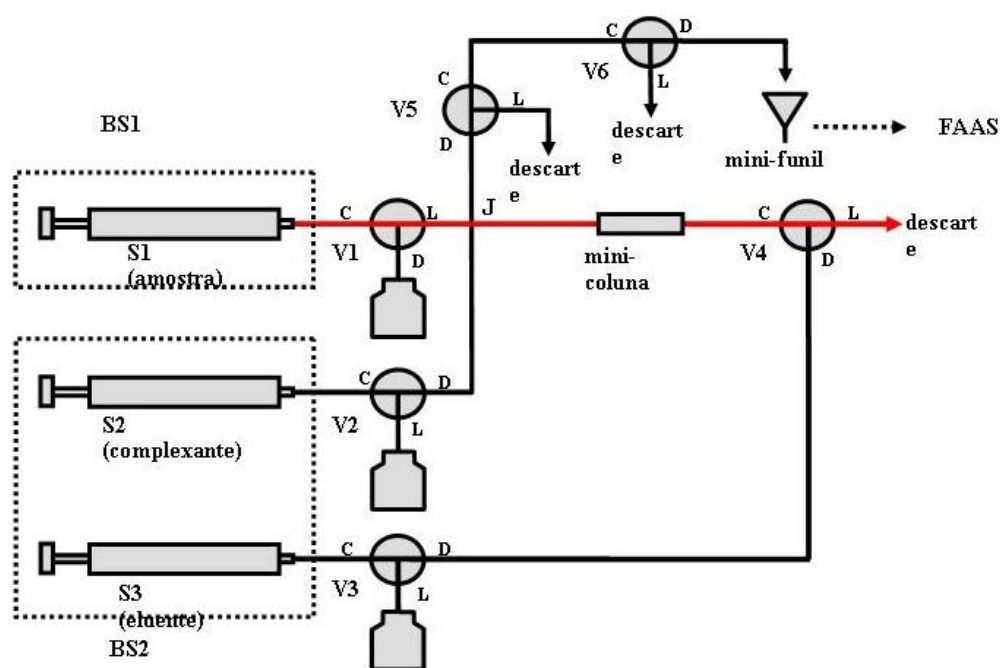


Figura 6. Complexação do íon metálico.

ETAPA(3) Eluição do íon metálico com etanol 95 % v/v.

Esta etapa possui três sub-etapas com a finalidade de dividir a zona de amostra em região frontal, região coletada e região posterior. Os volumes correspondentes à região frontal e região posterior são descartados através do canal "D" da válvula V6. Já o volume correspondente à região coletada é dispensado no mini-funil de amostragem através do canal L da válvula V6 conforme mostra a figura 6. Durante as três sub-etapas a seringa duplo canal é acionada juntamente com as válvulas V3, V4 e V5 conforme figura 7. Contudo, apenas na sub-etapa de coleta no mini-funil ocorre também o acionamento da válvula V6.

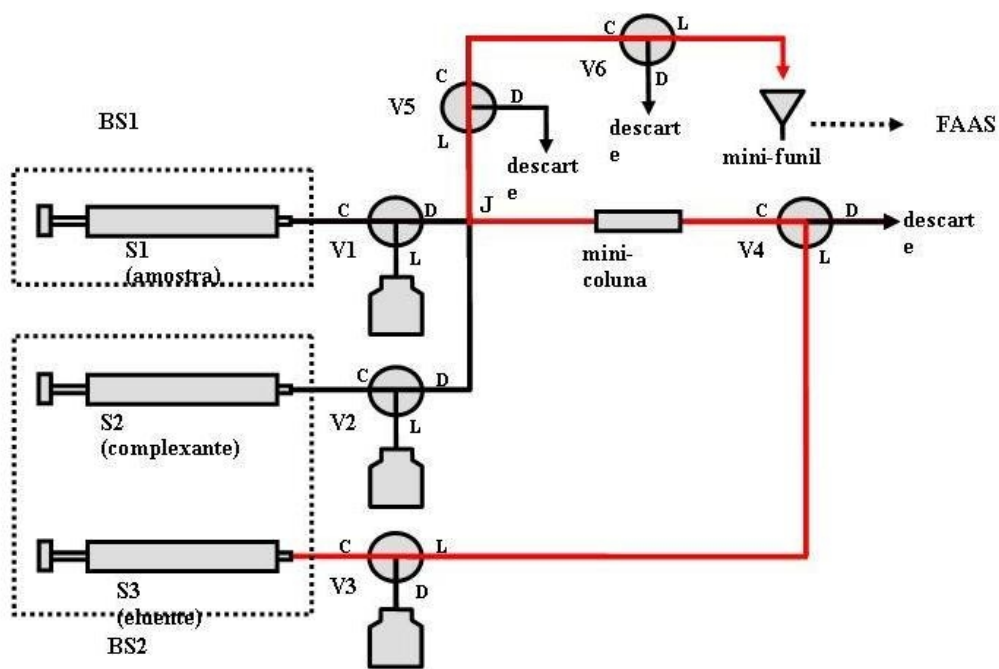


Figura 7. Eluição do íon metálico

Esta divisão do eluato encontra-se representada na figura 8, na qual pode-se observar o sinal de absorbância em função do volume de eluato dispensado na etapa de eluição.

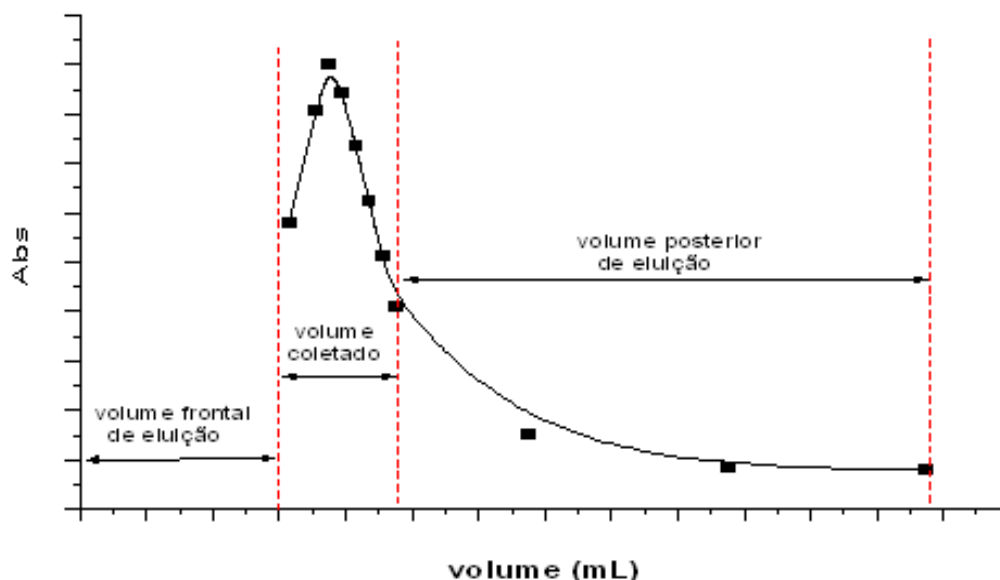


Figura 8. Gráfico demonstrativo das frações do eluato: volume frontal de eluição (VFE), volume coletado (VC) e volume posterior de eluição (VPE)

Deve-se ressaltar que existem outras etapas complementares executadas automaticamente pelo sistema de fluxos e controladas através do programa desenvolvido,

tais como, limpeza dos canais de fluxo, remoção de bolhas de ar, zeragem das seringas, entre outras.

Na tabela 2 estão ilustrados os principais processos juntamente com o funcionamento das seringas e o acionamento das válvulas correspondentes ao processo.

Tabela 2. Combinação de acionamento/desativação das bombas e válvulas para as principais etapas operacionais do sistema de fluxos.

Etapa operacional	BS1	BS2	V1	V2	V3	V4	V5	V6
1 Captação amostra	Suc	D	D	D	D	D	D	D
2 Captação complexante + eluente	D	Suc	D	D	D	D	D	D
3 Passagem do complexante pela minicoluna	D	Inj	D	L	D	D	D	D
4 Passagem da amostra pela minicoluna	Inj	D	L	D	D	D	D	D
5 eluição com descarte da zona frontal	D	Inj	D	D	L	L	L	D
6 eluição com amostragem no mini-funil	D	Inj	D	D	L	L	L	L
7 eluição com descarte da zona posterior	D	Inj	D	D	L	L	L	D
8 Drenagem da ponteira de amostragem	D	Suc	D	L	D	L	L	L

BS1 e BS2 = bombas de seringa 1 e 2; V1-V6= válvulas solenóides; Suc=sucção; Inj=injeção; D=desligada; L=ligada

4.2.4. Procedimento de quantificação dos analitos

O volume coletado de eluição é submetido à determinação *off-line* por espectrometria de absorção atômica, tal como foi realizado em trabalho prévio [31]. Este método de detecção permite a determinação inequívoca do fator de enriquecimento (FE), que é um dos parâmetros mais importantes quando se trata de pré-concentração [40]

4.2.5. Sistema automático de injeção

A injeção de padrões e/ou amostras, submetidas ou não ao processo de enriquecimento, no espectrômetro foi realizada sobre uma linha de base obtida com ar. Ou seja, o "branco" ou linha de base sempre foi feita com aspiração de ar pelo sistema nebulizador do aparelho.

Desta forma, para tornar o método de injeção mais reprodutível, foi desenvolvido um sistema constituído pelo acoplamento do mini-funil de amostragem a uma válvula solenóide de três vias, cujo canal C fica conectado ao espectrômetro (figura 9). O acionamento da válvula é feito manualmente em sincronismo com a leitura do sinal transiente pelo espectrômetro. Isto permite que a injeção seja feita sempre na mesma velocidade eliminando erros relacionados à injeção manual (sem auxílio da válvula).

A figura 9 demonstra o esquema geral do sistema para injeção *off-line* no espectrômetro de absorção atômica.

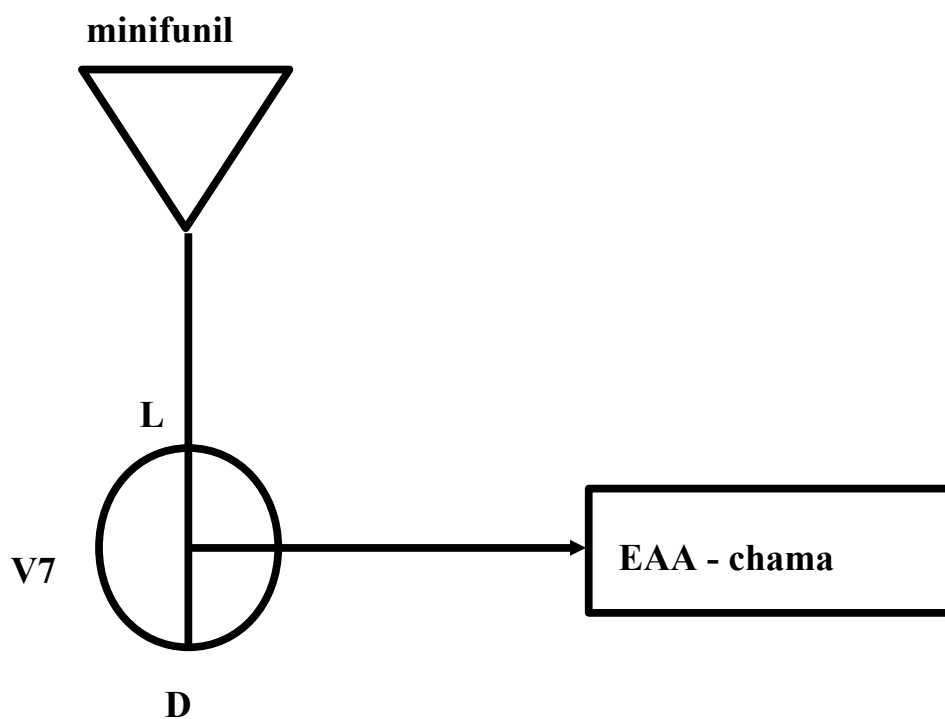


Figura 9. Sistema injeção de amostra para quantificação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os resultados foram obtidos através do método univariado, ou seja, manteve-se constante todas as variáveis envolvidas com exceção da variável em estudo.

Desta forma, a partir deste ponto serão apresentados os resultados experimentais relativos aos procedimentos utilizados para avaliar o desempenho e eficiência do sistema proposto. A maioria destes testes foi definida com base no próprio modo de funcionamento do sistema.

5.1. Método de injeção do volume coletado no espectrômetro de absorção atômica

O método de injeção do volume coletado no espectrômetro de absorção atômica é uma das inovações proposta neste sistema em relação a sistemas similares. Isto porque na maioria dos casos, a injeção do eluato no espectrômetro é feita simultaneamente à eluição, sendo o sinal transiente de absorvância tomado em altura pico ou área pico. Neste sistema proposto, a injeção do volume coletado é feita *off-line*, ou seja, uma fração definida do eluato é coletada e posteriormente injetada no espectrômetro. A vantagem deste procedimento relaciona-se à determinação do fator de enriquecimento, uma das figuras de mérito mais importantes quando se trata de métodos de pré-concentração. Isto porque, para determinação do fator de enriquecimento são necessárias duas curvas de calibração, sendo uma obtida aplicando-se a pré-concentração e outra obtida sem pré-concentração. A razão entre a sensibilidade de calibração da primeira em relação à segunda define o fator de enriquecimento. Desta forma, para obtenção inequívoca deste fator é necessário que as duas curvas de calibração sejam obtidas exatamente da mesma forma, visto que, nos sistemas em fluxo não se obtém um sinal de absorvância em estado estacionário e sim, um sinal transiente. Para isto, coletou-se a fração "volume coletado" do eluato no mini-funil de amostragem após o processo de enriquecimento. Após a coleta, o mini-funil foi removido e acoplado ao sistema automático de injeção. Para obtenção do sinal, este sistema foi acionado manualmente em sincronismo com a leitura do espectrômetro.

