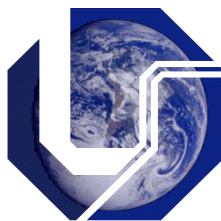


**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

***ESTUDOS PARA A DETERMINAÇÃO
AMPEROMÉTRICA DE NITROFOSFORADOS
TOTAIS EM ÁGUAS EM SISTEMA DE ANÁLISE
POR INJEÇÃO EM FLUXO***

Wallans Torres Pio dos Santos

**Uberlândia
Fevereiro/2007**



**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

***ESTUDOS PARA A DETERMINAÇÃO
AMPEROMÉTRICA DE NITROFOSFORADOS TOTAIS
EM ÁGUAS EM SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO
EM FLUXO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Mestrando: Wallans Torres Pio dos Santos

Orientadora: Prof. Dra. Yaico D. Tanimoto de Albuquerque

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo M. Richter

Área de Concentração: Química Analítica

**Uberlândia
Fevereiro/2007**

AGRADECIMENTOS

- *A Deus por estar sempre presente em minha vida, me iluminando durante toda essa jornada.*
- *À minha mãe, Maria Dulce, pelo apoio, confiança, carinho, dedicação e por me amar tanto, enaltecendo em mim suas virtudes. Também ao meu padrasto, Cristóvão, pelo carinho e amizade, que sempre teve por mim.*
- *À minha madrinha e a todos meus familiares pelo amor e carinho, acreditando e torcendo sempre por mim durante toda a minha vida.*
- *À minha namorada, Amanda, companheira de todas as horas, que sempre me motivou e ajudou a passar pelos momentos mais difíceis com muito amor, paciência e dedicação. Também a toda sua família.*
- *À minha orientadora, Professora Dra. Yaico D. Tanimoto de Albuquerque, pela orientação, dedicação, paciência e confiança, sempre me apoiando com muito carinho e amizade.*
- *Ao meu Co-orientador, Professor Dr. Eduardo M. Richter, pela amizade, confiança e grande colaboração no presente trabalho.*
- *Aos meus grandes amigos e colegas de laboratório: Eduardo, Diego, Douglas, Adriano, Humberto, Edimar, Marselha, Lucas, Daniel, Carla, Sabrina, Cláudio, Felipe, André, Tatiana e a todos os demais, a minha eterna gratidão pelo apoio e pelos bons momentos que passamos.*
- *Aos grandes amigos e mestres, que mesmo de longe, sempre torceram pelo meu sucesso: Manuel, Carlão, Faria, Reinaldo, Sergio, Francisco, Eduardo, Ângela, Maria Lucia, Margarida, Fernando, Rodrigo, Borgato, Bruno, Breno, Landercy, Jessé, Vitor, Jamile, Luciano, Tio Toninho, Flávio, Bill, Luciana, Sirlane, Nabil, Yara, Viviane, Ricielle, Cristiano, Felipe, Daniel e a todos os demais o meu muito obrigado.*
- *Em especial, aos membros da banca de dissertação e qualificação, Professores Dr. Mauro Bertotti, Dr. Sebastião de Paula Eiras e Dr. Luiz Antônio de Faria, pelas valiosas contribuições concedidas para o aprimoramento deste trabalho.*

- *À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao Professor, Dr. Luiz Antônio de Faria, pelo empréstimo do equipamento utilizado para realização dos estudos deste trabalho.*
- *Ao Instituto de Química pelo espaço concedido e aos seus funcionários pela paciência, colaboração e grande demonstração de amizade.*

“O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto”.

Thomas Huxley

ÍNDICE

Resumo	i
Abstract.....	iii
Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	viii
Lista de Abreviações	ix
Trabalhos provenientes desta dissertação.....	xi
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO	13
1. 1 - Considerações gerais.....	2
1. 2 - Métodos de determinação de compostos organofosforados.....	6
1. 3 - Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica.....	9
1.3 1 - Análise por injeção em fluxo	9
1.3 2 - Detecção amperométrica	11
1. 4 - Objetivos	13
CAPÍTULO 2: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	15
2. 1 - Soluções e reagentes.....	16
2. 2 - Esquema de montagem para utilização da pressão gerada por uma coluna de água no controle de vazão em sistemas em fluxo	16
2. 3 – Instrumentação.....	17
2. 4 - Estudos do controle da vazão gerado por uma coluna de água em sistema em fluxo	18
2.5 - Comparação entre o sinal obtido na detecção eletroquímica com bomba peristáltica e pelo sistema proposto	19
2.6 - Estudos do comportamento eletroquímico e otimização dos parâmetros da detecção amperométrica de Paration em FIA.....	19
2.6.1 - Comportamento eletroquímico de Paration	19

2.6.2 - Avaliação do eletrólito suporte, eletrodo de trabalho e potencial aplicado para	20
.....	20
detecção amperométrica em sistema FIA.....	20
2.6.3 - Avaliação da detecção amperométrica de múltiplos pulsos (AMP) de Paration	20
.....	20
2.6.4 - Análise do sinal obtido na detecção amperométrica de múltiplos pulsos de	21
Paration em função da vazão e em função da alça de amostragem.....	21
2.6.5 - Avaliação do tempo de aplicação de cada potencial estabelecido para os grupos	21
eletroativos do Paration na detecção AMP em FIA	21
2.6.6 - Estudos da comparação das técnicas amperiométricas em FIA.....	22
2.6.7 - Estudos do limite de detecção, de quantificação e recuperação do sinal	22
amperométrico de Paration fortificado em amostras aquosas.	22

CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÕES 23

3.1 - Investigação do uso da pressão gerada por uma coluna de água para controle da	24
vazão em sistemas em fluxo.	24
3.2 - Comparação entre a bomba peristáltica e o sistema proposto em relação ao ruído	26
gerado na detecção amperométrica e voltamétrica.....	26
3.3 - Aspectos Gerais e Investigação do Comportamento Eletroquímico do Paration....	28
3.3.1 - Estrutura e características físico-químicas do Paration.....	28
Fórmula Molecular	28
3.3.2 - Comportamento Eletroquímico do Paration.....	29
3.4 - Investigação da detecção amperométrica de Paration sob condições hidrodinâmicas	31
.....	31
3.5 - Investigação da detecção amperométrica de Paration usando a técnica	33
amperométrica de múltiplos pulsos (AMP) em sistema FIA	33
3.5.1 - Dependência do sinal amperométrico com o pulso de E	33
3.5.2 - Investigação do sinal obtido na detecção AMP de Paration em função da vazão	37
do carregador e em função da alça de amostragem.....	37
3.5.3 - Investigação do tempo de aplicação dos pulsos de E sobre o sinal	39
amperométrico	39

3.5.4 - Comparação das técnicas amperométricas, AMP e APD, em sistema de análise FIA, para a detecção de Paration.....	44
3.6 – Parâmetros analíticos e recuperação do sinal amperométrico de Paration, fortificado em amostras aquosas.	48
CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	52
4.1 – Conclusões.....	53
4.2 – Propostas de continuidade	54
CAPÍTULO 5: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

SANTOS, Wallans Torres Pio. *Estudos para a determinação amperométrica de nitrofosforados totais em águas em sistema de análise por injeção em fluxo*. Uberlândia: Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2007. Dissertação de Mestrado.

No presente trabalho investigou-se uma metodologia de determinação eletroquímica de Paration baseada na detecção amperométrica de múltiplos pulsos em sistema de análise por injeção em fluxo (FIA). Um sistema de propulsão isento de pulsação e um detector eletroquímico para sistemas de análise em fluxo foram construídos e investigados para esta determinação. Estudos do comportamento eletroquímico do Paration sobre eletrodos de carbono foram investigados em função do pH e do tipo de eletrólito suporte. Eletrodo de carbono vítreo e ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ forneceram as condições experimentais mais favoráveis para a detecção amperométrica de Paration. Os estudos da detecção amperométrica de múltiplos pulsos, no modo gerador-coletor, sob condições de análise em fluxo, indicaram que este modo de detecção aumenta a sensibilidade e a seletividade da determinação eletroquímica do Paration. Sinais amperométricos mais estáveis e de maior sensibilidade foram obtidos quando pulsos de potencial eram aplicados na seqüência, $-0,5 \text{ V}$, $+0,4 \text{ V}$ e $-0,1 \text{ V}$, durante 30 ms cada. A aplicação destes pulsos de potenciais envolveu os seguintes processos de eletrodo, respectivamente: redução de RNO_2 a RNHOH , oxidação de RNHOH a RNO e redução de RNO a RNHOH . O desvio padrão relativo dos sinais amperométricos obtidos em $-0,5 \text{ V}$, $+0,4 \text{ V}$ e $-0,1 \text{ V}$ foi, respectivamente: $1,5 \%$; $2,0 \%$ e $1,4 \%$. Os estudos realizados neste trabalho mostraram que a técnica AMP no modo gerador-coletor também aumenta a seletividade da detecção de nitrofosforados, pois permite diferenciar o sinal devido a estes compostos por meio dos produtos eletroativos formados em $-0,5 \text{ V}$.

Um aumento da sensibilidade do sinal analítico foi ainda possível por meio da soma algébrica, em módulo, dos sinais amperométricos obtidos em $-0,5 \text{ V}$, $+0,4 \text{ V}$ e $-0,1 \text{ V}$. Limite de detecção de $0,14 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para Paration e uma relação linear na faixa de concentração de 10 a $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ foram obtidos. Estes resultados indicam que a metodologia

investigada neste trabalho apresenta boa repetibilidade, seletividade e sensibilidade, podendo ser usada para a determinação de nitrofosforados totais em águas naturais. Estudos de recuperação realizados com amostras de água de rio (Rio Uberabinha) fortificadas com $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Paration mostraram uma recuperação de 102%, com desvio padrão relativo de 1,7 %.

Palavras Chave: Nitrofosforados; Paration; Análise por Injeção em Fluxo; Detecção Amperométrica.

ABSTRACT

SANTOS, Wallans Torres Pio dos Santos. *Studies for the amperometric determination of total nitrophosphates in waters in flow injection analysis*. Uberlândia: Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2007. Dissertação de Mestrado.

