UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JEFERSON ALVES BARRETO

Um novo e rápido sistema de pré-concentração em linha automatizado usando duplo reator enovelado para a determinação de chumbo e manganês em amostras de chás por FAAS

JEQUIÉ-BA

Março - 2016

JEFERSON ALVES BARRETO

Um novo e rápido sistema de pré-concentração em linha automatizado usando duplo reator enovelado para a determinação de chumbo e manganês em amostras de chás por FAAS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra

Co-orientador: Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos

JEQUIÉ-BA

Março - 2016

Barreto, Jeferson Alves.

B263 Um novo e rápido sistema de pré-concentração em linha automatizado usando duplo reator enovelado para a determinação de chumbo e manganês em amostras de chás por FAAS/Jeferson Alves Barreto.- Jequié, UESB, 2016.

94 f: il.; 30cm. (Anexos)

Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Química)- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2016. Orientador: Profº. Drº. Marcos de Almeida Bezerra.

1. Mn e Pb em amostras de chás – Desterminação por espectrometria de absorção atômica com chama 2. Reator

TERMO DE APROVAÇÃO

JEFERSON ALVES BARRETO

Um novo e rápido sistema de pré-concentração em linha automatizado usando duplo reator enovelado para a determinação de chumbo e manganês em amostras de chás por FAAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM **14/03/2016.**

Comissão Examinadora:

Marcos de Almeida Bezerra

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra (UFBA, Salvador-BA, 2006)
(Orientador)

Djalma Menezes de Oliveira

Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira (UFMG, Belo Horizonte-MG, 2012)

Rennan Geovanny Oliveira Araujo

Prof. Dr. Rennan Geovanny Oliveira Araújo (UFBA, Salvador-BA, 2007)

Dedico este trabalho a minha família, na qual todos os meus sonhos são inspirados , a todos os meus professores e amigos, dedico com carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por sua imensa graça derramada sobre mim, por todos os seus feitos em minha vida, por não me deixar desistir em momentos difíceis da vida, por me guiar em tudo que faço e por me fazer um vitorioso.

Ao Professor Dr. MARCOS DE ALMEIDA BEZERRA, pela valiosa orientação, amizade, paciência, dedicação, e por confiar em mim. Agradeço por poder caminhar lado a lado e aprender um pouco do seu grande conhecimento.

Ao Professor Dr. VALFREDO AZEVEDO LEMOS, por sempre está disponível a ajudar, por me fazer acreditar na capacidade que possuo. Jamais esquecerei este grande mestre.

A minha família, em especial aos meus pais GILDEVANDO E DINALVA, que sempre estão a luta pelos seus, obrigado mesmo por tudo que vocês representam na minha vida.

A minha namorada FERNANDA, pelas palavras de apoio nos momentos difíceis, por entender que o que faço é para o nosso melhor. A toda sua FAMÍLIA por serem pessoas incríveis e unidas.

Aos AMIGOS E COLEGAS do LQA, em especial a ANALÚ, LUCILIA, UILLIAN, JOÃO, LÉO, GISSELI e ELIZABETH pela valiosa ajuda na produção deste trabalho.

Ao grande RAFAEL (Rafa) pela valiosa ajuda na programação do sistema, e por ser uma pessoa tão prestativa.

Aos PROFESSORES do programa de pós-graduação e graduação pelos conhecimentos transmitidos.

À UESB e todos os amigos e colegas conquistados, pelo constante carinho. Aos funcionários da UESB, pelos serviços prestados.

Ao PROGRAMA de Pós-graduação em Química. A CAPES pela bolsa concedida, que foi de extrema valia, afinal esse era meu trabalho.

A BANCA por ter aceitado avaliar este trabalho, e poder contribuir para que ele fique melhor.

A TODOS que direta ou indiretamente contribuíram por mais esta etapa vencida.

Se, porém, algum de vós necessita de sabedoria, peça-a a Deus, que a todos dar liberalmente e nada lhe impropera; e ser-lhe-á concedida.

Tiago 1.5 Bíblia Sagrada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do planejamento Doehlert para duas variáveis. 30

Figura 2. Planejamentos Doehlert para três variáveis originados por deferentes projeções planas do cuboctaedro.....31

Figura 3. Pontos experimentais obtidos para a matriz de Box-Behnken a partir de um planejamento fatorial de três níveis para três variáveis.....32

Figura 4. Representação espacial do planejamento Box-Behnken de um cubo para três variáveis. 32

Figura 5. Representação gráfica do desenho composto central para duas varáveis. 34

Figura 6. Representação gráfica do desenho compostos central para três variáveis. 34

Figura 7. Esquema de sistemas FIA desenvolvidos por pesquisadores brasileiros, Ferreira (1,2); Zagatto (3) e Lemos (4). S: Amostra; E: Eluente; P: Bomba Peristáltica; C: Coluna; W: Descarte; V: Válvula; CR: Carreador; L: Loop 36

Figura 8. Imagem de um reator enovelado de PTFE com 200 cm. Fonte: Acervo de fotos do autor 38

Figura 9. Estrutura química do Br-PADAP. 44

Figura 10. Sistema usado na digestão ácida das amostras de folhas chás e material de referência certificado. Fonte: Acervo de fotos do autor 52

Figura 11. Demonstração das etapas de construção de um reator enovelado. Fonte: Acervo de fotos do autor 52

Figura 12. Imagem do sistema de pré-concentração em linha em uma visão geral. Fonte: Acervo de fotos do autor 53

Figura 13. Sistema de pré-concentração em linha automatizado para determinação de Mn^{2+} e Pb^{2+} utilizando duplo reator enovelado. Fonte: Acervo de fotos do autor .54

Figura 14. Esquema da parte elétrica envolvendo (1) computador, (2) fonte, (3) arduino, (4) circuito integrado, (5) diodo Zenner e as (6) válvulas solenóides. Fonte: Acervo de fotos do autor 58

Figura 15. (A) Reação de complexação do Mn^{2+} e Pb^{2+} pelo Br-PADAP, e (B) interação do complexo hidrofóbico com a parede do reator enovelado. Fonte: Acervo de fotos do autor 61

Figura 16. Influência do volume de Br-PADAP 0,01% (m/v) adicionado na amostra para a pré-concentração de Mn^{2+} e Pb^{2+} usando o sistema de pré-concentração

proposto. pH: 9,0 ; vazão de amostragem (VA): 10,0 mL min^{-1}; concentração de eluente (HCl): 1,0 mol L^{-1}. 62

Figura 17. Influência do tempo na pré-concentração de Mn^{2+} e Pb^{2+} usando o sistema de pré-concentração em linha.....63

Figura 18. Gráfico de pareto para as variáveis estudadas usando o planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} no sistema de pré-concentração de Mn. 66

Figura 19. Gráfico de pareto para as variáveis estudadas usando o planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} no sistema de pré-concentração de Pb. 66

Figura 20. Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) para pH x CT na determinação de Mn.....69

Figura 21. Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) para pH x VA na determinação de Mn.....70

Figura 22. Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) para pH x VA na determinação de Pb. 71

Figura 23. Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) para pH x CT na determinação de Pb. 72

Figura 24. Curvas analíticas com o sistema de pré-concentração proposto (A) e na medida direta (B) na determinação de Mn. 76

Figura 25. Curvas analíticas com o sistema de pré-concentração proposto (A) e na medida direta (B) na determinação de Pb. 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros operacionais do espectrômetro de absorção atômica com chama para a determinação de Mn e Pb. 48

Tabela 2. Condições experimentais iniciais utilizadas no sistema em linha automatizado para a pré-concentração de Mn^{2+} e Pb^{2+}. 56

Tabela 3. Funções utilizadas para o controle das válvulas solenóides gravadas na placa arduino após a programação para o trabalho proposto. 59

Tabela 4. Fatores e seus níveis experimentais estabelecidos para o planejamento fatorial fracionário 2^{5-1}. 64

Tabela 5. Matriz e resultados do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para a determinação de Mn e Pb.....65

Tabela 6. Matriz Doehlert para três variáveis na otimização do sistema para Mn e Pb. 68

Tabela 7. Condições otimizadas do sistema em linha automatizado para pré-concentração e determinação de Mn e Pb usando reator enovelado por FAAS. 73

Tabela 8. Interferentes de Mn^{2+} (50 μg L^{-1}) e Pb^{2+} (200 μg L^{-1}), foram considerados interferentes o íon concomitante que alterou o sinal analítico em ± 10% no sinal de absorvância. 74

Tabela 9. Dados relativos às curvas de calibração obtidas. 77

Tabela 10. Principais parâmetros analíticos do método proposto. 81

Tabela 11. Ensaios de adição e recuperação de Mn e Pb em folhas de chás usando o método proposto, com o intervalo de 95% de confiança (n=3). 82

Tabela 12. Determinação de Mn em amostras de chás comerciais usando o sistema de pré-concentração proposto.....83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

Br-PADAP: 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol;

CE: Concentração do eluente;

CR: Concentração do Reagente;

DOU: Diário Oficial da União;

DPR: Desvio Padrão Relativo;

EC: Eficiência de Concentração;

FA: Frequência Analítica/de Amostragem;

FAAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*;

FE: Fator de Enriquecimento;

FIA: Análise com Injeção em Fluxo, do inglês *Flow Injection Analysis*;

GFAAS: Espectrometria de Absorção Atômica com forno de grafite, do inglês *graphite furnace Atomic Absorption Spectrometry*;

HCL: Lâmpada de Cátodo Oco, do inglês *Hollow Cathode Lamp*;

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high-performance liquid chromatography;*

IC: Índice de Consumo;

ICP OES: Espectrometria de Emissão Ótica com plasma Indutivamente acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*;

ICP-MS: Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado; do inglês *Mass Spectrometry Inductively Coupled Plasma*;

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry;*

LD: Limite de Detecção;

LQ: Limite de Quantificação;

MME: Ministério de Minas e Energia;

MSR: Metodologia de Superfícies de Resposta;

NIST: National Institute of Standards and Technology;

PAN: 1-(2-Piridilazo)-2- Nafitol;

PAR: 4-(2-piridilazo)resorcinol;

PONPE 7,5: Polietilenoglicolmono-p-nonilfeniléter;

PTFE: Politetrafluoretileno;

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada;

RE: Reator Enovelado;

REC: Recuperação;

SFA: Análise em Fluxo Segmentada, do inglês *Analysis Segmented Flow*;

SIA: Análise com Injeção Sequencial, do inglês *sequential injection analysis*;

TAC: 2,2'-Tiazolilazo-p-Cresol;

USB: Porta Universal, do inglês *Universal Serial Bus*;

VA: Vazão de amostragem.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: LD = 3 x S_{Br} / b 77

Equação 2: LQ = 10 x S_{Br} / b 78

Equação 3: FE = b_p/ b_s 78

Equação 4: EC = FE x f/60 79

Equação 5: IC = V_a (mL)/FE 79

Equação 6: DPR% = S_c/X_c x 100 80

Equação 7: Rec.% = C_1 – C_2/C_3 x 100 81

Um novo e rápido sistema de pré-concentração em linha automatizado usando duplo reator enovelado para a determinação de chumbo e manganês por FAAS em amostras de chás

Autor: Jeferson Alves Barreto

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra

Co-orientador: Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos

RESUMO: No presente trabalho, um sistema de pré-concentração em linha automatizado com base no uso de dois reatores enovelados foi desenvolvido para a determinação de Mn e Pb em amostras de chás por espectrometria de absorção atômica com chama. A automação do sistema foi realizada pelo uso de quatro válvulas solenóides para comutar os fluxos de amostra e reagentes. As válvulas foram acionadas eletronicamente por um circuito integrado de transistores Darlington e controlada por uma plataforma de hardware Arduino de código aberto escrito em linguagem C. O processo de pré-concentração baseia-se na adsorção dos íons Mn^{2+} e Pb^{2+} complexados com o 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (Br-PADAP) nas paredes internas do reator, seguido da eluição com solução de ácido clorídrico. A otimização das variáveis deste sistema foi desenvolvida utilizando otimização univariada, planejamento fatorial fracionário de dois níveis e planejamento Doehlert. O sistema otimizado permite a determinação de Mn e Pb com limites de detecção de 2,1 e 7,2 $\mu g\ L^{-1}$; precisão (%RSD, 50,0 $\mu g\ L^{-1}$) de 2,6 e 6,7% e fatores de enriquecimento de 8 e 10, respectivamente. O sistema apresentou uma frequência de amostragem de 60 h^{-1}. A exatidão do método foi avaliada pela análise de amostra de referencia certificada de Folhas de Maçã (NIST 1515) e pelo teste de adição e recuperação. Apenas o Mn apresentou exatidão adequada. O método foi aplicado na determinação de Mn em amostras de chás comerciais adquiridas em um comércio da cidade de Jequié-BA. Encontrou-se teores de Mn numa faixa de concentração de 2,95 a 123 $\mu g\ g^{-1}$. O método não foi aplicado na determinação de chumbo nessas amostras, devido aos seus valores não serem satisfatórios na validação.

Palavras-chave: Duplo reator enovelado, sistema em linha automatizado, multicomutação, Mn, Pb, FAAS.

A new and fast online automated preconcentration system using double knotted reactor for the determination of lead and manganese in tea samples by FAAS

Author: Jeferson Alves Barreto
Advisor: Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra
Co-advisor: Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos

ABSTRACT: In the present work, an online automated preconcentration system based on the use of two knotted reactors was developed for the determination of Mn and Pb from tea samples by flame atomic absorption spectrometry. The system automation was realized by use of four solenoid valves to switch the flow of sample and reagents. The valves were electronically operated by an integrated circuit of Darlington transistors and controlled by an Arduino hardware platform of open code written in C language. The pre-concentration process is based on the adsorption of Mn^{2+} and Pb^{2+} complexed with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-dietilaminophenol (Br-PADAP) and adsorption on the internal walls of the reactor, followed by elution with hydrochloric acid solution. The variables optimization of this system was developed using univariate optimization, two levels fractional factorial design and Doehlert design. The optimized system allows the determination of Mn and Pb with detection limits of 2.1 and 7.2 μg L^{-1}; Precision (% RSD, 50.0 ug L^{-1}) of 2.6 and 6.7% and enrichment factors of 8 and 10 respectively. The system has presented a sampling frequency of 60 h^{-1}. The accuracy of the method was evaluated by analysis of the certified reference material of Apple Leaves (NIST 1515) and addition and recovery tests. Only Mn showed adequate accuracy. The method was applied in the determination of Mn in samples of commercial teas acquired in a trade of the city of Jequié-BA It was found Mn content in a range of concentrations from 2.95 to123 ug g^{-1}. The method has not been applied to the determination of lead in these samples due to their values are not satisfactory validation.

Keywords: Double Knotted Reactor, online automated system, multi commutation, Mn, Pb, FAAS.

SUMÁRIO

1 - Fundamentação teórica.....19
1.1 Aspectos gerais e toxicidade do chumbo e do manganês.....20
1.1.1 Chumbo.....20
1.1.2 Manganês 21
1.1.3 Determinação de chumbo e manganês em amostras de chás 23
1.2 Planejamentos multivariados.....25
1.2.1 Introdução 25
1.2.2 Planejamentos fatoriais de dois níveis 25
1.2.2.1 Planejamento fatorial de dois níveis completo 26
1.2.2.2 Planejamento fatorial fracionário.....27
1.2.3 Metodologia de superfície de resposta.....28
1.2.3.1 Planejamento Doehlert.....29
1.2.3.2 Planejamento Box-Behnken.....31
1.2.3.3 Planejamento Composto Central 33
1.3 Sistema de análise por injeção em fluxo automatizado.....35
1.4 Reator enovelado 38
1.4.1 Aspectos gerais.....38
1.1.2 Princípios envolvidos na formação do precipitado ou complexo e a etapa de eluição 39
1.1.3 Vantagens e limitações 41
1.1.4 Reatores enovelados aplicados a sistemas de pré-concentração em linha .41
1.5 O reagente Br-PADAP.....44
2 – Objetivos 45
2.1 Objetivo geral 46
2.2 Objetivos específicos.....46
3 – Parte Experimental.....47
3.1 Instrumentação.....48
3.2 Materiais utilizados 48
3.3 Reagentes.....49

3.4 Soluções 50

3.5 Coleta e armazenamento das amostras 51

3.6 Preparo da amostra 51

3.7 Confecção dos reatores enovelados 52

3.8 Procedimento do sistema em linha automatizado proposto para a pré-concentração de Mn^{2+} e Pb^{2+} 53

3.9 Procedimentos da otimização univariada e multivariada 55

3.10 Condições experimentais iniciais do sistema de pré-concentração em linha automatizado 55

4 – Resultados e discussão 57

4.1 Programação do sistema em linha automatizado usando arduino 58

4.2 Reação envolvida na formação do complexo e adsorção 60

4.3 Otimização univariada do sistema de pré-concentração 62

4.3.1 Estudo do volume de Br-PADAP 62

4.3.2 Estudo do tempo de pré-concentração 63

4.4 Otimização multivariada do sistema de pré-concentração 64

4.4.1 Planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} 64

4.4.2 Planejamento Doehlert para três varáveis 67

4.5 Estudo dos interferentes 74

4.6 Validação do método analítico 75

4.6.1 Linearidade 75

4.6.2 Limite de detecção e quantificação 77

4.6.3 Fator de enriquecimento 78

4.6.4 Frequência de amostragem 79

4.6.5 Eficiência de concentração 79

4.6.7 Índice de consumo 79

4.6.8 Precisão 80

4.6.9 Exatidão 81

4.7 Aplicação do método em amostras de chás comerciais 83

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 84

REFERÊNCIAS 86

INTRODUÇÃO

Os elementos metálicos representam um grupo muito importante de espécies químicas e suas determinações em matrizes ambientais, biológicas e alimentos são de grande interesse para a sociedade, pois seus excessos e faltas podem trazer malefícios para o homem, meio-ambiente, biota, etc.

O chumbo pertence ao bloco p e grupo 14 da tabela periódica [1], não apresenta nenhuma essencialidade para o ser humano, sendo considerado altamente tóxico acumulando-se no organismo, proporcionando vários problemas tais como: neurológicos, hematológicos, endocrinológicos, renais, carcinogênicos, cardiovasculares, gastrointestinais e hepáticas [4].

O manganês é um elemento essencial para seres vivos, desempenhando um papel importante na função do sistema nervoso, mineralização dos ossos, no metabolismo energético e de proteínas, regulação metabólica e proteção celular. Entretanto, a exposição crônica a este metal, principalmente durante estágios embrionários ou pós-natais, pode induzir diversos eventos tóxicos, onde o sistema nervoso central é o alvo principal. Uma alta exposição ao manganês tem sido associada a doenças tais como Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson, esquizofrenia, e autismo [6]. Em humanos efeitos agudos e crônicos podem ser gerados devidos a exposição de altas concentrações deste elemento, como tosse seca, náusea, dor de cabeça, fadiga, dispnéia, tremores, bronquite entre outros [3].

A determinação de Mn e Pb em amostras de chás é oportuna, pois esta bebida está ligada a dieta dos seres humanos demandando abordagens mais rápidas, sensíveis e eficazes na quantificação destes metais. Diversas técnicas analíticas tais como FAAS, GFAAS, ICP OES, ICP-MS entre, outras apresentam sensibilidade na determinação de metais em amostras de bebidas. No FAAS a depender do nível em que estes metais se apresentam, normalmente pode requerer uma etapa prévia de pré-concentração. Os reatores enovelados confeccionados de politetrafluoretileno (PTFE) vem sendo utilizados como dispositivo usado para separar e/ou pré-concentrar espécies metálicas com auxílio de reagentes precipitantes e/ou complexantes, visando principalmente no aumento da sensibilidade de técnicas analíticas [62,63,64,67].

A automação de métodos analíticos total ou parcial em sistemas de multicomutação com válvulas solenóides em análise por injeção em fluxo se destacam por apresentar várias vantagens tais como: a redução da contaminação da amostra e reagentes, aumento da frequência de amostragem, diminuição da dispersão das soluções levadas ao detector e diminuição de erros analíticos.

Com isso (com sistemas automatizados), otimizar métodos analíticos fica cada vez mais favorável, ainda mais com o uso de técnicas de planejamentos experimentais multivariados que executa os experimentos simultaneamente e ainda permite verificar as interações entre as variáveis estudadas, além de ser mais efetivo e econômico [13], dentre estes planejamentos, o planejamento fatorial fracionário e o planejamento Doehlert, são bastantes utilizados.

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um novo e rápido sistema de pré-concentração em linha automatizado utilizando um duplo reator enovelado para a determinação de Mn e Pb em amostras de chás por espectrometria de absorção atômica com chama.

1 - Fundamentação teórica

1.1 Aspectos gerais e toxicidade do chumbo e do manganês

1.1.1 Chumbo

O chumbo (Pb), elemento metálico que se apresenta em um dos grupos mais importantes da tabela periódica, por causa do carbono (C) que é base da vida e o silício (Si) que é vital para a estrutura física do meio ambiente sob a forma das rochas da crosta terrestre. Possui número atômico 82 e massa molar igual a 207,2 g mol^{-1}. A temperatura ambiente, o chumbo encontra-se no estado sólido, seu ponto de fusão é 327,4 °C. Nos compostos inorgânicos apresentam os estados de oxidação +2 e +4, sendo que o +2, o estado de oxidação mais comum, devido a um efeito do par inerte na configuração eletrônica que lhe confere esta estabilidade. A galena é o principal minério de chumbo [1].

Em torno de 55% do chumbo produzido no mundo são utilizados na fabricação de baterias e acumuladores de chumbo/ácido. Nas baterias as placas de suporte para os eletrodos são fabricadas com uma liga constituída de 91% de Pb e 9 % de Sb. Cerca de 15% da produção de chumbo são empregadas na fabricação de placas, tubulações e soldas. O óxido Pb_3O_4 é usado como pigmento vermelho em tintas antiferrugem (zarcão) e $Pb(OH)_2$ era antigamente muito usado para tornar as tintas “opacas”. Entretanto seu uso vem declinando por causa da toxicidade do chumbo. Plumbato de cálcio (Ca_2PbO_4) é usado para a proteção antiferrugem de chapas de aço onduladas e cromato de chumbo ($PbCrO_4$) é o pigmento amarelo intenso usado em tintas para sinalização de rodovias. Compostos de chumbo também são empregados na fabricação de “vidros cristais” e vidros lapidados, bem como para vitrificar materiais cerâmicos. [2].

O elemento chumbo ocorre naturalmente, e encontra-se com relativa abundância na crosta terrestre. É registrado em todas as partes da biosfera em diversas formas químicas. Apresenta concentração média entre 10 e 20 mg kg^{-1}, suas principais fontes naturais são emissões vulcânicas, intemperismo geoquímicos e névoas aquáticas. O teor de chumbo no solo é muito influenciado por atividades antropogênicas e pelo transporte do metal através do ar, oriundo de várias outras fontes [3].