Tendo em vista a importância desta etapa de injeção, e principalmente, devido a observações feitas durante o processo de leitura com relação à variação do formato do pico obtido, foi necessário a realização de testes comparativos entre os dois métodos de leitura disponíveis, área pico ou altura pico. Para isto foram feitas 10 medidas de um mesmo padrão

sob as mesmas condições experimentais para os dois métodos de leitura. Os resultados obtidos encontram-se dispostos na tabela 3, juntamente com os respectivos valores de desvio padrão relativo percentual (sd%). O valor de sd% foi obtido a partir da fórmula: $sd\% = (sd * 100 / \text{média})$.

Tabela 3. Teste de avaliação do melhor método de leitura para realização de medidas em FAAS

Replicata	Volume Injetado = 200 μL / conc. padrão $\text{Cd}^{2+} = 2 \text{ mg L}^{-1}$	
	Concentração Altura pico	Concentração Área pico
1	2,039	2,021
2	2,008	2,097
3	2,032	2,008
4	2,012	2,114
5	2,043	2,105
6	2,031	2,096
7	2,047	2,086
8	2,062	2,074
9	2,060	2,105
10	2,001	2,069
	Sd% = 1,04	Sd% = 1,74

Considerando que ambos os procedimentos foram realizados através dos mesmos procedimentos analíticos e que o método leitura por altura pico apresentou melhor reprodutibilidades (menor sd%), optou-se pelo seu uso em todas as medidas realizadas durante este trabalho.

5.2. Curva de eluição

A curva de eluição é um gráfico de "absorvância *versus* volume dispensado", obtido a partir das absorvâncias determinadas para cada fração do volume do eluato que sai pela válvula V6. Experimentalmente, obteve-se este gráfico através da variação do volume frontal de eluição mantendo-se constante o volume coletado (150 μL neste caso). O volume posterior de eluição não interfere neste resultado, pois os dados são coletados apenas até o ponto de eluição da fração "volume coletado". O ponto de absorvância máxima obtida foi determinado conforme o gráfico demonstrado na figura 10, onde obteve-se melhores resultados para o volume de 0,30 mL.

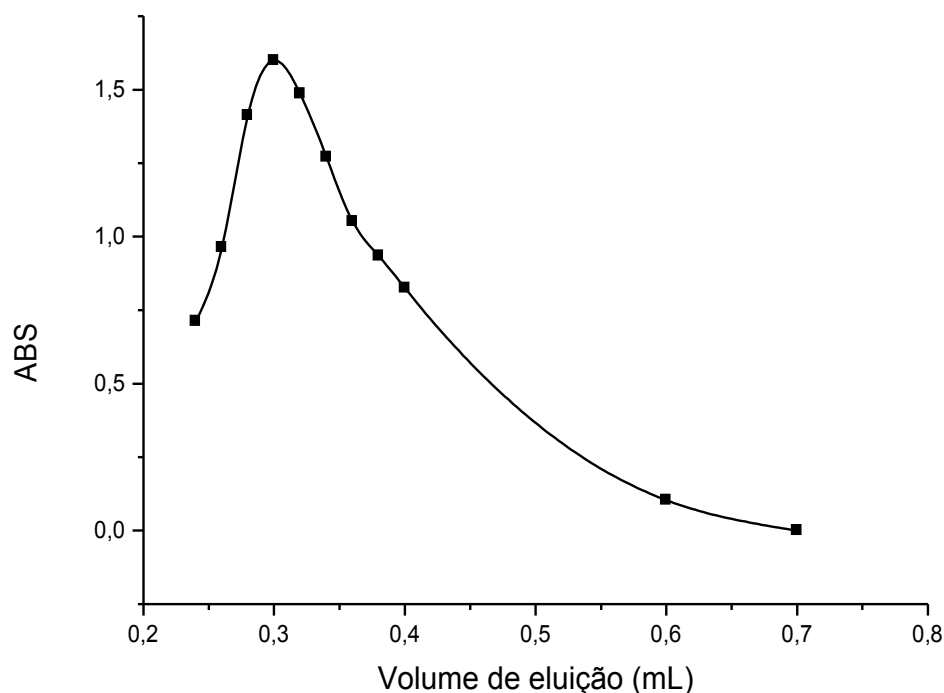


Figura 10. Gráfico variação VFE (Volume Frontal de Eluição)

Este procedimento foi refeito várias vezes, pois este parâmetro tem grande influência nos valores de absorvância obtidos experimentalmente, Isto ocorre devido à necessidade de coleta da zona de amostra na região mais rica em analito para se obter o máximo de sensibilidade na determinação.

5.3. Volume coletado

Trata-se da fração do eluato que é recolhida no mini-funil por injeção através da válvula V6 (figura 4) e posteriormente levada ao espectrômetro de absorção atômica para quantificação. Este teste foi realizado mantendo-se fixo o valor do volume frontal de eluição, já determinado no experimento anterior.

Como as determinações são feitas *off-line*, procura-se coletar o menor volume possível do eluato englobando a região central do pico, a qual é mais rica em analito. Contudo, volumes muito pequenos resultam em sinal analítico baixo durante o processo de quantificação. Isto porque, este processo é realizado pela injeção no espectrômetro do volume coletado, obtendo-se um sinal transiente de absorvância, sendo que este sinal, será menor para volumes muito pequenos. Por outro lado, para volumes muito grandes, tem-se

uma redução no sinal analítico devido à uma diluição do volume coletado provocado pelo alargamento da zona de amostra. Observando-se a figura 11, pode-se concluir que o melhor volume coletado é de 200 μL .

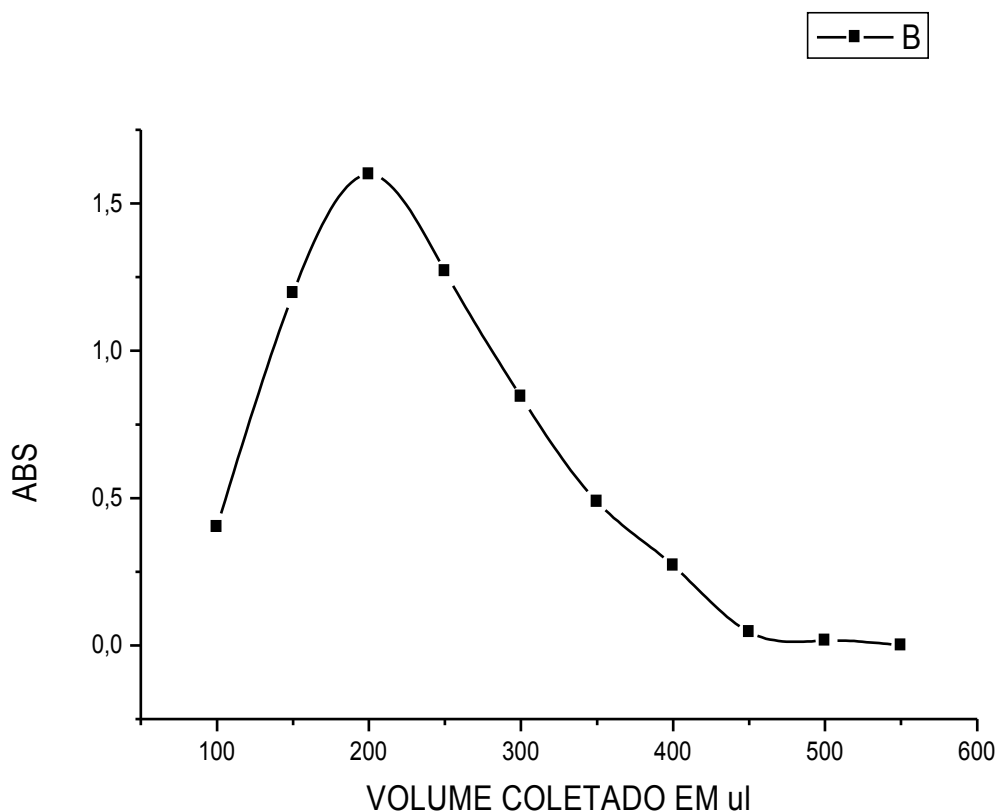


Figura 11. Gráfico da variação do volume coletado de eluição (VC).

Quanto ao volume posterior de eluição (VP) não houve necessidade de otimização, visto que, seu valor deve ser o suficiente para que o sinal transiente atinja um valor bem baixo para não interferir na próxima determinação. A figura 10 demonstra que em 0,7 mL o sinal já é suficientemente baixo, porém por medida de segurança utilizou-se um VP de 1,0 mL

A partir deste ponto, ficaram definidos os parâmetros físicos relacionados ao processo de eluição da zona de amostra, ou seja: volume frontal de eluição = 0,300 mL; volume coletado = 0,200 mL e volume posterior de eluição = 1,00 mL. Estes parâmetros são válidos para as condições físicas e químicas deste sistema, podendo variar apenas quando houver modificações nos diâmetros internos ou comprimento dos tubos condutores ou

quando houver alterações nos reagentes envolvidos, ou seja, agente complexante, suporte sólido, íon metálico ou eluente.

5.4. Vazões de amostra e eluição

Para definição das respectivas vazões da amostra e eluição procurou-se aplicar a maior vazão possível com a finalidade de redução do tempo de análise. Para isto partiu-se de baixas vazões (1,0 mL min⁻¹) e aumentou-se progressivamente até atingir um limite onde ocorria rompimento das conexões. Observou-se experimentalmente que não havia alterações significativas nos sinais de absorvância com a variação das respectivas vazões na faixa estudada (1,0 - 2,5 mL min⁻¹). Contudo em vazões de 2,5 mL min⁻¹ observou-se rompimento de conexões em alguns casos. Desta forma, optou-se pelo emprego de 2,0 mL min⁻¹ em todos os testes realizados. Para a vazão do complexante também empregou-se 2,0 mL min⁻¹ em todos os testes realizados.

5.5. Volume e concentração do complexante verde de bromocresol.

Foi utilizado como complexante o verde de bromocresol figura 12, pois em trabalhos anteriormente realizados pelo LABGATI [38] este indicador ácido-base apresentou bons resultados para adsorção do íon cádmio.

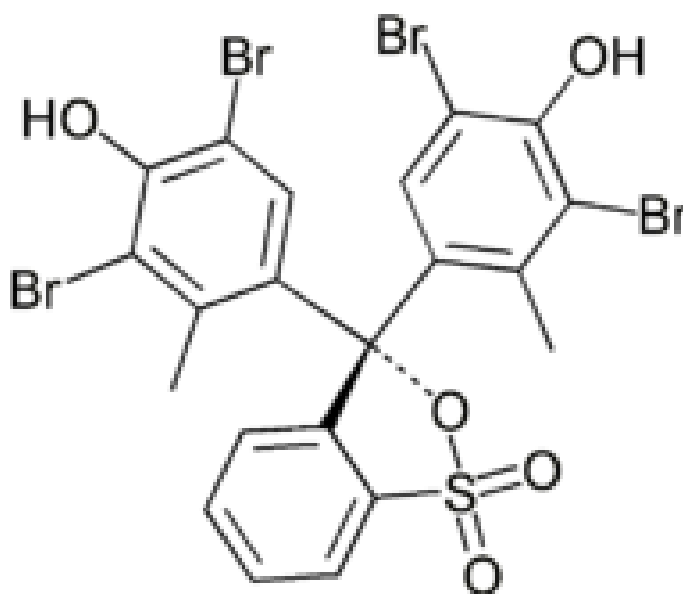


Figura12. Formula estrutural do indicador Verde de Bromocresol.

Na etapa “adsorção do agente complexante” ocorre a fixação do verde de bromocresol sobre a resina XAD-16. O complexante fica retido na resina não-iônica devido a uma interação física, pois o verde de bromocresol fica retido nos micro poros do XAD-16 [41]. Dessa forma, se utilizados volumes ou concentrações muito altas do complexante, ocorrerá uma saturação da coluna de pré-concentração. Ou seja, a partir de certa quantidade de complexante, não haverá mais retenção deste agente na mini-coluna. Assim sendo, procurou-se determinar a quantidade (em volume e/ou concentração) que provocasse a saturação da mini-coluna. Conforme demonstra a figura 13, o ponto de saturação acontece em 2,0 mL para uma concentração fixa de 0,01% m/v. Já na figura 14, observa-se que o ponto de saturação acontece na concentração de 0,01 % m/v para um volume fixo de 2,0 mL. Considerando-se a massa (em mg) de verde de bromocresol que atravessa a coluna, tem-se o mesmo valor para ambos os testes, ou seja: $0,01 \times 2,0/100 = 0,0002 \text{ g} = 0,2 \text{ mg}$.