An electrochemical determination methodology of Parathion was investigated based on the amperometric detection of multiple pulses in a flow injection analysis system (FIA). A propulsion system without pulsation and an electrochemical detector for flow analysis systems were built and investigated for this determination. Studies of the electrochemical behavior of Parathion on carbon electrodes were investigated in function of the pH and of the supporting electrolyte type. Glassy carbon electrode and citric acid 0.1 mol L^{-1} supplied the more favorable experimental conditions for the amperometric detection of Parathion. The studies of the amperometric detection of multiple pulses, in the generator-collector mode, under flow analysis conditions, showed that this detection mode increases the sensitivity and the selectivity of the electrochemical determination of Parathion. Stable amperometric signs and of greater sensitivity were obtained when pulse potentials were applied in the sequence: -0.5 V , $+0.4 \text{ V}$ and -0.1 V , during 30 ms each pulse. The application of these potential pulses involved the following electrode processes, respectively: reduction of RNO_2 to RNHOH , oxidation of RNHOH to RNO and reduction of RNO to RNHOH . The relative standard deviation of the amperometric signs obtained at -0.5 V , $+0.4 \text{ V}$ and -0.1 V was, respectively: 1.5%, 2.0% and 1.4%. The studies showed that the amperometric detection of multiple pulses in the generator-collector mode also increases the selectivity of the nitrophosphates detection, because it allows to differentiate the amperometric sign due to these compounds through the amperometric sign of the electroactive products formed at -0.5 V .

An increase of the sensitivity of the analytical sign was reached through the algebraic sum, in module, of the amperometric signs obtained in -0.5 V , $+0.4 \text{ V}$ and 0.1 V . Limit detection of $0.14 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ for Parathion and a linear range from 10 to $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ were obtained. These findings indicate that the methodology investigated in this work presents good repeatability, selectivity and sensibility, and it can be used for the determination of total nitrophosphates in natural waters. Recovery studies carried out with water samples of

river (Rio Uberabinha) *spiked* with Parathion at level of $20 \mu\text{g L}^{-1}$ showed a recovery of 102%, with relative standard deviation of 1.7%.

Keywords: Nitrophosphates; Parathion; Flow Injection Analysis; Amperometric Detection of Multiple Pulses.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema de montagem para utilização da pressão gerada por uma coluna de água para controle de vazão de sistemas em fluxo. (A) Mini-compressor de ar; (B, C) Válvulas usadas em aquarismo para divisão e controle de fluxo de ar; (D) Junção de acrílico tipo T; (E) Tubo de PVC – coluna de água; (F) Reservatório do carregador; (G) Vista ampliada da conexão do tubo de polietileno ao reservatório com eletrólito..... 16
- Figura 2:** Célula eletroquímica de três eletrodos (tipo “wall jet”), constituída de (EA) eletrodo auxiliar platina, (ER) eletrodo referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e (ET) eletrodo de trabalho..... 18
- Figura 3:** Esquema do sistema FIA utilizado: sistema propulsor (Figura 1). (A) Injetor comutador de acrílico [96]; (B) Seringa utilizada para preencher a alça de amostragem do sistema; e detector amperométrico (Figura 2). 20
- Figura 4:** Relação entre a vazão em função da altura da coluna de água para tubos (de 1,2 mm d.i.) de comprimentos: (■) 5; (●) 2,5; (▲) 1,0; (▼) 0,5 m e para tubos de (○) 20 cm e 0,15 d.i. e (□) 50 cm e 0,25 mm d.i..... 24
- Figura 5:** Comparação entre os sinais obtidos por FIA com detecção amperométrica com vazão controlada por pressão de coluna de água (A) e por bomba peristáltica (B). Vazão: 0,8 ml min⁻¹. Analito: Ferrocianeto de Potássio 1 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,7. Volume injetado: 100 µL. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo (2 mm de diâmetro). O potencial aplicado para oxidação do íon ferrocianeto foi de 0,4 V vs Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). 26
- Figura 6:** Voltamogramas cíclicos hidrodinâmicos obtidos para uma solução de ferrocianeto de potássio 2 mmol L⁻¹ em meio de tampão acetato 0,2 mol L⁻¹. (A) Vazões controladas por pressão gerada por coluna de água; (B) Vazão controlada por bomba peristáltica. O potencial foi variado de -0,20 a + 0,70 V a uma velocidade de 20 mV s⁻¹ vs Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). 27
- Figura 7:** VC de (—) HCl 0,5 mol L⁻¹ e de soluções de Paration 2,7 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em (—) HCl 0,5 mol L⁻¹; (—) ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹; (—) tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH

- 4,7) sobre EPC. Faixa de trabalho de -0,6 a 1,0 V vs Ag/AgCl, sobre eletrodo de pasta de carbono com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ 29
- Figura 8:** Dependência da corrente amperométrica em função do E aplicado, obtida da solução de Paration 2,0 mg L⁻¹ em ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹, mantida sob vazão de 2,0 mL min⁻¹. Eletrodo: ECV. 32
- Figura 9:** Amperogramas obtidos da injeção de 02 alíquotas de 100 µL de Paration 2,0 mg L⁻¹, para 10 pulsos de potenciais aplicados ao ECV. Eletrólito suporte: ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹. Duração de cada pulso: 100 ms. 34
- Figura 10:** Amperogramas de alíquotas de 100 µL de Paration 2,0 mg L⁻¹ sobre ECV com aplicação de 2 pulsos de potenciais, durante 100 ms cada, sendo o primeiro (E₁) em -0,5 V (não mostrado) e o segundo (E₂) em (—) +0,2 V ; (—) +0,3 V ; (—) +0,4 V ; (—) +0,5 V. Vazão de 2,0 mL min⁻¹. Eletrólito suporte: ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹ 35
- Figura 11:** Amperogramas de alíquotas de 100 µL de Paration 2,0 mg L⁻¹ sobre ECV com a aplicação de 03 pulsos de potencial, durante 100 ms cada, sendo o primeiro a -0,5 V (não mostrado), o segundo em + 0,4 V (não mostrado) e o terceiro em (—) 0.0 V ; (—) -0.1 V; (—) -0.2 V. Vazão de 2,0 mL min⁻¹. Eletrólito suporte: ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹ 36
- Figura 12:** Altura em módulo dos sinais amperométricos em função da vazão da solução carregadora (ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹), para pulsos de potencial aplicados, durante 100ms, na seqüência: (●) -0,5 V (redução de RNO₂ a RNHOH) , (▲) + 0,4 V (oxidação de RNHOH a RNO) e -0.1 V (redução de RNO, não apresentado). 37
- Figura 13:** Altura em módulo dos sinais amperométricos em função do volume da alíquota da amostra injetada no sistema FIA, correspondentes aos pulsos de potenciais aplicados, durante 100 ms, na seqüência: (●) -0,5 V, para a redução de RNO₂, a RNHOH, (▲) + 0,4 V, para a oxidação de RNHOH a RNO e em -0,1 V, para a redução de RNO (não apresentado). Vazão = 1,4 mL min⁻¹. Solução de Paration = 1,0 mg L⁻¹. 39
- Figura 14:** Altura em módulo dos sinais amperométricos obtidos da injeção de 300 µL de solução Paration 2,0 mg L⁻¹ em dois potenciais de pulso: (●) -0,5 V, aplicado durante períodos de tempo variados, para a redução de RNO₂ a RNHOH e (▲) +0,4 V,

- aplicado durante 100 ms, para a oxidação de RNHOH). Eletrólito suporte: ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹ Vazão = 1,4 mL min⁻¹..... 41
- Figura 15:** Altura em módulo dos sinais amperométricos correspondentes à (●) redução de RNO₂ em -0,5 V, durante 30 ms e (▲) oxidação de RNHOH em +0,4 V, em função do tempo de aplicação do pulso. Solução de Paration 2,0 mg L⁻¹. Volume injetado: 300 µL. Eletrólito suporte: ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹..... 43
- Figura 16:** Amperogramas de alíquotas de 300 µL de Paration 2,0 mg L⁻¹ sobre ECV em 3 pulsos de potenciais aplicados, durante 30 ms, na seqüência: (—) -0,5 V; (—) +0,4 V; (—) -0,1 V. Vazão de 1,4 mL min⁻¹. Eletrólito suporte: ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹ .. 44
- Figura 17:** Amperogramas obtidos de alíquotas de 300 µL de solução de Paration 2,0 mg L⁻¹, usando a ; detecção amperométrica com pulsos de E aplicados, durante 30 ms, na seqüência: (—) -0,5 V , (—) +0,4 V e detecção amperométrica de pulso diferencia (ΔI = I_{0,5 v} - I_{+0,4 v}). Vazão = 1,4 mL min⁻¹..... 45
- Figura 18:** Amperogramas de alíquotas de 300 µL de solução de Paration 200 µg L⁻¹ obtidos da aplicação de 03 pulsos de potenciais, durante 30 ms, na seqüência: (—) - 0,5 V, (—) +0,4 V e (—) -0,1 V. Vazão = 1,4 mL min⁻¹. Eletrólito suporte: ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹..... 46
- Figura 19:** A) Amperogramas de alíquotas de 300 µL de solução de Paration 200 µg L⁻¹ obtidos da aplicação de 03 pulsos de potenciais, durante 30 ms, na seqüência: (—) - 0,5 V , (—) + 0,4 V e (—) - 0,1 V. Vazão = 1,4 mL min⁻¹. Eletrólito suporte: ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹. B) Sinal obtido da somatória em modulo dos sinais amperométrico. 47
- Figura 20:** Fiagrama de soluções de Paration nas seguintes concentrações: a) 50, b) 100, c) 150, d) 200 e) 250 µg L⁻¹. Condições experimentais da Figura 18. 48
- Figura 21:** Curvas de Calibração obtidas para Paration. A) em -0,5V, envolvendo a redução de RNO₂; B) em +0,4 V, envolvendo a oxidação de RNHOH e C) em -0,1 V, envolvendo a redução de RNO..... 49
- Figura 22:** Fiagrama de soluções de Paration nas seguintes concentrações: a) 10 b) 20 c) 30 d) 40, e) 50 µg L⁻¹ e f) amostra fortificada com 20 µg L⁻¹ de Paration. Condições experimentais da Figura 18. Os sinais amperométricos correspondem à soma dos sinais (em módulo) amperométricos obtidos em -0,5 V, +0,4 V e -0,1 V. 50
- Figura 23:** Curva de Calibração obtida do fiagrama apresentado na Figura 22. 50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Alguns compostos organofosforados, principais aplicações, LD ₅₀ e classe de toxicidade.	4
Tabela 2: Níveis máximos de concentração de pesticidas OF's permitidos em águas destinadas ao abastecimento doméstico.	6
Tabela 3: Principais características físico-químicas e estruturais do pesticida Paration [93]	28
Tabela 4: Limites de detecção e de quantificação na determinação de Paration obtidos em função do pulso de E aplicado.	51