Este elemento não apresenta nenhuma essencialidade, sendo considerado totalmente tóxico acumulando-se no organismo do ser humano. Na sua interação com a matéria viva, o chumbo apresenta tanto características comuns a outros metais quanto algumas peculiaridades. Como este metal afeta virtualmente todos os órgãos e sistemas do organismo, os mecanismos de toxicidade propostos envolvem processos bioquímicos fundamentais, que incluem a habilidade do chumbo de inibir ou imitar a ação do cálcio e de interagir com proteínas. Em níveis de exposição moderada (ambiental e ocupacional), um importante aspecto dos efeitos tóxicos do chumbo é a reversibilidade das mudanças bioquímicas e funcionais induzidas. A toxicidade do chumbo se deve a sua interferência no funcionamento das membranas celulares e enzimas, formando complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio (grupamentos –SH, $–H_2PO_3$, $–NH_2$, –OH), que funcionam como doadores de elétrons. Este elemento apresenta vários problemas tais como: neurológicos, hematológicos, endocrinológicos, renais, carcinogênicos, cardiovasculares, gastrointestinais e hepáticas [4].

1.1.2 Manganês

O manganês, elemento de número atômico 25 e massa molar de 54,94 g mol^{-1}, é um metal de transição do grupo 7 da tabela periódica, apresentando várias formas e estados de oxidação variando de 0 a +7, e forma vários compostos coloridos [2].

Elemento amplamente distribuído na crosta terrestre compreendendo aproximadamente 0,1%, sendo que dos metais mais abundante, perdendo apenas para o ferro, foi isolado por Scheele em 1774. Este metal ocorre naturalmente em diversos tipos de rochas combinados com outras substâncias, como oxigênio, enxofre e cloro. São sólidos e não possui gosto e nem cheiro, apresentando-se como um sólido frágil, quebradiço, lustroso, ou pó branco-acinzentado, e aparece de quatro formas alotrópicas (α, β, γ e δ). Algumas partículas podem ser encontradas em suspensão no ar e alguns compostos podem ser dissolver na água, ou ainda, baixos níveis destes compostos se encontram normalmente presentes em lagos, oceanos e rios. No meio ambiente, pode ser modificado de um composto para outro através de processos naturais ou atividade humana [3].

O manganês mineral apresentou uma produção em torno de 8,8 milhões de toneladas em 1986, permanecendo até 1990. Os níveis mundiais deste minério em milhões de toneladas decaíram nos anos de 1995, 1996 e 1997. O Brasil como produtor deste minério possuia a 6ª posição ficando atrás de países como a África do Sul e Ucrânia dados obtidos no ano de 2000 [3]. Alguns anos a frente em 2006 o Brasil assume a primeira colocação como produtor e exportador ultrapassando a África do Sul, mas em 2007 perdeu a posição para o país Africano novamente de acordo com os dados conseguidos pelo Ministério de Minas e Energia (MME) [5].

O manganês e seus compostos apresentam uma variedade de usos e aplicações, tais como: o manganês metálico (ferromanganês) é usado principalmente na produção do aço (85-90%); o dióxido de manganês é utilizado na produção de baterias, palitos de fósforo, porcelanas e materiais a base de vidro; o cloreto de manganês é usado como precursor para outros compostos de manganês, como catalisador na cloração de compostos orgânicos, como suprimentos para animais e nas baterias, o sulfato de manganês é usado como fertilizante e suplemento, entre outros; o permanganato de potássio é um pó oxidante e utilizado como desinfetante, agente antialgas, agente de limpeza de metais e conservante de folhas e frutas secas; seu derivado orgânico é utilizado na gasolina como antidetonante em substituição ao chumbo tetraetila; entre outras aplicações [3].

O manganês é um elemento essencial para seres vivos, desempenhando um papel importante na função do sistema nervoso, mineralização dos ossos, no metabolismo energético e de proteínas, regulação metabólica e proteção celular. Entretanto, a exposição crônica a este metal, principalmente durante estágios embrionários ou pós-natais, pode induzir diversos eventos tóxicos, onde o sistema nervoso central é o alvo principal [6].

Uma alta exposição ao manganês tem sido associada a doenças tais como Alzheimer`s, esclerose lateral amiotrófica, Doença de Parkinson, esquizofrenia, e autismo. Algumas dessas doenças aumentam com o envelhecimento e consequentemente o custo dos programas de saúde pública tem aumentado também. Numerosas hipóteses têm sido levantadas para explicar a atividade neurotóxica do manganês, e um papel central para alterações em função mitocondrial e metabolismo energético foram propostos. Entretanto, os dados experimentais existentes neste momento para suportar essa hipótese ainda são escassos, assim como o papel da especiação do Mn como determinante da sua

toxicidade mitocondrial e da sua neurotoxicidade permanecem sem serem resolvidos satisfatoriamente [6].

Em humanos efeitos agudos e crônicos podem ser gerados devidos a exposição de altas concentrações deste elemento como tosse seca, náusea, dor de cabeça, fadiga, dispnéia, tremores, bronquite em trabalhadores expostos a níveis que excedem os padrões, doença pulmonares, anorexia, apatia, irritabilidade, desenvolvimento de condições clínicas graves, como mal de Parkinson marcado por tremores e rigidez muscular, entre outros. Um distúrbio psiquiátrico conhecido como “loucura mangânica” pode preceder ou acompanhar os sinais neurológicos, esta síndrome tem como características problemas de sonolência, confusão, comportamento bizarro, alucinações visuais, perda de memória, ansiedade, impotência e diminuição da libido. A sua deficiência no corpo humano afeta a função pancreática e o metabolismo [3].

As fontes de contaminação deste elemento são naturais e antropogênicas, esta contaminação pode ocorrer no ar, que tendem a ser maior em zonas urbanas, água, sedimentos, solo e alimentos [3,7].

1.1.3 Determinação de chumbo e manganês em amostras de chás

A contaminação de alimentos por metais potencialmente tóxicos é uma das principais fontes de exposição humana e tem merecido atenção constante dos órgãos mundiais. Em 1976, foram criados programas para monitoramento de contaminações em alimentos por órgãos competentes, com objetivo de conhecer e divulgar os teores de contaminantes em alimentos, assim como a contribuição destes para a contaminação humana [8].

A palavra chá designa vários arbustos da família das teáceas. Uma das espécies mais conhecida hoje é *Camellia sinensis*. O chá foi difundido mundialmente pela companhia Inglesa das Índias Orientais. Por extensão, são chamadas de chá as infusões de outras plantas, medicinais ou não, como a espécies de camomila e erva-mate [8].

Nos dias atuais, com a proposta da alimentação natural, sem aditivos, o chá de ervas passou a ser amplamente difundido e divulgado em vários locais. O mercado ficou disputado também pelas grandes indústrias que introduziram os chás prontos para consumo ou em pó solúvel, sendo-o consumido por todas as classes

sociais e faixa etárias dos brasileiros. Esses fatos demonstram a necessidade de ser avaliada a qualidade dos chás comercializados e utilizados no Brasil, assegurando uma composição de dieta saudável, que não acarrete risco à saúde àqueles que os utilizam [8].

A contaminação de chá por metais geralmente ocorre como resultado da contaminação do solo por fertilizantes, ou pela água de esgotos poluídos pela ação industrial ou de mineração, pelo ar atmosférico contaminado pela emissão de resíduos das grandes indústrias poluidoras ou durante a etapa de processamento dos chás, quando as espécies vegetais ficam em contato com os utensílios industriais [9]. Diversas técnicas analíticas tais como Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS), Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS), Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES), Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), entre outras apresentam de boa sensibilidade na determinação de metais em amostras de bebidas, a depender do nível em que estes metais se apresentam, normalmente pode-se requerer uma etapa prévia de pré-concentração.

Os limites máximos de Pb nas bebidas chás, foi estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 42 de 29 de agosto de 2013, onde regulamentava também o teor máximo de outros elementos inorgânicos em alimentos, publicados no diário oficial da união (DOU), o valor foi de 0,60 mg kg^{-1} [10].

A legislação brasileira não estabelece limites máximos de manganês em alimentos, no entanto a comunidade européia avalia a saúde de pessoas através da urina e sangue, sendo as faixas de concentrações de manganês de 0,12 a 1,9 $\mu g\ L^{-1}$ para urina, e 7,1 a 10,5 $\mu g\ L^{-1}$ para o sangue [11]. Assim recomenda-se a ingestão diária deste elemento entre 1 a 5 mg, através de alimentos que contenha o mesmo, tais como grãos integrais, leguminosas, nozes, amêndoas, frutas e chás [7,12].

1.2 Planejamentos multivariados

1.2.1 Introdução

A otimização de métodos analíticos podem ser executadas principalmente de duas formas. Primeiramente a metodologia univariada (convencional), onde uma variável é otimizada por vez, mantendo-se as outras constantes. A outra é a multivariada onde todas as variáveis são otimizadas simultaneamente e ainda permite verificar as interações entre as variáveis estudadas, além de ser mais efetivo e econômico [13]. O método univariado apesar de possuir uma simples interpretação dos resultados, apresenta algumas desvantagens como: grande quantidade de experimentos são necessários durante o trabalho e não considera as interações entre as variáveis [14].

O emprego de princípios estatístico em química analítica é cada vez mais frequente. A evolução dos recursos de informática como o aprimoramento de softwares, tem auxiliado ainda mais os profissionais na associação entre a química e a estatística. Nesse contexto, a quimiometria que é um ramo em ascensão em química que utiliza de ferramentas matemática e estatística para resolver problemas químicos, apresenta-se cada vez mais nas atividades destes. Nas últimas décadas tornou-se cada vez mais evidente na utilização de técnicas de planejamentos de experimentos e na análise e calibração multivariada [14,15].

1.2.2 Planejamentos fatoriais de dois níveis

Os planejamentos fatoriais de dois níveis são bastante utilizados como uma etapa de triagem em química, visando encontrar qual (is) variável (is) são significativas e os efeitos de suas interações numa determinada resposta. Estes planejamentos podem ser feitos de forma completa (fatorial completo) e de forma fracionada (fatorial fracionário).

1.2.2.1 Planejamento fatorial de dois níveis completo

Em um planejamento fatorial são investigadas as influências de todos os fatores experimentais de interesse e os efeitos de interação na resposta ou respostas. Se a combinação de k fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial completo exige a realização de 2 x 2 x ... x 2 = 2^k ensaios diferentes, sendo chamado de planejamento fatorial 2^k [15,16,17].

No planejamento fatorial cada variável é denominada de fator e cada fator varia em dois ou três níveis. A fim de deixar os planejamentos fatoriais efetivos, eles são preferencialmente estudados em dois níveis porque a depender da quantidade de fatores, o número de experimentos é grande, e o planejamento torna-se ineficiente. A quantidade de experimentos é calculado pela expressão n^k, onde n é o número de níveis a serem estudados e k o número de fatores. Um planejamento fatorial em dois níveis com três fatores terá um número de experimentos igual á 8 (2^3). Embora o planejamento fatorial completo não indique os valores ótimos para os fatores e consequentemente para as variáveis, ele é muito importante para a análise dos efeitos individuais e das interações [18].

Estes planejamentos são realizados escolhendo-se as variáveis a serem estudadas e efetuam-se experimentos em diferentes valores destes fatores. Em seguida são realizados experimentos para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados. É muito comum codificar esses níveis usando o sinal (+) para o maior valor de um fator e o sinal (-) para o menor valor desse fator. Um nível zero (0) pode ser também incluído como ponto central no qual todas as variáveis estão em seu valor médio [19].

Com intuito de se obter uma maior quantidade de informação na realização do planejamento fatorial, é necessário fazer repetições de alguns ensaios para que se possa estimar o erro experimental. As replicatas devem ser cópias fiéis, devendo representar adequadamente o espaço experimental no qual o planejamento fatorial foi desenvolvido, e a realização dos experimentos (ensaios e replicas) executados de forma aleatória, visando evitar distorções estatísticas que possam comprometer a qualidade dos resultados obtidos e dos efeitos calculados para as variáveis estudadas [20,21,22].

1.2.2.2 Planejamento fatorial fracionário

O aumento de fatores em um planejamento fatorial completo aumenta significativamente a quantidade dos experimentos a serem executados, com isso, não se deve descartar fatores sem uma base científica simplesmente para reduzir o número de experimentos. Uma alternativa mais segura para a diminuição de experimentos é o emprego do planejamento fatorial fracionário, o qual possibilita uma avaliação preliminar dos fatores com uma significativa diminuição de trabalho [14].

Para a realização de um fatorial fracionário o número de experimentos necessários é definido pela expressão $n = 2^{k-x}$, onde n é a quantidade de experimentos que serão executados, k o número de fatores investigados e x se refere-se a redução de experimentos. Quando x é igual a 1 o número de experimentos será a metade que seria utilizada no planejamento fatorial completo, se x for igual a 2, a quantidade de experimento será um quarto (1/4) do fatorial completo. A matriz gerada é chamada de “fração meia” e os efeitos dos fatores e das interações destes, apesar de serem calculados da mesma forma usada no planejamento fatorial completo, são nominados no planejamento fracionário como “contrastes” e são representados pela letra l [14].

No entanto de maneira geral, os efeitos das interações de ordem alta (terceira, quarta, quinta, etc.) são baixos, podendo ser confundidas com o desvio padrão dos efeitos. Desta forma, o número de experimentos pode ser reduzido sem que haja perda de informação pelo uso de um planejamento fatorial fracionário. Nos planejamentos fatoriais fracionários com quatro ou mais fatores, os termos de interação de ordem mais elevada podem ser ignorados e somente os efeitos principais e as interações de dois fatores são avaliados. Embora os números de experimentos sejam reduzidos drasticamente ainda assim são geradas valiosas informações [18,22].

A principal aplicação do planejamento fatorial fracionário é a seleção de fatores, entre outros estudados, que apresentam os maiores efeitos (estudos de triagem). Na etapa inicial de um estudo multivariado de um sistema com muitas variáveis independentes, as mais importantes e significativas são selecionadas enquanto as demais são descartadas. Sendo assim, um novo planejamento é feito considerando apenas as variáveis que apresentem os maiores efeitos [18,21].

Os planejamentos fatoriais fracionários com resolução III, IV e V são os mais comuns e suas características são [14]:

1. Planejamentos de resolução III – Os contrastes dos fatores principais são confundidos com os contrastes das interações de segunda ordem de outros fatores. Exemplo: $I_A = I_{BC}$.

2. Planejamentos de resolução IV – Os contrastes dos fatores principais são confundidos com os contrastes das interações de terceira ordem de outros fatores, e as interações dos fatores de segunda ordem são confundidas também com outras de segunda ordem de outros fatores. Exemplo: $I_A = I_{BCD}$; $I_{AB} = I_{CD}$.

3. Planejamentos de resolução V – Os contrastes dos fatores principais são confundidos com os contrastes das interações de quarta ordem de outros fatores. Existe também confundimentos entre os contrastes de segunda ordem e os de terceiras ordem. Exemplo: $I_A = I_{BCDE;}$ $I_{AB} = I_{CDE}$.

1.2.3 Metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi criada por George Edward Pelham Box e colaboradores na década de 50. O termo MSR foi originado a partir da perspectiva gráfica gerada após análise e modelagem matemática, e seu uso tem sido amplamente adotado em textos sobre quimiometria. A MSR consiste de um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas que são baseados no ajuste dos modelos empíricos para os dados experimentais obtidos em relação ao desenho experimental, visando a otimização de uma ou várias resposta (s) [23, 24, 25].

A MSR apresenta de formas distintas, etapas de modelagem e deslocamento, que são repetidas quantas vezes forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície em estudo. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos simples (em geral, lineares ou quadráticos) a respostas obtidas com planejamentos fatoriais ou planejamentos fatoriais ampliados. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é o caminho onde a resposta varia de forma mais pronunciada [18].

A relação entre variáveis experimentais e as respostas são ilustrados de forma eficiente por superfícies, oferecendo valiosas informações sob o comportamento das variáveis na região estudada. O primeiro passo para aplicação

da MSR é a obtenção de uma estimativa apropriada da relação funcional entre a resposta e os fatores estudados. A função polinominal deve representar uma boa descrição da relação entre os fatores e a resposta dentro de um domínio experimental delimitado [22].

As principais matrizes de planejamento para superfícies quadráticas mais conhecidas e usadas em metodologia de superfície de resposta são: planejamento Doehlert, planejamento Box-Behnken e planejamento composto central. Sendo estes apresentam vantagens e limitações, esses planejamentos são estabelecidos mediante figuras geométricas, tendo níveis e valores codificados dos fatores em função dessas figuras. Os modelos quadráticos são avaliados considerando as respostas experimentais e os valores preditos [14].

FERREIRA em seu livro mostra que dentre estes planejamentos mais utilizados, o Doehlert é o mais eficiente, onde a eficiência é medida através da razão do número de parâmetros pelo número de experimentos usados. O planejamento fatorial de três níveis que não será citado aqui neste trabalho, é o mais ineficiente, e sua utilização em termos práticos só é viável quando o número de fatores é dois [14].

1.2.3.1 Planejamento Doehlert

Desenvolvido em 1970 por David Doehlert, este planejamento vem se mostrando uma alternativa prática e econômica em relação aos outros planejamentos de superfícies de resposta quadráticas. O planejamento ou matriz de Doehlert descreve um domínio circular para duas variáveis, esférico para três e hiperesférico para mais de três variáveis o que acentua a uniformidade no espaço envolvido. Suas matrizes não são rotacionais, mas possui várias vantagens como necessidade de poucos pontos experimentais para sua aplicação e alta eficiência. Embora o planejamento não seja ortogonal, isto não significa perda da qualidade necessária para o seu uso efetivo nos procedimentos de otimização [26].

Outras características deste planejamento, que pode ser referida como vantagens em relação a outros planejamentos são [14,27]:

1. Possibilidade de planejamentos envolvendo número de níveis diferentes para os fatores, sendo que pode ocorrer situações de fatores com até sete níveis;

2. O número de experimentos (N) necessários para a aplicação do planejamento é dado por $N = k^2 + k + C$, onde k é o número de variáveis e C é o número de replicatas do ponto central;
3. Possui grande eficiência em termos de números de experimentos necessários em uma otimização;
4. O deslocamento do planejamento para fora do domínio experimental inicial pode ser feito aproveitando-se pontos do planejamento inicial, dando a este planejamento grande mobilidade.

Para duas variáveis, o planejamento Doehlert consiste de um ponto central e mais seis pontos adicionais formando um hexágono regular e, por esse motivo, situado em um círculo (Figura 1). Para três variáveis, este planejamento é representado pelo cuboctaedro, que é um sólido geométrico que apresenta faces quadradas alternadas por faces triangulares. Os doze vértices do sólido mais o ponto central representam as coordenadas dos 13 pontos experimentais. Dependendo da forma em que este cuboctaedro é projetado no plano, originam-se alguns planejamentos para as três variáveis que apresentam matrizes experimentais diferentes (Figura 2) [14,28].

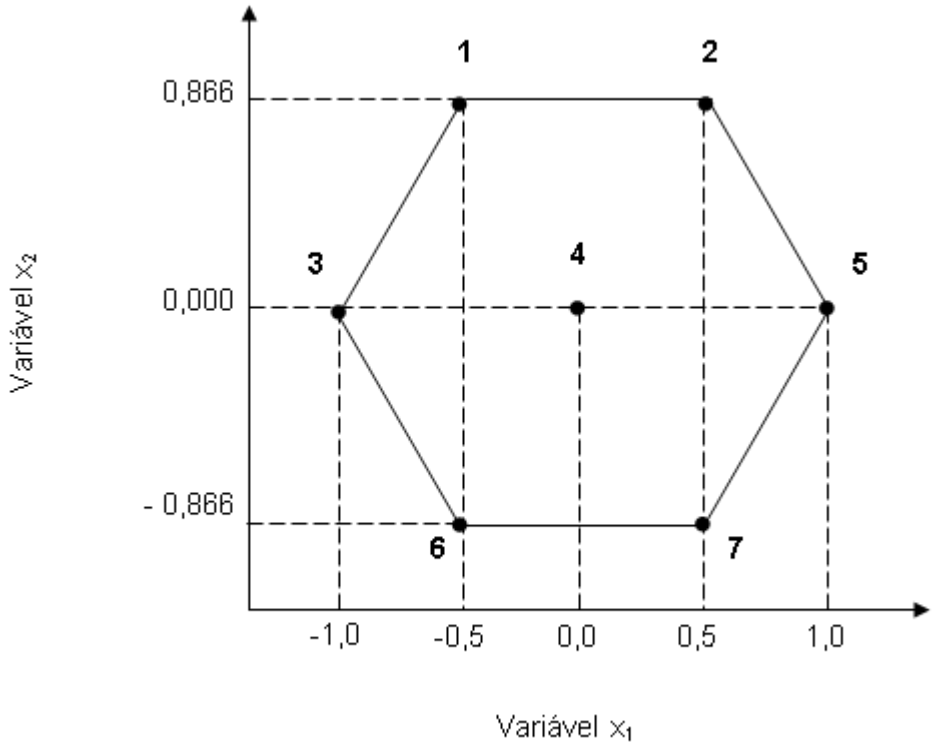


Figura 1. Representação do planejamento Doehlert para duas variáveis.

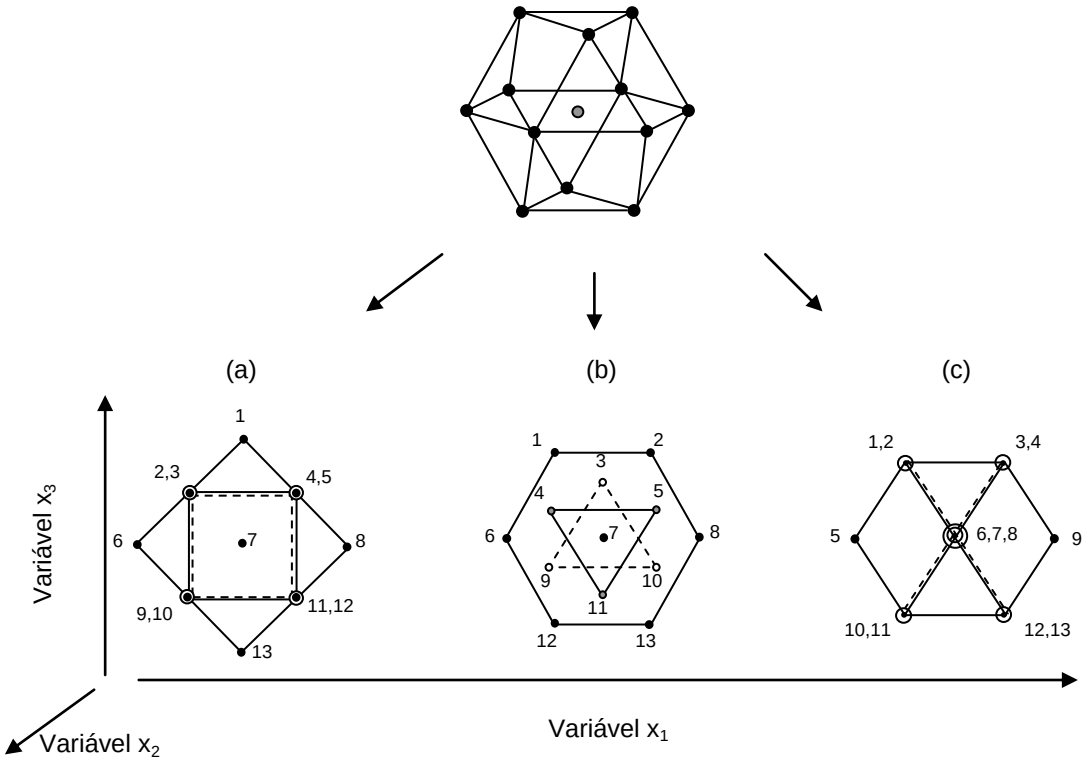


Figura 2. Planejamentos Doehlert para três variáveis originados por deferentes projeções planas do cuboctaedro.