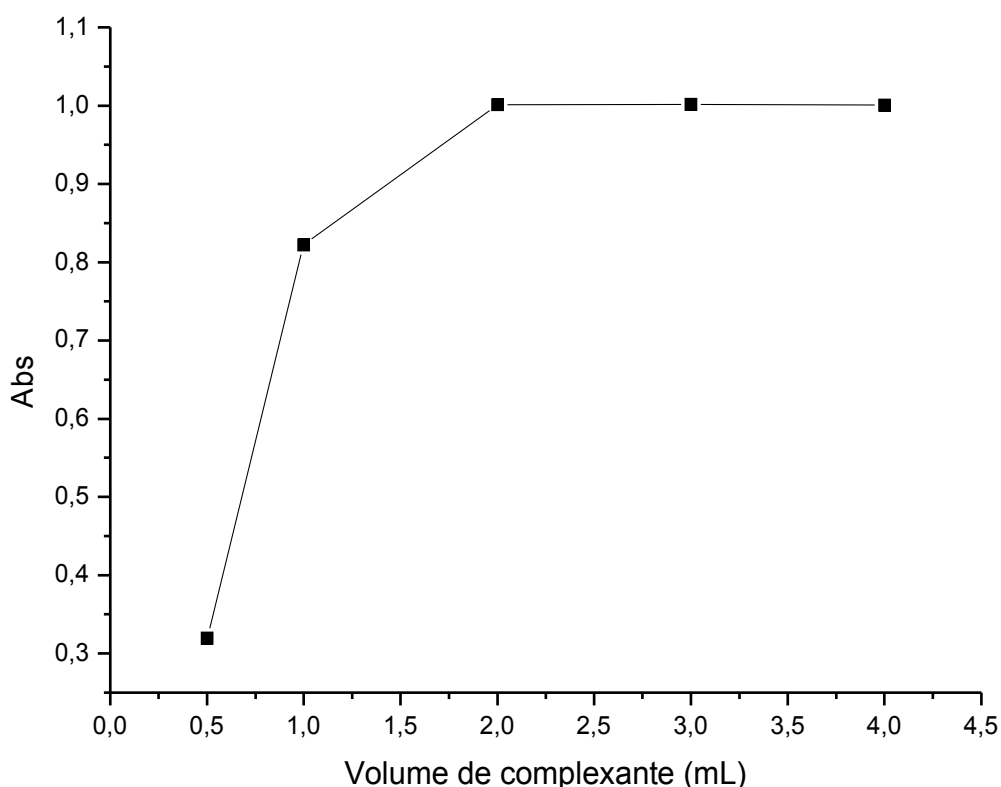


Figura 13. Gráfico da variação do volume de verde bromocresol 0,01% m/v

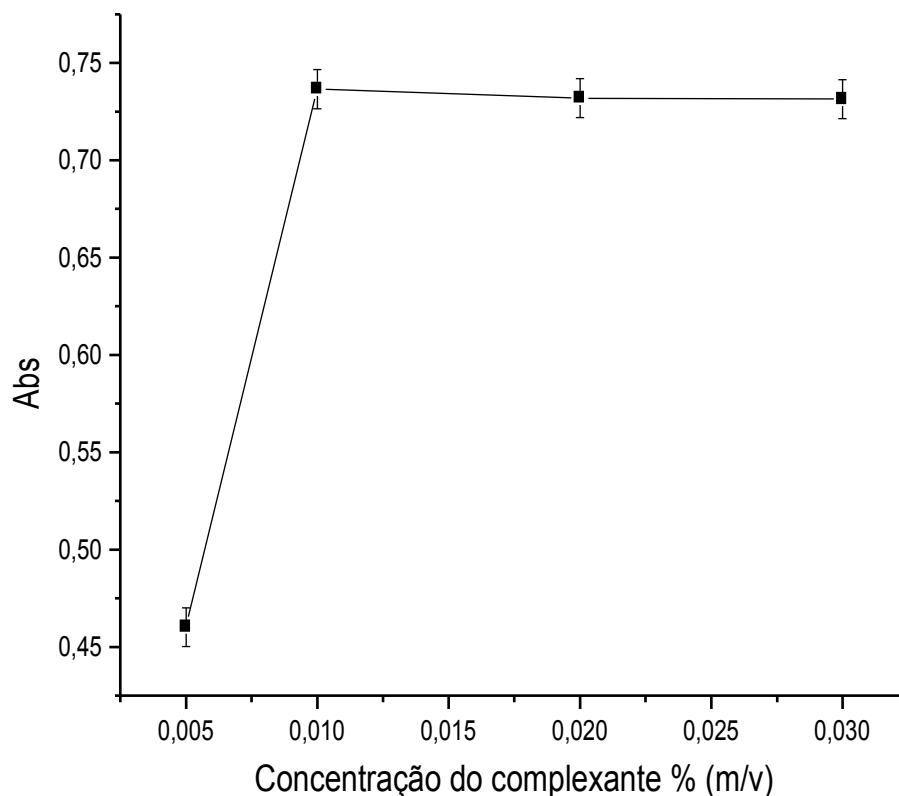


Figura 14. Gráfico da variação da concentração do verde bromocresol para 2 mL.

Através destes gráficos foi possível observar claramente que a melhor absorvância foi verificada para o volume de 2 mL e concentração de 0,01% (m/v) do complexante.

5.6. Variação do volume de amostra injetado

Com todas as etapas anteriores conclusas restou ainda analisar um dos parâmetros de maior importância para esta sequência analítica, o volume de amostra injetado, isto porque ao otimizá-la influenciamos diretamente no fator de enriquecimento encontrado.

Este procedimento forneceu dados gerais, sobre o comportamento da variável volume de amostra injetado no sistema, sendo variado o volume de injeção de 1,8 mL até 14,8 mL, para um padrão na concentração de Cd^{2+} $0,25 \text{ mg L}^{-1}$. Este teste foi realizado com variação de dois em dois mililitros sempre em triplicatas, apresentando, resultados com uma margem de erro de $\pm 0,52$ conforme demonstrado na figura 15.

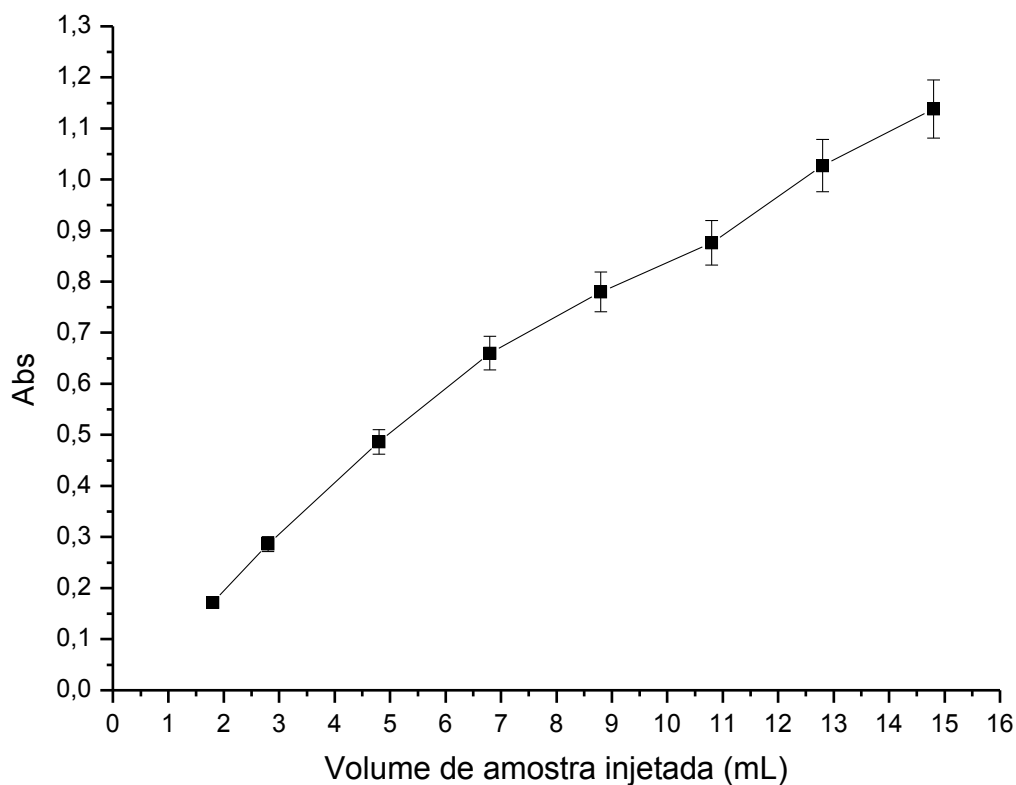


Figura 15. Gráfico da variação volume de amostra injetado.

Os resultados obtidos comprovaram que quanto maior o volume de amostra melhor é a pré-concentração e maior o fator de enriquecimento.

Entretanto nestas condições as análises não permitiram encontrar a capacidade máxima de adsorção do XAD-16 para este sistema, além de diminuir significativamente a frequência analítica.

Para contornar esta dificuldade, o processo foi refeito utilizando-se de uma coluna ainda menor, contendo apenas 19 mg de XAD-16. Utilizou-se padrão $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd^{2+} , pois com uma menor superfície de contato disponível e uma maior concentração do íon metálico a adsorção máxima do analito deveria acontecer com volumes menores de amostra. O resultado obtido pode ser observado na figura 16 para determinações feitas em triplicatas.

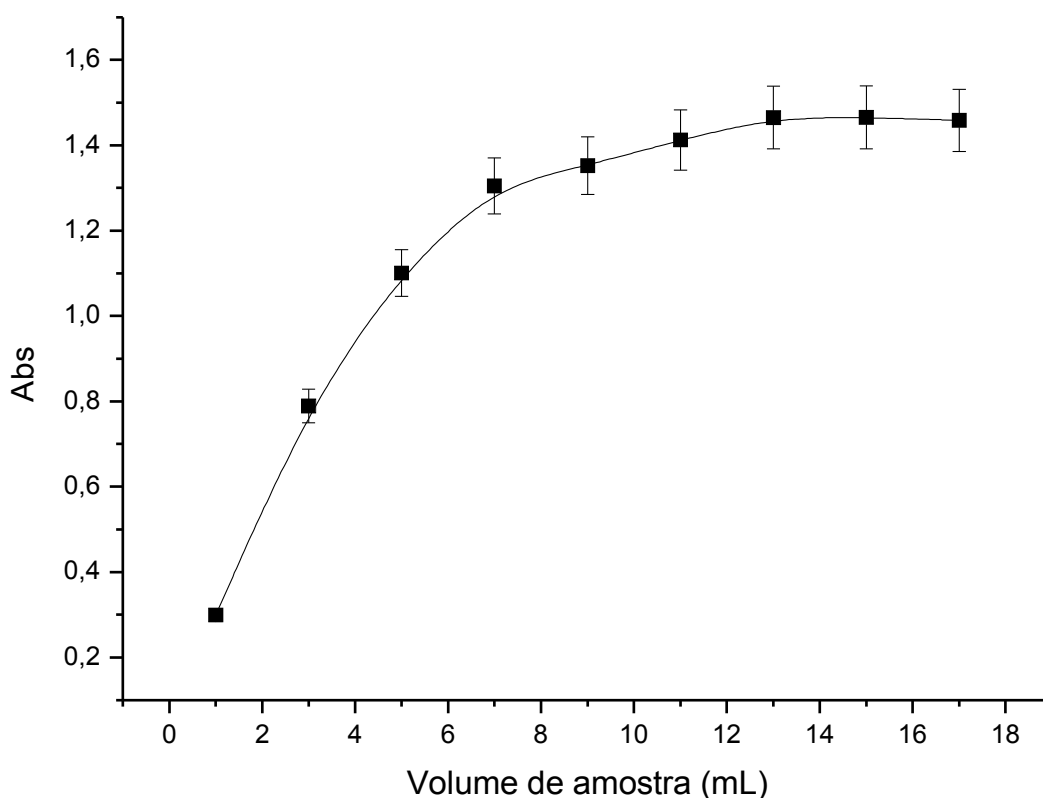


Figura 16. Gráfico saturação coluna contendo 19 mg XAD-16

Através da figura 16 e de posse de dados anteriores foi possível determinar a quantidade máxima de analito adsorvido por grama de resina, ou seja:

Utilizando 13 mL do padrão $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, o que corresponde a uma massa total de $(0,5 \times 13)/1000 = 0,0065 \text{ mg}$ de Cd^{2+} . Sendo assim possível predizer que a capacidade em $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ foi de $0,0065/0,019 = 0,34 \text{ mg}$ de Cd^{2+} por grama de adsorvente, em fluxo.

5.7. Pré-concentração sem a utilização de complexante

Para constatar a eficácia do verde de bromocresol com agente complexante do íon metálico foi então realizado um teste de pré-concentrações sem a utilização do mesmo. Neste caso, utilizou-se os mesmos parâmetros de vazão e eluição dos testes anteriores para pré-concentração de 10,0 mL de um padrão $0,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ em Cd^{2+} .

O resultado obtido após o processo sem complexante foi de $-0,0405 \pm 0,001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ contra $2,19 \pm 0,053 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ obtido com o uso do complexante. Como o resultado sem complexante fica na mesma ordem de grandeza do limite de confiança da medida nesta

condição, pode-se concluir que este resultado não possui significado analítico. Isto significa que apenas a resina XAD-16 não pode reter significativamente o íon metálico em estudo.

5.8. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Para avaliar a sensibilidade do equipamento foram avaliados os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). De acordo com a IUPAC, o LD deve ser determinado dividindo o valor correspondente a três vezes o desvio padrão do sinal analítico do branco (obtido com 10 replicatas), pela inclinação da curva analítica [29]. Já o limite de quantificação é a menor quantidade que pode ser medida com um determinado grau de confiança. Desta forma foram realizadas dez medidas utilizando água ultra-pura encontrando o LD 0,03978 mg L⁻¹ e LQ 0,1327 mg L⁻¹ para um volume de amostra de 2,8 mL.

5.9. Fator de enriquecimento

Sabendo-se que o fator de enriquecimento é uma das figuras de mérito mais importantes em métodos de pré-concentração, determinou-se este parâmetro para duas faixas de concentração. Para a primeira faixa utilizou-se padrões de Cd²⁺ entre 0,25-1,0 mg L⁻¹ e para a segunda faixa padrões entre 0,05 -0,5 mg L⁻¹. Já a curva de calibração sem o processo de pré-concentração foi realizada na faixa de 0,5-2,0 mg L⁻¹ de Cd²⁺ para ambos os fatores determinados.