LISTA DE ABREVIACOES

A – Ampere

AChE - Acetilcolinesterase

AMP – Amperometria de Múltiplos Pulsos

APD – Amperometria de Pulso Diferencial

CB's – Carbamatos

CLAE – Cromatografia de Líquida de Alta Eficiência

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DPR – Desvio Padrão Relativo

E – Potencial

EA – Eletrodo Auxiliar

EPC – Eletrodo de Pasta de Carbono

ER – Eletrodo de Referência

ET – Eletrodo de Trabalho

FIA – Flow Injection Analysis

I – Sinal amperométrico

i – Corrente

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

L - Litros

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

min – minuto

mL – mililitro

ms – milisegundos

mV – milivolt

NF's – Nitrofosforados

OC's – Organoclorados

OF's – Organofosforados

R – Coeficiente de correlação linear

s – Segundo

UV – Ultravioleta

V - Volt

VC - Voltamograma

μ - Micro

TRABALHOS PROVENIENTES DESTA DISSERTAÇÃO

- 1 - Wallans T. P. dos Santos, Marselha P. Ceolin, Yaico D. T. de Albuquerque, Eduardo M. Richter. *Uso da Pressão Gerada por uma Coluna de Água para Controle da Vazão em Sistemas em Fluxo*; *Química Nova*, **2006**, aceito para publicação.
- 2- Wallans T. P. dos Santos, Yaico D. T. de Albuquerque, Eduardo M. Richter, *Construção e Caracterização de um Detector Eletroquímico para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*, Resumo enviado para o do XVI Sibe, Águas de Lindóia, Brasil, **2007**.
- 3 - Almeida, E. G. N.; Ferreira, H. E. A.; Santos, W. T. P.; Albuquerque, Y. D. T.; Richter, E. M.; *Utilização da Detecção Amperométrica de Múltiplos Pulsos para Análises Simultâneas em FIA*, Resumo enviado para o do XVI Sibe, Águas de Lindóia, Brasil, **2007**.
- 4 - Eduardo F. de Azevedo; Wallans T. Pio dos Santos e Yaico D. Tanimoto de Albuquerque, *Determinação De Metil Paration: Cromatografia Líquida/UV Vs Detecção Eletroquímica*, Livro de Resumos do XV Sibe, Londrina, Brasil, **2006**.
- 5 - Wallans T. P. dos Santos, Eduardo F. de Azevedo, Yaico D. T. de Albuquerque, Eduardo M. Richter, *Investigação para Determinação de Metil Paration por Técnicas Voltamétricas*, Anais do I Encontro de Química do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, IV mostra de Pós Graduação e III Jornada Científica de Química, ISBN: 978-85-98616-11-7, Uberlândia, Brasil, **2006**.
- 6 - Eduardo F. de Azevedo, Wallans T. P. dos Santos, Adriângela G. de Paula, Yaico D. T. de Albuquerque, Eduardo M. Richter, *Investigação da Determinação Eletroquímica de Carbofuran Empregando Técnicas Amperométricas*, Anais do I Encontro de Química

do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, IV mostra de Pós Graduação e III Jornada Científica de Química, ISBN: 978-85-98616-11-7, Uberlândia, Brasil, **2006**.

- 7 - Santos, W. T. P.; Albuquerque, Y. D. T.; Richter, E. M. *Estudos para Determinação de Paration Empregando Técnicas Amperométricas*, Livro de Resumos da XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de química de Minas Gerais, São João Del Rei, Brasil, **2006**.
- 8 - Marselha, P. Ceolin; Santos, W. T. P.; Albuquerque, Y. D. T.; Richter, E. M.; *Avaliação do controle da vazão em sistemas em fluxo utilizando a pressão gerada por uma coluna de água*, Livro de Resumos da XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de química de Minas Gerais, São João Del Rei, Brasil, **2006**.
- 9 - Wallans T. P. Santos, Eduardo F. Azevedo, Adriangela Guimarães de Paula e Yaico D. T. Albuquerque, *Avaliação das Etapas de Separação e Concentração na Recuperação de Pesticidas Carbamatos e Organofosforados de Amostras de Alimentos*, CD de Resumos do XIII ENQA e I CIAQA, Niterói, Rio de Janeiro, **2005**.

CAPÍTULO 1:
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO

1. 1 - Considerações gerais

A água é um recurso fundamental para a existência da vida. O maior problema referente à gestão da água é a grande demanda deste recurso em atividades domésticas, na agricultura e na indústria, e a pouca preocupação quanto à disponibilidade de água potável e ao tratamento da água após seu uso, para a remoção de contaminantes químicos e biológicos.

O uso da água na agricultura e a crescente demanda por agrotóxicos, a partir da década de 1960, para garantir a produção de alimentos, representam, atualmente, um dos principais problemas enfrentados pela sociedade contemporânea. Por essas razões, o desenvolvimento de uma agricultura mais eficiente e sustentável faz-se necessário para suprir a demanda por alimentos. O uso extensivo de fertilizantes, pesticidas, fungicidas, herbicidas, contamina os alimentos e o solo com compostos tóxicos, os quais podem ser carregados pela chuva ou serem infiltrados no solo, contaminando as águas superficiais e os mananciais subterrâneos e lençóis freáticos [1]. Essa situação contribui para a previsão alarmante em relação à escassez da água em muitas regiões no mundo [2].

Os pesticidas usados na agricultura representam a principal classe de compostos, pois podem causar impactos ambientais de grandes proporções. Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) [3], pesticidas são substâncias ou mistura de substâncias utilizadas na produção, colheita ou no armazenamento de alimentos. Eles são bioativos e capazes de prevenir, destruir ou combater espécies indesejáveis, as quais, de alguma maneira, podem interferir na produção, no processamento, armazenamento, transporte e estocagem de alimentos e produtos agrícolas em geral. Esta definição também compreende substâncias utilizadas no combate a insetos domésticos ou quaisquer agentes preventivos à ação de vetores de doenças que possam ser transmitidas ao homem ou animais domésticos como, por ex., febre amarela, doença de Chagas, malária, dengue, entre outras [4, 5]. Por essa razão, os países em desenvolvimento são responsáveis pelo consumo de 20% do mercado mundial de pesticidas, entre os quais o Brasil se destaca como o maior mercado individual, representando 35% do montante, o equivalente a um mercado de 1,1 bilhão de dólares americanos (ou 150.000 t/ano) [6].

Os compostos organofosforados (OF's), por exemplo, são largamente aplicados desde a década de 1950 em substituição aos organoclorados (OC's), que tiveram seu uso

proibido e/ou restrito a partir da década de 70. Apesar dos OC's apresentarem, em geral, baixa toxicidade ao homem e demais animais vertebrados, estes sofrem um efeito de bioacumulação ao longo das cadeias alimentares, provocando um maior impacto ambiental comparado aos OF's [7]. Os OF's são mais tóxicos ao homem, porém, sofrem degradação mais rápida no meio ambiente, sob condições favoráveis. No entanto, o uso indiscriminado dos compostos OF's no combate às pragas domésticas e da agricultura, bem como no controle de vetores de doenças na saúde pública [8], pode deixar resíduos nos alimentos e na vegetação e representar uma das principais fontes de poluição dos solos, subsolos e corpos de água doce.

Os OF's são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiosfosfórico ou do ácido ditiosfosfórico. A classe de OF's compreende um grande número de compostos que variam largamente em polaridade e peso molecular [9]. Dentre os compostos mais tóxicos dessa classe estão o grupo dos nitrofosforados (NF's), tendo como maior representante o Paration e seus derivados como Metil Paration e Fenitrothion. Na Tabela 1 encontram-se alguns pesticidas organofosforados e suas principais aplicações.

Os compostos OF's apresentam toxicidade aguda para os insetos, bem como para o homem e demais mamíferos. Os efeitos tóxicos dos compostos OF's e dos seus produtos de biodegradação estão relacionados à ligação irreversível da enzima acetilcolinesterase (AChE) com esses compostos. Dessa forma a enzima perde sua atividade, deixando de atuar na hidrólise da acetilcolina, que é um neurotransmissor responsável pela transmissão de impulsos neuro-musculares (Equação 1). Como consequência, a intoxicação pode causar tremores, convulsões e até a morte, dependendo do grau de intoxicação [10].

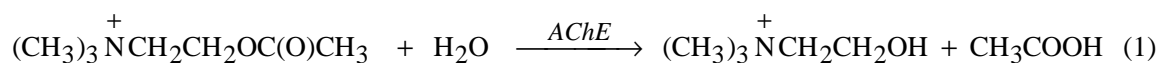


Tabela 1: Alguns compostos organofosforados, principais aplicações, LD₅₀ e classe de toxicidade.

Composto	Aplicações	LD₅₀*	Classe**
Paration	Amplo espectro de atuação; usado na agricultura de algodão, batata, café, citros, cereais, culturas de frutas, verduras e legumes.	3,6	I
Diazinon	Culturas de frutas cítricas	300	II
Malation	Uso doméstico, controle de pragas em jardins, hortaliças e frutas.	1000	II

*LD₅₀ = dose letal; representa a dose (mg K⁻¹) capaz de matar 50% da população testada (ratos).

**Classe I - produtos extremamente tóxicos (faixa vermelha); Classe II - produtos altamente tóxicos (faixa amarela).

Os OF's mais lipofílicos podem alcançar concentrações significativas no tecido nervoso e/ou outros tecidos ricos em lipídios. Sendo assim, os OF's podem desenvolver prontamente ou tardiamente os sinais clínicos da intoxicação. A toxicidade destes produtos está intimamente ligada à sua bio-transformação, que pode ocorrer por vários mecanismos [11]. Dentre esses, encontram-se:

- ✓ Dessulfuração: constitui uma das principais vias de bio-transformação dos organofosforados, que envolve a conversão da ligação P=S em P=O, resultando num aumento acentuado da toxicidade do inseticida, como ocorre com o Paration, que é convertido em Paraoxon, e Malation, que é convertido em Malaixon;
- ✓ Oxidação do Grupo Tioéter: esta via também resulta na formação de compostos mais ativos, porém em menor grau;
- ✓ Oxidação dos Substitutos Alifáticos: essa via também eleva em geral a toxicidade dos compostos OF's, como no caso do Diazinon.