Os valores codificados das coordenadas de cada ponto experimental que compõe os planejamentos Doehlert não são comuns como nos outros planejamentos. Estes valores podem ser calculados a partir de relações trigonométricas e, portanto, sua obtenção não é tão imediata [14,28].

1.2.3.2 Planejamento Box-Behnken

Este planejamento foi proposto em 1960, por Box e Behnken, sendo uma das metodologias de superfície de resposta mais conhecidas. A matriz Box-Behnken são obtidas pela subtração de pontos de um planejamento fatorial de três níveis originário, como mostra a Figura 3, podendo também ser gerado por um planejamento fatorial de dois níveis, uma outra forma gráfica para o Box-Behnken consiste em um cubo, sendo que as coordenadas da matriz são estabelecidas pelos pontos médios dos três eixos e o ponto central (Figura 4). Em um planejamento Box-Behnken, os pontos experimentais descrevem hiperesferas onde estes estão equidistantes do centro [29,30].

A quantidade de experimentos utilizados para este planejamento segue a mesma expressão usada pelo planejamento Doehlert $N = k^2 + k + c$, onde k é o número de variáveis e c é o número de replicatas do ponto central. Este planejamento possui uma eficiência superior ao planejamento de composto central, e equiparável a matriz de Doehlert. Suas principais caraterísticas estão listadas abaixo [23,30]:

1. Aplicado quando o número de fatores (variáveis) é igual ou superior a três;
2. Todos os fatores são estudados a três níveis (-1,0,+1);
3. Intervalos uniformes entre os níveis dos fatores estudados.

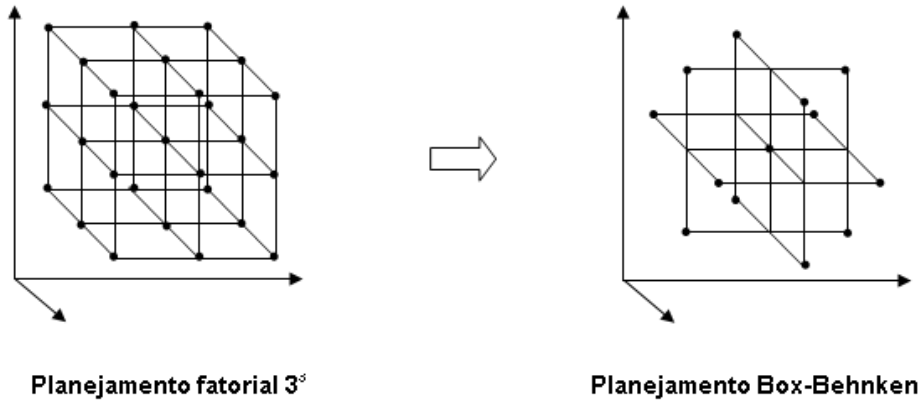


Figura 3. Pontos experimentais obtidos para a matriz de Box-Behnken a partir de um planejamento fatorial de três níveis para três variáveis.

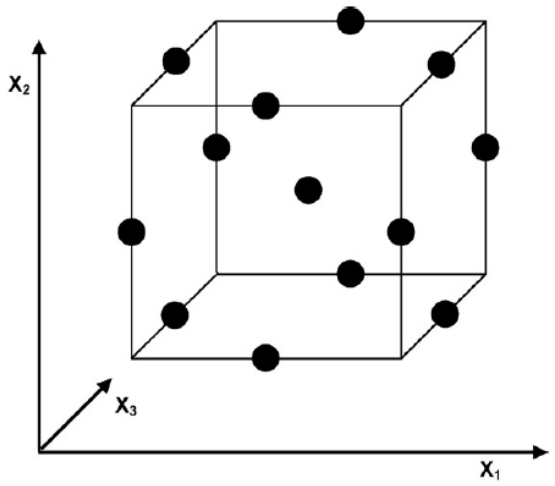


Figura 4. Representação espacial do planejamento Box-Behnken de um cubo para três variáveis.

1.2.3.3 Planejamento Composto Central

O planejamento composto central é mais antigo do que o Doehlert e Box-Behnken, foi apresentado por Box e Wilson, em 1951, como uma alternativa aos planejamentos fatoriais de três níveis, que necessitavam de muitos experimentos para um pequeno número de fatores. A quantidade de experimentos realizados neste planejamento é dada através da expressão, $N = 2^k + 2k + C$, onde k é o número de variáveis e C é o número de pontos centrais [31, 32]. Este planejamento é constituído por três partes: (1) um planejamento fatorial de dois níveis completo ou fracionário, (2) um planejamento em estrela (ou axial), formada por $n = 2k$, cujos pontos estão a uma distância α do seu centro e (3) um ponto central que pode ser realizado em n ensaios [14].

A execução de um planejamento composto central é necessário definir como será cada uma dessas três partes. É preciso definir quantos e quais serão os pontos cúbicos, qual o valor de α, e quantas repetições serão feitas no ponto central. As repetições no ponto central têm como finalidade: fornecer uma medida do erro puro e estabilizar a variância da resposta prevista [33]. As Figuras 5 e 6 representam graficamente a constituição de um planejamento composto central para estudo de duas e três variáveis respectivamente [14].

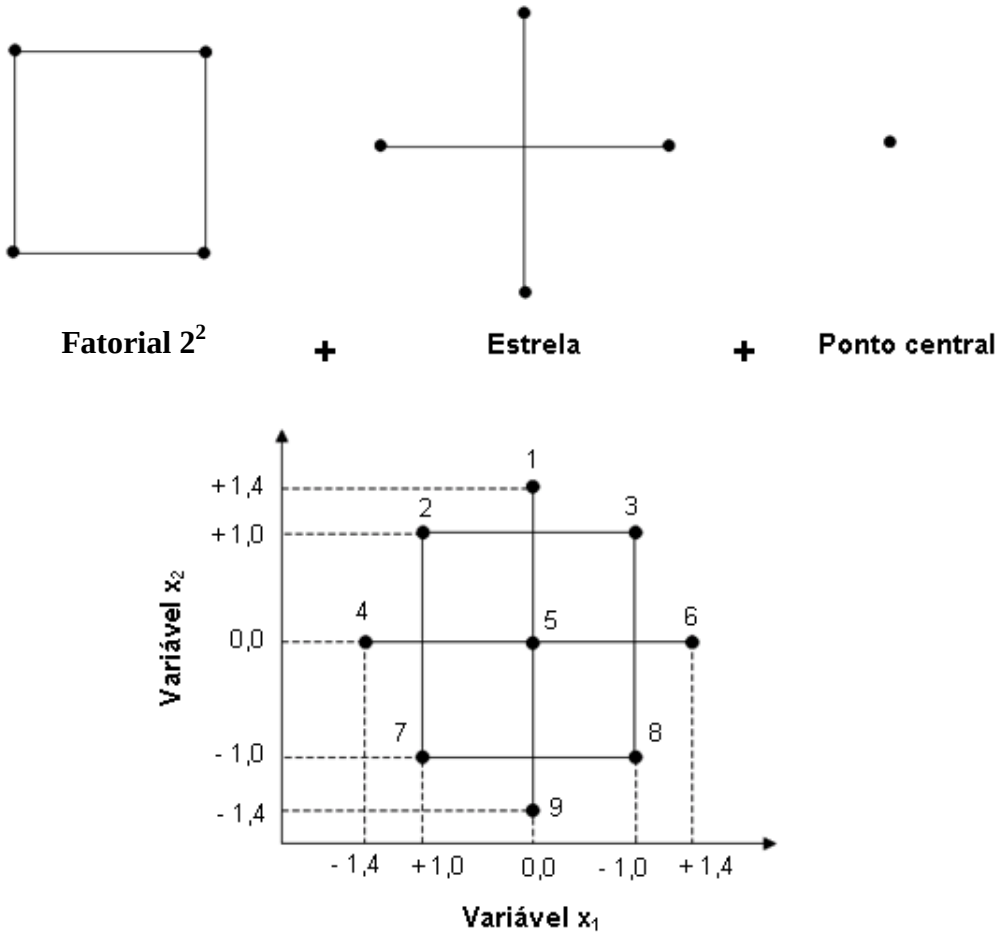


Figura 5. Representação gráfica do desenho composto central para duas varáveis.

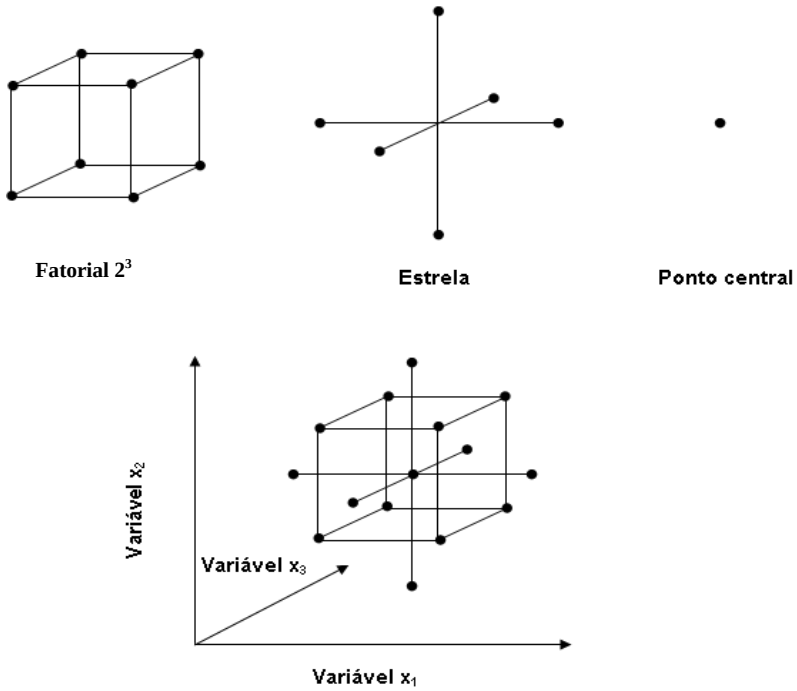


Figura 6. Representação gráfica do desenho compostos central para três variáveis.

1.3 Sistema de análise por injeção em fluxo automatizado

Os avanços na ciência e tecnologia têm levado a um aumento na demanda por controle das análises, e colocado vários desafios para químicos analíticos como a necessidade de desenvolver vários métodos seletivos, sensíveis, econômicos (amostra e reagente), simples, etc. [34]. A crescente necessidade de automação de procedimentos analíticos se deve ao aumento significativo do número de amostras laboratoriais a serem analisadas, por exemplo, nas áreas clínicas e ambientais, e a demanda por técnicas rápidas e confiáveis operando 24 horas por dia, frequentemente requeridas para controle de processos industriais [35].

A origem das técnicas em fluxo foi na década de 1950, por Skeggs, quando desenvolveu a análise em fluxo segmentada (SFA), anos depois foram surgindo outras técnicas como análise por injeção em fluxo (FIA), análise com injeção sequencial (SIA), entre outras [34,37].

Métodos automatizados parcialmente ou totalmente têm sido cada vez mais desenvolvidos utilizando a análise por injeção em fluxo na separação e pré-concentração de íons metálicos, oferecendo aos métodos uma maior confiança nos resultados obtidos e minimizando a intervenção humana, consequentemente diminuindo a possibilidade de contaminação das amostras e reagentes [36,37].

A análise química por injeção em fluxo foi proposto por Ruzicka e Hasen em 1975. O termo injeção por mais que pareça estranho nos dias atuais, se deve ao fato de, no início da técnica uma seringa era utilizada para injetar a amostra através de um septo para um fluxo de reagente. Hoje em dia, as válvulas de rotação que inserem a amostra para um fluxo de reagentes, em vez de injetar a amostra, são utilizados, mesmo assim o termo permaneceu [38,39,40].

Esta técnica pode ser definida como um processo na qual alíquotas de amostra (e eventualmente de reagentes) são inseridas em uma solução, que as transporta através do percurso analítico. No decorrer do procedimento, a amostra sofre dispersão na solução transportadora, produzindo uma zona de amostra caracterizada pela existência de gradientes de concentração. Caso necessário, reações químicas podem ocorrer durante o transporte da zona de amostra em direção ao sistema de detecção. Em função da existência dos gradientes de concentração e da medida ser feita com a zona de amostra em movimento em

relação ao sistema de detecção, obtém-se um sinal transiente, cuja altura pode ser relacionada à concentração inicial da espécie de interesse [41]. Em geral, o método FIA pode ser dividido em quatro partes: propulsão dos fluidos, injeção da amostra, reação e detecção [42].

A Figura 7 apresenta alguns esquemas de sistemas FIA desenvolvido por alguns autores brasileiros como Ferreira [43,44], Zagatto [45] e Lemos [46].

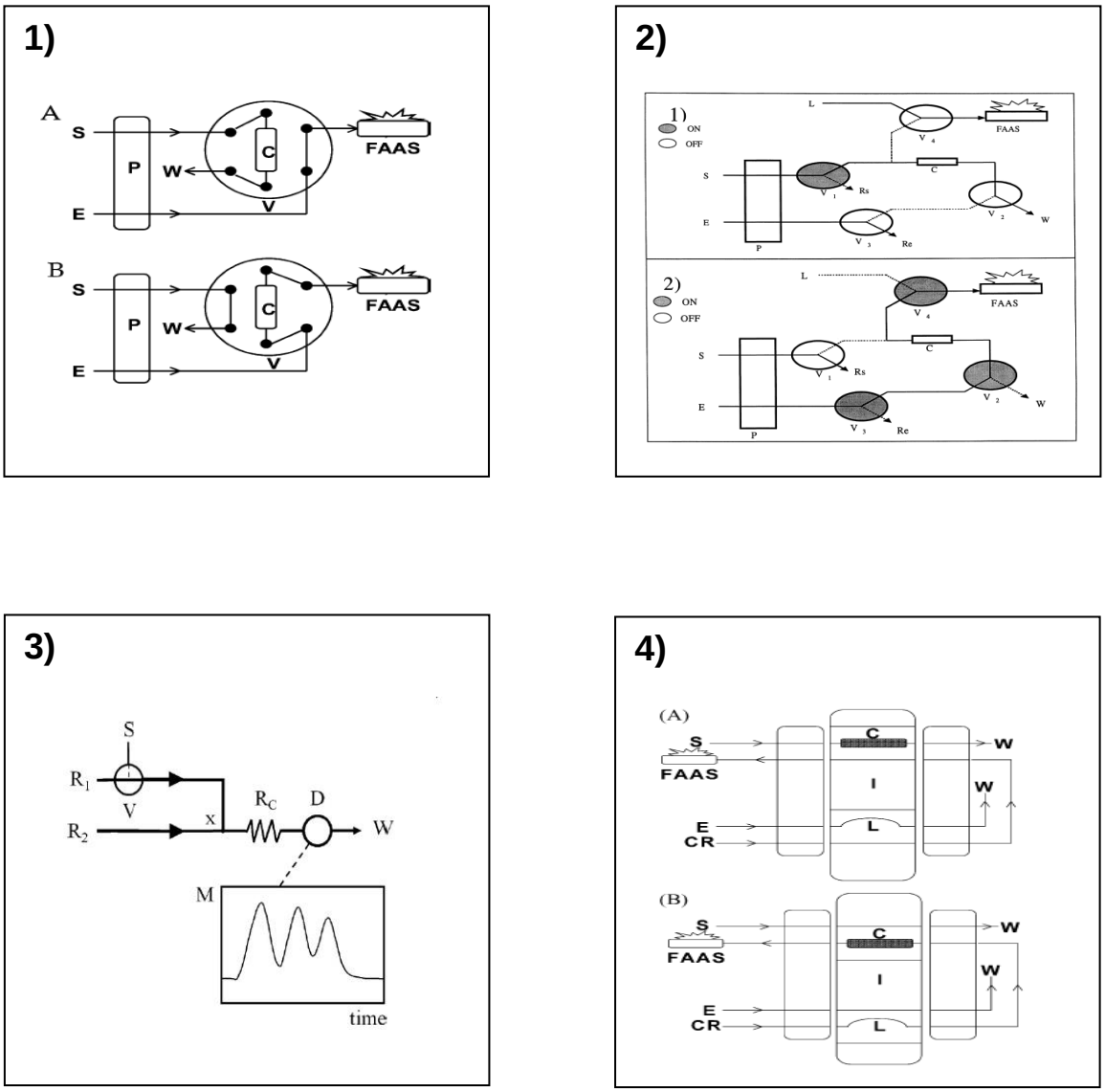


Figura 7. Esquema de sistemas FIA desenvolvidos por pesquisadores brasileiros, Ferreira (1,2); Zagatto (3) e Lemos (4). S: Amostra; E: Eluente; P: Bomba Peristáltica; C: Coluna; W: Descarte; V: Válvula; CR: Carreador; L: Loop

A multicomutação representa um dos desenvolvimentos mais recentes em termos de técnicas de fluxo. A sua grande diferença em relação à FIA reside na utilização, como dispositivos injetores, de válvulas eletromecânicas ativadas por um solenóide, sendo cada válvula acionada individualmente o que lhe permite funcionar como um multicomutador, embora muitos pesquisadores tenha resistência em aceitar o termo multicomutação, sendo muita das vezes tratado como FIA.

Esta característica permite a utilização combinada de várias válvulas solenóides, dispostas em distintas configurações, de modo a criar uma rede de fluxo consistindo em diferentes percursos analíticos, possibilitando assim uma grande versatilidade na manipulação da zona de amostragem, sem necessidade de introduzir alterações na configuração do sistema analítico. As válvulas solenóides apresentam uma grande rapidez de comutação, o que lhes confere alguma vantagem relativamente aos outros dispositivos de injeção em termos de procedimento de inserção de amostra e reagentes, o qual pode ser facilmente alterado e ajustado com base no controle do tempo [47].

1.4 Reator enovelado

1.4.1 Aspectos gerais

Utilizado pela primeira vez por Engelhardt e Newe, o reator enovelado (KR) foi aplicado em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com o objetivo de minimizar a dispersão das amostras. Devido à alteração do fluxo de uma para três dimensões o KR foi chamado de reator 3D (três dimensões) [48]. O termo “reator enovelado” (Figura 8) não é uma tradução literal do inglês “knotted reactor” (reator enodado) foi proposto em 1994 por recomendações da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Ele consiste de um tubo aberto bem entrelaçado sem estrangular suas paredes, assegurando-se a presença de vários percursos curvos de pequeno raio [35].

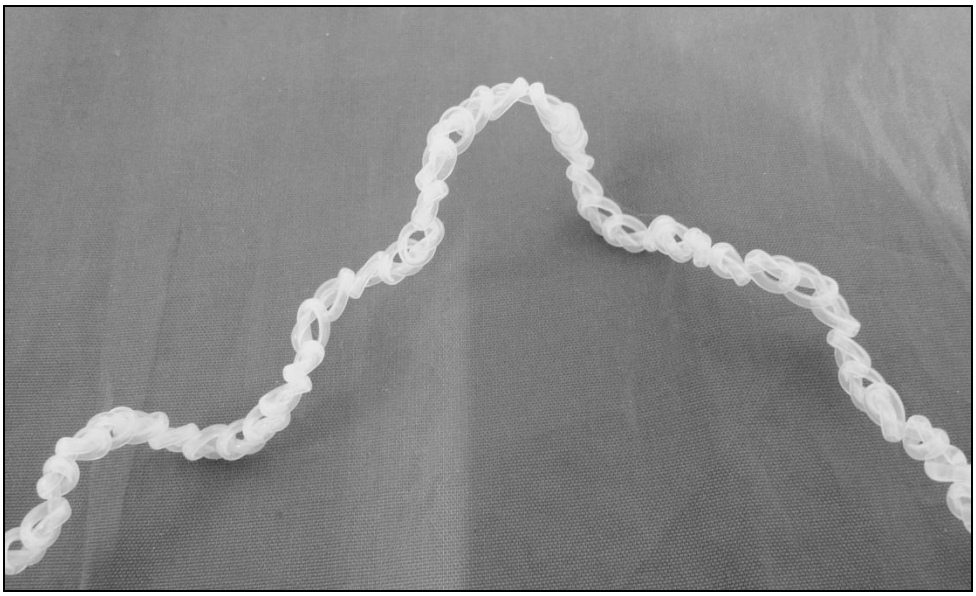


Figura 8. Imagem de um reator enovelado de PTFE com 200 cm. Fonte: Acervo de fotos do autor

Procedimentos de separação e pré-concentração combinado com a análise com injeção em fluxo (FIA), veio para resgatar a precipitação como técnica analítica que havia ficado em desuso por ser uma técnica de difícil trabalho, e que requer um analista habilidoso [49].

O primeiro trabalho com esses reatores em sistema FIA foi desenvolvido Fang em 1991. Na época os sistemas de análises com injeção em fluxo já estavam sendo muito eficaz na pré-concentração de metais, apresentando-se seletivo e sensível em espectrometria de absorção atômica. No entanto, alguns problemas com interferência eram obtidos quando trabalhava-se com altas concentrações de metais de transição. Pensando na resolução deste problema, Fang usa a técnica de co-precipitação que é bastante tolerável às altas concentrações destes metais [50].

Alguns anos mais tarde este pesquisador verificou que a complexão nas paredes do reator enovelado era possível na ausência de um agente co-precipitante quando trabalhava na pré-concentração de íons cádmio usando dietilditiocarbamato (DDC) como agente quelante. Para verificar que os complexos de fato eram adsorvidos nas paredes do reator, foi realizada uma microscopia eletrônica de parte da superfície interna dos reatores enovelados após uma etapa de pré-concentração. Fang percebeu também que a eficiência da adsorção poderia ser melhorada se o material do tubo que constitui o reator fosse de mesma natureza que o complexo formado [51].

Mesmo com tantas vantagens tais como baixa impedância sobre o sistema e baixa dispersão oferecidas por estes dispositivos (KR) ainda sim, quando comparados com reatores com preenchimentos (mini colunas), existem poucos trabalhos publicados com reatores enovelados.

1.1.2 Princípios envolvidos na formação do precipitado ou complexo e a etapa de eluição

Existem basicamente dois fatores que são responsáveis pela retenção do complexo ou precipitado nas paredes do reator enovelado [52]. Este primeiro fator diz que o complexo ou precipitado formado no interior do reator se deve ao lançamento destes nas paredes do tubo, através de uma força centrifuga gerada a partir do fluxo secundário, criado pelos nós que constituem o reator, devido as alterações na direção deste fluxo. Experimentos realizados com dois sistemas iguais, colocando-se um tubo retilíneo no lugar do reator com o mesmo tamanho e mesmo material comprovam esta suposição, sendo o tubo retilíneo ineficiente na pré-concentração. O segundo fator está relacionado com a natureza do complexo ou

precipitado formado, tem-se uma adsorção mais efetiva quando o complexo/precipitado e reator são de mesma natureza, ou seja, são ambos hidrofílicos ou ambos hidrofóbicos [52,53,54].