A figura 17 apresenta as duas curvas de calibração (com e sem pré-concentração) em um mesmo gráfico para a primeira faixa de concentração e a figura 18 para a segunda faixa. Para a primeira faixa utilizou-se 2,8 mL dos padrões submetidos ao processo de enriquecimento e para a segunda faixa utilizou-se 10,0 mL dos respectivos padrões. O volume coletado no mini-funil de amostragem foi mantido em 200 µL para ambas as faixas estudadas. Para a primeira faixa foram gastos aproximadamente 4 minutos para cada determinação e para a segunda aproximadamente 15 minutos.

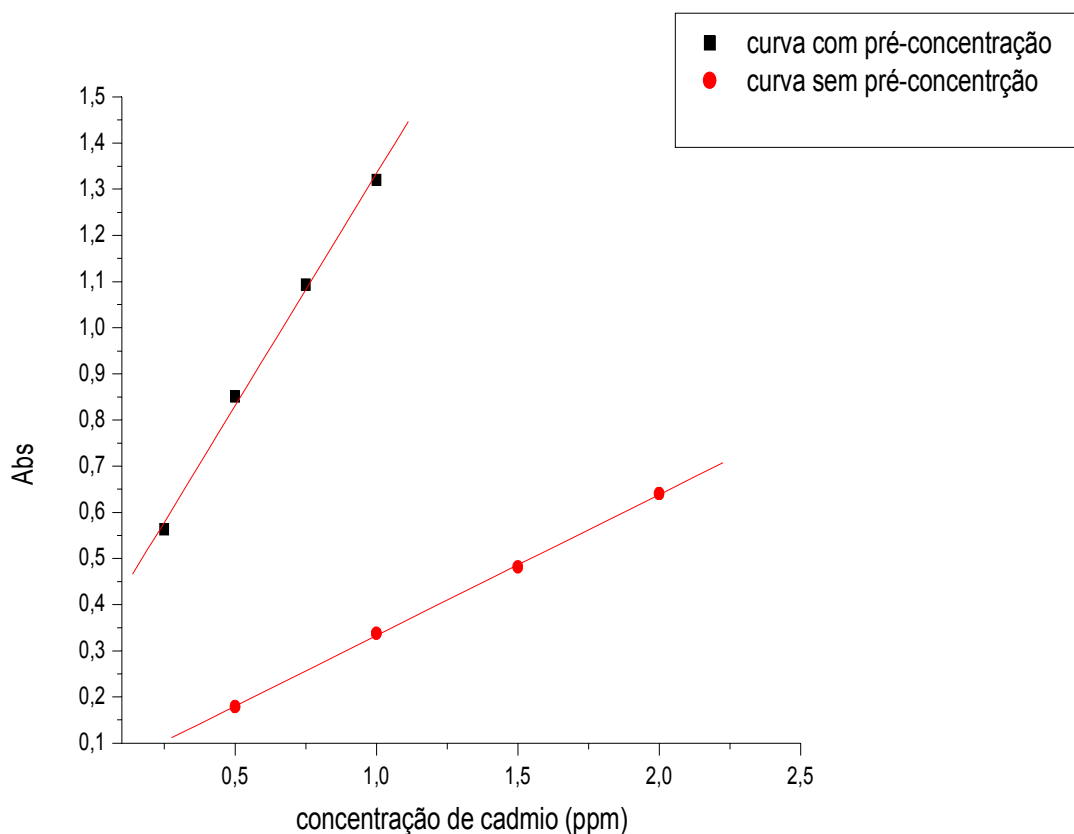


Figura 17. Gráfico fator de enriquecimento da primeira faixa de eluição.

Para a primeira faixa obteve-se fator de enriquecimento igual a $1,01/0,306 = 3,3$, sendo 1,01 o coeficiente angular da curva com pré-concentração e 0,306 o coeficiente angular da curva sem pré-concentração. Desta forma, houve um enriquecimento de 3,3 vezes em relação à concentração original dos padrões submetidos ao processo. Sabendo-se que a partir de 2,8 mL da amostra foram coletados 200 μ L para a medida, pode-se determinar a razão volumétrica entre o volume inicial e final como sendo: $2800/200 = 14$ vezes. Com isto é possível a determinação da eficiência do processo, ou seja: $\text{eficiência}\% = (3,3/14) * 100 = 23,6\%$.

Já a figura 18 apresenta as duas curvas de calibração (com e sem pré-concentração) para a segunda faixa de concentração avaliada.

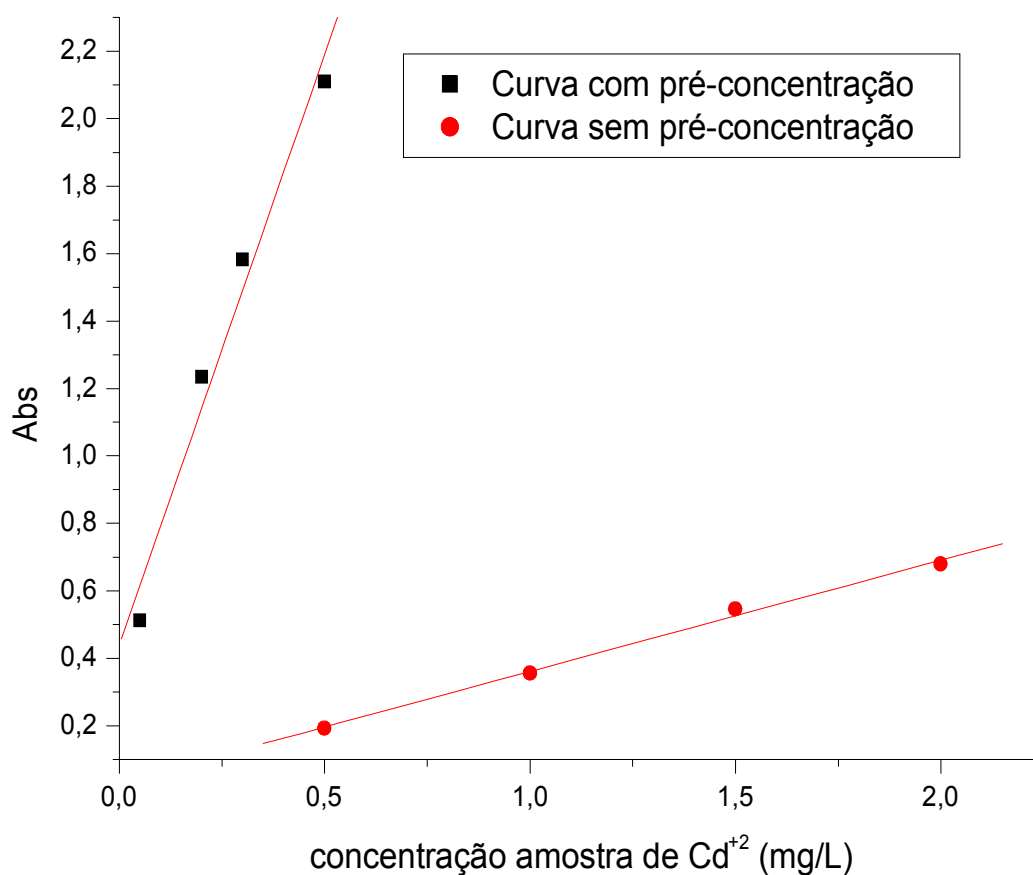


Figura 18. Fator de enriquecimento da segunda faixa de eluição

Para a segunda faixa obteve-se fator de enriquecimento igual a $3,50/0,33 = 10,61$ sendo 3,50 o coeficiente angular da curva com pré-concentração e 0,33 o coeficiente angular da curva sem pré-concentração. Desta forma, houve um enriquecimento de 10,61 vezes em relação à concentração original dos padrões submetidos ao processo. Sabendo-se que a partir de 10,0 mL obteve-se 200 μ L para a medida, pode-se determinar a razão volumétrica entre o volume inicial e final como sendo: $10000/200 = 50$ vezes. Com isto é possível a determinação da eficiência do processo, ou seja: $\text{eficiência}\% = (10,61/50) * 100 = 20,2 \%$.

Estes resultados são considerados satisfatórios, visto que, empregou-se a injeção *off-line*. Neste tipo de injeção, o sinal de absorvância fica menor devido a uma diluição decorrente da amostragem, ou seja, ocorre diluição da zona mais rica em analito. Por outro lado, um aumento no volume de amostra injetada produz um aumento no fator de enriquecimento, visto que, o volume coletado foi mantido para as duas faixas estudadas.

5.10. Determinação do pH ótimo de complexação dos íons Cd^{2+}

Para realização das análises utilizou-se uma solução $0,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ sendo que o pH das amostras foi ajustado utilizando-se soluções de $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, variando na faixa de 2 a 10. Não foi possível utilizar soluções tampão, pois observou-se que alteravam significativamente as respostas esperadas. Isto possivelmente ocorre devido a alguma interação do analito com os respectivos elementos dos tampões.

O procedimento analítico foi realizado individualmente para cada pH da faixa escolhida sendo realizado os procedimentos de limpeza do sistema após cada análise.

Após o processo de pré-concentração e quantificação por FAAS, observou-se que o pH com melhores resultados para o atual sistema é o cinco, conforme demonstrado na figura 19.

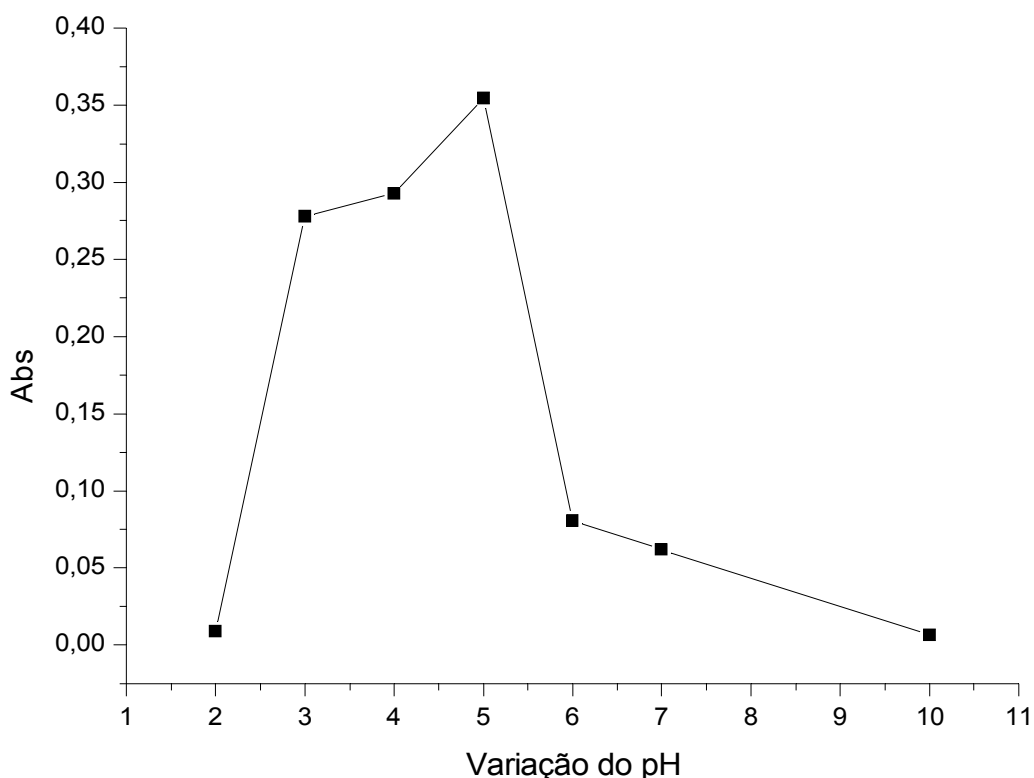


Figura 19. Gráfico pH ótimo para complexação íon Cd^{2+}

Este fato acontece possivelmente a uma maior interação do íon Cádmio com o complexante tendo em vista que o verde de bromocresol aumenta seu pK_a conforme o pH vai ficando mais básico, apresentando assim pK_a 's médios de 4,02 em pH's próximos de 5 e

proporcionando duas formas estruturais predominantes no intervalo investigado, cuja distribuição relativa obedece ao equilíbrio ácido-base mostrado na figura 20 [42,43].

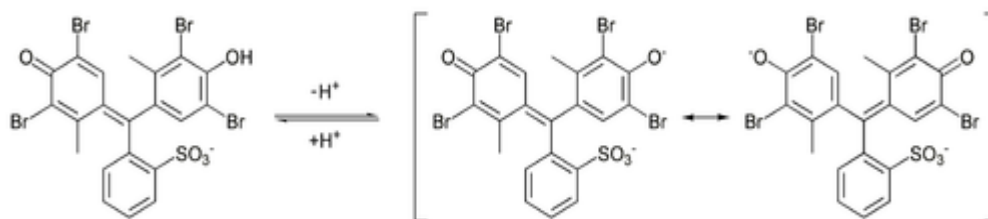


Figura 20. Equilíbrio ácido-base do Verde de bromocresol.

Sabendo que o pH é um parâmetro que interfere em diversas variáveis, foram necessários novos estudos para verificar se não houve alterações nos valores do volume frontal de eluição. Desta forma foram realizados novos testes para VFE referente ao pH 5 conforme figura 21.