Considerando-se a toxicidade e os impactos ambientais provocados pelos pesticidas OF's, os órgãos de proteção ambiental de diversos países têm estabelecido limites para esses compostos nos corpos d'água usados para abastecimento público. No Brasil, a Resolução CONAMA N^o 357/05, estabelece níveis máximos de concentração de inseticidas

OF's de acordo com classificação das águas. As águas doces, salobras e salinas do Território Nacional são classificadas, segundo a qualidade requerida para os seus usos preponderantes, em treze classes [12]. As classes de água destinada ao abastecimento doméstico são:

- ✓ Classe especial: águas destinadas ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção; à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; e, à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral.
- ✓ Classe 1: águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho; à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.
- ✓ Classe 2: águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e à aquicultura e à atividade de pesca.
- ✓ Classe 3: águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário; à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas, que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película, e à criação natural e/ou intensiva (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana.

Na Tabela 2 encontram-se os níveis máximos permitidos pela Resolução CONAMA 357/05 para os pesticidas OF's em relação às respectivas classes especial, 1, 2 e 3. Essa resolução não cita a concentração de OF's totais que podem estar presentes nas águas. Como a classe de OF's possui uma diversidade de compostos [9], sendo a grande maioria

tóxicos, faz se necessário recorrer a Resolução CONAMA 20/86, que apesar de antiga, determina a quantidade de pesticidas OF's e pesticidas carbamatos (CB's) totais em águas [13], englobando assim toda essa classe. Esses níveis também se encontram na Tabela 2.

Tabela 2: Níveis máximos de concentração de pesticidas OF's permitidos em águas destinadas ao abastecimento doméstico.

Pesticidas Organofosforados	Valor Máximo em $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Classe especial, 1 e 2	Classe 3
Paration*	0,04	35
Demeton*	0,1	14
Malation*	0,1	100
Organofosforados totais**	10	100

* De acordo com a Resolução CONAMA 357/05

** De acordo com a Resolução CONAMA 20/86

Tendo-se em vista os baixos níveis permitidos para os OF's em águas, métodos analíticos que combinam menor tempo de análise e maiores sensibilidade e seletividade, bem como simplicidade de aplicação e baixo custo, constituem ainda uma área de pesquisa muito ampla e em expansão para a análise desses compostos em amostras de composição complexa como os alimentos, águas e solos.

1. 2 - Métodos de determinação de compostos organofosforados

Os métodos cromatográficos são em geral os mais utilizados para a determinação de pesticidas organofosforados [14-17]. Apesar da baixa sensibilidade da detecção ultravioleta (UV) utilizada na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/UV) em relação à detecção de Nitrogênio-Fósforo normalmente empregada na cromatografia gasosa (CG) para determinação de uma diversidade de OF's [18-19], a CLAE é mais adequada para a determinação de muitos pesticidas polares como o Paration [20], principal representante do grupo dos nitrofosforados.

Apesar da CLAE ser um dos métodos mais difundidos para a determinação de OF's polares, os limites de detecção são ainda insuficientes para viabilizar a determinação direta

desses compostos em águas, nos níveis de concentração exigidos pela legislação. Outro problema deve-se aos interferentes ou aos compostos de elevado peso molecular ou a ambos, que podem ser eluídos junto com os OF's na CLAE, dificultando a determinação cromatográfica direta desses compostos nas amostras. Para contornar esses problemas, uma etapa prévia de separação dos interferentes do extrato da amostra é normalmente envolvida na análise cromatográfica de OF's. Nessa etapa, gorduras e demais compostos de elevado peso molecular são removidos e os pesticidas são pré-concentrados, para atingirem os níveis de concentração que podem ser detectados pelas técnicas cromatográficas. Dessa forma, essa etapa de preparação da amostra pode levar várias horas, e consumir grandes volumes de solventes orgânicos, além de envolver uma instrumentação mais complexa, que exige operações prévias mais demoradas. Devido a esse fato, há necessidade de se desenvolver técnicas mais rápidas, mais simples e de menor custo, e tão sensíveis e seletivas quanto as técnicas cromatográficas.

Atualmente, a sensibilidade das técnicas eletroanalíticas é comparada à de qualquer técnica espectroscópica. Esta comparação é possível graças ao desenvolvimento tecnológico, o qual possibilitou um grande avanço da instrumentação eletroanalítica, contribuindo intensamente para a melhoria da sensibilidade [21]. Nesse contexto, técnicas eletroanalíticas são uma alternativa para diminuir o tempo e o custo de análise, pois possibilitam a determinação direta do analito na amostra. Assim sendo, essas técnicas têm sido exploradas na análise de pesticidas totais em amostras complexas como água e alimentos. [22-29].

Dentre os métodos eletroanalíticos mais utilizados para a determinação de OF's estão os biossensores potenciométricos e amperométricos baseados na enzima AChE [30-33], que envolvem a detecção do ácido acético ou da colina produzida na reação enzimática, quando a acetilcolina é usada como substrato. Essa determinação é baseada na inibição da atividade da enzima para o substrato pelos referidos pesticidas. Como os carbamatos também inibem a enzima, os biossensores AChE têm sido explorados como método *screening* de pesticidas OF's em amostras de água e de alimentos, após a extração seletiva destes compostos numa etapa prévia [34-36]. A alta afinidade da enzima para os OF's possibilita a determinação direta destes compostos no extrato orgânico da amostra. Os biossensores apresentam vantagens sobre os métodos cromatográficos, pois, em geral, apresentam menores limites de detecção e não estão sujeitos a interferentes da matriz, como

os cromatográficos. No entanto, os biossensores apresentam como desvantagens o fato de não discriminar os compostos presentes na amostra, que atuam como substratos ou inibidores do elemento biológico, presente no biossensor, pois uma diversidade de compostos age como inibidores da AChE, tais como: organofosforados, carbamatos, ésteres e ácidos sulfônicos [37].

A voltametria é a técnica eletroquímica mais explorada na determinação direta de uma variedade de OF's eletroativos, como, por exemplo, o Metil Paration, Etil Paration, Fenitrothion. Esses compostos contêm um grupo $-NO_2$ (nitro), que pode sofrer redução eletroquímica a $-NHOH$ (hidroxilamina) no eletrodo [29]. A proximidade dos valores de potencial de eletrodo a partir do qual estes compostos são reduzidos impossibilita a determinação destes compostos em separado, que é uma desvantagem comparada aos métodos cromatográficos. Por outro lado, a alta sensibilidade e a elevada seletividade da detecção voltamétrica, onde somente compostos eletroativos podem ser determinados por esta técnica, simplificam a etapa de preparação da amostra, reduzindo o tempo da análise. Dependendo do nível de concentração dos compostos e da complexidade da amostra, esta etapa prévia pode ser suprimida. O uso desta técnica associada a métodos quimiométricos para resolver a sobreposição dos voltamogramas (curvas corrente-potencial) dos compostos eletroativos tem se mostrado uma metodologia muito útil para a determinação dos nitrofosforados (NF's) [38].

O uso da detecção amperométrica em sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) é uma alternativa que pode ser explorada na determinação de NF's totais em águas. Esta técnica de detecção mantém o eletrodo de trabalho (ou sensor eletroquímico) num potencial constante, que permite a oxidação ou redução eletroquímica de determinados compostos eletroativos. A detecção amperométrica em sistema FIA oferece vantagens sobre os métodos voltamétricos convencionais, como a maior sensibilidade e menores problemas de contaminação da superfície do eletrodo, uma vez que somente alíquotas da amostra e das soluções padrão (em geral, 20 a 100 μL) são utilizadas e o eletrólito suporte flui continuamente durante a análise em fluxo. Como consequência, uma maior reprodutibilidade da resposta do detector é obtida. A discussão desse método de análise será feita na seção seguinte.

1.3 - Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica

1.3.1 - Análise por injeção em fluxo

A análise por injeção em fluxo foi proposta por Růzicka & Hansen em 1975 como um novo conceito de análises químicas [39, 40]. Esse modo de análise, identificada pela sigla FIA, do Inglês “Flow Injection Analysis”, foi explorada com sucesso numa diversidade de análises [41-48], demonstrando as vantagens que podem ser alcançadas nas análises em sistema FIA, tais como: alta produtividade, equipamentos de baixo custo; possibilidade de módulos de análise em diferentes configurações, libertando o pesquisador das amarras impostas pelos equipamentos fechados; baixo consumo de reagentes e vidrarias, o que minimiza o efeito da geração de resíduos; diminui os riscos de contaminação do operador, pois esse fica menos exposto aos reagentes comparados com os procedimentos manuais abertos.

Os equipamentos e acessórios usados em sistema FIA são normalmente: bomba peristáltica, tubos de polietileno, injetor de amostra e um detector. O modo de detecção empregado nas análises em sistema FIA, durante muito tempo, foi a absorção molecular [41]; porém, ao longo do tempo, outros modos de detecção foram explorados, como: potenciometria [49]; espectrometria de emissão atômica com chama [50]; fluorescência [51]; quimiluminescência [52]; voltametria [53-54], entre outros.

A principal limitação imposta pelos detectores voltamétricos é a alta dependência do sinal eletroquímico com a vazão do eletrólito/amostra no detector eletroquímico. Assim, pequenas oscilações na vazão devido à pulsação do carregador da amostra (eletrólito suporte) causam variações no sinal eletroquímico monitorado, levando a ruídos na linha base, que comprometem a sensibilidade da análise.