Um terceiro fator pode ser observado nos trabalhos de Fang e Saisunee, que mostram que a forma geométrica dos reatores pode influenciar na eficiência de sistemas de pré-concentração, podendo ser construídos reatores com forma de um oito, em serpentina ou enovelado. Fang observou que usando diferentes reatores não se observa uma diferença significativa no fator de pré-concentração, havendo apenas perda da precisão do reator em serpentina quando comparado com o enovelado. Comparando o fator de pré-concentração do enovelado com o em serpentina, Saisunee contemplou que o enovelado apresenta maiores fatores de pré-concentração [50,55]. No presente trabalho, os autores no processo de formação do complexo (amostra e reagente complexante), propõe uma mudança, quando comparado com a forma proposta por outros autores. Nos trabalhos vistos na literatura, é colocada uma linha para a amostra e outra para o reagente quelante ou precipitante, no presente trabalho uma quantidade adequada do reagente é adicionada a amostra, eliminando a linha do reagente no sistema, e consequentemente simplificando-o ainda mais.

Na etapa de eluição, que se faz necessário para a re-extração do analito para uma fase normalmente de volume menor e aquosa em sistemas em fluxo, ocorre de forma muito mais simples nos reatores enovelados do que em reatores com preenchimentos (mini colunas), não sendo necessário a inversão da direção do fluxo como acontece com as mini colunas que são invertidas, devido boa parte do analito ser complexado assim que alcança o material de enchimento da mini coluna, isto leva a uma maior concentração dos complexos numa determinada extremidade da coluna. Se, nas mini colunas, a eluição ocorrer no mesmo sentido da amostragem, certamente, haverá dispersão da concentração dos complexos durante a percolação, diminuindo assim o fator de pré-concentração. Outro aspecto que pode ser observado nestes sistemas e que diferencia o reator enovelado e a mini coluna é o processo de eliminação do analito, sendo que o reator apresenta picos finos por aspirar a solução contendo o analito em uma única porção, e consequentemente não apresentando caldas [56,57].

1.1.3 Vantagens e limitações

Os reatores enovelados apresentam inúmeras vantagens frente a outros dispositivos usados para pré-concentração, tal como a mini coluna. Suas principais vantagens são: (1) baixa pressão no sistema mesmo utilizando-se altas vazões de fluxo devido a inexistência de elemento que cause impedância (o reator é um tubo aberto); (2) a perda de sensibilidade devido a dispersão é negligenciável; (3) é livre de contaminação pois é feito de material inerte; (4) é de fácil construção e apresenta baixo custo e (5) tempo de vida longo sem perder a eficiência.

Duas limitações podem ser observadas em sistemas que fazem uso de reatores enovelados em análises em fluxo. A primeira é a necessidade de se usar materiais para produção do reator que possuam a mesma natureza, hidrofílica ou hidrofóbica, do composto que será formado para que a adsorção do complexo ou precipitado seja mais efetiva. E a segunda é a relativa baixa sensibilidade, devido à capacidade limitada dos reatores enovelados em adsorver maiores quantidades do complexo ou precipitado [58].

1.1.4 Reatores enovelados aplicados a sistemas de pré-concentração em linha

A separação e pré-concentração são muitas vezes utilizadas na determinação de metais traços, devido à baixa sensibilidade de algumas técnicas para estes elementos nestas concentrações e (ou) a efeitos de matriz que algumas amostras possui por ser complexas [59].

Na literatura são encontrados diversos trabalhos utilizando a pré-concentração em linha com reator enovelado, que são desenvolvidos de diversas formas e por várias técnicas analíticas tais como a espectrometria de absorção atômica com chama e atomização eletrotérmica (FAAS e GFAAS) [60,61,62,63], espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) [64,65,66] e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [67,68], entre outras técnicas analíticas.

Souza e et al. desenvolveram dois trabalhos com otimização multivariada utilizando planejamento Box-Behnken, em um dos trabalhos [56] eles utilizaram um

sistema de pré-concentração manual na determinação de Cd^{2+} em amostras de água potável por FAAS, obtendo-se bons resultados como limite de detecção e limite de quantificação de 0,10 e 0,33 μg L^{-1}, respectivamente. Um fator de enriquecimento de 18 e frequência de amostragem de 48 h^{-1}. No outro trabalho [57], eles determinaram Pb^{2+} em amostras de água potável usando um sistema automatizado, e obteve limite de detecção de 0,43 μg L^{-1}, fator de enriquecimento de 26,5 e frequência analítica de 48 h^{-1}.

Cerutti et al. [69], usando a extração no ponto nuvem para determinar Co^{2+} por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (GFAAS) em amostras de água potável, utilizando reator enovelado para a separação da fase rica da fase descartável. Eles conseguiram um fator de enriquecimento de 15, com um tempo de pré-concentração de 60 s, e um limite de detecção de 10 ng L^{-1}. Martinez et al. [70] determinaram Cd^{2+} em amostras de água potável baseado na precipitação destes íons nas paredes de um reator enovelado por FAAS após otimização com planejamento fatorial completo. As características analíticas encontradas foram: fator de enriquecimento de 23, limite de detecção de 40 ng L^{-1} e frequência de amostragem de 25 h^{-1}.

Yang e Jianhua [71] comparam o método do reator enovelado com outro método na determinação de Cd por GFAAS, tendo hidróxido de sódio como reagente precipitante, os resultados obtidos para o reator foram: limite de detecção de 3 ng L^{-1}, fator de enriquecimento de 14, eficiência de retenção de 48% e frequência analítica de 20 h^{-1}. A Tabela 10 mostra algumas características analíticas destes trabalhos citados.

Tabela 10. Características analíticas de algumas aplicações de trabalhos com sistema de pré-concentração em linha utilizando reator enovelado.

Analito	Técnica	Matriz	Reagente	Eluente	FE	FA	LD	Referência
Pd	GFAAS	Sangue e Poeira	SCN	Metanol com HNO_3 1%	29	14 h^{-1}	16,0 ng L^{-1}	61
Cd	FAAS	Mel	Br-Padap	Etanol	140	---	0,5 ng L^{-1}	62
Cd	FAAS	Água de chuva e mar	Dietilditiocarbamato	Etanol	33	30 h^{-1}	3,44 μg L^{-1}	63
Pb	ICP OES	Água de torneira	Dietilditiocarbamato	HCl	140	---	0,2 ng mL^{-1}	64
Gd	ICP OES	Urina	Br-Padap	HNO_3	255	---	4,0 ng L^{-1}	65
Sc	ICP OES	Água de rio	Br-Padap	HNO_3	1120	---	0,45 ng L^{-1}	66
Elementos de terras raras	ICP-MS	Água subterrânea, geológicas e ambientais	NH_4	HNO_3	55-75	---	0,06-0,27 ng L^{-1}	68
Cd^{2+}	FAAS	Água potável	PAN	HCl	18	48 h^{-1}	0,10 μg L^{-1}	56
Pb^{2+}	FAAS	Água potável	PAN	HCl	26,5	48 h^{-1}	0,43 μg L^{-1}	57
Co	GFAAS	Água potável	PONPE 7,5	Metanol-HNO_3	15	---	10 ng L^{-1}	69
Cd^{2+}	FAAS	Água potável	TAC	HNO_3	23	25 h^{-1}	40 ng L^{-1}	70
Cd^{2+}	GFAAS	---	NaOH	HNO_3	14	20 h^{-1}	3 ng L^{-1}	71

FE: Fator de Enriquecimento, FA: Frequência Analítica, LD: Limite de Detecção

1.5 O reagente Br-PADAP

Os reagentes azos representam um grande e muito importante grupo de corantes sintéticos aplicados em química analítica. Sua estrutura é constituída basicamente de Ar-N=N-Ar', onde Ar e Ar' são alguns grupos aromáticos, a unidade da ligação -N=N- é referido como o grupo azo e é um cromóforo que dá cor brilhante para estes compostos. Na formação dos grupos Azos, muitas combinações podem ser obtidas, e estas diferentes combinações dão uma variedades de cores a estes compostos tais como: amarelo, laranja, vermelho, etc. Para a formação de um corante azo é necessário o tratamento de uma amina aromática com ácido nitroso, resultando em um diazo como um produto intermediário, este processo é conhecido como diazotação. Os reagentes piridilazo e tiazolilazo são os principais corantes azos [72,73,74]

O 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(dietilamino)-fenol, conhecido trivialmente como Br-PADAP (Figura 9), é um corante sólido laranja derivado do reagente 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR), sendo um excelente reagente apresentando-se bastante seletivo para vários metais [75].

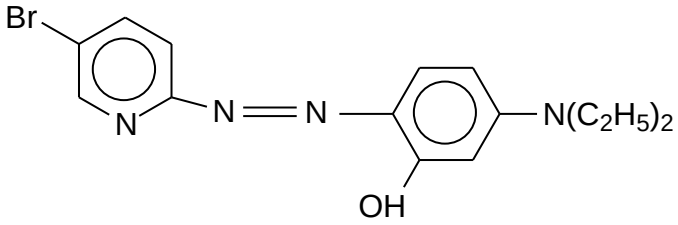


Figura 9. Estrutura química do Br-PADAP.

O Br-PADAP possui uma massa molar de 349,24 g moL^{-1}, sendo pouco solúvel em água e bastante solúvel em solventes orgânicos. Os complexos formados com esse reagente são coloridos, e altamente estáveis e sensíveis [75].

2 – Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um novo e rápido método de pré-concentração em linha automatizado utilizando um duplo reator enovelado para a determinação de Mn e Pb em amostras de chás por espectrometria de absorção atômica com chama.

2.2 Objetivos específicos

Construir e aperfeiçoar um sistema em linha automatizado com uma placa de programação de código aberto (arduino) e válvulas solenóides para o controle de fluxos das amostras e reagentes.

Confeccionar reatores enovelados para pré-concentrar espécies de Mn^{2+} e Pb^{2+} através da complexação.

Utilizar um planejamento fatorial fracionário e um planejamento Doehlert para selecionar e otimizar as variáveis que afetam significativamente o sistema de pré-concentração em linha.

Validar o método desenvolvido obtendo-se seus parâmetros de mérito.

Aplicar o método desenvolvido na determinação de Mn e Pb em amostras de chás comerciais coletadas no mercado da cidade de Jequié-Bahia.

3 – Parte Experimental

3.1 Instrumentação

Um espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS) formada de ar/acetileno da marca Perkin Elmer, (Norwalk, CT, EUA), modelo AAnalyst 200 equipado com lâmpada de deutério como corretor de fundo foi utilizado para as medidas de picos de absorvância. O valor de comprimento de onda para a lâmpada de cátodo oco (HCL) de Mn foi 279,48 nm e Pb de 283,31 nm. A Tabela 1 descreve alguns parâmetros do espectrômetro de absorção atômica com chama sugerido pelo fabricante.

Tabela 1. Parâmetros operacionais do espectrômetro de absorção atômica com chama para a determinação de Mn e Pb.

Parâmetros	Valores
Altura do queimador (mm)	13,5
Abertura da fenda (nm)	0,2
Vazão de fluxo do acetileno (L min^{-1})	2,0
Vazão de fluxo do ar (L min^{-1})	13,5
Vazão de fluxo do nebulizador (mL min^{-1})	5,0 a 7,0

3.2 Materiais utilizados

- Balança analítica (SHIMADZU), modelo AY 220
- Bloco de digestão (TECNAL), modelo 040125 com tubos digestores de vidro
- 2 bombas peristáltica multi-canal (MILLAN, modelo 204)
- Micropipetas (Transferpette Digital - Brand, RB704174, RB704178; Sealpette ER 33832; Kacil S; ponteiras (Brand, 18170, 18266, 702533)
- Medidor de pH (DIGIMED, modelo DM 20)
- Refrigerador (CONSUL, modelo CRA28888NA)
- Sistema de purificação de água QUIMIS (São Paulo, Brasil)

- Silicone
- Tubos capilares de Teflon ou polietileno
- Tubos de tygon de vários diâmetros
- 4 válvulas solenóides de 3 vias (Cole Parmer)
- Vidraria convencional. Estas foram mantidas em solução de HNO_3 a 5 % (v/v) durante 24h para descontaminação. Antes do uso, elas foram enxaguadas com água deionizada e secas em ambiente livre de poeira
- Reator enovelado de PTFE 200 cm de comprimento e diâmetro interno de 0,5 mm e diâmetro externo de 1,5 mm, com loop de 0,5 mm
- Placa arduíno uno R3 com uma protoboard
- Jumpers (fios)
- Circuito integrado ULN 2803
- Diodo
- Suporte universal para a fixação das válvulas solenóides
- Liquidificador (WALITA) para trituração das amostras

3.3 Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico.

- Ácido nítrico a 65% (m/v) (F. MAIA)
- Ácido clorídrico a 37% (m/v) (F. MAIA)
- Acetato de sódio hidratado (VETEC)
- Ácido acético glacial (VETEC)
- Fosfato de sódio (VETEC)
- Cloreto de amônio (ÊXODO)
- Etanol a 99,5% (v/v) (ANIDROL)
- Hidróxido de amônio (ÊXODO)
- Hidróxido de sódio (F. MAIA)
- Peróxido de hidrogênio (ÊXODO)
- 2-(5-bromo-2-piridilazo)- 5-(dietilamino)fenol (SIGMA-ALDRICH)
- Soluções padrões (estoques) dos metais (FLUKA)

3.4 Soluções

As soluções utilizadas foram preparadas com água deionizada proveniente de um sistema de purificação de água (QUIMIS, São Paulo, Brasil).

- **Soluções de manganês 50 µg L^{-1} -** As soluções de Mn^{2+} foram preparadas a partir da diluição de 2,5 µL da solução estoque de Mn^{2+} 1000 µg mL^{-1} e dilui-se a 50 mL com água deionizada.

- **Soluções de chumbo 200 µg L^{-1} -** As soluções de Pb^{2+} foram preparadas a partir da diluição de 10 µL da solução estoque de Pb^{2+} 1000 µg mL^{-1} e dilui-se a 50 mL com água deionizada.

- **Soluções de ácido clorídrico e nítrico -** as soluções de ácido clorídrico e ácido nítrico foram preparadas a partir da diluição de volumes adequados dos ácidos P.A com água deionizada.

- **Solução de hidróxido de sódio-** As soluções de hidróxido de sódio foram preparadas a partir dissolução da quantidade de massa adequada da base com água deionizada.

- **Soluções de Br-PADAP 0,01 e 0,1% (m/v)-** As soluções de Br-Padap foram preparadas a partir da dissolução de 0,01 e 0,1g do soluto em 100 mL de etanol P.A.

- **Tampão acetato 0,1; 0,2 e 0,3 mol L^{-1} (pH 5 e 6)**: preparado pela dissolução de massa adequada de acetato de sódio hidratado em 1,0 L de água deionizada. Ajustou-se o pH desejado com ácido acético glacial.

- **Tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} (pH 7)**: preparado pela dissolução de massa adequada de fosfato de sódio em 1,0 L de água deionizada. Ajustou-se o pH desejado com ácido clorídrico e hidróxido de sódio.

- **Tampão amoniacal 0,1; 0,2 e 0,3 mol L^{-1} (pH 8 e 9)**: preparado pela dissolução de massa adequada de cloreto de amônio em 1,0 L de água deionizada. Ajustou-se o pH desejado com hidróxido de amônio.

- **Soluções utilizadas nos teste dos interferentes**: As soluções de interferentes foram preparadas a partir de vários padrões (Ca, CO_3, Zn, Co, Cd, Cr, Ni, Cu,

Fe, Pb, Na, Cl e Mn) para várias concentrações com volumes adequados e diluídas para 50 mL com água deionizada.

3.5 Coleta e armazenamento das amostras

Foram coletadas amostras de folhas de chás no comércio na cidade de Jequié-Ba para aplicação na determinação de manganês e chumbo. Para a validação do método utilizando o teste de adição e recuperação de chumbo e manganês. Coletou-se folhas de chás (espécies distintas). Um material de referência certificado de folhas de maçã (NIST SRM 1515) foi adquirida também para a avaliação da exatidão do método.

As amostras, exceto o NIST 1515 foram trituradas em um liquidificador e tamisses de 500 micras, até a obtenção de um pó fino e seguiu-se com a digestão ácida (descrita em 3.6).

Após a digestão foram armazenadas em um refrigerador. No dia das análises as amostras foram neutralizadas com frações de volumes de solução aquosa de NaOH saturado, tamponadas com 8 mL em pH 9, adicionou-se 500 μL de reagente complexante Br-Padap 0,01% (m/v), completou-se o volume para 50 mL. Levou-se para as medidas em triplicatas no FAAS com o sistema de pré-concentração em linha proposto.

3.6 Preparo da amostra

Aproximadamente foi medido 0,3 g da amostra em papel manteiga e transferiu-se para tubos de digestão, em seguida adicionou-se 2,0 mL de HNO_3 e 0,5 mL de H_2O_2. Aguardou por alguns minutos e levou para um bloco digestor com um sistema simulando o dedo frio (Figura 10) a uma temperatura entre 100 e 150 ºC por 2 horas, até a completa mineralização da amostra e obtenção de uma solução límpida, com cuidado para não deixar secar. O procedimento de digestão das amostras foi feito em triplicata. Para o NIST SRM 1515 (Folhas de maçã) mediu-se aproximadamente 0,1 g, e seguiu-se o mesmo procedimento, citado anteriormente para a mineralização da amostra. O volume final da amostra é mostrado no item 3.5.

Figura 10. Sistema usado na digestão ácida das amostras de folhas chás e material de referência certificado. Fonte: Acervo de fotos do autor

3.7 Confecção dos reatores enovelados

Os dois reatores enovelados foram construídos com material polimérico PTFE, ambos possuíam tamanho de 200 cm, diâmetro externo de 1,5 mm e interno de 0,5 mm e o diâmetro de aproximadamente dos loops foram de 5 mm. A Figura 11 mostra as etapas de confecção de um reator enovelado.

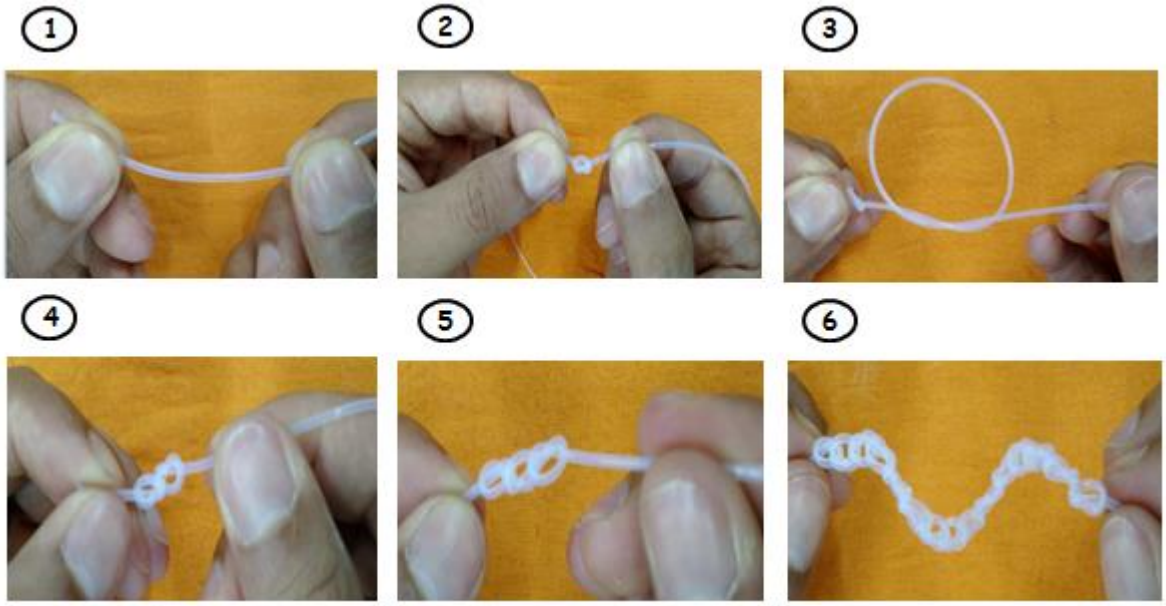


Figura 11. Demonstração das etapas de construção de um reator enovelado. Fonte: Acervo de fotos do autor

Corta-se o tubo de PTFE no tamanho a ser usado, entrelaça-o e puxa-o as suas extremidades para a formação da alça (loop), evitando-se estrangulamento nos nós, este processo se repete até a construção do RE.

3.8 Procedimento do sistema em linha automatizado proposto para a pré-concentração de Mn^{2+} e Pb^{2+}

O sistema de pré-concentração em linha automatizado proposto para a determinação de Mn^{2+} e Pb^{2+} em amostras de folhas de chás está ilustrado na Figura 12. A página oficial do aduino apresenta tutoriais com exemplos de aplicações e códigos (www.arduino.cc).

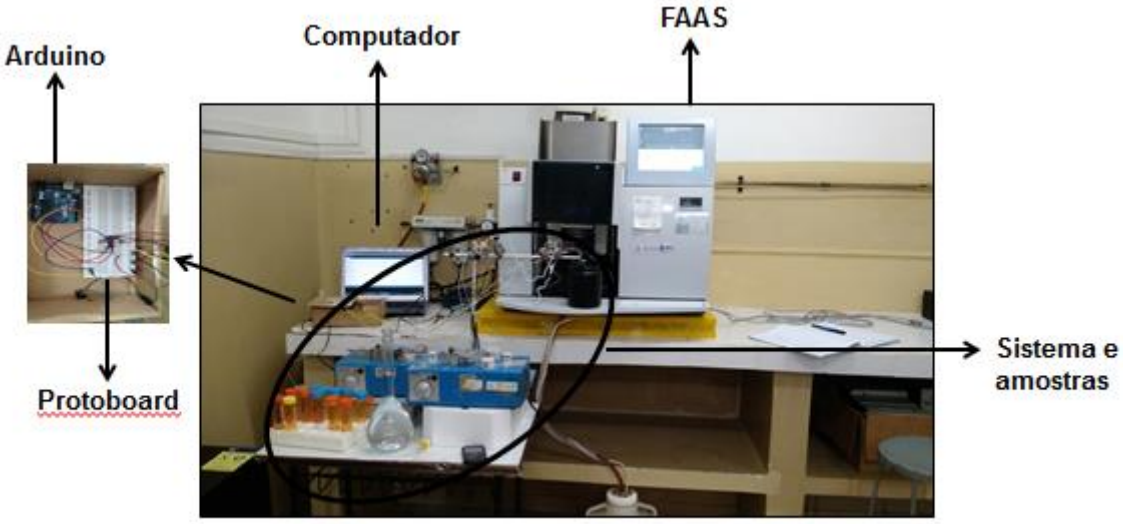


Figura 12. Imagem do sistema de pré-concentração em linha em uma visão geral. Fonte: Acervo de fotos do autor

A Figura 13 apresenta um esquema do funcionamento do sistema de pré-concentração em linha automatizado.