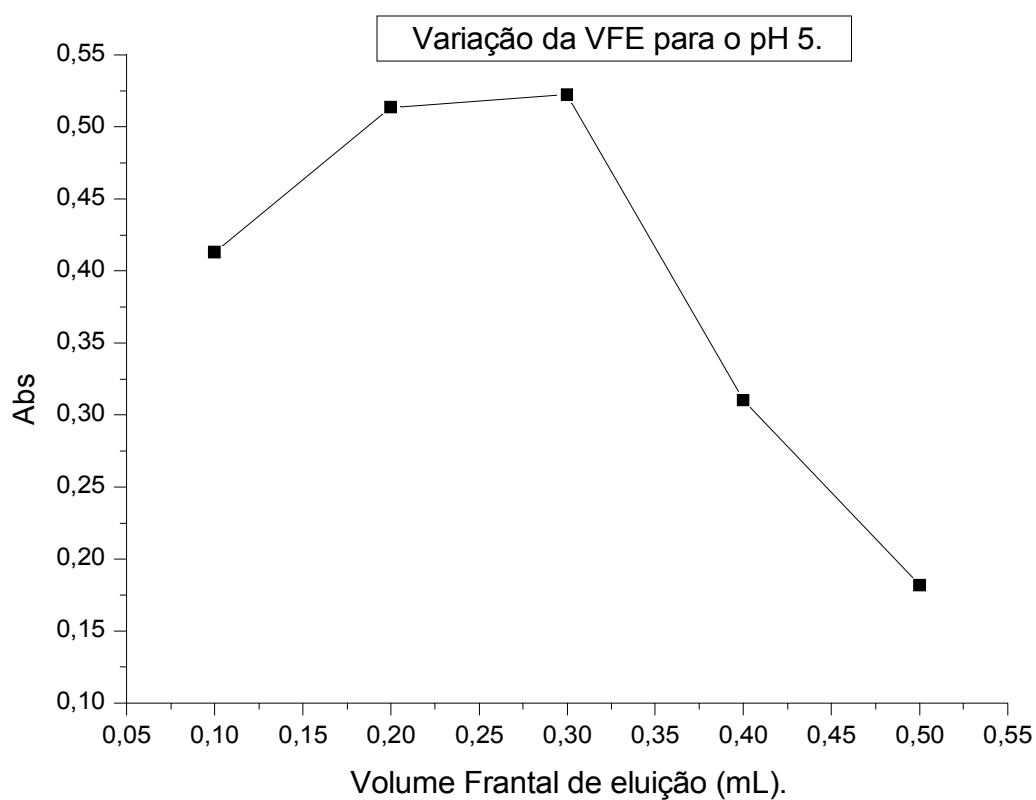


Figura 21. Frente de eluição para o pH 5.

Desta forma foi possível dar continuidade ao trabalho e obter os fatores de enriquecimento para o pH 5.

5.11. Determinação do fator de enriquecimento em pH 5

Para o fator de enriquecimento então foram ajustados os valores de pH dos padrões e também do complexante. A faixa de concentração dos padrões para a pré-concentração foi de 0,05 a 0,5 mg L⁻¹ de Cd⁺² e a faixa para a calibração sem pré-concentração foi de 0,5 a 2 mg L⁻¹ de Cd⁺². O volume de amostra sintética submetido a pré-concentração foi de 2,8 mL e o volume coletado após o processo de pré- concentração foi de 200μL. Conforme demonstra a figura 22.

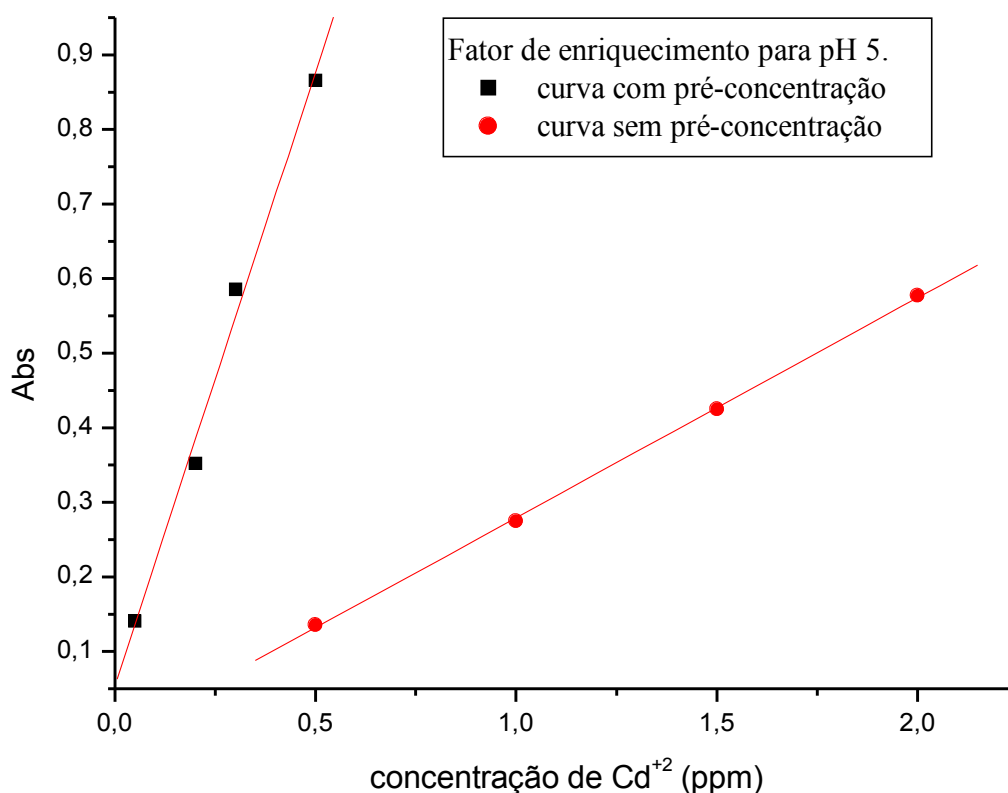


Figura 22. Fator de enriquecimento para pH 5

Para a primeira faixa obteve-se fator de enriquecimento igual a $1,6443 / 0,2947 = 5,6$ sendo 1,6443 o coeficiente angular da curva com pré-concentração e 0,2947 o

coeficiente angular da curva sem pré-concentração. Desta forma, houve um enriquecimento de 5,6 vezes em relação à concentração original dos padrões submetidos ao processo. Sabendo-se que a partir de 2,8 mL obteve-se 200 μ L para a medida, pode-se determinar a razão volumétrica entre o volume inicial e final como sendo: $2800/200 = 14$ vezes. Com isto é possível a determinação da eficiência do processo, ou seja: $\text{eficiência}\% = (5,6/14) * 100 = 40\%$. Estes resultados demonstram uma pequena melhoria no fator de enriquecimento (5,6 vs 3,3) e também na eficiência (40,0 % vs 23,6 %) em relação ao processo realizado sem ajuste de pH.

7. CONCLUSÕES

O sistema proposto possibilitou a determinação inequívoca do fator de enriquecimento a partir dos coeficientes angulares das curvas com e sem pré-concentração obtidas de forma idêntica. Isto é considerado uma inovação em relação aos sistemas similares que utilizam bomba peristáltica. Geralmente, nos sistemas com bomba peristáltica, obtém-se a curva com pré-concentração a partir da injeção no detector, simultânea à eluição, medindo-se um sinal em altura pico ou área pico. Já a curva sem pré-concentração, é obtida pela aspiração direta dos padrões, ou seja, obtém-se um sinal em estado estacionário. Isto geralmente conduz a erros, pois nos sistemas de injeção em fluxo, raramente atinge-se o estado estacionário do sinal analítico.

Quanto ao uso de bombas de seringa em sistemas desta natureza, também pode ser considerado algo pouco comum. As bombas de seringa geralmente são consideradas dispositivos não-contínuos, fator este, que dificulta a elaboração dos sistemas em fluxos. Este inconveniente foi contornado através do uso de automação para todas as etapas do processo. Por outro lado, as bombas de seringa produzem vazões e/ou volumes bem mais reprodutíveis que as bombas peristálticas.

Além disto bombas de seringa podem ser empregadas para propulsão de solventes orgânicos agressivos para os tubos flexíveis das bombas peristálticas, tais como etanol, acetona, etc.

Outra vantagem do sistema proposto é o processo de fixação do complexante no suporte sólido. Neste caso, para cada ciclo de pré-concentração/eluição o agente complexante é aplicado ao suporte sólido. Isto permitiu que todos os testes realizados desde o início do trabalho até sua finalização fossem realizados com uma única coluna com XAD16. Comparando-se sinais obtidos com esta coluna no início do trabalho com aqueles obtidos no seu final observou-se os mesmos resultados, demonstrando assim que não houve perda na eficiência da coluna.

Tendo em vista que o objetivo principal deste trabalho foi a montagem do sistema de pré-concentração, diversas configurações do equipamento, do software de controle, bem como dos parâmetros usados para testá-lo ainda podem ser alteradas tornando o sistema muito mais eficiente e versátil.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. DADFARNIA, S.; TALEBI, M.; SHABANI, A. M. H.; BENI, Z. A. Determination of lead and cadmium in different samples by flow injection atomic absorption spectrometry incorporating a microcolumn of immobilized ammonium pyrrolidine dithiocarbamate on microcrystalline naphthalene. **CCACAA**, 2007 ,v. 80, n. 1, p. 17-23.
2. ZHANG, Y.; RIBY, P.; COX, A. G.; MCLEOD, C. W. On-line pre-concentration and determination of lead in potable water by flow injection atomic absorption spectrometry. **The Analyst**, v. 113, n. 1, p. 125-128, 1988.
3. MENTASTI, E.; NICOLOTTI, A.; PORTA, V.; SARZANINI, C. Comparison of different pre-concentration methods for the determination of trace levels of arsenic, cadmium, copper, mercury, lead and selenium. **The Analyst**, v. 114, n. 9, p. 1113-1117, 1989.
4. RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow Injection analysis. Part I: A new concept of fast continuous flow analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 78, p. 145-157, 1975.
5. REIS, B. F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Quím. Nova**, jan. v. 19, n.1, p. 51-58, 1996.
6. RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. **Flow Injection Analysis**. John Wiley & Sons, New York, 1988.
7. SALADO, G. A.; PRADO FILHO, L. G. **Contaminação de alimentos por metais pesados. Revisão bibliográfica**. 1987, pag 127 – 149, Trabalho apresentado no Curso de Pós Graduação na disciplina de Química de Alimentos da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, SP.
8. NAMIESNIK, J. Trace Analysis - Challenges and Problems. Crit. Rev., **J. Anal. Chem.** , v. 32, n. 4, p. 271, 2002.
9. PRICHARD, E.; MACKAY, G. M.; POINTS J.; Traces Analysis: A structured approach to obtaining reliable results. UK: The Royal Society of Chemistry, 1996.
10. ORTNER, H. M.; Ultratrace analysis - facts and fiction. , **J. Anal. Chem.**, v. 343, p. 695, 1992.

11. ROCHA, A. S; **Desenvolvimento de sistemas de separação e pré-concentração para determinação de metais em águas naturais.** 2005, Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.
12. MORRISON, G. H.; FREISER, H. **Solvent extraction in Analytical Chemistry.** London, John Wiley & Sons, 1957
13. FAGUNDES, T; **Estudo da interação do polímero Quitosna-ferro (III) – R com íons inorgânicos em meio aquoso.** 2007, Tese de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em ciências farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC.
14. ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento da sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.
15. FRITZ, J.S., **Analytical Solid-Phase Extraction.** USA, John Willey & Sons, Inc.,1999.
16. MIZUIKE, A. Enrichment Techniques for Inorganic Trace Analysis. Berlin Geidelberg: Springer-Verlag, 1993.
17. JIMENEZ, M. S.; CASTILLO, J. R. Tandem preconcentration of cobalt by on-line ion Exchange and gás phase chelates generated by merging-zones flow injection analysis with electrothermal atomic absorption spectrometric determination. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 12, n. 12, p. 1397, 1997.
18. A, M. J. R.; MEDINA, A. R.; DIAZ, A. M.; New contributions to the field of bead-injection spectroscopy-flow-injection analysis: determination of cobalt. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 376, n. 4, 527, 2003.
19. KE, W. A.; BLISS, H.; Aplication of ion exchange – copper – Amberlite IR- 120 in fixed beds. **Chem. Eng. Prog.**, v. 46, n. 10, p. 509, 1950.
20. MARANON, E.; SASTRE, H.; Preconcentration and removal of trace-metals from water by apple waste. **Biores. Tech.**, v. 40, n. 1, p. 73, 1992.
21. BAUMAN, W. C.; SKIDMORE, J. R.; OSMUN, R. H. Dowex-50- A new hig capacity cation exchange resin. **Ind. Eng. Chem.**, v. 40, n. 8, p. 1350, 1948.
22. BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M.; CARRERO, P.; MARCANO, J.; RIVAS, C.; BRUNETTE, M. R. A fully automated flow-injection atomic-absorption system for the determination of copper traces in waters with on line pre-cocentration in an ion exchange column. **J. Aut. Chem.**, v. 17, n. 1, p. 25, 1995.