Apesar das bombas peristálticas serem os equipamentos mais utilizados para transportar as soluções em sistemas em fluxo, estas em geral são limitadas quando usadas em sistemas FIA com detectores voltamétricos, pois produzem ruídos na linha base devido a pulsação do fluido transportador, o qual é causado pela alternância dos roletes propulsores da bomba [55]. Esse problema torna-se mais acentuado quando se deseja controlar a vazão de sistemas de análise miniaturizados, com detecção eletroquímica [56-57]. Estudos para contornar problemas devido à pulsação do fluido transportador são necessários, pois

atualmente há uma tendência na implementação de sistemas micro-FIA, para adequar os métodos de análises químicas às tendências atuais de se praticar a “química limpa” [58-59].

A utilização de amortecedores de pulso, usados em sistemas FIA com outros modos de detecção, pode ser uma alternativa para atenuar os ruídos na linha de base provocados pela bomba peristáltica. Outras alternativas para contornar a pulsação do fluido transportador são o uso de bombas isentas de pulsações, como as utilizadas em equipamentos da CLAE [60-61]. Uma opção também viável para esta finalidade é o uso da pressão gerada por pistão de seringa [62-63]. O uso de vazões controladas pela força da gravidade (isentas de pulsações) [64-68] mantém a vazão constante ao longo do tempo, mas este sistema não é eficiente em estudos onde há a necessidade de mudança na vazão, de um valor preciso para outro.

Uma outra opção versátil e de baixo custo foi recentemente publicada por Matos e colaboradores para impulsionar soluções em sistemas em fluxo [55]. O trabalho trata do uso de mini-compressores de ar do tipo bomba de diafragma, utilizadas em princípio para a oxigenação da água de aquários domésticos. Este sistema foi utilizado com sucesso em diferentes estudos [69-75] e tem como características principais, o baixo custo e a geração de uma vazão isenta de pulsação. Este sistema de propulsão oferece vantagens sobre as bombas peristálticas, que têm como principais limitações o custo relativamente elevado (\approx US\$ 1.500,00), a queda gradual de vazão após longos períodos de operação devido à fadiga e deformação dos tubos e limitação no controle da vazão quando vários canais são usados. Por outro lado, os sistemas de propulsão baseados no uso de mini-compressores de ar têm como desvantagens a alteração da vazão devido a problemas como variações da tensão da rede elétrica e do aquecimento do mini-compressor com o tempo de uso.

Um sistema alternativo para obter uma pressão constante em função do tempo foi recentemente descrita por Lago e colaboradores [76-77]. Neste estudo, os autores utilizam a pressão gerada por uma coluna de água para introduzir alíquotas de amostras em um sistema de eletroforese capilar. A estratégia utilizada também apresentou uma boa linearidade entre o volume de amostra injetada e diferentes alturas de colunas de água utilizadas.

Assim, o uso da pressão gerada por uma coluna de água para controle da vazão de sistemas em fluxo, pode resolver problemas gerados pelas bombas peristálticas quando da

utilização de detectores voltamétricos, além de proporcionar um controle sistemático da vazão.

1.3 2 - Detecção amperométrica

A detecção amperométrica baseia-se na medida de uma corrente a um potencial (E) fixo aplicado, ou seja, um sensor amperométrico é um sensor voltamétrico mantido num potencial constante [78]. Esse tipo de detecção é o mais utilizado em detectores eletroquímicos em fluxo, respondendo pela grande maioria dos trabalhos descritos na literatura [79-85], embora uma parcela significativa esteja baseada na detecção voltamétrica convencional [54,86].

A detecção amperométrica à E constante exige instrumentação simples e de baixo custo, razão pela qual foi a mais explorada em sistemas FIA e em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação de uma grande variedade de compostos eletroativos [87-88]. A limitação associada a esse modo de detecção está na estabilidade do sinal eletroquímico quando determinados compostos são analisados, comprometendo a repetibilidade da corrente eletroquímica (sinal eletroquímico) e a reprodutibilidade dos resultados da análise. A estabilidade do sinal eletroquímico é governada pela taxa de transferência de carga (elétron) entre o eletrodo e a espécie eletroativa (presente na interface eletrodo-solução), que por sua vez depende das condições da superfície do eletrodo. A superfície do eletrodo pode ser modificada durante a análise, dependendo do tipo de composto que está envolvido no processo eletroquímico. Ou seja, quando a espécie eletroativa ou o produto formado na reação de eletrodo ou ambos são adsorvidos na superfície do eletrodo de modo irreversível ou quase-irreversível, ocorre a contaminação ou a passivação do eletrodo, que se torna mais significativo a medida que novas alíquotas da solução do analito são injetadas. Este problema é verificado, por exemplo, na determinação eletroquímica de fenol e dos derivados fenólicos [89]. A passivação ou a contaminação da superfície do eletrodo pode afetar a taxa de transferência de carga entre o eletrodo e o analito, como também pode produzir sinais eletroquímicos devido aos produtos adsorvidos, que interferem no sinal desejado.

Em geral, a determinação eletroquímica de compostos orgânicos envolve contaminação da superfície do eletrodo, seja devido à adsorção dos produtos da reação

eletroquímica ou dos contaminantes orgânicos presentes na solução da amostra. Para muitos casos, a detecção amperométrica em fluxo minimiza o problema da contaminação do eletrodo, pois um volume pequeno de amostra ou de soluções padrão (em geral, 20 a 100 μL) é injetado no sistema. Assim, a extensão do processo é limitada pela quantidade de analito disponível na superfície do eletrodo. Além disso, a passagem contínua de eletrólito suporte sobre o eletrodo (mantido em potencial constante) promove a limpeza do eletrodo, mantendo sua superfície nas mesmas condições por maior período de tempo.

Outra limitação da detecção amperométrica à E constante é a determinação simultânea de compostos eletroativos com potenciais redox distintos em determinadas condições experimentais. Quando a diferença de potencial envolvida em ambos processos eletroquímicos é suficientemente grande, superior a 0,1 V [90], é possível contornar esta limitação realizando-se medidas do sinal amperométrico em dois potenciais de eletrodo: 1^o) em E_1 onde somente uma das espécies é reduzida ou oxidada, sendo o sinal amperométrico proporcional à concentração desta espécie eletroativa. 2^o) em E_2 onde ambas as espécies sofrem processo de eletrodo. O sinal amperométrico diferencial corresponderá à concentração da 2^a espécie eletroativa. Essa medida pode ser também realizada simultaneamente utilizando-se uma célula eletroquímica em fluxo com dois eletrodos de trabalho (ou sensores) em paralelo, um em E_1 e outro em E_2 . Nesse caso, um bi-potenciostato é normalmente exigido para controlar o potencial de cada eletrodo de trabalho.

A detecção amperométrica envolvendo a aplicação de múltiplos pulsos de E, denominada amperometria de múltiplos pulsos (AMP), disponibilizada em alguns potenciostatos (por exemplo, da Autolab), contorna de forma simples as limitações da detecção amperométrica a E constante discutidas anteriormente. Esses equipamentos possibilitam ainda o uso da técnica amperométrica no modo pulso diferencial, conhecida como amperometria de pulso diferencial (APD). Em ambas técnicas, AMP e APD é possível a aquisição simultânea de sinais amperométricos (ou amperogramas) da alíquota da solução amostra (ou padrão) injetada em até 10 potenciais diferentes. O tempo de aplicação de cada E pode ser definido para valores tão pequenos quanto 30 ms. No caso da técnica APD, tem-se ainda a possibilidade de selecionar dois E para se obter o sinal amperométrico diferencial, que vem dado por: $\Delta I = I_x - I_y$, onde ΔI é o sinal amperométrico diferencial, I_x e I_y são os valores dos sinais amperométricos quando um pulso de potencial

E_x e E_y são aplicados ao eletrodo. Para processos reversíveis, ΔI pode ter um valor significativo, se E_x e E_y envolverem correntes de oxidação e de redução, respectivamente.

A detecção AMP vem sendo utilizada como detector acoplado a CLAE, no intuito de realizar a limpeza eletroquímica da superfície de eletrodos [91-93], durante a análise cromatográfica. Em muitos artigos essa técnica é descrita como amperometria pulsada. Embora a AMP esteja disponibilizada há algum tempo, esta técnica ainda não foi explorada em detectores eletroquímicos no modo gerador-coletor. Nesse modo de detecção, os pulsos de E são aplicados numa seqüência que possibilita monitorar simultaneamente o sinal eletroquímico tanto do analito eletroativo (em E_1) como de seu produto formado na reação de eletrodo (em E_2). Esse modo de detecção aumenta a seletividade do método eletroquímico, pois possibilita a determinação simultânea de compostos eletroativos, se estes apresentarem diferenças quanto à reversibilidade do processo eletroquímico [94-95].

Considerando-se a potencialidade da detecção AMP em sistema FIA, abrem-se perspectivas de desenvolvimento de metodologias de análises químicas de compostos orgânicos eletroativos, que apresentam vantagens como: baixo custo; alta reprodutibilidade dos resultados; alta seletividade e sensibilidade, menor tempo de análise e maior simplicidade na execução da metodologia de tratamento das amostras.

1.4 - Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi investigar as vantagens da AMP em termos de seletividade e sensibilidade, sem a necessidade de etapas de preparação de amostra na detecção de NF's. Nesse contexto, o Paration foi utilizado como modelo para determinação amperométrica em sistema de análise por injeção em fluxo contínuo (FIA), visando o desenvolvimento de uma metodologia rápida e de baixo custo para a análise de NF's totais em águas naturais.

As seguintes atividades foram executadas e desenvolvidas:

- Construção de um sistema controlador da vazão de fluídos em sistemas de análise em fluxo por meio da pressão gerada por uma coluna de água. O desempenho deste sistema de propulsão foi comparado com o de uma bomba peristáltica na detecção amperométrica e voltamétrica de analitos eletroativos;

- Construção de uma célula eletroquímica em fluxo versátil e de baixo custo, que possibilita o uso de diferentes eletrodos de trabalho, bem como um possível acoplamento após a coluna de separação cromatográfica;
- Otimização dos parâmetros analíticos da detecção amperométrica em FIA, tais como: tipo de eletrodo de trabalho, tipo de eletrólito suporte, pH, vazão, tamanho da alça de amostragem, pulsos de potenciais aplicados e tempo de aplicação de cada potencial;
- Análise de amostras de água de rio (Uberabinha), fortificadas com $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Paration, com a finalidade de aferir a recuperação da resposta amperométrica para Paration no sistema FIA proposto, nas condições experimentais investigadas.