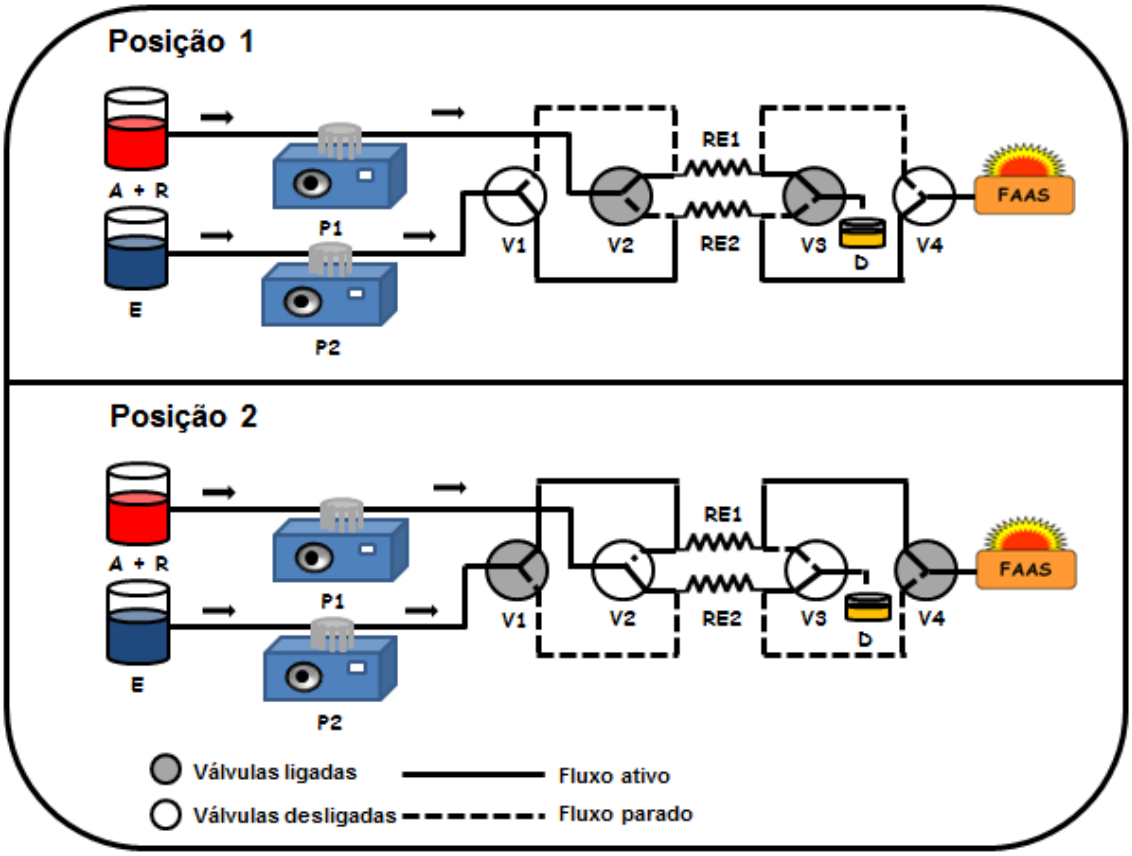


Figura 13. Sistema de pré-concentração em linha automatizado para determinação de Mn^{2+} e Pb^{2+} utilizando duplo reator enovelado. Fonte: Acervo de fotos do autor

Este funcionamento pode ser divido em duas partes, posição 1 e 2. Na posição 1 a amostra de Mn^{2+}/Pb^{2+} (concentrações de 50 e 200 μg L^{-1}, respectivamente) e reagente, na forma de um complexo é propulsionado pela bomba peristáltica 1 (P1), entra na válvula 2 (V2) que está ligada (passando corrente), vai para o reator enovelado 1(RE1), os complexos de Mn^{2+}-Br-Padap e Pb^{2+}-Br-Padap são retidos nas paredes do RE1 e a solução entra na válvula 3 (V3) que também está ligada, e vai para um recipiente de descarte (D).

Enquanto isso simultaneamente a este processo, a bomba peristáltica 2 (P2) propulsiona o eluente que passa pela válvula 1 (V1) que está desligada, entra no reator enovelado 2 (RE2), passa pela válvula 4 (V4) desligada e vai para o descarte do FAAS. Após o tempo de 1 minuto de pré-concentração no RE1 e eluição no RE2, as válvulas são comutadas, a válvula ligada, desliga, e a desligada, liga. Com isso na posição 2, o eluente é injetado nas mesmas válvulas citadas anteriormente (V1 e V4), passando agora pelo RE1, extraindo o analito do complexo formado anteriormente na posição 1 e levando para a detecção no FAAS.

Enquanto isso no mesmo tempo a amostra e o reagente na forma complexada percola a V2, adsorvido nas paredes do RE2, passa pela V3 e vai para o descarte. Após 1 minuto novamente, as válvulas trocam de posição simultaneamente, e estes processos são repetidos quantas vezes forem necessárias. Devido a não haver perca de tempo na eluição, ou seja, ela não é considerada no cálculo da frequência por causa da troca de posição alternadamente na etapa de pré-concentração para ambos os processos, a P2 é desligada após a medida no FAAS, sendo acionada para a eluição. O sistema possui características monoelementar.

3.9 Procedimentos da otimização univariada e multivariada

O processo de otimização foi realizado de forma univariada e multivariada. A otimização foi realizada para as variáveis tempo de pré-concentração e volume do reagente complexante adicionado na amostra. Usou-se o planejamento fatorial fracionário para a triagem das variáveis que afetam significativamente estes tipos de sistemas (concentração do HCl como eluente, concentração do reagente complexante Br-Padap, vazão de amostragem, pH e concentração do tampão), e o planejamento Doehlert para encontrar os pontos ótimos das varáveis consideradas significativas. Os dados experimentais foram processados no STATISTÍCA 10 a um nível de confiança de 95%.

O sistema de pré-concentração em linha foi baseado no tempo de 1 minuto. Na etapa de otimização, utilizou-se soluções de 50 mL de Mn^{2+} 50 $\mu g\ L^{-1}$ e Pb^{2+} 200 $\mu g\ L^{-1}$, como resposta analítica obteve-se a absorvância.

3.10 Condições experimentais iniciais do sistema de pré-concentração em linha automatizado

O procedimento geral do presente trabalho foi aplicado à adsorção de Mn^{2+} e Pb^{2+} por dois reatores enovelado, após a formação complexo com o Br-PADAP. As condições experimentais iniciais foram escolhidas de acordo com experimentos prévios. Estas condições são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições experimentais iniciais utilizadas no sistema em linha automatizado para a pré-concentração de Mn^{2+} e Pb^{2+}.

Tamanho do reator enovelado (cm)	200
Tempo de pré-concentração (min)	1,0
Concentração de Br-Padap (% m v^{-1})	0,01
pH	9,0
Vazão de amostragem (mL min^{-1})	10,0
Concentração do eluente (mol L^{-1})	1,0
Tampão	Amoniacal
Concentração do tampão (mol L^{-1})	0,3

4 – Resultados e discussão

4.1 Programação do sistema em linha automatizado usando arduino

Neste sistema foi utilizado uma placa Arduino Uno R3 usado como microcontrolador das quatro válvulas solenóides de três vias. Foi utilizado também uma interface com circuito integrado ULN 2803, com finalidade de fazer com que os comandos originados no computador através de software open source para programação do Arduino cheguem às válvulas solenóides. O acionamento das válvulas solenóides se dá por uma fonte de alimentação de 12 V cc e corrente de 2ª. A placa Arduino é alimentada com uma tensão de 5 V cc da porta serial USB de um computador (ou bateria), cada válvula acionada opera com 150 à 500 mA de corrente. Um diodo foi colocado entre a porta de 12 V do circuito integrado e a fonte de 12 V com o objetivo de limitar a tensão que chega ao circuito integrado, e evitar sua danificação. A Figura 14 mostra um esquema de ligação elétrica da placa do computador, fonte de 12 V, Arduino, circuito integrado ULN 2803 e as válvulas solenóides baseado no trabalho de KAMOGAWA e MIRANDA [76].

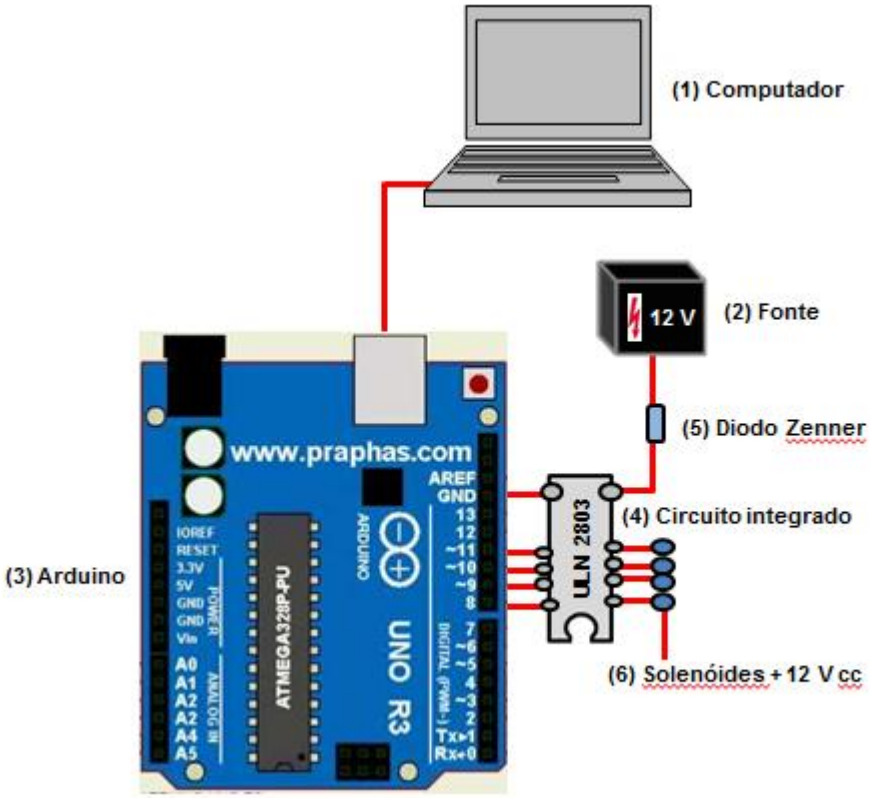


Figura 14. Esquema da parte elétrica envolvendo (1) computador, (2) fonte, (3) arduino, (4) circuito integrado, (5) diodo Zenner e as (6) válvulas solenóides. Fonte: Acervo de fotos do autor

Os comandos usados para a criação da programação do controle das válvulas solenóides foram escritos em linguagem C para o presente trabalho, e estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Funções utilizadas para o controle das válvulas solenóides gravadas na placa arduino após a programação para o trabalho proposto.

Função	Comentário

int valv1 = 8;
int valv2 = 9;
int valv3 = 6;
int valv4 = 11;
	// Define as variáveis do tipo inteiras das válvulas 1,2,3 e 4 nas posições dos pinos digitais 8, 9, 6 e 11, respectivamente

void setup(){ pinMode (valv1, OUTPUT); pinMode (valv2, OUTPUT); pinMode (valv3, OUTPUT); pinMode (valv4, OUTPUT);}	// Define as portas de comando lógico das válvulas solenoides, ativando as portas 8 (Valv1), 9 (valv2), 6 (valv3) e 11 (valv4) como saída de informações

void loop(){
digitalWrite (valv2, HIGH);
digitalWrite (valv3, HIGH);
digitalWrite (valv1, LOW);
digitalWrite (valv4,LOW);
delay(60000);
	// Ciclo de comando 1. As válvulas 2 e 3 estão acionadas, e as válvulas 1 e 4 estão desligadas em um delay de 60 s

digitalWrite (valv1, HIGH); digitalWrite (valv4, HIGH); digitalWrite (valv2,LOW); digitalWrite(valv3,LOW); delay(60000); }	// Ciclo de comando 2. As válvulas 1 e 4 estão acionadas, e as válvulas 2 e 3 estão desligadas em um delay de 60 s

A função “int” define o nome e a posição de cada variável. A função “void setup” realiza as ações dentro dos colchetes uma única vez, geralmente utilizada

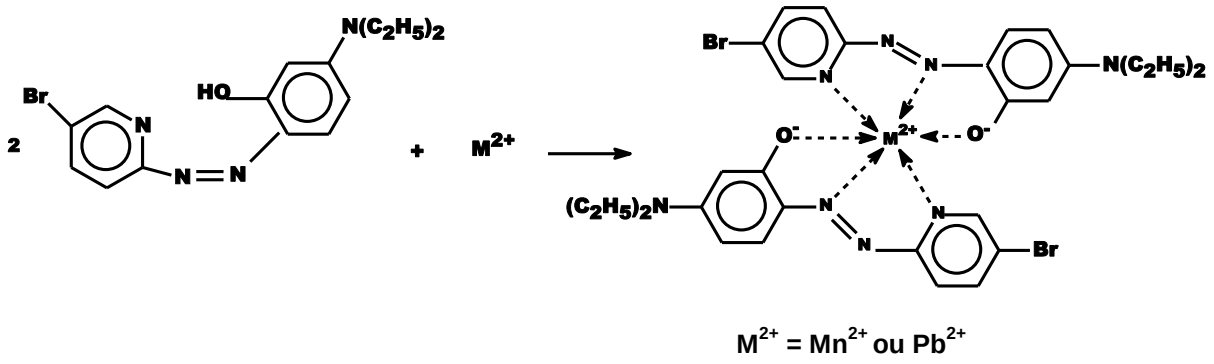
nas configurações iniciais, a função “pinMode” ativa as portas digitais (0 a 13), como saída (OUTPUT) ou entrada de dados (INPUT), a função “void loop” realiza as ações dentro dos colchetes de forma cíclica, permanentemente. A função “digitalWrite”, indicada como HIGH, liga a porta digital e LOW, desliga a porta digital e o delay estabelece o tempo de espera em milissegundos [76]. Neste trabalho, foram utilizadas quatro portas digitas (6, 8, 9 e 11), como o código escrito em linguagem C no software do arduino foi gravado no microcontrolador que passa a realizar as ações de forma independente e contínua.

4.2 Reação envolvida na formação do complexo e adsorção

A aproximação entre moléculas, átomos ou íons uns dos outros, podem gerar dois fenômenos. Eles podem reagir ou eles podem interagir. Uma reação química por definição requer que ligações químicas sejam quebradas e/ ou formadas. Usualmente as energias envolvidas neste processo variam entre 50 e 100 kcal mol^{-1}. Uma interação química significa que as moléculas se atraem ou se repelem entre si, sem que ocorra a quebra ou formação de novas ligações químicas. Estas interações são frequentemente chamadas de interações intermoleculares. As energias envolvidas em tais tipos de interações são muito menores que aquelas envolvidas em processos reativos, variando usualmente entre 0,5 a 10 $kcal.mol^{-1}$ [77].

No presente trabalho, a reação de formação do complexo entre Mn^{2+}/Pb^{2+} com Br-PADAP, se deu com a adição do reagente complexante a amostra em uma configuração inédita para este tipo de sistema usando reator enovelado, eliminando a linha do reagente quelante, diferentemente do que é apresentado em vários trabalhos na literatura. A adsorção do complexo formado ocorreu através de uma interação deste com as paredes de um reator enovelado.

A)



B)

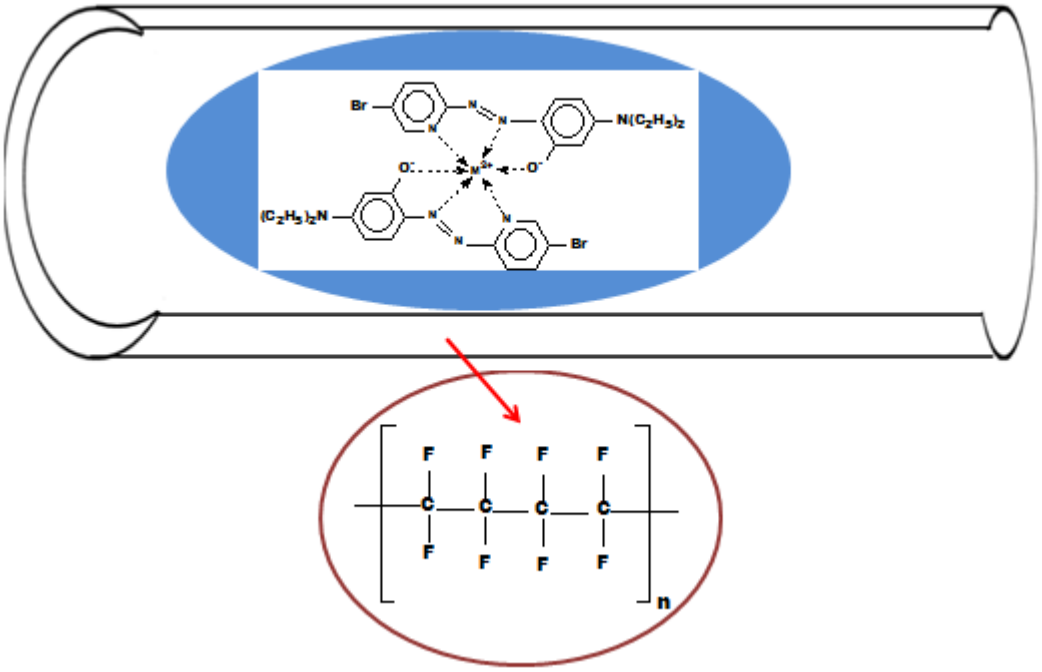


Figura 15. (A) Reação de complexação do Mn^{2+} e Pb^{2+} pelo Br-PADAP, e (B) interação do complexo hidrofóbico com a parede do reator enovelado.

A Figura 15A apresenta a reação de formação do complexo de Mn^{2+} e Pb^{2+} pelo Br-PADAP, e a adsorção do complexo nas paredes do reator enovelado Figura 15B. O reagente Br-PADAP em meio básico sofre uma desprotonação, de um hidrogênio ligado a um oxigênio, que juntamente com pares de elétrons dos

nitrogênios, formam um quelato tridentado que realiza ligações coordenadas com Mn^{2+} e Pb^{2+}. Após a formação do complexo alaranjado, dois fenômenos são responsáveis pela retenção do complexo nas paredes dos reatores enovelados. Uma força centrifuga gerada através um fluxo turbulento que muda de uma para várias direções, lança o quelato nas paredes do reator, e interações apolares ou forças dispersivas de London, pois o complexo e RE feito de politetrafluoretileno (PTFE) são espécies hidrofóbicas.

4.3 Otimização univariada do sistema de pré-concentração

4.3.1 Estudo do volume de Br-PADAP

O volume do reagente complexante Br-PADAP 0,01% (m v^{-1}). Foi estudado na formação dos complexos Mn^{2+} e Pb^{2+}, devido a configuração proposta ser descrita pela primeira vez, os volumes estudados variaram de 0,10 a 10,00 mL. Os resultados estão apresentados na Figura 16.

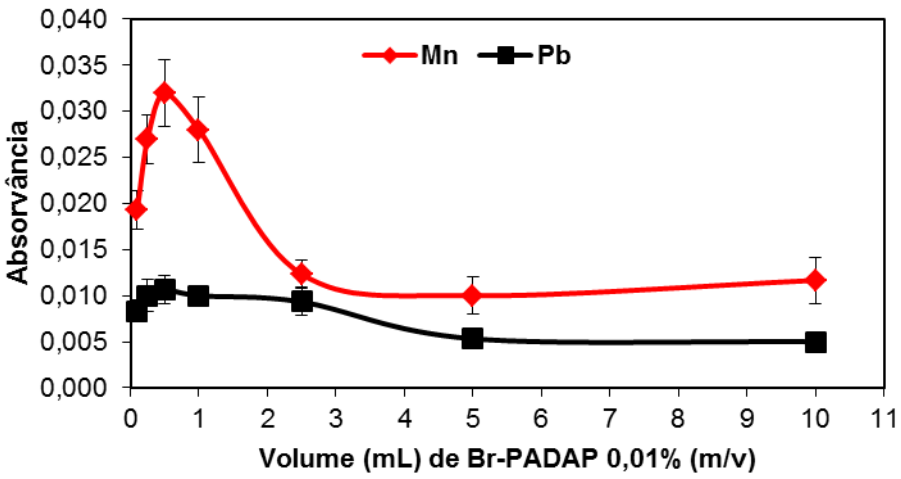


Figura 16. Influência do volume de Br-PADAP 0,01% (m/v) adicionado na amostra para a pré-concentração de Mn^{2+} e Pb^{2+} usando o sistema de pré-concentração proposto. pH: 9,0 ; vazão de amostragem (VA): 10,0 mL min^{-1}; concentração de eluente (HCl): 1,0 mol L^{-1}.

Os resultados apresentados na Figura 16 acima mostram um comportamento similar para ambos os metais estudados. O melhor volume na formação do complexo foi de 0,50 mL de Br-PADAP. Abaixo de 0,50 mL, a quantidade de Br-

Padap foi insuficiente para formar os complexos de Mn^{2+} e Pb^{2+}. Acima deste volume os complexos adsorvidos nas paredes do reatores enovelados podem está sendo solubilizados, pois o Br-PADAP é preparado em etanol, e esta (adsorção) pode está provavelmente sendo desfeita por excesso de etanol.

4.3.2 Estudo do tempo de pré-concentração

Em sistemas de pré-concentração em linha o estudo do tempo é um fator importante, pois está ligado diretamente com a frequência de amostragem. O período de pré-concentração foi variado no intervalo de 0,5 a 3,0 minutos, e os resultados são mostrados na Figura 17.

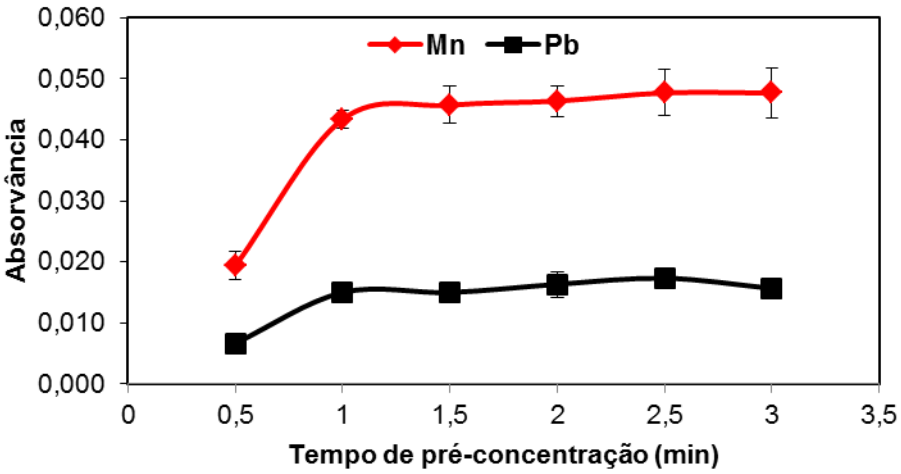


Figura 17. Influência do tempo na pré-concentração de Mn^{2+} e Pb^{2+} usando o sistema de pré-concentração em linha.