23. RAMA, M. J. R.; MEDINA, A. R.; DIAZ, A. M. New contributions to the field of bead-injection spectroscopy-flow-injection analysis: determination of cobalt. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 376, n. 4, p. 527, 2003.
24. REIS, B. F.; GUINÉ, M. F. & KRONKA, E. A. M. Análise química por injeção em fluxo contínuo. **Quím. Nova**, 12-82, 1989.
25. MARTÍNEZ-CALATAYUD, J. & GARCÍA-MATEO, J. V. Online solid-phase reactors for unsegmented continuous-flow drug analysis. **Trends Anal. Chem.** 12-428, 1993.
26. SUAREZ, T. W; **Desenvolvimento de Procedimentos Analíticos para a Determinação de N-acetilcisteína em Produtos Farmacêuticos.** 2005, Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCAR, São Carlos, SP.
27. ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B. & REIS, B. F. “Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo”. **Quím. Nova**, 23, 1-119, 2000.
28. CARRILHO, E.; MIRANDA, C. E. S. M.; GERVASIO, A. P. & GINÉ, M. F. Sistemas interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar (FIA-CE): desafios, aplicações e perspectivas, **Quím. Nova**, 25, 3- 412, 2002.
29. HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; Crouch, S. R. **Princípios de Análise Instrumental.** 6ª ed. Bookman, Porto Alegre, p. 17-20 e 732, 2009
30. ZAGATTO E, A, G; OLIVEIRA, C. C. & COLLINS, C. H. Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo recomendações a IUPAC . **Quím. Nova**, 22, p.143, 1999.
31. MORONA, F.; QUINAIA, S. P.; GANZAROLLI, E. M.; Aplicação de bombas de seringa para automação de metodologias analíticas – preconcentração de metais-traço a partir de matrizes aquosas. Trabalho apresentado no XIV EAIC (2005) - Universidade Estadual do Centro-Oeste - Guarapuava - PR
32. J. WANG, E. H. HANSEN, B. GAMMELGAARD; Flow injection on-line dilution for multi-element determination in human urine with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, 55, p. 117–126, 2001.
33. MALTEZ, H.F. **Desenvolvimento de metodologia em sistema em fluxo para especiação e determinação de cromo em água usando sílica gel modificada e espectrometria de absorção atômica em chama.** 2002, Dissertação de Mestrado em Química, Departamento de Pós-graduação em Química, UFSC.

34. BAIRD, C. Química Ambiental. 2ª edição. Porto Alegre. Editora Bookman, 2002.
35. LARINI, L.; Toxicologia. 3ª edição. Editora Manole Ltda, 1997.
36. MENDHAM, J.; DENNEY, R.C.; BARNES, J.D.; THOMAS, M.J.K. VOGEL. Análise Química Quantitativa. 5ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A. 1989, Traduzido por Afonso, et all.
37. VARIAN ANALYTICAL METHODS, Flame Atomic Absorption Spectrometry. Varian Australia Pty Ltd, Mulgrave Victoria, Australia.
38. TECHY, J. G; QUINAIA, S. P.; GANZAROLLI, E. M. Otimização de metodo analitico para detecção de Cd atraves de sistema de fluxo automatizado com diferentes adsorventes. Trabalho apresentado no EAIC 2008, Unioeste, Campos de Foz do Iguaçu, PR.
39. Manual of the user Cole-Parmer Dual Syringe Infusion Pump, disponível em <http://www.chinookmed.com/cgi-bin/writereview.cgi?item=700164&pass=0>, consultado em 20/06/2010.
40. FANG, Z. **Flow Injection Separation and Preconcentration**, VCH, New York, 1993.
41. SANTOS, A. F. J.; KORN, M. G. A.; Determinação de Mn, Cu e Zn em matrizes salinas após separação e pré-concentração usando Amberlite XAD-7 impregnada com vermelho de ilizarinas; Quim. Nova, Vol. 25, No. 6B, 1086-1090, 2002
42. Estrutura e Equilíbrio ácido-base do Verde de bromocresol, disponível em it.wikipedia.org/wiki/Verde_di_bromocresolo#cite_ref-0, consultado em 28/02/2011
43. PREVIDELLO, F. A. B. ; CARVALHO, R. F. de ; TESSARO, L. A.; SOUZA, R. V. de; Hioka, N.;. O pKa de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais. **Química Nova, Brasil**, v. 29, n. 3, p. 600-606, 2006.

ANEXO I

DESCRIÇÃO DO PROGRAMA DE CONTROLE

Descrição dos comandos utilizados para elaboração do programa de controle do sistema de pré-concentração. Sendo que o desenvolvimento destas rotinas foram feitas de modo intuitivo.

```

DECLARE SUB inicializacao ()
DECLARE SUB ajustaS23 ()
DECLARE SUB desativado ()
DECLARE SUB calibracaointerna ()
DECLARE SUB enderecos ()
DECLARE SUB parametrosI ()
DECLARE SUB entraparametros ()
DECLARE SUB destivado ()
DECLARE SUB telainicial ()
DECLARE SUB salvaparametros ()
DECLARE SUB zeraseringa1 ()
DECLARE SUB zeraseringa23 ()
DECLARE SUB ambientalizaS1 ()
DECLARE SUB cargaS23 ()
DECLARE SUB acionavalvulas ()
DECLARE SUB acionasinga1 ()
DECLARE SUB acionasinga23 ()
DECLARE SUB carregamostra ()
COMMON SHARED bas&, cont0&, cont1&, cont2&, contctr&, Lbyte&, Hbyte&
COMMON SHARED DIlow&, DIhigh&, intclear&, gain&, channel&, intctr&, trig&
COMMON SHARED DOlow&, DOhigh&, DOalto&, DObaixo
COMMON SHARED VLimpeza, constante, Etapa$
COMMON SHARED NAS '*** nova amostra ***
COMMON SHARED NA
COMMON SHARED carS23$
COMMON SHARED zera$
COMMON SHARED primed$
COMMON SHARED VCPXIS '*** volume complexante injetado (mL) ***
COMMON SHARED VazCpx$ ' *** vazao do complexante em mL/min ***
COMMON SHARED VazS23$ '*** vazao de S2 ***
COMMON SHARED VoluS23$ '*** volume de S2 ***
COMMON SHARED TAS23 ' *** tempo de acionamento de S23 ***
COMMON SHARED VAI# '*** Volume Amostra Injetado ***
COMMON SHARED VazAmos# '*** vazÆo amostra ***
COMMON SHARED VEF$ '*** volume eluente frontal ***
COMMON SHARED VEC$ '*** volume eluente injetado ***
COMMON SHARED VEP$ '*** volume eluente posterior ***
COMMON SHARED VazElu$ '*** vazÆo eluiÆo ***
COMMON SHARED VL '*** v lvulas ligadas ***
COMMON SHARED VTtotalS1, VTtotalS2
COMMON SHARED VoluS1#
COMMON SHARED VazS1#
COMMON SHARED TAS1#
COMMON SHARED VeloInv
COMMON SHARED MOS1$, MOS23$ '*** modo operacional de S1, S2
(sucÆo/injeÆo)***
COMMON SHARED S1AS2A '*** sensor1 aberto e sensor2 aberto ***

```

```

COMMON SHARED S1AS2F '*** sensor1 aberto e sensor2 fechado ***
COMMON SHARED S1FS2A '*** sensor1 fechado e sensor2 aberto ***
COMMON SHARED S1FS2F '*** sensor1 fechado e sensor2 fechado ***
COMMON SHARED V1, V2, V3, V4, V5, V6
COMMON SHARED i%, j%
COMMON SHARED decisao$, par$
COMMON SHARED VcicloS1, VcicloS23 '***
COMMON SHARED DiamInt$ '*** diametro interno da seringa em mm **
DIM SHARED bit(30)
DIM SHARED passoS1(20)

*****
'saida digital, pinos CN3: 1-16 = bits; 17, 18 = terra; 19 = +5V; 20 = +12V
'variaveis locais: DOalto&, DObaixo&
'variaveis globais: SaiDigital&, DOlow&, DOhigh&
*****
*
'DOalto& = SaiDigital& / 256
'DObaixo& = SaiDigital& - (256 * DOalto&)
'OUT DOlow&, DObaixo&
'OUT DOhigh&, DOalto&

' CALL inicializacao

decisao$ = "s"
DO WHILE (decisao$ = "s") OR (decisao$ = "S")

CALL calibracao interna
CALL enderecos
CALL parametros I
CALL entraparametros
CALL desativado

telainicial

CALL salvaparametros '*** parametros utilizados na ultima operacao ***

CALL ajustaS23

'-----
IF zera$ = "s" OR zera$ = "S" THEN
Etapa0:      '*** coloca seringas na posicao inicial (vazias) **
Etapa$ = " Etapa(0): zerando seringas 1 e 2/3 "
MOS1$ = "inj"      '*** modo operacional de injeção ***
MOS23$ = "inj"
VazS23$ = "4" '*** 3 mL/min ****
VL = 0
sensor = INP(DIlow&) '** Leitura dos sensores de posição ***
SELECT CASE sensor

```

```

CASE IS = S1AS2A ' = 255      *** ambos sensores abertos ***
CALL zeraseringal
CALL zeraseringa23
CASE IS = S1AS2F ' = 239      *** apenas sensor de S1 aberto ***
CALL zeraseringal
CASE IS = S1FS2A ' = 251      *** apenas sensor de S2 aberto ***
CALL zeraseringa23
CASE IS = S1FS2F ' = 235      *** ambos sensores fechados ***
carS23$ = "s"
END SELECT
ELSE
END IF

'-----
IF carS23$ = "s" OR carS23$ = "S" THEN
CALL cargaS23
END IF

'-----
IF primed$ = "s" OR primed$ = "S" THEN
*** limpeza da minicoluna com eluente ***
Etapa$ = "Etapa(0): limpeza da minicoluna com eluente - S3+V3+V4+V5"
MOS1$ = "D"      *** modo operacional de S1 ***
VoluS1# = 0
VazS1# = 0      *** vazao de eluicao para S1 ***
MOS23$ = "inj"   *** modo operacional de S2 ***
VoluS23$ = VEPS  *** volume posterior de eluente descartado por V6D ***
VazS23$ = VazElu$
TAS23 = (VAL(VoluS23$) / VAL(VazS23$)) * 60 *** Tempo Acionamento em segundos ***
VL = V3 OR V4 OR V5 *** define acionamento das vlvulas... ***
CALL acionasinga23
ELSE
END IF
primed$ = "n"
'-----

Etapa1: *** Injecao do complexante na minicoluna S23 + V2 ***
Etapa$ = "Etapa(1): Injecao do complexante na minicoluna - acionadas: S23+V2 "
MOS1$ = "D"      *** modo operacional de S1 ***
VoluS1# = 0      *** volume total de amostra injetado ***
VazS1# = 0
MOS23$ = "inj"   *** modo operacional de S2/3 ***
VoluS23$ = VCPXIS *** volume complexante pre-definido ***
VazS23$ = VazCpx$ *** vazao complexante pre-definida ***
TAS23 = (VAL(VoluS23$) / VAL(VazS23$)) * 60 *** Tempo Acionamento em segundos ***
VL = V2      *** define acionamento da vlvula 2 ***
CALL acionasinga23 *** acionamento S2/3 ***

'-----

```

```

IF NA$ = "S" OR NA$ = "s" THEN
  CALL ambientalizaS1 '** S1 com nova amostra **
END IF
'-----

etapa2:      '** captacao amostra **
Etapa$ = "Etapa(2): Carga de amostra em S1 "
MOS1$ = "suc"      '** modo operacional de S1 **
VoluS1# = VAI# + .7 '** volume (mL) para carregar S1 + excesso .7 mL **
VazS1# = VazAmos#  '** vazao de preenchimento da amostra **
MOS23$ = "D"
VoluS23$ = "0"
VazS23$ = "0"
VL = 0           '** nenhuma vlvula acionada-captacao por V1 **
CALL acionasingal '** preenchimento da seringa1 com amostra **
'-----

Etapa2fix:    '** coloca S1 posicao de partida **
Etapa$ = " Etapa(2fix): Coloca S1 posicao de partida "
MOS1$ = "inj"    '** para tirar folga na posicao de partida de S1 **
VoluS1# = .5     '** volume injetado para fixar posicao de partida **
VazS1# = VazAmos# '** vazao amostra em mL/min **
MOS23$ = "D"
VoluS23$ = "0"
VazS23$ = "0"
VL = 0
CALL acionasingal '** injecao do excesso de volta para frasco original **
'-----

CLS
PRINT " pressione qualquer tecla "
DO WHILE INKEY$ = ""
LOOP

Etapa3:      '** preconcentracao na minicoluna S1 + V1 **
Etapa$ = "Etapa(3): Preconcentracao em curso - acionadas: S1+V1 "
MOS1$ = "inj"    '** modo operacional de S1 **
VoluS1# = VAI#   '** volume total de amostra injetado **
VazS1# = VazAmos# '** vazao da amostra pr,-definida **
MOS23$ = "D"
VoluS23$ = "0"
VazS23$ = "0"
VL = V1         '** define acionamento da vlvulas 1 **
CALL acionasingal '** acionamento S1 **
'-----

Etapa3fix:    '** coloca S1 posicao de partida **
Etapa$ = "Etapa(3a): Coloca S1 posicao de partida "
MOS1$ = "suc"    '** modo operacional de S1 **
VoluS1# = .5     '** volume para fixar posicao de partida S1 **
VazS1# = VazAmos# '** vazao amostra pr,-definida **
MOS23$ = "D"    '** modo operacional de S2 **
VoluS23$ = "0"