CAPÍTULO 2:
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2. 1 - Soluções e reagentes

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida de sistema de purificação Milli-Q.plus (Millipore). As soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico (Merck). Foram investigados como eletrólito suporte para detecção eletroquímica soluções de ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ácido clorídrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e soluções tampão de ácido acético/acetato de potássio $0,1$ ou $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7). O pesticida Paration foi adquirido da Sigma. Solução padrão estoque do pesticida foi preparada em concentração de 5000 mg L^{-1} , em acetonitrila. Soluções padrão de trabalho do respectivo inseticida foram preparadas por diluição da solução estoque nos eletrólitos suporte.

2. 2 - Esquema de montagem para utilização da pressão gerada por uma coluna de água no controle de vazão em sistemas em fluxo

A Figura 1 apresenta o esquema da montagem para utilização da pressão gerada por uma coluna de água no controle de vazão em sistemas em fluxo.

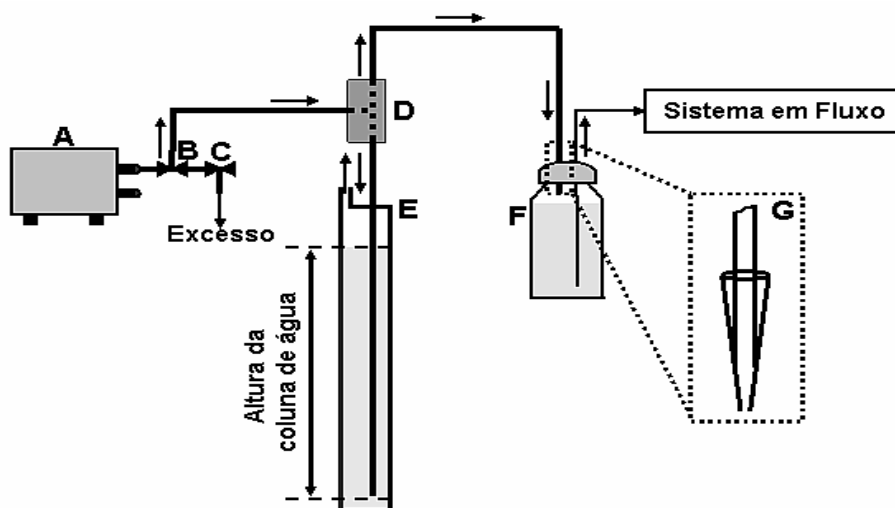


Figura 1: Esquema de montagem para utilização da pressão gerada por uma coluna de água para controle de vazão de sistemas em fluxo. (A) Mini-compressor de ar; (B, C) Válvulas usadas em aquarismo para divisão e controle de fluxo de ar; (D) Junção de acrílico tipo T; (E) Tubo de PVC – coluna de água; (F) Reservatório do carregador; (G) Vista ampliada da conexão do tubo de polietileno ao reservatório com eletrólito.

O sistema consiste em um mini-compressor (A), de duas válvulas para divisão e controle grosseiro do fluxo de ar (B, C), um divisor de fluxo tipo T em acrílico (D), tubo de PVC de 10 cm de diâmetro interno e 160 cm de altura (E) e de um reservatório para o eletrólito ou solução transportadora (F). O diâmetro interno da tubulação usada do mini-compressor até a coluna de água e ao reservatório da solução transportadora é de 3,0 mm. A vazão é controlada com o deslocamento do tubo no interior da coluna de água (E). Quanto maior a coluna de água, maior a resistência oferecida ao fluxo de ar e maior a pressão transferida ao reservatório contendo o eletrólito ou a solução transportadora. Em relação ao mini-compressor, o fluxo de ar é subdividido em quatro com auxílio de válvulas adquiridas em lojas para aquarismo. O sistema em fluxo é ainda constituído de um injetor e um detector eletroquímico.

2.3 – Instrumentação

As medidas amperométricas e voltamétricas foram realizadas utilizando-se o equipamento Potenciostato/Galvanostato PGSTAT 20 da Autolab (Eco Chemie) e uma célula eletroquímica (tipo “wall-jet”) de três eletrodos, construída no próprio laboratório (Figura 2). O detector eletroquímico foi construído a partir de um tubo de vidro de 7 cm de comprimento e com 1,5 cm de diâmetro interno. Inicialmente, foram efetuados três orifícios laterais no tubo de vidro. Em cada orifício foi soldado um tubo de vidro (1,5 cm de comprimento) com menor diâmetro interno. Os dois tubos inferiores (4 mm d.i.) foram usados para fixação, sob simples pressão, dos eletrodos de referência e auxiliar (ambos de formato cônico) e o tubo superior (7 mm d.i.) serve para saída da fase móvel (resíduo). Uma peça de teflon (sob medida), com um canal (orifício) centralizado (1,5 mm d.i.), foi fixada na parte inferior da célula. Na parte superior da célula, outra peça de teflon (sob medida) foi fixada. Esta peça também possui um canal (orifício) centralizado (com rosca interna) de 12 mm de diâmetro para a fixação do eletrodo de trabalho na célula. Este eletrodo foi adaptado dentro de um tubo de teflon com rosca externa, o qual foi rosqueado na peça de teflon da parte superior da célula, dando origem a uma célula do tipo “wall-jet”. Como eletrodos de referência e auxiliar foram usados Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e um fio de platina, respectivamente. Os eletrodos de trabalho utilizados foram o de pasta de carbono, carbono vítreo e ouro, todos de 2,0 mm de diâmetro, sendo os dois últimos da

Metrohm e o de pasta de carbono preparado pela mistura de 0,100 g de grafite puro (Fluka) com 50 μL de óleo mineral em um almofariz de ágata, até completa homogeneização.

O eletrodo de referência foi preparado pela eletrodeposição de AgCl sobre a superfície de uma lâmina de Ag metálica (5,0 mm x 7,0 mm) e de um fio de Ag (3,0 mm x 0,1 mm de diâmetro), através da eletrólise da solução de NaCl 0,1 mol L⁻¹, sob corrente constante de 0,2 mA, durante 2 h, utilizando-se o Potenciostato/Galvanostato PGSTAT 20 da Autolab (Eco Chemie).

Uma bomba peristáltica Minipuls 3 (Gilson) e um minicompressor de ar de duas vias (Friska) foram usados para o controle da vazão nos sistemas em fluxo. Foi usado um software gráfico para os tratamentos de dados obtidos nesse trabalho.

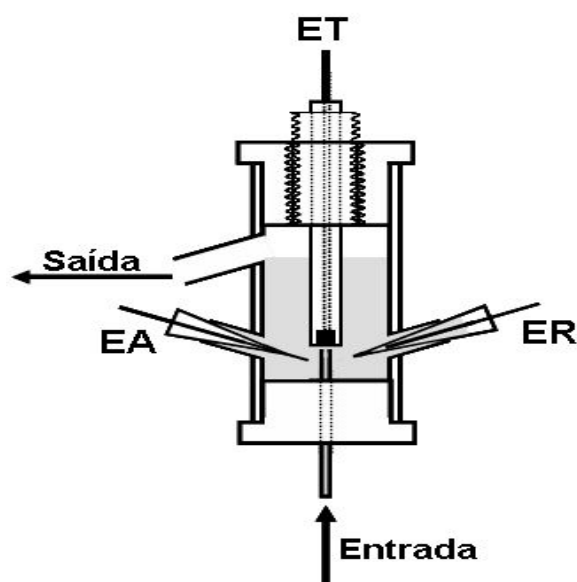


Figura 2: Célula eletroquímica de três eletrodos (tipo “wall jet”), constituída de (EA) eletrodo auxiliar platina, (ER) eletrodo referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e (ET) eletrodo de trabalho.

2. 4 - Estudos do controle da vazão gerado por uma coluna de água em sistema em fluxo

Estudos da estabilidade da vazão em função do tempo foram realizados utilizando-se duas vazões distintas: uma em 2,0 mL min⁻¹ e outra em 0,007 mL min⁻¹. Os estudos da estabilidade de vazões tão baixas quanto 0,007 mL min⁻¹ foram realizados visando o uso

deste sistema de propulsão em micro-FIA. No primeiro caso, o volume do fluido dispensado foi avaliado de hora em hora durante 8 h contínuas de funcionamento. No segundo caso ($7 \mu\text{L min}^{-1}$), foram realizadas medidas de hora em hora ao longo de 12 h contínuas de funcionamento.

Foram também investigadas as relações existentes entre a altura da coluna de água e a vazão para diferentes comprimentos de tubulações (reatores), de 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 m, e de diâmetros internos com 1,2; 0,25 e 0,15mm.

2.5 - Comparação entre o sinal obtido na detecção eletroquímica com bomba peristáltica e pelo sistema proposto

Estudos comparativos entre o desempenho de uma bomba peristáltica e o sistema proposto foram realizados utilizando-se a célula eletroquímica em fluxo construída no laboratório, tendo o Carbono Vítreo como eletrodo de trabalho.

Foi utilizada uma solução de ferrocianeto de potássio $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,7 para demonstrar a diferença do sinal analítico entre os dois sistemas de propulsão na detecção amperométrica. O potencial aplicado para oxidação do íon ferrocianeto foi de $0,4 \text{ V vs Ag/AgCl (KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1})$.

A comparação entre os dois sistemas de propulsão também foi investigada usando voltametria cíclica para uma solução de ferrocianeto de potássio 2 mmol L^{-1} , em meio de tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7), obtida sob regime hidrodinâmico. O potencial foi variado de $-0,20$ a $+0,70 \text{ V}$ a uma velocidade de $20 \text{ mV s}^{-1} \text{ vs Ag/AgCl (KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1})$.

2.6 - Estudos do comportamento eletroquímico e otimização dos parâmetros da detecção amperométrica de Paration em FIA

2.6.1 - Comportamento eletroquímico de Paration

O comportamento eletroquímico do Paration foi estudado utilizando-se a Voltametria Cíclica na faixa de trabalho de $-0,6$ a $1,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$, sobre eletrodo de pasta de carbono com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , nos eletrólitos suportes descritos no item 2.1.