Analisando-se a Figura 17, pode verificar que há um aumento dos sinais para ambos os metais de 0,5 a 1,0 minuto. Entre 1,0 e 3,0 minutos observa-se que o sinal permanece constante. Este comportamento se deve a saturação do reator enovelado, ou seja, a capacidade do reator em adsorver os complexos de Mn^{2+} Pb^{2+} atingiu uma capacidade máxima. Com o propósito de manter uma boa frequência analítica e o baixo índice de consumo da amostra com boa sensibilidade, optou-se pelo tempo de 1,0 minuto.

4.4 Otimização multivariada do sistema de pré-concentração

4.4.1 Planejamento fatorial fracionário 2^{5-1}

O planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} foi realizado com a intenção de investigar a influência que estas cinco variáveis possuem sobre o sistema de pré-concentração. As variáveis selecionadas e seus níveis, superior e inferior, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Fatores e seus níveis experimentais estabelecidos para o planejamento fatorial fracionário 2^{5-1}.

Variáveis	Nível mínimo (-)	Nível máximo (+)
Vazão de amostragem (mL min^{-1})	5,0	10,0
Concentração do reagente (% m/v)	0,01	0,1
pH	7,0	9,0
Concentração do tampão (mol L^{-1})	0,1	0,3
Concentração de Eluente (mol L^{-1})	0,1	1,0

A matriz de planejamento e os resultados estão apresentados na Tabela 5 constando de dezesseis ensaios em duplicata. Os experimentos foram realizados de modo aleatório e os resultados foram obtidos em medidas de absorvância.

Tabela 5. Matriz e resultados do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para a determinação de Mn e Pb.

						Absorvância	
Experimentos	**VA**	**CR**	**pH**	**CT**	**CE**	**Mn**	**Pb**
1	+	+	+	+	+	0,023/0,022	0,011/0,011
2	+	+	+	-	-	0,033/0,026	0,012/0,010
3	+	+	-	+	-	0,035/0,031	0,019/0,020
4	+	+	-	-	+	0,043/0,048	0,021/0,018
5	+	-	+	+	-	0,048/0,054	0,012/0,010
6	+	-	+	-	+	0,063/0,071	0,019/0,016
7	+	-	-	+	+	0,023/0,021	0,023/0,025
8	+	-	-	-	-	0,017/0,018	0,035/0,036
9	-	+	+	+	-	0,016/0,011	0,006/0,004
10	-	+	+	-	+	0,010/0,011	0,009/0,008
11	-	+	-	+	+	0,011/0,014	0,011/0,010
12	-	+	-	-	-	0,018/0,020	0,007/0,008
13	-	-	+	+	+	0,015/0,014	0,008/0,010
14	-	-	+	-	-	0,026/0,023	0,010/0,013
15	-	-	-	+	-	0,015/0,010	0,013/0,015
16	-	-	-	-	+	0,014/0,010	0,010/0,011

VA: vazão de amostragem; CR: concentração do reagente; CT: concentração do tampão; CE: concentração do eluente (HCl)

As Figuras 18 e 19 apresentam os resultados para Mn e Pb em forma de gráfico de Pareto para as variáveis VA, pH, CT, CR e CE. No caso de triagem de variáveis, as interações não são consideradas.

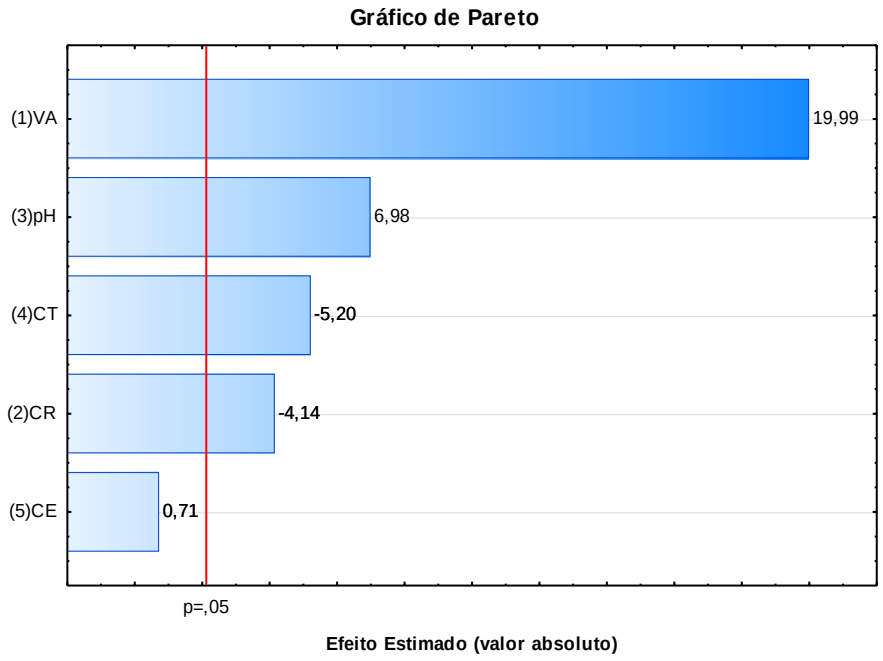


Figura 18. Gráfico de pareto para as variáveis estudadas usando o planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} no sistema de pré-concentração de Mn.

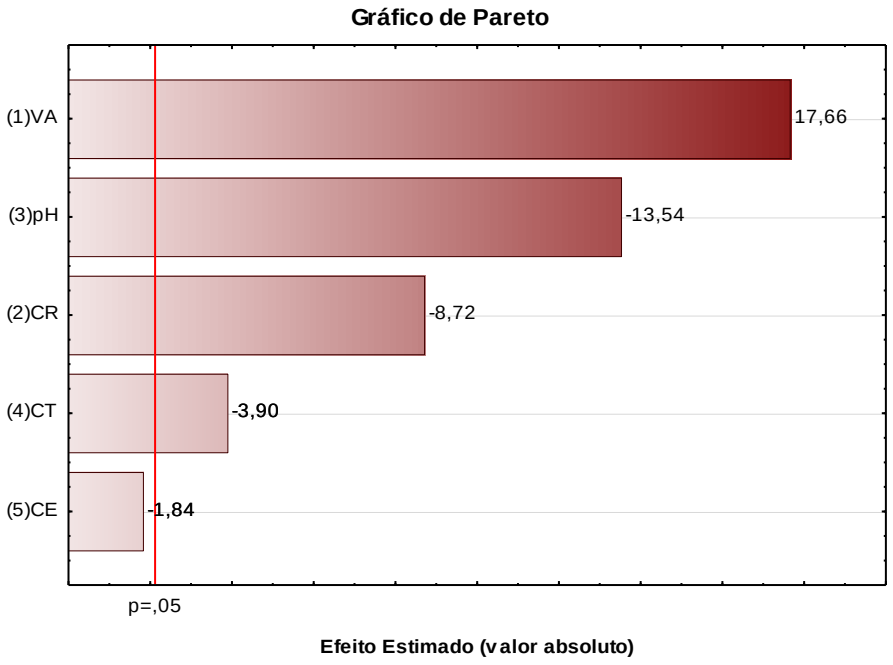


Figura 19. Gráfico de pareto para as variáveis estudadas usando o planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} no sistema de pré-concentração de Pb.

Os gráficos de Pareto mostraram que as variáveis VA, pH, CR e CT apresentaram efeitos significativos. No entanto, junto com a variável CE que não apresentou efeito significativo e fixou-se em 0,3 mol L^{-1}, a CR foi fixada em 0,01% (m v^{-1}), para os experimentos posteriores. No caso da CR, o efeito foi relativamente significativo, porém um efeito negativo para esta variável não condiz com o que se esperava, pois com uma maior concentração de reagente complexante espera-se uma maior resposta, o efeito contrário pode ser devido a ação do álcool que foi a substância usada para dissolver o reagente, que age lixiviando o complexo adsorvido nas paredes do reator enovelado.

A variável VA apresentou um maior efeito significativo para os metais Mn^{2+} e Pb^{2+}, mostrando-se como a variável mais crítica para este tipo de sistema. Isto é totalmente justificável, pois para uma adsorção eficiente do complexo nas paredes do reator enovelado, são necessários fluxos turbulentos e estes fluxos são obtidos em altas vazões de amostragem. O pH e a CT também apresentaram-se significativas, estes fatores são críticos para que reações de complexação aconteçam.

4.4.2 Planejamento Doehlert para três varáveis

Após a avaliação e triagem das variáveis significativas, o segundo passo do planejamento foi determinar os pontos críticos destas variáveis.

Um planejamento Doehlert para três variáveis foi estudado para as variáveis VA, pH e CT. A Tabela 6 apresenta a matriz para este planejamento na determinação de Mn e Pb.

Este planejamento foi escolhido por apresentar vantagens em relação aos planejamentos Box-Benhken e composto central para os propósitos deste trabalho, pois permite estudar as variáveis em níveis diferentes e possuir boa eficiência na modelagem matemática.

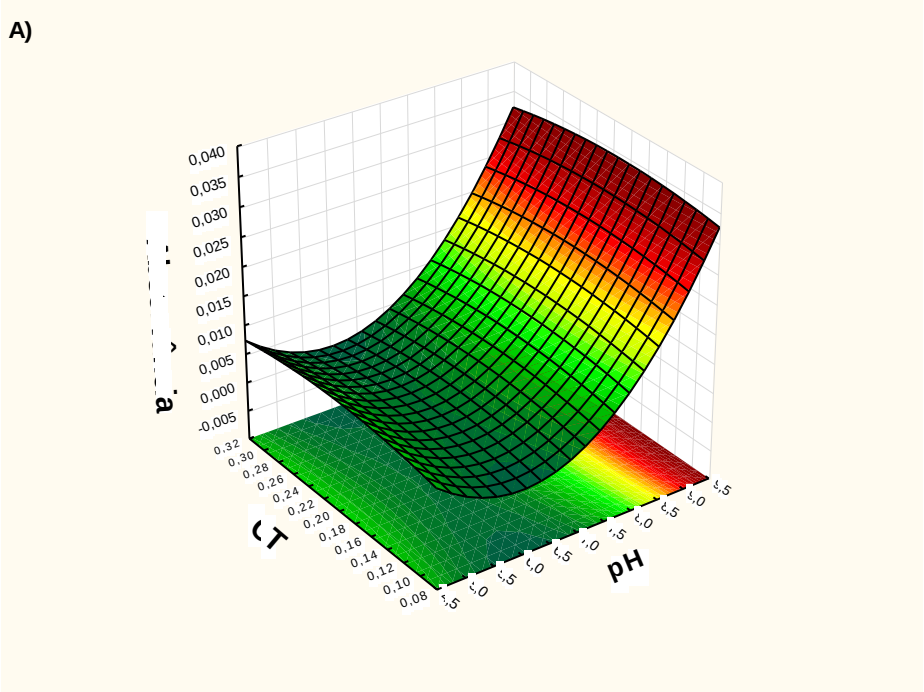
Tabela 6. Matriz Doehlert para três variáveis na otimização do sistema para Mn e Pb.

Experimentos	VA (mL min^{-1})	pH	CT (mol L^{-1})	Absorvância	
				Mn	Pb
1	8	9	0,2	0,033/0,030	0,020/0,017
2	7	8	0,1	0,008/0,008	0,011/0,010
3	7	8	0,3	0,008/0,006	0,020/0,022
4	9	8	0,1	0,010/0,010	0,022/0,022
5	9	8	0,3	0,011/0,010	0,031/0,036
6	6	7	0,2	0,006/0,007	0,008/0,007
7	8	7	0,2	0,004/0,001	0,007/0,006
8	10	7	0,2	0,007/0,007	0,007/0,006
9	7	6	0,1	0,000/0,000	0,024/0,024
10	7	6	0,3	0,000/0,000	0,014/0,010
11	9	6	0,1	0,008/0,010	0,031/0,028
12	9	6	0,3	0,010/0,008	0,013/0,014
13	8	5	0,2	0,000/0,000	0,008/0,008

VA: vazão de amostragem; CT: concentração do tampão

Os dados obtidos na execução dos experimentos que compõem esta matriz acima geraram as superfícies de resposta e gráficos das curvas de níveis.

As Figuras 20 e 21 apresentam as superfícies de resposta e a curvas de nível para o Mn.



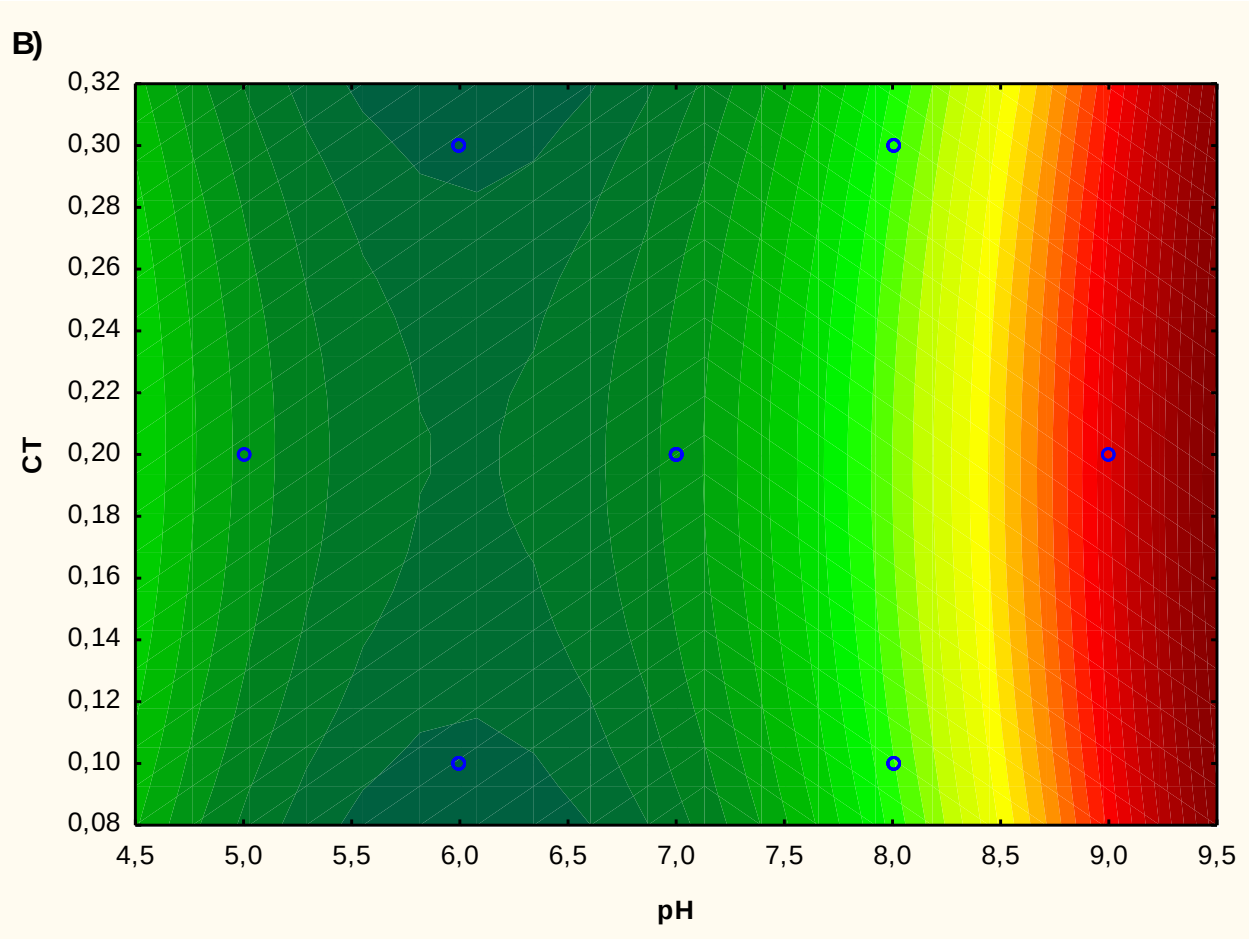


Figura 20. Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) para pH x CT na determinação de Mn.

Analisando-se a Figura 20, pode-se verificar que o pH ótimo está em torno de 9,0, e a concentração do tampão não apresenta uma faixa ótima.

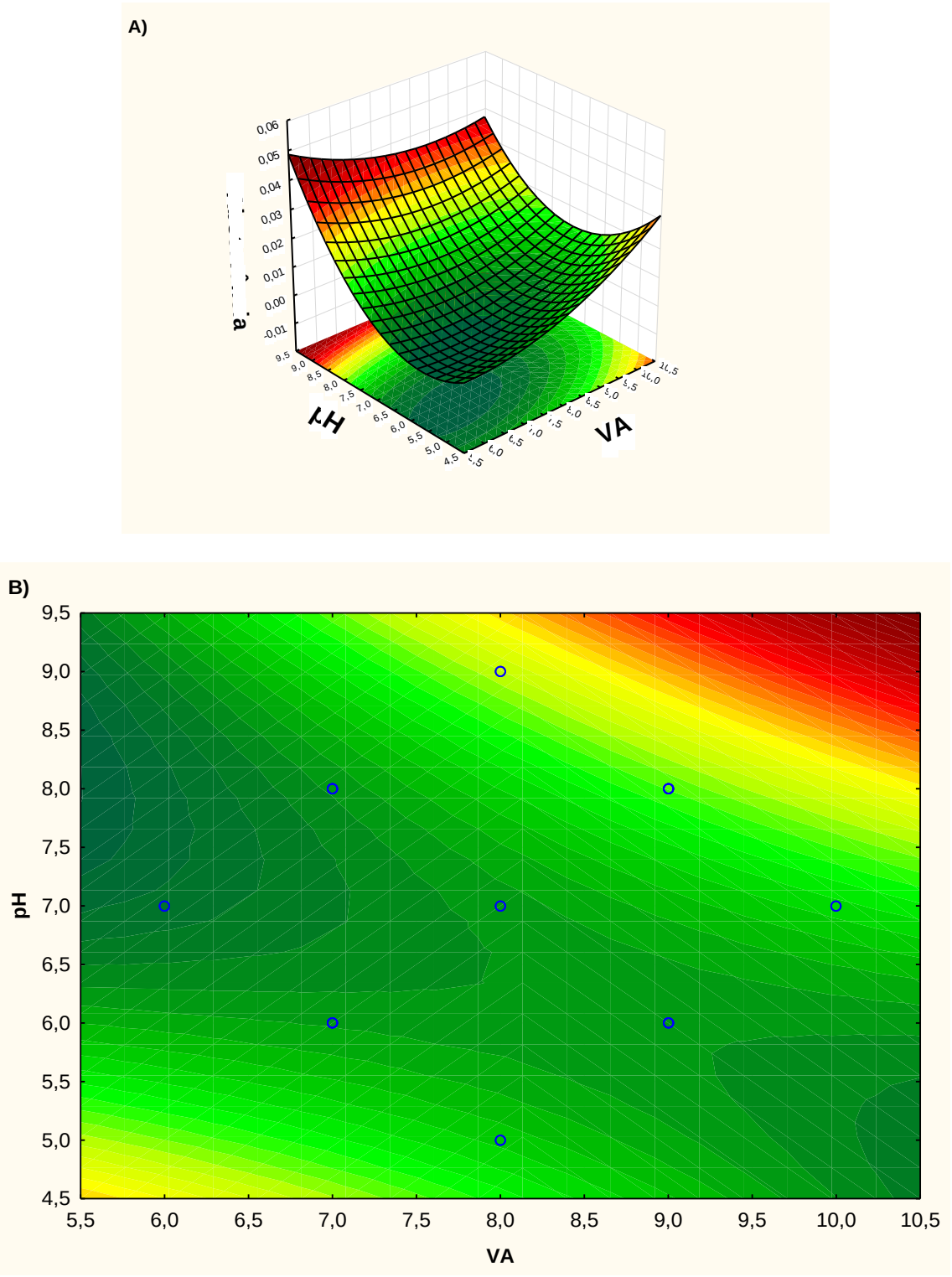
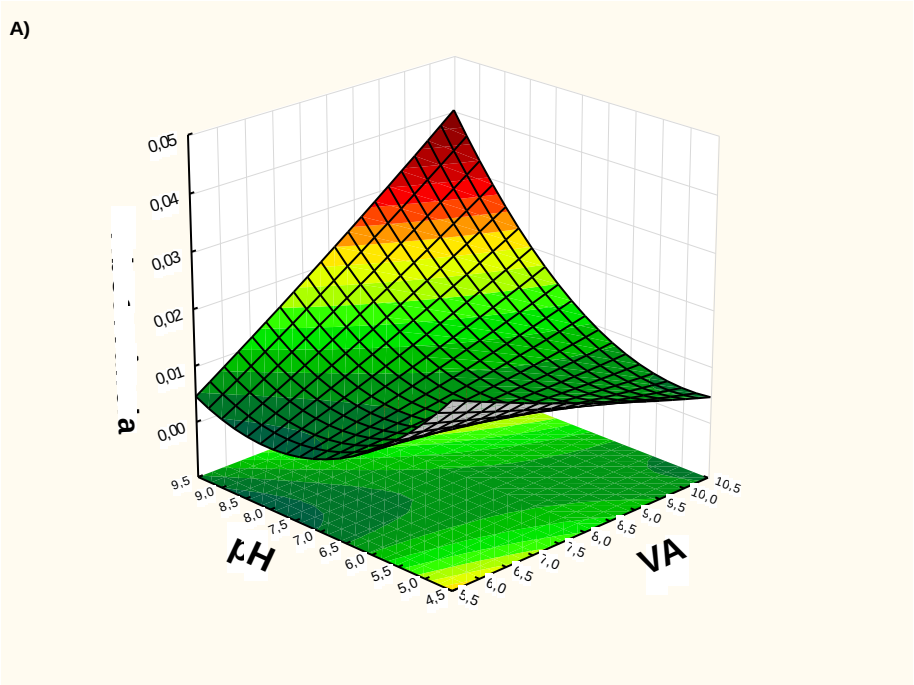


Figura 21. Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) para pH x VA na determinação de Mn.

A Figura 21 mostra que a vazão de amostragem e pH, apresentam os valores ótimos em torno de 10,0 mL min^{-1} e 9,,0, respectivamente.

As Figuras 22 e 23 apresentam as superfícies de resposta e a curvas de nível para o Pb.