```

```

VazS23$ = "0"
VL = 0          *** nenhuma vlvula acionada-captadao por V1 ***
CALL acionasinga1 *** acionamento para fixar posicao de partida ***
'-----
CLS
LOCATE 10, 10: PRINT " pressione qualquer tecla para iniciar eluicao"
DO WHILE INKEY$ = ""
LOOP
'-----
Etapa4:          *** eluicao simultanea com volume frontal de descarte ***
Etapa$ = "Etapa(4): Eluicao/Descarte do volume frontal de eluente - S23+V3+V4+V5 "
MOS1$ = "D"      *** modo operacional de S1 ***
VoluS1# = 0
VazS1# = 0      *** vazao de eluicao para S1 ***
MOS23$ = "inj"   *** modo operacional de S2 ***
VoluS23$ = VEF$ *** volume frontal de eluente descartado por V6D ***
VazS23$ = VazElu$
TAS23 = (VAL(VoluS23$) / VAL(VazS23$)) * 60*** Tempo Acionamento em segundos
***
VL = V3 OR V4 OR V5 *** define acionamento das vlvulas... ***
CALL acionasinga23 *** acionamento para eluicao com descarte frontal ***
'-----
Etapa5:          *** eluicao com amostragem minifunil ***
Etapa$ = "Etapa(5): Eluicao/Injecao do eluente no minifunil - S3+V3+V4+V5+V6"
MOS1$ = "D"      *** modo operacional de S1 ***
VoluS1# = 0
VazS1# = 0      *** vazao de eluicao para S1 ***
MOS23$ = "inj"   *** modo operacional de S2 ***
VoluS23$ = VEC$ *** volume injetado de eluente por V6L ***
VazS23$ = VazElu$
TAS23 = (VAL(VoluS23$) / VAL(VazS23$)) * 60*** Tempo Acionamento em segundos
***
VL = V3 OR V4 OR V5 OR V6 *** define acionamento das vlvulas... ***
CALL acionasinga23 *** acionamento para amostragem no minifunil ***
'-----
Etapa6:          *** Descarte do volume de eluente posterior ***
Etapa$ = "Etapa(6): Descarte do Volume de Eluente Posterior - S3+V3+V4+V5"
MOS1$ = "D"      *** modo operacional de S1 ***
VoluS1# = 0
VazS1# = 0      *** vazao de eluicao para S1 ***
MOS23$ = "inj"   *** modo operacional de S2 ***
VoluS23$ = VEP$ *** volume posterior de eluente descartado por V6D ***
VazS23$ = VazElu$
TAS23 = (VAL(VoluS23$) / VAL(VazS23$)) * 60*** Tempo Acionamento em segundos
***
VL = V3 OR V4 OR V5 *** define acionamento das vlvulas... ***
CALL acionasinga23
'-----
Etapa6fix:       *** coloca S23 posicao partida ***
Etapa$ = "Etapa(6fix): Coloca S23 posicao partida "
MOS1$ = "D"      *** modo operacional de S1 ***

```

```

VoluS1# = 0
VazS1# = 0      '*** vazao de eluiçao para S1 ***
MOS23$ = "suc"  '*** modo operacional de S2/3 ***
VoluS23$ = "0.2" '*** volume fixar posicao partida ***
VazS23$ = VazElu$

TAS23 = (VAL(VoluS23$) / VAL(VazS23$)) * 60'*** Tempo Acionamento em segundos
***

VL = 0          '*** define acionamento das v lvulas... ***
CALL acionasinga23
'-----
Etapa7: '*** refluxo do eluente contido na ponteira de injeçao ***
Etapa$ = "Etapa(7): Refluxo do eluente contido na ponteira injeçao "
MOS1$ = "D"     '*** modo operacional de S1 ***
VoluS1# = 0
VazS1# = 0      '*** vazao de eluiçao para S1 ***
MOS23$ = "suc"  '*** modo operacional de S2/3 ***
VoluS23$ = "0.07" '*** volume ponteira injeçao mL ***
VazS23$ = VazElu$
TAS23 = (VAL(VoluS23$) / VAL(VazS23$)) * 60'*** Tempo Acionamento em segundos
***

VL = V2 OR V4 OR V5 OR V6
CALL acionasinga23

PRINT " acione qualquer tecla"
DO WHILE INKEY$ = ""
LOOP

'-----
Etapa7fix:      '*** coloca S23 posiçao partida ***
Etapa$ = "Etapa(7fix): Coloca S23 posiçao partida "
MOS1$ = "D"     '*** modo operacional de S1 ***
VoluS1# = 0
VazS1# = 0
MOS23$ = "inj"  '*** modo operacional de S2/3 ***
VoluS23$ = "0.2" '*** volume para fixar posicao partida (mL) ***
VazS23$ = VazElu$
TAS23 = (VAL(VoluS23$) / VAL(VazS23$)) * 60'*** Tempo Acionamento em segundos
***

VL = 0          '*** define acionamento das v lvulas... ***
CALL acionasinga23
'-----
Etapa8: '*** descarte do residuo por V6 ***
Etapa$ = "Etapa(8): descarte residuo por V6 "
MOS1$ = "D"     '*** modo operacional de S1 ***
VoluS1# = 0
VazS1# = 0      '*** vazao de eluiçao para S1 ***
MOS23$ = "inj"  '*** modo operacional de S2 ***
VoluS23$ = "0.7" '*** volume e descartado por V6D ***
VazS23$ = VazElu$

```

TAS23 = (VAL(VoluS23\$) / VAL(VazS23\$)) * 60*** Tempo Acionamento em segundos

VL = V2 OR V4 OR V5

CALL acionasinga23

'-----

CLS

LOCATE 10, 10

INPUT ">>>>>> Continuar? (s/n): ", decisao\$

LOOP

END

SUB acionasinga1

*** vari veis locais: cont#, n Ciclos#, i%, VeloInv, a ***

*** vari veis globais: passoS1(), vazaoS1, constante, velocidade ***

*** vari veis globais: MOS1\$, VL, volumeS1, sensor

CLS : LOCATE 4, 5: PRINT Etapa\$

** ajuste de VeloInv pela equacao de Lorenz ***

' VeloInv = 491.977 + ((2 * 52612.993# / 3.14) * (.44099 / (4 * ((VazS1 - (-.4141)) ^ 2) + .44099 ^ 2)))

nciclos# = CINT(VoluS1# / VcicloS1) *** calibracao pr, via ***

*** ajuste de velocidade com base no timer ***

TAS1# = (VoluS1# / VazS1#) * 60*** Tempo Acionamento em segundos ***

VeloInv# = TAS1# / (nciclos# * 4#) *** tempo para cada passo **

LOCATE 8, 5: PRINT "MOS1 = ", MOS1\$

LOCATE 10, 5: PRINT "VoluS1 = "; VoluS1#, " mL"

LOCATE 12, 5: PRINT "VazS1 = "; VazS1#, " mL/min"

LOCATE 14, 5: PRINT "Decorrido: de"; nciclos#, " nciclos#"

LOCATE 16, 5: PRINT "TAS1# = "; TAS1#

LOCATE 18, 5: PRINT " VeloInv# = "; VeloInv#

OUT DOhigh&, VL ** aciona v lvulas com 8 bits mais significativos ***

IF (MOS1\$ = "inj") THEN *** sentido direto de movimento ***

cont# = 0 *** zeragem do contador de passos ***

sensor = INP(DIlow&) *** posicao vazia impede acionamento ***

DO UNTIL (cont# > nciclos#) OR (sensor = S1FS2F) OR (sensor = S1FS2A) ***
movimentacao direta ***

LOCATE 14, 15: PRINT cont#

cont# = cont# + 1

***** ajuste com base no contador Lorentz ***

' FOR i% = 4 TO 1 STEP -1

' FOR t = 1 TO VeloInv#: NEXT *** tempo de atraso***

' OUT DOlow&, passoS1(i%) ** 8 bits menos significativos ***

' OUT DOhigh&, VL ** 8 bits mais significativos ***

' NEXT

***** ajuste com base no timer *****

FOR i% = 4 TO 1 STEP -1

```

tempo# = TIMER
DO WHILE (TIMER - tempo#) < VeloInv#: LOOP
OUT DOlow&, passoS1(i%)  *** 8 bits menos significativos ***
OUT DOhigh&, VL *** 8 bits mais significativos ***
NEXT
sensor = INP(DIlow&)
LOOP
END IF

```

```

IF (MOS1$ = "suc") THEN ' *** sentido reverso de movimento**
cont# = 0  *** zeragem do contador de passos ***
DO UNTIL (cont# > nciclos#)
LOCATE 14, 15: PRINT cont#
cont# = cont# + 1
'***** ajuste de velocidade com base no contador ***
' FOR i% = 1 TO 4
' FOR t = 1 TO VeloInv#: NEXT *** tempo de atraso***
' OUT DOlow&, passoS1(i%) *** 8 bits menos significativos ***
' OUT DOhigh&, VL *** 8 bits mais significativos ***
' NEXT
'***** ajuste de velocidade com base no timer ****
FOR i% = 1 TO 4
tempo# = TIMER
DO WHILE (TIMER - tempo#) < VeloInv#: LOOP
OUT DOlow&, passoS1(i%)  *** 8 bits menos significativos ***
OUT DOhigh&, VL *** 8 bits mais significativos ***
NEXT
LOOP
END IF

```

```

OUT DOlow&, 0
OUT DOhigh&, 0

```

```

END SUB

```

```

SUB acionasinga23
CLS : LOCATE 4, 5: PRINT Etapa$

```

```

OPEN "COM2:9600,N,8,1,CD0,CS0,DS0,OP0,RS,TB2048,RB2048" FOR RANDOM AS
#2
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP
SELECT CASE MOS23$
CASE IS = "inj"
PRINT #2, "mode i"
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP
PRINT #2, "ratei " + VazS23$ + " ml/m"
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP
CASE IS = "suc"
PRINT #2, "mode w"
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP
PRINT #2, "ratew " + VazS23$ + " ml/m"

```



```

    tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP
CASE IS = "D"
    PRINT #2, "stop"
    tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP
END SELECT

```

```

LOCATE 8, 5: PRINT " MOS23 = "; MOS23$
LOCATE 10, 5: PRINT " VoluS23 = "; VoluS23$; " mL"
LOCATE 12, 5: PRINT " VazS23 = "; VazS23$; " mL/min"

```

```

OUT DOhigh&, VL  '** aciona v lvulas com 8 bits mais significativos ***
PRINT #2, "run"
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP
tempo = TIMER

```

```

sensor = INP(DIlow&)
DO UNTIL (TIMER - tempo) > TAS23 OR (sensor = S1FS2F) OR (sensor = S1AS2F) '**
Tempo de Acionamento de S23 ***
    sensor = INP(DIlow&)
    TD = CINT(TIMER - tempo) '*** Tempo Decorrido ***
    LOCATE 14, 5: PRINT " Decorrido:"; TD; " de "; TAS23; " seg"
LOOP
IF (sensor = S1FS2F) OR (sensor = S1AS2F) THEN
    PRINT #2, "stop"
    tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP
    CLOSE #2
    OUT DOlow&, 0
    OUT DOhigh&, 0
    carS23$ = "s"
    BEEP
    CALL telainicial
END IF

```

```

PRINT #2, "stop"
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP
CLOSE #2
OUT DOlow&, 0
OUT DOhigh&, 0

```

```

END SUB

```

```

SUB ajustaS23
OPEN "COM2:9600,N,8,1,CD0,CS0,DS0,OP0,RS,TB2048,RB2048" FOR RANDOM AS
#2
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP
PRINT #2, "dia " + DiamInt$  '*** diametro interno da seringa de 20 mL vidro BD ***
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP
CLOSE #2

```

END SUB

SUB ambientalizaS1

EtapaAmbS1a:

Etapa\$ = "Etapa(AmbS1a): AmbientalizaçÆo setor S1-V6D"

MOS1\$ = "inj" *** modo operacional de S1 ***

MOS23\$ = "D"

VoluS1# = 0

VoluS23 = 0

VazS1# = VazAmos# *** vazao amostra ***

VazS23 = 0

VL = V1 OR V4 OR V5 *** expulsao residuo amostra anterior ***

CALL zeraseringal *** esvazia S1 ***

'-----

EtapaAmbS1b:

Etapa\$ = "Etapa(AmbS1b): AmbientalizaçÆo setor S1-V6D"

MOS1\$ = "suc" *** modo operacional de S1 ***

MOS23\$ = "D"

VoluS1# = 1 + .7 ***

VoluS23 = 0

VazS1# = VazAmos# *** vazÆo de preenchimento da amostra ***

VazS23 = 0

VL = 0 *** nenhuma v lvula acionada-captaçÆo por V1 ***

CALL acionasingal *** preenchimento S1 com amostra ***

'-----

EtapaAmbS1c:

Etapa\$ = "Etapa(AmbS1c): AmbientalizaçÆo setor S1-V6D"

MOS1\$ = "inj" *** modo operacional de S1 ***

MOS23\$ = "D"

VoluS1# = 0

VoluS23 = 0

VazS1# = VazAmos# *** vazÆo de preenchimento da amostra ***

VazS23 = 0

VL = V1 OR V4 OR V5 *** nenhuma v lvula acionada-captaçÆo por V1 ***

CALL zeraseringal *** expulsao residuo por V6D ***

'-----

EtapaAmbS1d:

Etapa\$ = "Etapa(AmbS1d): AmbientalizaçÆo setor S1-V6D"

MOS1\$ = "suc" *** modo operacional de S1 ***

MOS23\$ = "D"

VoluS1# = 3 + .7

VoluS23 = 0

VazS1# = VazAmos# *** vazÆo de preenchimento da amostra ***

VazS23 = 0

VL = 0 *** nenhuma v lvula acionada-captaçÆo por V1 ***

CALL acionasingal *** preenchimento da seringa1 com amostra ***

'-----

EtapaAmbS1e:

Etapa\$ = "Etapa(AmbS1e): AmbientalizaçÆo setor S1-V6D"

MOS1\$ = "inj" *** modo operacional de S1 ***

MOS23\$ = "D"

```

VoluS1# = 0
VoluS23 = 0
VazS1# = VazAmos#   *** vazao de preenchimento da amostra ***
VazS23 = 0
VL = V1 OR V4 OR V5   *** nenhuma vlvula acionada-captada por V1 ***
CALL zerasinga1   *** expulsao residuo por V6D ***
'-----