2.6.2 - Avaliação do eletrólito suporte, eletrodo de trabalho e potencial aplicado para detecção amperométrica em sistema FIA

Foram realizados estudos para estabelecer o melhor potencial a ser aplicado para determinação de Paration em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7) e ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sobre os diferentes eletrodos de trabalho apresentados no item 2.2 com vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$, alça de amostragem de $100 \mu\text{L}$ em sistema FIA de linha única com tubos de polietileno com $0,5 \text{ mm}$ de diâmetro interno e 100 cm de comprimento. O esquema do sistema FIA com detecção eletroquímica está apresentada na Figura 3.

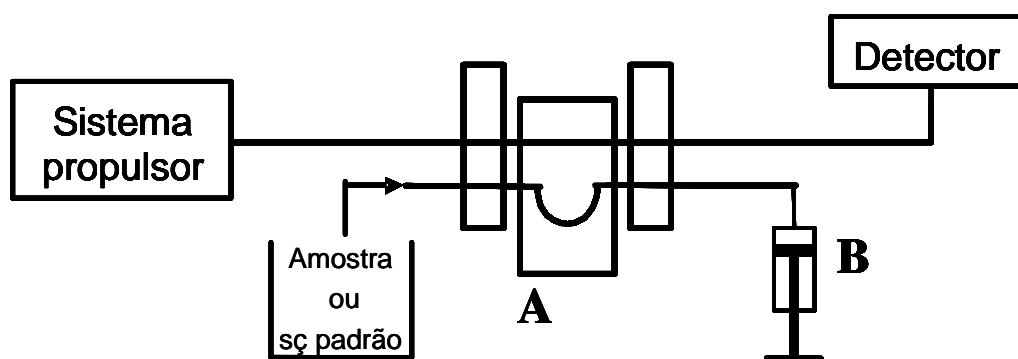


Figura 3: Esquema do sistema FIA utilizado: sistema propulsor (Figura 1). (A) Injetor comutador de acrílico [96]; (B) Seringa utilizada para preencher a alça de amostragem do sistema; e detector amperométrico (Figura 2).

2.6.3 - Avaliação da detecção amperométrica de múltiplos pulsos (AMP) de Paration

Estudos da aplicação de pulsos em diferentes potenciais foram realizados para uma solução de Paration $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ em ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sobre eletrodo de carbono vítreo com vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$, alça de amostragem de $100 \mu\text{L}$ em sistema FIA de linha única com tubos de polietileno com $0,5 \text{ mm}$ de diâmetro interno e 100 cm de comprimento.

Nas mesmas condições experimentais foram avaliados os potenciais de coleta para os outros processos eletroquímicos do Paration. Isso foi feito fixando o potencial aplicado para o grupo nitro (gerador) e variando o potencial aplicado para o grupo hidroxilamina

num mesmo eletrodo de carbono vítreo. Mesmo procedimento foi realizado para observação da redução do grupo nitroso, o qual é gerado pelo grupo hidroxilamina.

2.6.4 - Análise do sinal obtido na detecção amperométrica de múltiplos pulsos de Paration em função da vazão e em função da alça de amostragem

Os estudos da relação do fluxo com a intensidade da resposta obtida pelo detector foi feito para uma solução de Paration $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ nas mesmas condições do sistema FIA apresentado no item 2.6.3, com aplicação de três potências: $-0,5 \text{ V} / 100 \text{ ms}$; $+ 0,4 \text{ V} / 100 \text{ ms}$ e $-0,1 \text{ V} / 100 \text{ ms}$, os fluxos foram variados de $0,35 \text{ mL min}^{-1}$ a $2,1 \text{ mL min}^{-1}$ com a modificação da altura da coluna de água.

A relação entre o sinal amperométrico de Paration e a quantidade de amostra injetada foi investigada variando a alça de amostragem de 100 a 500 μL de uma solução de Paration $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ nas condições experimentais de fluxo descritas no item 2.6.3 e nas mesmas condições de aplicação de potencial utilizadas para os estudos em função da vazão aplicada.

2.6.5 - Avaliação do tempo de aplicação de cada potencial estabelecido para os grupos eletroativos do Paration na detecção AMP em FIA

Estudos do tempo de aplicação de cada potencial estabelecido para os grupos eletroativos do Paration sobre eletrodo de carbono vítreo foram realizados variando primeiramente o tempo para a redução do grupo nitro entre 30 a 500 ms e mantendo os outros dois grupos gerados constantes em 100 ms. A mesma metodologia foi utilizada para a avaliação da oxidação da hidroxilamina, porém o tempo de aplicação do potencial de redução para o grupo nitro foi fixado em 30 ms e do grupo hidroxilamina variado de 30 a 500 ms. A investigação da redução do grupo nitroso foi realizada fixando o tempo de aplicação dos outros dois grupos em 30 ms e modificando o tempo de 30 a 500 ms para a redução desse grupo.

2.6.6 - Estudos da comparação das técnicas amperométricas em FIA

A comparação entre as técnicas amperométricas de múltiplos pulsos e pulso diferencial foram realizadas para a detecção de uma solução de Paration $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ sobre eletrodo de carbono vítreo em ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, fluxo de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, alça de $300 \text{ }\mu\text{L}$ e reator de 100 cm em um sistema FIA de linha única com tubos de polietileno com $0,5 \text{ mm}$ de diâmetro interno. O potencial e os tempos de aplicação dos potenciais para cada técnica foram de $-0,5 \text{ V} / 30 \text{ ms}$; $+ 0,4 \text{ V} / 30 \text{ ms}$ e $-0,1 \text{ V} / 30 \text{ ms}$ para a amperometria de múltiplos pulsos e $-0,5 \text{ V} / 30 \text{ ms}$ e $+ 0,4 \text{ V} / 30 \text{ ms}$ para a amperometria de pulso diferencial.

2.6.7 - Estudos do limite de detecção, de quantificação e recuperação do sinal amperométrico de Paration fortificado em amostras aquosas.

Os estudos da reposta do detector à recuperação do sinal amperométrico de Paration em amostras aquosas, foram realizados com fortificação de Paration $20 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ em uma amostra coletada no Rio Uberabinha, à margem da avenida Rondon Pacheco, próximo ao Praia Clube S/C, no dia 20 de outubro de 2006 na cidade de Uberlândia. Os cálculos foram realizados através de uma curva de calibração obtida de um fiagrama com detecção AMP em triplicata para concentrações padrão de Paration de 10 a $50 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, sobre eletrodo de carbono vítreo em ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, fluxo de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$, alça de $300 \text{ }\mu\text{L}$ e reator de 100 cm em um sistema FIA de linha única com tubos de polietileno com $0,5 \text{ mm}$ de diâmetro interno. Os potenciais e os tempos de aplicação para cada um foram: $0,5 \text{ V} / 30 \text{ ms}$; $+ 0,4 \text{ V} / 30 \text{ ms}$ e $-0,1 \text{ V} / 30 \text{ ms}$. No software gráfico foi realizada a somatória em módulo dos sinais obtidos para cada um dos potenciais. O limite de detecção (LD) foi calculado multiplicando o desvio padrão do branco por três e então dividindo esse valor pelo coeficiente angular da curva de calibração [97]. O limite de quantificação foi obtido multiplicando o LD por 3,33 [97].

CAPÍTULO 3:
RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 - Investigação do uso da pressão gerada por uma coluna de água para controle da vazão em sistemas em fluxo.

Os estudos da estabilidade da vazão do sistema de propulsão proposto neste trabalho demonstram que a pressão gerada pela coluna de água é estável durante longos períodos de operação do mini-compressor, permitindo a utilização do mesmo tanto para FIA quanto para micro-FIA. Um desvio padrão relativo (DPR) de 0,9 % foi obtido para vazão de 2,0 mL min⁻¹, e um DPR de 1,4% para vazão de 0,007 mL min⁻¹. Deve-se ressaltar que, para estudar a estabilidade da vazão de 2,0 mL min⁻¹, o frasco contendo a solução transportadora foi colocado na posição horizontal (deitado), para evitar que a coluna de água no interior do frasco sofresse grandes variações.

A Figura 4 apresenta o estudo da relação existente entre a altura da coluna de água e a vazão obtida para reatores de diferentes comprimentos e diâmetros internos.

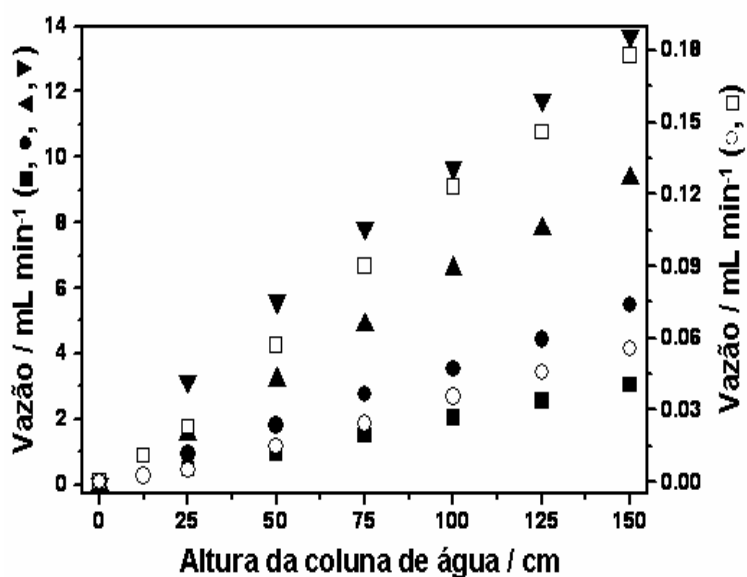


Figura 4: Relação entre a vazão em função da altura da coluna de água para tubos (de 1,2 mm d.i.) de comprimentos: (■) 5; (●) 2,5; (▲) 1,0; (▼) 0,5 m e para tubos de (○) 20 cm e 0,15 d.i. e (□) 50 cm e 0,25 mm d.i.