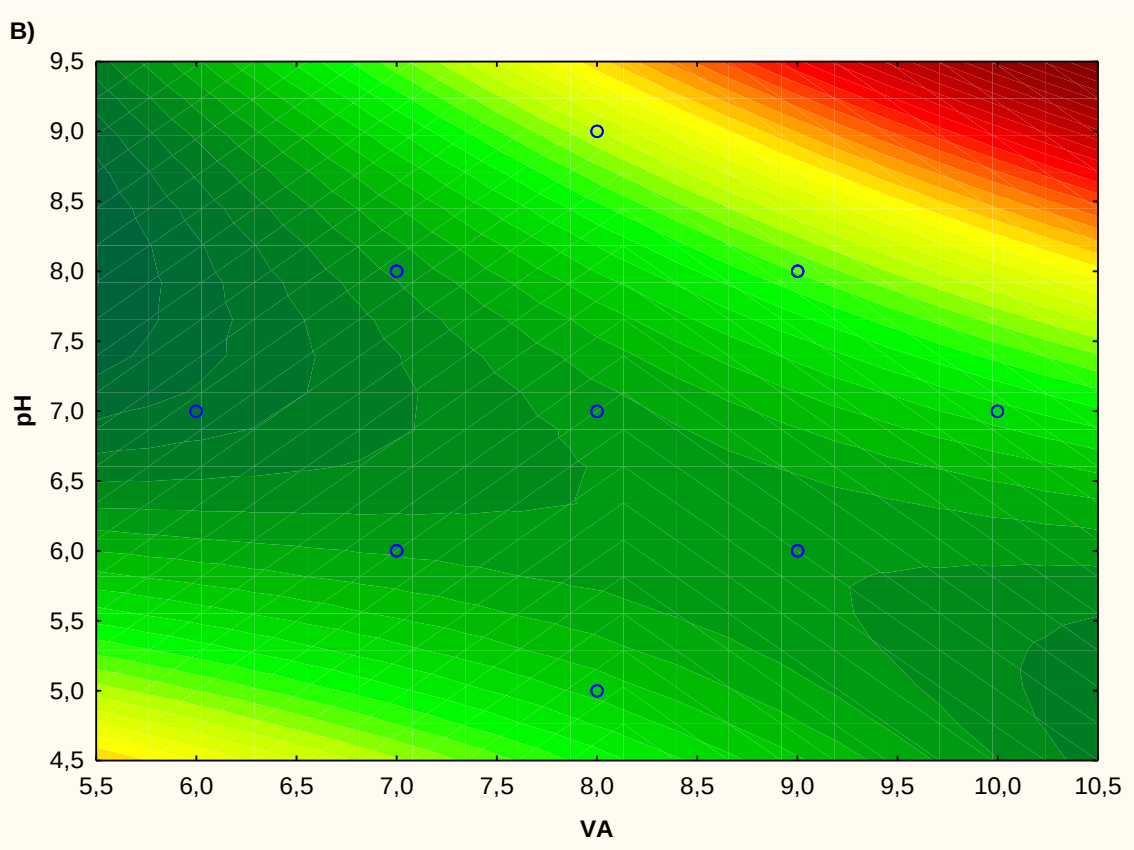
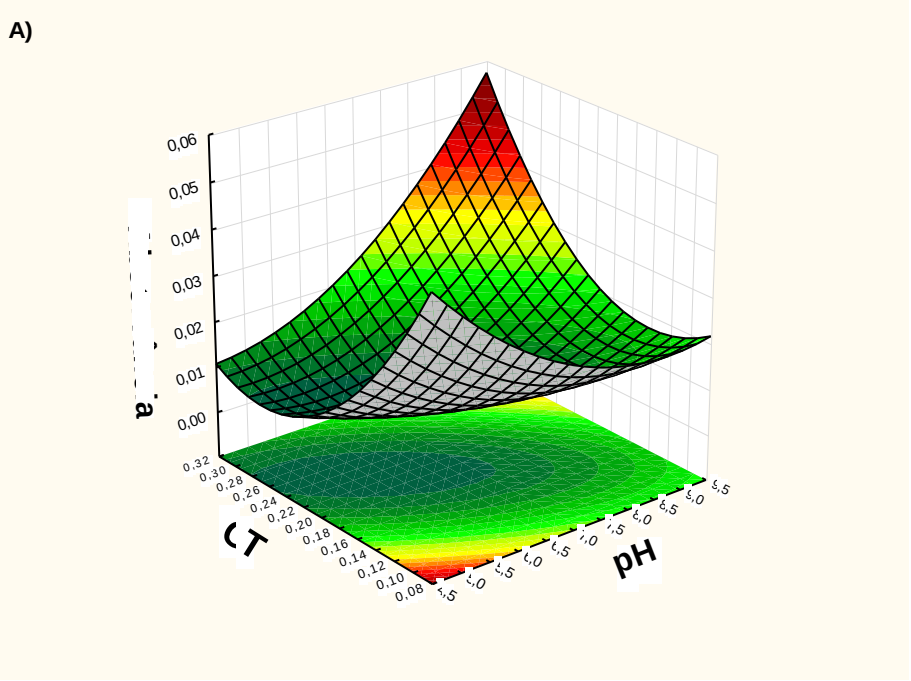


Figura 22. Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) para pH x VA na determinação de Pb.



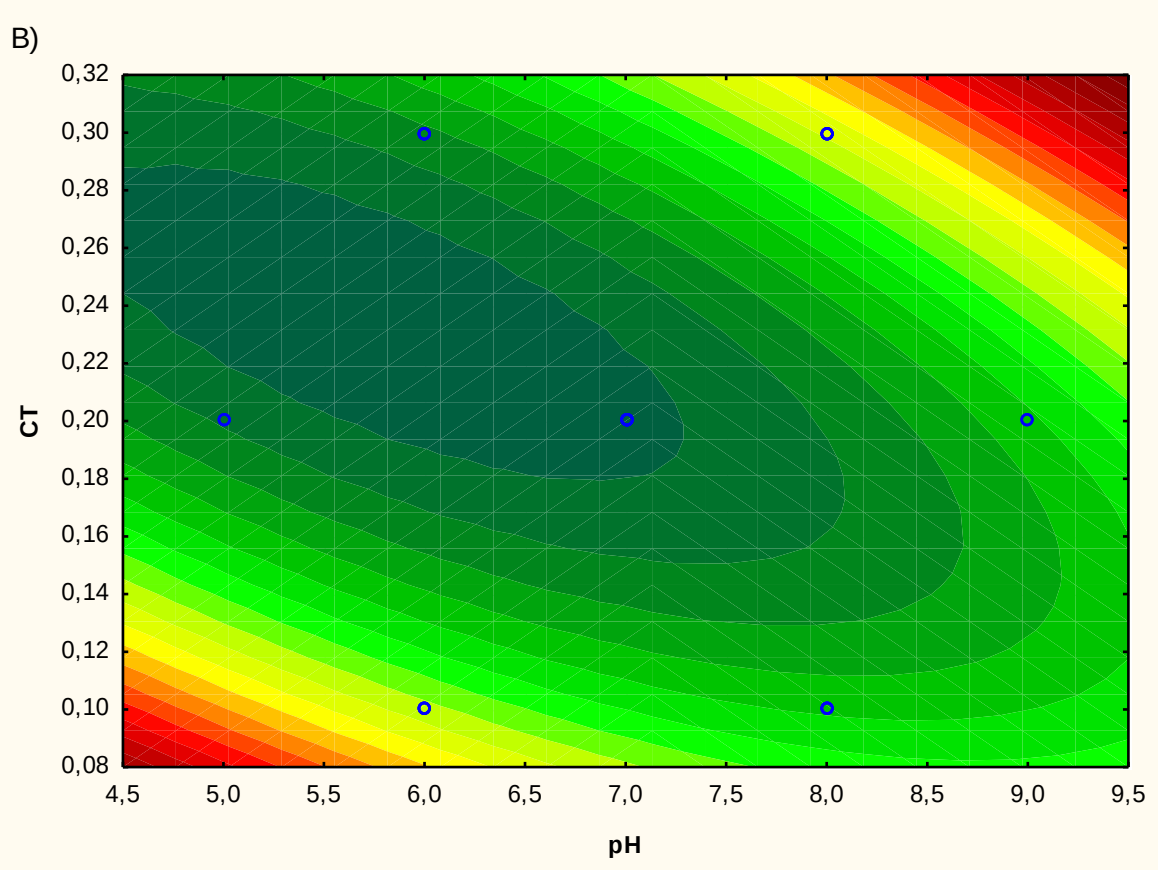


Figura 23. Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) para pH x CT na determinação de Pb.

Os resultados para o chumbo nas Figuras 22 e 23 mostraram que o pH ótimo está em torno de 9,0; a concentração do tampão fixou-se em 0,3 mol L^{-1} e vazão de amostragem em 10,0 mL min^{-1}.

A Tabela 7 apresenta as condições ótimas do sistema de pré-concentração em linha automatizado utilizando duplo reator enovelado para a determinação de Mn^{2+} e Pb^{2+} em amostras de chás.

Tabela 7. Condições otimizadas do sistema em linha automatizado para pré-concentração e determinação de Mn e Pb usando reator enovelado por FAAS.

Tamanho do reator enovelado (cm)	200
Tempo de pré-concentração (min)	1,0
Concentração de Br-Padap (% m/v)	0,01
Volume de Br-Padap (μL)	500
pH	9,0
Vazão de amostragem (mL min^{-1})	10,0
Concentração do eluente (mol L^{-1})	1,0
Tampão	Amoniacal
Concentração do tampão (mol L^{-1})	0,3

4.5 Estudo dos interferentes

O estudo dos interferentes é um parâmetro que influência na efetiva adsorção dos analitos em sistemas de pré-concentração.

Com o intuito de avaliar a seletividade do sistema de pré-concentração em linha automatizado utilizando duplo reator enovelado na determinação de Mn^{2+} e Pb^{2+} em amostras de chás, verificou-se a influência de alguns íons na sensibilidade do sistema. A Tabela 8 mostra os resultados deste estudo.

Tabela 8. Interferentes de Mn^{2+} (50 μg L^{-1}) e Pb^{2+} (200 μg L^{-1}), foram considerados interferentes o íon concomitante que alterou o sinal analítico em ± 10% no sinal de absorvância.

Espécie	Quantidade (μg L^{-1})	
	Mn	**Pb**
Ca^{2+}	750 (19,3%)	500 (42,1%)
CO_3^{2-}	750 (19,3%)	500 (42,1%)
Zn^{2+}	250 (53,8%)	1000 (34,2%)
Co^{2+}	250 (87,1%)	200 (25,4%)
Cd^{2+}	50 (32,2%)	500 (14,0%)
Cr^{3+}	250 (48,2%)	200 (21,0%)
Ni^{2+}	250 (94,7%)	200 (33,3%)
Cu^{2+}	50 (77,2%)	200 (49,1%)
Fe^{2+}	50 (19,3%)	200 (50,9%)
Pb^{2+}	250 (30,4%)	-
Na^{+}	50 (12,9%)	500 (14,0%)
Cl^{-}	50 (12,9%)	500 (14,0%)
Mn^{2+}	-	500 (18,4%)

Os resultados descritos na Tabela 18, mostram que o método apresenta baixa tolerância para alguns íons como: Cd, Cu, Cl, Fe e Na na determinação de Mn, e Co, Cr, Ni, Cu e Fe na determinação de Pb. Esta baixa tolerência pode ser devido a preferência que estes íons apresentam com relação ao analito.

4.6 Validação do método analítico

O processo de validação define uma exigência analítica, e confirma que o método proposto tem capacidade de desempenhar com consistência a determinação do analito (Mn^{2+} e Pb^{2+}) [78]. Na validação de procedimentos de pré-concentração a obtenção de alguns parâmetros analíticos se faz necessário, tais como: linearidade e faixa dinâmica, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão, entre outros [79].

4.6.1 Linearidade

A linearidade de um método é a capacidade deste em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância estudada. Podendo ser estabelecida por uma correlação dos dados, através de uma função matemática que represente mais adequadamente a relação concentração versus sinal analítico. A relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de estudo, na maioria das vezes deve ser determinada experimentalmente [80]. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressada como uma equação de reta chamada de curva de calibração ou analítica.

A linearidade pode ser calculada a partir da regressão linear de uma curva de calibração. O valor do coeficiente de correlação (R) permite uma estimativa da qualidade da curva, pois quanto mais próximo de 1,0 menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza do coeficiente de regressão estimado. A Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda que um coeficiente de correlação seja de no mínimo igual a 0,99 e que os pontos na curva de calibração seja realizada através da análise de no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes [81]. O presente trabalho gerou quatro curvas de calibração (Figuras 24 e 25) duas com pré-concentração e duas sem pré-concentração, e suas características são apresentadas na Tabela 9 para Mn e Pb.

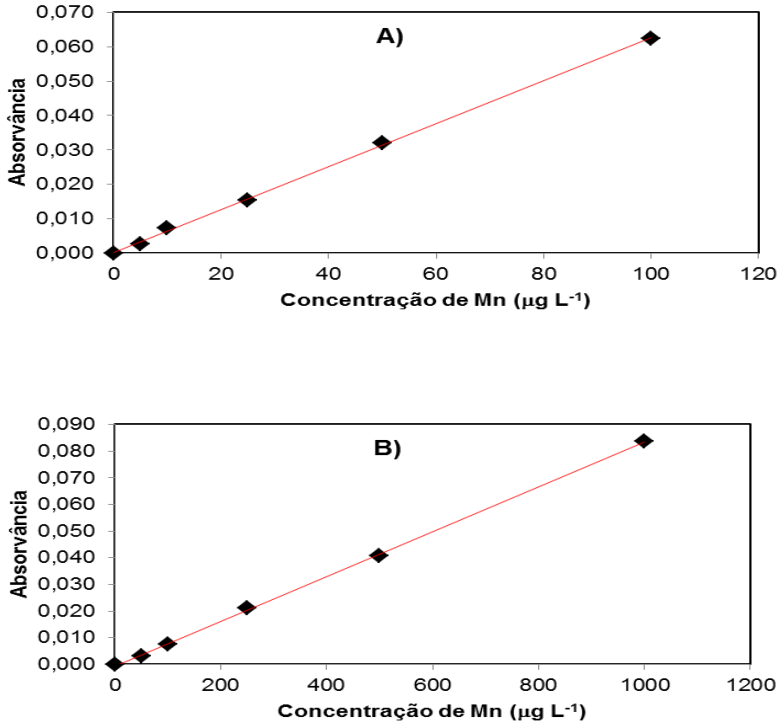


Figura 24. Curvas analíticas com o sistema de pré-concentração proposto (A) e na medida direta (B) na determinação de Mn.

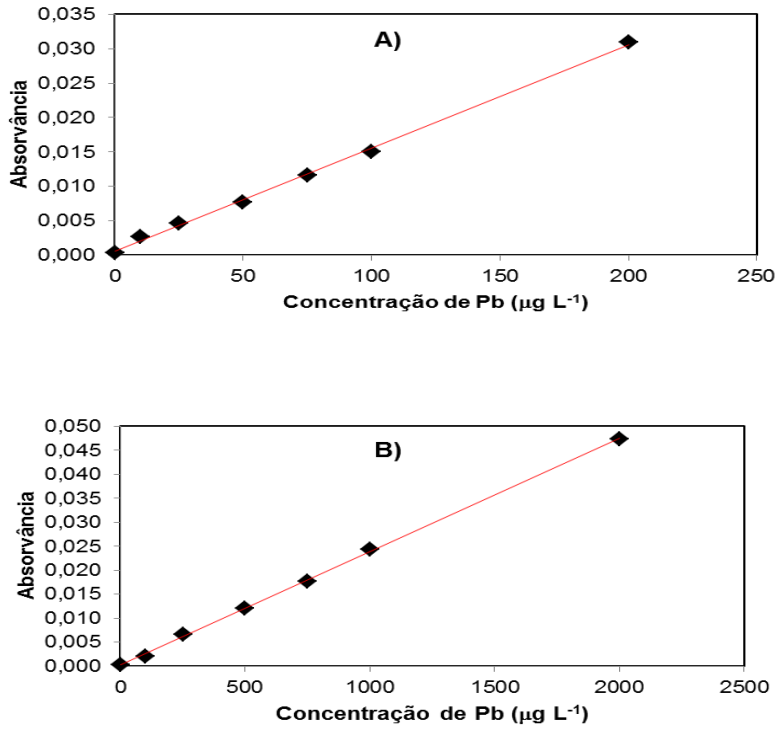


Figura 25. Curvas analíticas com o sistema de pré-concentração proposto (A) e na medida direta (B) na determinação de Pb.

Tabela 9. Dados relativos às curvas de calibração obtidas.

	Mn	
Característica da curva de calibração	Com pré-concentração	Medida direta
Equação da regressão linear	$A = 6{,}0\times10^{-4}C + 2{,}0\times10^{-4}$	$A = 8{,}0\times10^{-5}C + 6{,}0\times10^{-4}$
Coeficiente de correlação	0,9993	0,9997
Faixa de concentração (µg L^{-1})	5,0 – 100,0	50,0 – 1000,0
Faixa dinâmica (µg L^{-1})	7,0 – 100,0	---
	Pb	
Característica da curva de calibração	Com pré-concentração	Medida direta
Equação da regressão linear	$A = 2{,}0\times10^{-4}C + 5{,}0\times10^{-4}$	$A = 2{,}0\times10^{-5}C + 2{,}0\times10^{-4}$
Coeficiente de correlação	0,9981	0,9994
Faixa de concentração (µg L^{-1})	10,0 – 200,0	100,0 – 2000,0
Faixa dinâmica (µg L^{-1})	24,6 – 200,0	---

Com os resultados obtidos das curvas analíticas com o sistema de pré-concentração, mais especificamente a equação da reta foi possível calcular as concentrações de Mn e Pb.

4.6.2 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) pode ser definido como a menor concentração ou massa do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, que é matematicamente expresso como três vezes o desvio padrão do valor do sinal analítico correspondente ao branco (S_{Br}) obtido de 10 ou mais determinações, dividido pelo coeficiente angular (b) da curva de calibração.

Equação 1: $LD = 3 \times S_{Br} / b$

Neste trabalho os valores de LD para Mn e Pb foram de 2,1 e 7,2 µg L^{-1}, respectivamente.

O LQ é definido como a menor concentração do analito, que pode ser mensurada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. É matematicamente expresso como dez vezes o desvio padrão do valor do sinal analítico correspondente ao branco (S_{Br}) obtido de 10 ou mais determinações, dividido pelo coeficiente angular (b) da curva analítica.

Equação 2: $LQ = 10 \times S_{Br} / b$

O LQ encontrado no presente trabalho para as determinadas condições usadas na determinação de Mn e Pb foram 7,0 e 24 µg L^{-1}, respectivamente.

4.6.3 Fator de enriquecimento

O fator de enriquecimento (FE) é um parâmetro que permite avaliar em quantas vezes o sistema de pré-concentração consegue aumentar a concentração em relação à medida direta. Basicamente existem duas maneiras de calcular este fator. Uma é através da razão das concentrações depois do processo de pré-concentração e na amostra original, esta permite avaliar o aumento na concentração de forma pontual. A outra maneira é através da razão dos coeficientes angulares das curvas com e sem pré-concentração, esta avalia o aumento das respostas e não apenas de uma concentração. A segunda forma é mais recomendada e está descrita na Equação 3.

Equação 3: $FE = b_p / b_s$

Em que b_p e b_s são os coeficientes angulares das curvas com e sem pré-concentração. O FE obtidos para Mn e Pb foram de 8 e 10, respectivamente.

4.6.4 Frequência de amostragem

A frequência de amostragem ou analítica (FA) está ligada diretamente a quantidade de amostra que serão analisadas em um determinado tempo, ou seja, é quantas amostras são corridas em um sistema de pré-concentração por hora.

O tempo de pré-concentração foi o mesmo para as espécies de Mn e Pb. Devido a comutação que ocorre entre os reatores, o tempo de eluição não é considerado, então como são necessário 1 minuto para a pré-concentração das espécies de Mn e Pb, em 60 minutos ser poderão ser processadas 60 amostras. Desta forma, a frequência analítica para o procedimento é de 60 h^{-1}, para ambos os analitos.

4.6.5 Eficiência de concentração

A eficiência de concentração (EC) é definida como o produto do fator de enriquecimento FE pela frequência f do número de amostras analisadas por determinado tempo, expressada em min^{-1}. Este parâmetro visa auxiliar o FE, pois o FE sozinho pode não confirmar nada sobre o método. Com isso se a frequência analítica estiver expressa em amostras por horas, tem-se:

Equação 4: $EC = FE \times f/60$

A EC para o sistema proposto foi obtida pela aplicação da equação acima, sendo o seu valor 8 e 10 min^{-1}, para Mn e Pb.

4.6.7 Índice de consumo

O índice de consumo (IC) da amostra pode ser definido como o volume de amostra (V_a), em mililitros (mL), consumido para conseguir-se uma unidade de EF. Este parâmetro define a quantidade da amostra a ser usada. O índice de consumo é calculado através da Equação 5 descrita:

Equação 5: $IC = V_a\ (mL)/FE$

Neste trabalho os IC de consumo da amostra para as espécies de Mn e Pb foram de 1,25 e 1,00 mL. Baixos volumes no consumo de amostras são necessários quando amostras como sangue e outros fluidos são utilizadas, pois estão disponíveis em quantidades limitadas.

4.6.8 Precisão

A precisão visa avaliar a repetitividade dos resultados obtidos em várias medidas de uma mesma amostra, podendo ser expressa através da repetibilidade e/ou reprodutibilidade. Matematicamente como desvio padrão relativo.(DPR%), sendo calculada pela razão entre o desvio padrão de várias medidas em uma determinada concentração (S_c) e a média dessas medidas (X_c), geralmente em porcentagem, como mostra a Equação 6.

Equação 6: $DPR\% = S_c/X_c \times 100$

No procedimento de pré-concentração proposto, a precisão foi expressada como repetibilidade entre os sinais de absorvâncias de sete determinações. A precisão para este método foi de 2,60% (50μg L^{-1}) e 3,22% (100 μg L^{-1}) para o Mn, e de 6,67% (100μg L^{-1}) e 4,67% (200 μg L^{-1}) para o Pb, de forma repectiva.

Os parâmetros de mérito do sistema de pré-concentração desenvolvido para a determinação de Mn e Pb em amostras de chás, estão descritos de forma resumida na Tabela 10.

Tabela 10. Principais parâmetros analíticos do método proposto.

Parâmetro	Valor	
	Mn	**Pb**
Linearidade (μg L^{-1})	5,0-100,0	10-200
Limite de detecção (μg g^{-1})	0,07	0,24
Limite de quantificação (μg g^{-1})	0,23	0,80
Fator de enriquecimento	8	10
Frequência analítica (h^{-1})	60	
Eficiência de concentração (min^{-1})	8	10
Índice de consumo (mL)	1,25	1,00
Precisão (n= 7; %)	2,60 (50μg L^{-1}) e 3,22 (100 μg L^{-1})	6,67 (100μg L^{-1}) e 4,67 (200 μg L^{-1})

4.6.9 Exatidão

A exatidão de um método é quão seu valor, é mais próximo de um outro valor, tido como valor verdadeiro.

A avaliação da exatidão de um método pode ser determinada de várias maneiras tais como: uso de um material de referência certificado, comparação do método entre vários laboratórios ou por técnicas diferentes e realização de ensaios de adição e recuperação.

O presente trabalho utilizou o teste de adição e recuperação como uma das formas de verificar a exatidão deste método, como mostra a Tabela 11. A Equação 7 apresenta a forma usada nos cálculos da recuperação (Rec.).

Equação 7: $Rec.\% = C_1 - C_2/C_3 \times 100$

E, que C_1 = concentração determinada na amostra com adição do analito, C_2 = concentração determinada na amostra sem adição do analito e C_3 = concentração do analito adicionada.

Tabela 11. Ensaios de adição e recuperação de Mn e Pb em folhas de chás usando o método proposto, com o intervalo de 95% de confiança (n=3).