```

```
END SUB
```

```
SUB calibracao interna
```

```
*** calibracao volume S1 (em mL) com nciclos# = 100
```

```
Media = (3.0392 + 3.044) / 2
```

```
VcicloS1 = Media / 100
```

```
END SUB
```

```
SUB cargaS23
```

```
** carrega seringas S2 e S3 com complexante e eluente respectivamente **
```

```
Etapa1a:
```

```
Etapa$ = "Etapa(0a): Carga complexante/eluente em S23"
```

```
MOS23$ = "suc"   *** modo operacional de S2 ***
```

```
VazS23$ = VazCpx$ ' *** vazao complexante pre-definida ***
```

```
VoluS23$ = "20"   *** volume de cplx/eluente total (20 mL) para S3 ***
```

```
VL = 0   *** nenhuma vlvula acionada-captada por V2 e V3 ***
```

```
CLS
```

```
LOCATE 4, 5: PRINT Etapa$
```

```
LOCATE 8, 5: PRINT " MOS23 = "; MOS23$
```

```
LOCATE 10, 5: PRINT " VoluS23 = "; VoluS23$; " mL"
```

```
LOCATE 12, 5: PRINT " VazS23 = "; "4,0"; " mL/min"
```

```
LOCATE 16, 5: PRINT " Acione qualquer tecla para prosseguir"
```

```
OPEN "COM2:9600,N,8,1,CD0,CS0,DS0,OP0,RS,TB2048,RB2048" FOR RANDOM AS #2
```

```
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP
```

```
PRINT #2, "mode w"
```

```
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP
```

```
PRINT #2, "ratew " + "4" + " ml/m"
```

```
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP
```

```
PRINT #2, "run"
```

```
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP
```

```
tempo = TIMER
```

```
*** 300 s para carga completa de S23 na vazao de 4 ml/min ***
```

```
DO WHILE ((TIMER - tempo) <= 300)   ** Tempo de Acionamento de S23 **
```

```
TD = CINT(TIMER - tempo) ' *** Tempo Decorrido ***
```

```
LOCATE 14, 5: PRINT " Decorrido: "; TD; " de "; 300; " seg"
```

```
IF INKEY$ <> "" GOTO go3
```

```
LOOP
```

```
go3:
```

```

PRINT #2, "stop"
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .7): LOOP
'-----
Etapa1afix:      *** posição de partida de S23
Etapa$ = "Etapa(1afix): Coloca S23 posição de partida"

PRINT #2, "mode i"
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .7): LOOP
PRINT #2, "ratei " + VazS23$ + " ml/m"
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .7): LOOP
PRINT #2, "run"
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .7): LOOP
TAS23 = (.4 / VAL(VazS23$)) * 60 *** Tempo Acionamento em segundos
tempo = TIMER
DO WHILE (TIMER - tempo) <= TAS23  ** Tempo de Acionamento de S23 ***
  TD = CINT(TIMER - tempo) ' *** Tempo Decorrido ***
  LOCATE 14, 5: PRINT " Decorrido: "; TD; " de "; TAS23; " seg"
LOOP
PRINT #2, "stop"
tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .7): LOOP
CLOSE #2

END SUB

SUB carregamostra

END SUB

SUB desativatudo
OUT DOlow&, 0
OUT DOhigh&, 0

END SUB

SUB enderecos
bas& = 544      'endereço base = &H220
cont0& = bas& + 0  'base + 0 = contador #0
cont1& = bas& + 1  'base + 1 = contador #1
cont2& = bas& + 2  'base + 2 = contador#2
contctr& = bas& + 3  'base + 3 = controle contador
Lbyte& = bas& + 4  'base + 4 = A/D Low Byte Data Format
Hbyte& = bas& + 5  'base + 5 = A/D High Byte Data Format
DIlow& = bas& + 6  'base + 6 = D/I low
DIhigh& = bas& + 7  'base + 7 = D/I low
intclear& = bas& + 8  'base + 8 = A/D clear interrupt request
gain& = bas& + 9  'base + 9 = controle do ganho
channel& = bas& + 10  'base + 10 = seleção de canal de entrada
intctr& = bas& + 11  'base + 11 = A/D controle de modo
trig& = bas& + 12  'base + 12 = gatilho do conversor AD

```

DOlow& = bas& + 13 'base + 13 = DO low byte
DOhigh& = bas& + 14 'base + 14 = DO high byte

END SUB

SUB entraparametros

OPEN "c:/basics/parametr/" + par\$ FOR INPUT AS #1'* parfmetros anteriores ***

INPUT #1, VCPXI\$
INPUT #1, VazCpx\$
INPUT #1, VAI#
INPUT #1, VazAmos#
INPUT #1, VEF\$
INPUT #1, VEC\$
INPUT #1, VEP\$
INPUT #1, VazElu\$
INPUT #1, NA\$

'INPUT #1, NA, VCPXI\$, VazCpx\$, VAI, VazAmos, VEF\$, VEC\$, VEP\$, VazElu\$
CLOSE #1

END SUB

SUB inicializacao

' *** esta subrotina so e acionada quando se altera a quantidade de parametros ***

OPEN "c:/basics/parametr/" + par\$ FOR OUTPUT AS #1'* parfmetros anteriores ***

NA = 0
VCPXI\$ = "i"
VazCpx\$ = "i"
VAI = 0
VazAmos = 0
VEF\$ = "i"
VEC\$ = "i"
VEP\$ = "i"
VazElu\$ = "i"

PRINT #1, VCPXI\$
PRINT #1, VazCpx\$
PRINT #1, VAI
PRINT #1, VazAmos
PRINT #1, VEF\$
PRINT #1, VEC\$
PRINT #1, VEP\$
PRINT #1, VazElu\$
PRINT #1, NA\$

CLOSE #1

END SUB

SUB parametrosI

```
bit(1) = 1: bit(2) = 2: bit(3) = 4: bit(4) = 8: bit(5) = 16: bit(6) = 32
bit(7) = 64: bit(8) = 128: bit(9) = 256: bit(10) = 512: bit(11) = 1024
bit(12) = 2048: bit(13) = 4096: bit(14) = 8192: bit(15) = 16384
bit(16) = 32768
passoS1(1) = bit(1)
passoS1(2) = bit(2) 'OR bit(2)
passoS1(3) = bit(3)
passoS1(4) = bit(4) 'OR bit(3)
```

```
'passoS1(5) = bit(3)
'passoS1(6) = bit(3) 'OR bit(4)
'passoS1(7) = bit(4)
'passoS1(8) = bit(4) 'OR bit(1)
```

```
V1 = bit(1)
V2 = bit(2)
V3 = bit(3)
V4 = bit(4)
V5 = bit(5)
V6 = bit(6)
V7 = bit(7)
V8 = bit(8)
```

```
S1AS2A = 255
S1FS2A = 251
S1AS2F = 239
S1FS2F = 235
```

```
par$ = "precbs4.par"
```

```
*** parametros da bomba de seringa cole-parmer
DiamInt$ = "19.13" ' *** (em mm para seringa vidro BD ) ***
'diametro original (tabelado) = 19.13
END SUB
```

```
SUB salvaparametros
OPEN "c:/basics/parametr/" + par$ FOR OUTPUT AS #1 '* parfmetros anteriores ***
```

```
PRINT #1, VCPXI$
PRINT #1, VazCpx$
PRINT #1, VAI#
PRINT #1, VazAmos#
PRINT #1, VEF$
PRINT #1, VEC$
PRINT #1, VEP$
PRINT #1, VazElu$
PRINT #1, NAS
```

```
CLOSE #1
```

END SUB

SUB telainicial

zera\$ = "n"

carS23\$ = "n"

primed\$ = "n"

Npar\$ = "22"

DO UNTIL Npar\$ = ""

CLS

IF NA = 1 THEN

NA\$ = "s"

ELSE

NA\$ = "n"

END IF

LOCATE 2, 6: PRINT "(1) Volume Complexante Injetado Atual = "; VCPXIS\$; " mL"

LOCATE 3, 6: PRINT "(2) Vazao do complexante atual = "; VazCpx\$; " mL/min"

LOCATE 4, 6: PRINT "(3) Volume Amostra Injetado Atual = "; VAI#; " mL"

LOCATE 5, 6: PRINT "(4) Vazao de amostra Atual = "; VazAmos#; " mL/min"

LOCATE 6, 6: PRINT "(5) Volume de Eluente Frontal Atual = "; VEF\$; " mL"

LOCATE 7, 6: PRINT "(6) Volume de Eluente Coletado Atual = "; VEC\$; " mL"

LOCATE 8, 6: PRINT "(7) Volume de Eluente Posterior Atual = "; VEP\$; " mL"

LOCATE 9, 6: PRINT "(8) Vazao de eluição Atual = "; VazElu\$; " mL/min"

LOCATE 10, 6: PRINT "(9) Nova Amostra = "; NA\$

LOCATE 11, 6: PRINT "(10) Zerar seringas = "; zera\$

LOCATE 12, 6: PRINT "(11) Carga seringas 2/3 = "; carS23\$

LOCATE 13, 6: PRINT "(12) Primeira medida = "; primed\$

LOCATE 15, 6: PRINT "=>>> <enter> para continuar"

LOCATE 16, 6: PRINT "=>>> Numero + <enter> para alterar parametro "

LOCATE 17, 6: INPUT "=>>> "; Npar\$

SELECT CASE Npar\$

CASE IS = "1"

LOCATE 20, 6: INPUT "(1) Volume Complexante injetado atual (mL) = "; VCPXIS\$

CASE IS = "2"

LOCATE 20, 6: INPUT "(2) Vazao complexante(mL/min) = "; VazCpx\$

CASE IS = "3"

LOCATE 20, 6: INPUT "(3) Volume Amostra Injetado (mL) = "; VAI#

CASE IS = "4"

LOCATE 20, 6: INPUT "(4) Vazao de amostra (0,1 - 5,0 mL/min) = "; VazAmos#

CASE IS = "5"

LOCATE 20, 6: INPUT "(5) Volume de Eluente Frontal = "; VEF\$

CASE IS = "6"

LOCATE 20, 6: INPUT "(6) Volume de Eluente Coletado = "; VEC\$

CASE IS = "7"

LOCATE 20, 6: INPUT "(7) Volume de Eluente Posterior = "; VEP\$

CASE IS = "8"

LOCATE 20, 6: INPUT "(8) Vazao de eluição (mL/min) = "; VazElu\$

CASE IS = "9"

LOCATE 20, 6: INPUT "(9) Nova Amostra (s/n) "; NA\$

```

IF NA$ = "s" OR NA$ = "S" THEN
  NA = 1
ELSE
  NA = 0
END IF
CASE IS = "10"
LOCATE 20, 6: INPUT "(10) Zerar seringas (s/n) "; zera$
CASE IS = "11"
LOCATE 20, 6: INPUT "(11) Carga Seringas 2/3 (s/n) "; carS23$
CASE IS = "12"
LOCATE 20, 6: INPUT "(12) Primeira medida (s/n) "; primed$

END SELECT

LOOP

END SUB

SUB zeraseringal
Etapa$ = "zeraseringal"
CLS : LOCATE 5, 10: PRINT Etapa$
LOCATE 7, 10: PRINT "Decorrido:   ", "s"
LOCATE 9, 10: PRINT " Acione qualquer tecla para prosseguir"

'*** ajuste de VeloInv pela equacao de Lorenz ***
' VeloInv = 491.977 + ((2 * 52612.993# / 3.14) * (.44099 / (4 * ((VazS1 - (-.4141)) ^ 2) + .
44099 ^ 2)))

'*** ajuste de velocidade com base no timer ***
VeloInv# = .2 '*** tempo para cada passo **

OUT DOhigh&, VL '*** aciona v lvulas com 8 bits mais significativos ***
tempo = TIMER
sensor = INP(DIlow&)
DO UNTIL (sensor = S1FS2F) OR (sensor = S1FS2A) '*** aciona at, atingir sensor ***
  LOCATE 7, 25: PRINT CINT(TIMER - tempo)
  FOR i% = 4 TO 1 STEP -1
    tempo# = TIMER
    DO WHILE (TIMER - tempo#) < VeloInv#: LOOP
    OUT DOlow&, passoS1(i%)
    OUT DOhigh&, VL '*** 8 bits mais significativos ***
  NEXT
  sensor = INP(DIlow&)
  IF INKEY$ <> "" GOTO go1
LOOP
go1:
OUT DOlow&, 0
OUT DOhigh&, 0

```


END SUB

SUB zeraseringa23

Etapa\$ = "zeraseringa23"

CLS : LOCATE 5, 10: PRINT Etapa\$

LOCATE 7, 10: PRINT "Decorrido: ", "s"

LOCATE 9, 10: PRINT " Acione qualquer tecla para prosseguir"

OPEN "COM2:9600,N,8,1,CD0,CS0,DS0,OP0,RS,TB2048,RB2048" FOR RANDOM AS #2

tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP

PRINT #2, "mode i" '*** modo injecao para S2/3 ***

tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP

PRINT #2, "ratei " + VazS23\$ + " ml/m"

tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP

PRINT #2, "run"

tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP

sensor = INP(DIlow&)

tempo = TIMER

DO UNTIL (sensor = S1FS2F) OR (sensor = S1AS2F) '** aciona at, atingir sensor ***

LOCATE 7, 25: PRINT CINT(TIMER - tempo)

sensor = INP(DIlow&)

IF INKEY\$ <> "" GOTO go2

LOOP

go2:

PRINT #2, "stop"

tempo = TIMER: DO WHILE (TIMER - tempo < .5): LOOP

CLOSE #2

OUT DOlow&, 0

OUT DOhigh&, 0

END SUB