Amostra	Conc. de Mn ($\mu g\ g^{-1}$)		Rec. (%)	Conc. de Pb ($\mu g\ g^{-1}$)		Rec. (%)
	Adicionada	Encontrada		Adicionada	Encontrada	
Boldo	0	**< LQ**		0	**< LQ**	
	4,2	5,0	119,0	41,7	22,0	52,8
Erva Cidreira	0	3,0		0	**< LQ**	
	4,2	7,0	95,2	41,7	15,0	36,0
Hortelã	0	**< LQ**		0	**< LQ**	
	4,2	4,1	97,6	41,7	34,4	82,5
Pitanga	0	**< LQ**		0	**< LQ**	
	4,2	4,4	104,8	41,7	19,0	45,6

Para confirmar o desempenho do método na determinação de manganês e chumbo em amostras de chás, utilizou-se o material de referência certificado de folhas de maçã (NIST 1515).

Para o manganês o resultado encontrado foi de 52,0 ± 5,0 $\mu g\ g^{-1}$. Com valor certificado de 54,0 ± 3,0 $\mu g\ g^{-1}$, obtendo um erro de -3,7%. O teste t mostrou que o resultado encontrado não apresenta diferença significativa com o valor certificado para o nível de confiança de 95%.

Os resultados para o Pb ficaram abaixo do LQ, isso pode ser devido a competição de outros íons de forma preferencial pelo reagente complexante. Isso pode ser verificado na tabela de interferentes. Estas ideias não são conclusivas, necessitando de estudos para a sua confirmação.

4.7 Aplicação do método em amostras de chás comerciais

Os resultados apresentados na Tabela 11 foram considerados excelentes na recuperação de Mn em amostras de folhas de chás, e não concordantes para o Pb também nestas amostras. Com isso procedeu-se a aplicação do método apenas para determinação de Mn em amostras de chás de vários sabores comercializadas em um mercado na cidade de Jequié-Ba. A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 12. Determinação de Mn em amostras de chás comerciais usando o sistema de pré-concentração proposto.

Amostra	**Quantidade de Mn ($\mu g\ g^{-1}$)**
Chá de Hortelã	3,0 ± 0,8
Chá Mate	123 ± 18
Chá Verde	108 ± 1,6
Chá de Erva Cidreira	< LQ
Chá Preto	119 ± 4,3
Chá Cítrico	18,8 ± 0,6
Chá de Morango	8,8 ± 0,8

Os valores obtidos para o Mn nas amostras de chás variaram entre 2,95 e 122,89 $\mu g\ g^{-1}$. As amostras de chá mate e preto apresentaram um maior teor deste elemento, e as amostras de chá de hortelã e morango apresentaram menores concentrações, enquanto que o chá de erva cidreira apresentou nenhuma concentração de Mn que possa ser mensurado por este método.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- **Conclusões**

O método desenvolvido utilizando duplo reator enovelado apresentou um aumento considerável na frequência analítica, bons fatores de enriquecimento, limites de detecção e quantificação adequados na determinação de Mn e Pb em amostras de folhas de chás. A automação do sistema de pré-concentração usando válvulas solenóides controladas por um circuito integrado interligado a uma placa Arduino permitiu obter uma excelente precisão, com a diminuição de erros operacionais, consequentemente. A configuração do sistema em linha automatizado com o duplo reator enovelado foi proposta pela primeira vez para este trabalho, buscando-se um formato mais simples possível sem a perda de eficiência e velocidade analítica.

A aplicação dos planejamentos experimentais: fatorial fracionário e Doehlert mostrou-se eficiente e rápido na otimização das variáveis químicas e de fluxo do sistema de pré-concentração em linha proposto. O planejamento fatorial fracionário permitiu fazer a triagem das variáveis que mais afetam neste tipos de sistemas, as interações destas variáveis não foram consideradas, visto que com o aumento dos fatores, os efeitos de ordens crescentes passam a se confundir com os efeitos principais e de segunda ordem, etc. O planejamento Doehlert proporcionou encontrar os valores ótimos das variáveis significativas.

O método foi avaliado através de seus parâmetros de méritos. A determinação de Mn obteve excelentes resultados de recuperação, enquanto que a determinação de Pb, apresentou resultados insatisfatórios.

O método foi aplicado na determinação de Mn em amostras de folhas chás comerciais adquiridas em um mercado na cidade de Jequié-Ba. O teor de Mn encontrado nestas amostras ficaram entre 2,95 e 122,89 $\mu g\ g^{-1}$ para sete amostras analisadas. A legislação brasileira não regulamenta a quantidade de Mn máxima aceitáveis em alimentos.

Os resultados para a determinação de Pb^{2+} não foram satisfatórios na análise de folhas de chás.

- **Perspectivas**

Realizar um estudo com vários agentes mascarantes para Pb, visando contornar o problema da validação do método em amostras de chás com adição padrão e amostra certificada. Avaliar a digestão da amostra com sistemas fechados para a determinação de Pb para verificar se está havendo perdas por volatilidade.

Estudar vários reagentes complexantes dos grupos piridilazos e tiazolilazos, com o objetivo de tornar o método mais seletivo, na determinação de Mn e Pb em amostras de chás.

Determinar Mn e Pb em outras matrizes como águas naturais, sedimentos, cosméticos, fluídos biológicos, entre outras. Utilizar o sistema de pré-concentração em linha automatizado com duplo reator enovelado na determinação de outras espécies metálicas com elevada importância toxicológica.

Automatizar o sistema completamente com bombas peristálticas automáticas, e criar uma plataforma como auto amostrador, visando a mínima intervenção humana possível.

REFERÊNCIAS

[1] SHRIVER, D.; ATKINS, P. **Química inorgânica.** Tradução Roberto de Barros Faria. IV ed. Porto Alegre: Bookman, 2008, 848 p.

[2] LEE, J. D. **Química inorgância não tão concisa.** Tradução Henrique E. Toma et al. V ed. São Paulo: Edgar Blucher, 1999, 527 p.

[3] AZEVEDO, F. A. de; Chasin, A. A. da M. **Metais: gerenciamento da toxicidade.** I ed. São Paulo: Atheneu, 2003, 554 p.

[4] MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para saúde. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health,** v.15, n.2, p. 119-129, 2004.

[5] QUARESMA, L. F. Relatório técnico: Perfil da mineração de manganês. **J. Mendo consultoria,** v.19, n.1, p. 1-40, 2009.

[6] HERNÁNDEZ, R. B.; PINTO, N. C. de S. **Especiação do manganês como determinante da sua toxicidade mitocondrial: implicações para o mecanismo de neurotoxicidade do manganês.** Biblioteca Virtual. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/75698/especiacao-do-manganes>. Acesso em: 17 set. 2015.

[7] MARTINS, I.; LIMA, I. V. Ecotoxicologia do manganês e seus compostos. **Série Cadernos de Referência Ambiental,** v.7, n.1, p. 1-122, 2001.

[8] VULCANO, I. R. C.; SILVEIRA, J. N.; ALVAREZ-LEITE, E. M. Teores de chumbo e cádmio em chás comercializados na região metropolitana de Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** v.44, n.3, p. 425-431, 2008.

[9] HAN, W.Y.; SHIYZ, M.A.L.F.; RUAN, J.Y. Arsenic, cadmium, chromium, cobalt, and copper in different types of Chinese tea. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.,** v.75, n.2, p. 272-277, 2005.

[10] ANVISA. Resolução – **RDC Nº 42, de 29 de agosto de 2013.** Portal anvisa.gov.br.Disponívelem:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8100bb8040eac2e8b590b79cca77f4cf/RDC+n%C2%BA+42_2013_final.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 18 set. 2015.

[11] NEVES, E. B.; JUNIOR, N. M.; MOREIRA, M. F. R. Avaliação da exposição a metais numa usina de recuperação de armamento de uma organização militar. **Ciência & Saúde Coletiva,** v.14, n.6, p. 2269-2280, 2009.

[12] SANTOS, A. F. Jr. et al. Determinação de Mn, Cu e Zn em amostras salinas após separação e pré-concentração usando Amberlite XAD-7 impregnada com vermelho de alizarina S. **Química Nova,** v.25, n.6, p. 1086-1090, 2002.

[13] SANTOS, W. N. L.; SANTOS, C. M. C.; FERREIRA, S. L. C. Application of three-variables Doehlert matrix for optimisation of an on-line pre-concentration system for zinc determination in natural water samples by flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal,** v.75, n.3, p. 211-221, 2003.

[14] FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos.** I ed. Salvador: Vento Leste, 2015, 190 p.

[15] TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química nova,** v.29, n.2, p. 338-350, 2006.

[16] BUTLER, N. A. Defining equations for two-level factorial designs. **Journal of Statistical Planning and Inference,** v.138, n.10, p. 3157 -3163, 2008.

[17] FERREIRA, S. L. C.; KORN, M. G. A.; FERREIRA, H. S.; SILVA, E. G. P.; ARAÚJO, R. G. O.; AMORIM, F. A. C.; SOUZA, A. S.; MACEDO, S. M.; LIMA, D. C.; JESUS, R. M. BOSQUE-SENDRA, J. M. Application of Multivariate Techniques in Optimization of Spectroanalytical Methods. **Appllied Spectroscopy Reviews,** v.42, p. 475-491, 2007.

[18] NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos - Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** II ed. Campinas: Editora Unicamp, 1996, p.

[19] LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTRÖM, A.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems,** v.42, p. 3–40, 1998.

[20] NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos.** IV ed. Porto Alegre: Bookman, 2010, p.

[21] CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statistica.** E-papers, Rio de Janeiro, 2003.

[22] MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments.** IV ed. New York: Willey, 1996.

[23] BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta,** v.76, n.5, p. 965-977, 2008.

[24] FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; SILVA, E. G. P.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; NETO, B. B. Review-Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A,** v.1158, n.1-2, p. 2-14, 2007.

[25] TARLEY, C. R. T.; SILVEIRA, G.; SANTOS, W. N. L.; MATOS, G. D.; SILVA, E. G. P.; BEZERRA, M. A.; MIRÓ, M.; FERREIRA, S. L. C. Review article - Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal,** v.92, n.1, p. 58- 67, 2009.

[26] DOEHLERT, D. H. Uniform shell designs. **Aplied Statistics,** v.19, n.3, p. 231-239, 1970.

[27] FERREIRA, S. L. C.; dos SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. **Talanta,** v.63, n.4, p. 1061-1067, 2004.

[28] CAMPAÑA, A. M. G.; RODRÍGUEZ, L. C.; GONZÁLEZ, A. L.; BARRERO, F. A.; CEBA, M. R. Sequential response surface methodology for multioptimization in analytical chemistry with three-variable Doehlert designs. **Analytica Chimica Acta,** v.338, n.1-3, p. 237-246, 1996.

[29] BOX, G.E.P. and BEHNKEN, D.W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics,** v.2, n.4, p. 455-475, 1960.

[30]FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta,** v.597, n.2, p. 179-186, 2007.

[31] BRERETON, R. G.; ARAUJO, P. W. Experimentals designs II. Optimization. **Trends in Analytical Chemistry,** v.15, n.2, p. 63-70, 1996.

[32]B OX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B,** v.13, n.1, p. 1-45,1951.

[33] LEARDI, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta,** v.652, p. 161–172, 2009.

[34] CERDÀ, A; CERDÀ, V. **An introduction to flow analysis.** I ed. Palma de Mallorca: Sciware, 2009, 218 p.

[35] ZAGATTO, E A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (Recomendações - IUPAC 1994) **Química Nova,** v.22, n.1, p. 143-146, 1999.

[36] CLAVIJO, S.; AVIVAR, J.SUÁREZ, R.; CERDÀ, V. Analytical strategies for coupling separation and flow-injection techniques. **Trends in Analytical Chemistry,** v.67, p. 26-33, 2015.

[37] FARJADO, Y.; AVIVAR, J.; FERRER, L.; GÓMEZ, E.; CASAS, M.; CERDÀ, V. Automation of radiochemical analysis by applying flow techniques to environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry,** v.29, n.11, p. 1399-1408, 2010.

[38] FANG, Z. **Flow Injection Separation and Preconcentration.** I ed. New York: VCH. 1993, 259 p.

[39] CERDÀ, V.; ESTELA, J. M.; FORTESA, R.; CLADERA, A.; BECERRA, E.; ALTIMIRA, P.; SITJAR, P. Flow techniques in water analysis. **Talanta,** v.50, n.4, p. 695-705, 1999.

[40] REIS, B. F. dos. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento – Revisão. **Química Nova,** v.19, n.1, p. 51-58, 1996.

[41] ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B.; REIS, B. F. dos. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. **Química Nova,** v.23, n.1, p. 119-125, 2000.

[42] REIS, B. F. dos; GINÉ, M. F.; KRONKA, E. A. M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova,** v.12, n.1, p. 82-91, 1989.

[43] FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L. dos. LEMOS, V. A. On-line preconcentration system for nickel determination in food samples by flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta,** v.41, n.2, p. 145-151, 2001.

[44] FERREIRA, S. L. C.; LEMOS, V. A.; SANTELLI, R. E.; GANZAROLLI, E.; CURTIUS, A. J. An automated on-line flow system for the pre-concentration and determination of lead by flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal,** v.68, n.1, p. 41-46, 2001.

[45] FORTES, P. R.; FERES, M. A.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C. Sequential injections as an alternative to gradient exploitation for implementing differential kinetic analysis in a flow injection system. **Talanta,** v.81, n.4-5, p. 1409-1412, 2010.

[46] LEMOS, V. A.; BALIZA, P. X.; YAMAKI, R. T.; ROCHA, M. E.; ALVES, A. P. O. Synthesis and application of a functionalized resin in on-line system for copper preconcentration and determination in foods by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta,** v.61, n.5, p. 675-682, 2003.

[47] SANTOS, J. L. M. dos. **Sistemas de fluxo multicomutado aplicados à análise de produtos farmacêuticos.** 250f. Dissertação (Doutorado em Farmácia) – Universidade do Porto, 2000.

[48] ENGELHARDT, H.; NEUE, U. D. Reaction detector with three dimensionalcoiled open tubes in HPLC. **Chromatographia,** v.15, n.7, p. 403-408, 1982.

[49] MARTINEZ-JIMENEZ, P.; GALLEGO M. and VALCARCEL, M., Indirect atomic-absorption determination of chloride by continuous precipitation of silver-chloride in a flow-injection system. **J. Anal. At. Spectrom,** v.2, n.2, p. 211-215, 1987.

[50] FANG, Z.; SPERLING, M. and WELZ, B. Flame atomic absorption spectrometric determination of lead in biological samples using a flow injection system with on-line preconcentration by coprecipitation without filtration. **J. anal. at. Spectrum,** v.6, p. 301-306, 1991.

[51] FANG, Z.; XU, S.; DONG L.; and LI, W. Determination of cadmium in biological materials by flame atomic absorption spectrometry with flowinjection on-line sorption preconcentration. **Talanta,** v.41, n.12, p. 2165-2172, 1994.

[52] FERREIRA, S.LC.; ANDRADE, J.B. de; KORN, M.G.A.; PEREIRA, M.G.; LEMOS, V.A.; SANTOS, W.N.L. dos; RODRIGUES, F.M.; SOUZA, A.S.; FERREIRA,

H.S.; SILVA, E.G.P. da. Review of procedures involving separation preconcentration for the determination of cadmium using spectrometric techniques. **Journal of Hazardous Materials,** v.145, n.3, p. 358-367, 2007.

[53] BALIZA, P.X.; FERREIRA, S.L.C.; TEIXEIRA, L.S.G. Review - Application of pyridylazo and thiazolylazo reagents in flow injection preconcentration systems for determination of metals. **Talanta,** v.79, n.1, p. 2-9, 2009.

[54] FANG, Z. **Flow Injection Separation and Preconcentration.** I ed. New York: VCH. 1993, 259 p.

[55] LIAWRANGRATH, S.; SOM-AUM, W.; TOWNSHEND, A.; A comparison of enrichment factor of knotted and serpentine reactors using flow injection sorption and preconcentration for the off-line determination of some trace elements by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta,** v.58, n.6 p. 1177-1184, 2002.

[56] SOUZA, A. S.; SANTOS, W. N. L. dos; FERREIRA, S. L. C. Application of Box–Behnken design in the optimisation of an on-line pre-concentration system using knotted reactor for cadmium determination by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B,** v.60, n.5, p. 737– 742, 2005.

[57] SOUZA, A. S.; BRANDÃO G. C.; SANTOS, W. N. L. dos; LEMOS, V. A.; GANZAROLLI, E. M.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, S. L. C. Automatic on-line pre-concentration system using a knotted reactor for the FAAS determination of lead in drinking water. **Journal of Hazardous Materials,** v.141, n.3 , p. 540–545, 2007.

[58] PEI, S.; FANG, Z. Flame atomic absorption spectrometric determination of silver in geological materials using a flow-injection system with on-line preconcentration by coprecipitation with diethyldithiocarbamate. **Anal. Chim. Acta,** v.294, v.2, p. 185-193, 1994.

[59] CAMEL, V. Review: Solid phase extraction of trace elements. **Spectrochimica Acta Part B,** v.58, p. 1177–1233 , 2003.

[60] CERUTTI, S.; MARTINEZ, L.D.;WUILLOUD, R.G. Knotted reactors and their role in flow-injection on-line preconcentration systems coupled to atomic spectrometry-based detectors. **Applied Spectroscopy Reviews,** v.40, n.1, p. 71-101, 2005.

[61] DIMITROVA, B.; BENKHEDDA, K.; IVANOVA, E.; ADAMS, F. Flow injection on-line preconcentration of palladium by ion-pair adsorption in a knotted reactor coupled

with electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal Of Analytical Atomic Spectrometry,** v.19, n.10, p. 1394-1396, 2004.

[62] ORSI, R.F.; WUILLOUD, R.G.; WUILLOUD, J.C.A. de; OLSINA, R.A.; MARTINEZ, L.D. On-line preconcentration and determination of cadmium in honey using knotted reactor coupled to flow injection-flame atomic absorption spectrometry. **Journal Of Aoac International,** v.85, n.6, p. 1410-1414, 2002.

[63] GARRIDO, I.; SOTO, R.M.; CARLOSENA, A.; LOPEZ-MAHIA, P.; MUNIATEGUI, S.; PRADA, D. Flame atomic absorption spectrometry with flow-injection on-line adsorption preconcentration using a knotted reactor for cadmium determination in aqueous samples. **Analytical Letters,** v.34, n.10, p. 1763-1779, 2001.

[64] SALONIA, J.A.; WUILLOUD, R.G.; GASQUEZ, J.A.; et al. Determination of lead in tap water by ICP-AES with flow-injection on-line adsorption preconcentration using a knotted reactor and ultrasonic nebulization. **Journal Of Analytical Atomic Spectrometry,** v.14, n.8, p. 1239-1243, 1999.

[65] SALONIA, J.A.; GASQUEZ, J.A.; MARTINEZ, L.D.; CERUTTI, S.; KAPLAN, M.; OLSINA, R.A. Inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination of gadolinium in urine using flow injection on-line sorption preconcentration in a knotted reactor. **Instrumentation Science & Technology,** v.34, n.3, p. 305-316, 2006.

[66]CERUTTI, S.; SALONIA, J.A.; GASQUEZ, J.A.; OLSINA, R.A.; MARTINEZ, L.D. Determination of scandium in river water by ICP-OES with flow-injection on-line preconcentration using knotted reactor and ultrasonic nebulization. **Journal Of Analytical Atomic Spectrometry,** v.18, n.10, p. 1198-1201, 2003.

[67] YAN, X.P.; JIANG, Y. Flow injection on-line preconcentration and separation coupled with atomic (mass) spectrometry for trace element (speciation) analysis based on sorption of organo-metallic complexes in a knotted reactor. **Trac-Trends In Analytical Chemistry,** v.20, n.10, p. 552-562, 2001.

[68] YAN, X.P.; KERRICH, R.; HENDRY, M.J. Flow injection on-line group preconcentration and separation of (ultra)trace rare earth elements in environmental and geological samples by precipitation using a knotted reactor as a filterless

collector for inductively coupled plasma mass spectrometric determination. **Journal Of Analytical Atomic Spectrometry,** v.14, n.2, p. 215-221, 1999.

[69] GIL, R.A.; GASQUEZ, J.A.; OLSINA, R.; MARTINEZ, L.D.; CERUTTI, S. Cloud point extraction for cobalt preconcentration with on-line phase separation in a knotted reactor followed by ETAAS determination in drinking waters. **Talanta,** v.76, n.3, p. 669-673, 2008.

[70] CERUTTI, S.; FERREIRA, S.L.C.; GASQUEZ, J.A.; OLSINA, R.A.; MARTINEZ, L.D. Optimization of the preconcentration system of cadmium with 1(2-thiazolylazo)-p-cresol using a knotted reactor and flame atomic absorption spectrometric detection. **Journal Of Hazardous Materials,** v.112, n.3, p. 279-283, 2004.

[71] WANG, Y.; WANG, J. Octadecyl Immobilized Silica Beads Packed Microcolumn Versus PTFE Knotted Reactor as $Cd(OH)^2$ Precipitate Collection Media Coupled to ETAAS for Cadmium Determination. **Chinese Journal Of Analytical Chemistry,** v.34, n.8, p. 1078-1082, 2006.

[72] YING, T; LI, Z. J.; ZUAN, Z.; PAN, J. M. Recent advances of the derivatives of pyridylazo as reagents in analytical chemistry. **Rev. Anal. Chem.,** v.24, n.2, p. 103-147, 2005.

[73] IVANOV, V. M. Ninety years of using azo compounds of the pyridine series as analytical reagents. **Journal Of Analytical Chemistry,** v.60, n.5, p. 486-490, 2005.

[74] OSZWALDOWSKI, S.; JAROSZ, M. Heterocyclic azo reagents as derivatizing agents in spectrophotometric and reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of metal ions. **Chemia Analityczna,** v.42, n.6, p. 739-756, 1997.

[75] SHIBATA, S.; FURUKAWA, M.; TOEI, K. Syntheses and spectrophotometric studies of azo dyes containing meta-dimethylaminophenol as analytical reagents. **Analytica Chimica Acta,** v.66, n.3, p. 397-409, 1973.

[76] KAMOGAWA, M. Y.; MIRANDA, J. C. Uso de hardware de código fonte aberto “arduino” para acionamento de dispositivo Solenóide em sistemas de análises em fluxo – Nota técnica. **Química Nova,** v.36, n.8, p. 1232-1235, 2013.

[77] ROCHA, W. R. Interações intermoleculares. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola,** v.35, n.4, p. 31-36, 2001.

[78] European Commission; **Guidance document on residue Analytical methods, SANCO/825/00.** 2000.

[79] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. e MELO, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Quimica Nova,** v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

[80] Guidance for Industry – **Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, European Agency for the Evaluation of Medical Products (ICH)**. Londres, 1996.

[81] MACIEL, M. V. **Desenvolvimento de um sistema em linha para pré-concentração e determinação de selênio em amostras ambientais por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos.** 76f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Estadual da Bahia, Jequié-Ba, 2012.