Conforme pode ser observado, há uma relação linear ($r^2 \approx 1$) entre a altura da coluna de água e a vazão obtida para todos os testes realizados. Estes resultados permitem concluir

que, para cada sistema, a vazão numa única altura de coluna de água necessita ser calibrada e por relação direta obtêm-se as demais. Para que esta condição de linearidade seja obtida, alguns cuidados necessitam ser adotados: (a) o diâmetro interno do tubo colocado no interior da coluna de água deve ser igual ou superior a 5 mm. Tubos com diâmetros inferiores oferecem uma certa resistência ao fluxo de ar fazendo com que a relação vazão vs altura da coluna de água não seja linear; (b) quando toda pressão gerada pelo mini-compressor é transferida para o sistema, a intensidade de borbulhamento para uma coluna de 10 cm de água é muito maior do que para uma de 100 cm, fazendo com que a relação vazão vs altura da coluna também deixe de ser linear. A intensidade de borbulhamento pode ser facilmente controlada através das válvulas B e C da Figura 1. Quanto menor a coluna, maior a pressão de ar liberada pela válvula C (excesso de ar) e por conseqüência, uma menor pressão de ar será transferida para a coluna. Um controle grosseiro nesta etapa é suficiente para que haja uma relação linear entre vazão e altura da coluna de água.

A mudança de uma vazão para outra é simples quando se deseja aumentar a mesma. Basta aumentar a altura da coluna de água e o sistema entra em equilíbrio rapidamente (≈ 1 min). No entanto, isto não é verdadeiro quando o objetivo é diminuir a vazão, pois a pressão interna diminui lentamente até que um novo equilíbrio seja estabelecido numa vazão menor. Uma solução para isto é abrir rapidamente o sistema (isto é, a conexão do tubo de polietileno ao reservatório com eletrólito, Figura 1G) para que a pressão interna seja reduzida a zero. Desta forma, um novo equilíbrio é rapidamente estabelecido após o fechamento do sistema. O tubo pelo qual o fluxo de ar é transportado para o frasco contendo o eletrólito (solução transportadora) é pressionado no interior de uma ponteira de micropipeta (100 μ L), a qual é fixada num orifício na tampa do reservatório. Este tipo de conexão é muito eficiente e permite que esta ação seja realizada em alguns segundos. A estrutura cônica da ponteira facilita a sua fixação na tampa do reservatório. Este tipo de conexão pode ser utilizado em qualquer sistema e é de grande utilidade na montagem dos sistemas em fluxo, pois as conexões podem ser facilmente ajustadas, mesmo quando estão úmidas.

O uso da coluna de água evita variações nas vazões geradas por flutuações na tensão de alimentação [55] e o aquecimento da bomba após longos períodos de operação, desde que a pressão de ar gerada pela bomba continue sendo suficiente para que o borbulhamento não pare.

3.2 - Comparação entre a bomba peristáltica e o sistema proposto em relação ao ruído gerado na detecção amperométrica e voltamétrica

A Figura 5 apresenta os sinais amperométricos obtidos de 100 μL de uma solução de ferrocianeto de potássio $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ introduzidos no sistema de análise por injeção em fluxo esquematizado na Figura 3, com controle da vazão realizado pelo sistema proposto (A) e por uma bomba peristáltica (B).

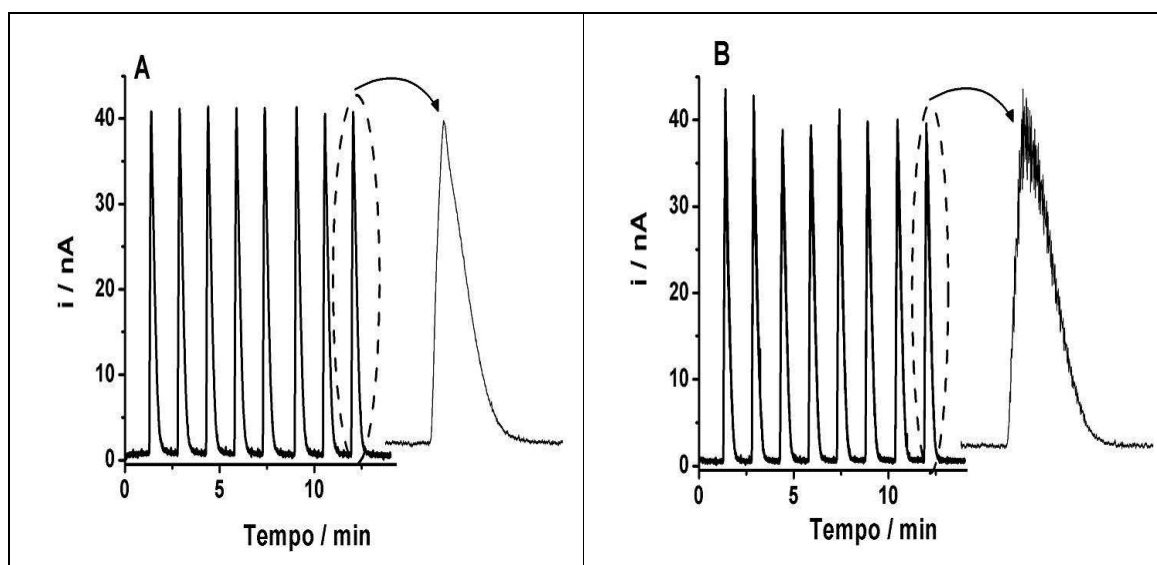


Figura 5: Comparação entre os sinais obtidos por FIA com detecção amperométrica com vazão controlada por pressão de coluna de água (A) e por bomba peristáltica (B). Vazão: $0,8 \text{ ml min}^{-1}$. Analito: Ferrocianeto de Potássio $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,7. Volume injetado: $100 \mu\text{L}$. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo (2 mm de diâmetro). O potencial aplicado para oxidação do íon ferrocianeto foi de $0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}$ ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

Observa-se pela imagem ampliada do último pico das Figuras 5A e 5B que os sinais transientes apresentam um nível de ruído muito inferior quando a vazão é controlada pelo sistema proposto. Além disto, a repetibilidade do sinal obtida com o sistema proposto ($\text{DPR} = 0,6 \%$) é melhor, comparada à obtida com a bomba peristáltica ($\text{DPR} = 4,0 \%$). A diferença se deve principalmente ao nível de ruído presente no experimento usando a bomba peristáltica. A Figura 6 apresenta a resposta obtida para o experimento usando o

fluxo controlado por pressão gerada por uma coluna de água (A) e por uma bomba peristáltica (B) em voltametria hidrodinâmica de uma solução de ferrocianeto de potássio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

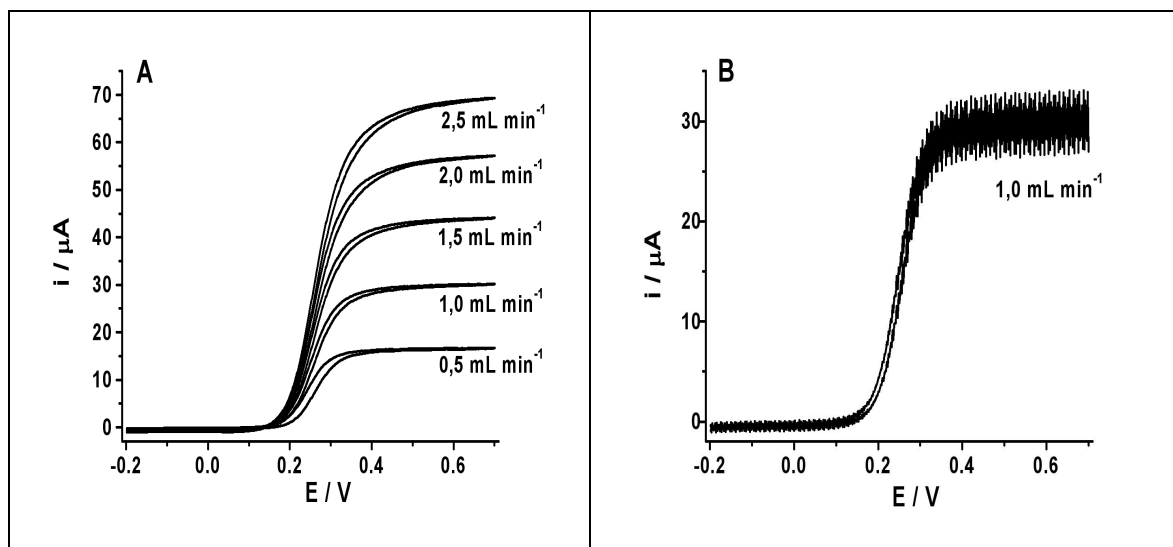


Figura 6: Voltamogramas cíclicos hidrodinâmicos obtidos para uma solução de ferrocianeto de potássio 2 mmol L^{-1} em meio de tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. (A) Vazões controladas por pressão gerada por coluna de água; (B) Vazão controlada por bomba peristáltica. O potencial foi variado de $-0,20$ a $+0,70 \text{ V}$ a uma velocidade de 20 mV s^{-1} vs Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

Neste estudo fica ainda mais evidente a diferença no nível de ruído gerado pelos dois sistemas. No experimento onde a vazão foi controlada pela coluna de água em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, o ruído médio calculado foi de $0,055 \text{ mA}$, enquanto que usando a bomba peristáltica ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$) este valor ficou em $3,46 \text{ mA}$ (63 vezes superior).

A atenuação do ruído da linha de base gerado pela bomba peristáltica foi investigada neste trabalho utilizando-se um amortecedor de pulso dotado de três câmaras de amortecimento (cada câmara possui $2,5 \text{ cm}$ de altura e $0,5 \text{ cm}$ de diâmetro interno), utilizado normalmente em sistema FIA com detecção espectrofotométrica. Estudos conduzidos com soluções de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ indicaram que o uso de três câmaras de amortecimento de pulso minimiza significativamente a pulsação dos sistemas FIA com detecção eletroquímica. Porém, a pulsação da linha de base com os sistema de

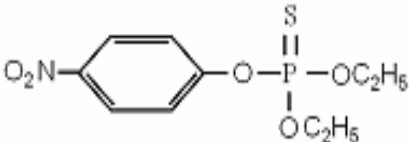
amortecimento é ainda suficientemente grande, limitando as análises de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ em níveis de concentração de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

3.3 - Aspectos Gerais e Investigação do Comportamento Eletroquímico do Paration

3.3.1 - Estrutura e características físico-químicas do Paration

A estrutura e principais características físico-químicas do Paration estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Principais características físico-químicas e estruturais do pesticida Paration [98]

Estrutura	
Fórmula Molecular	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_5\text{PS}$
Peso Molecular (g mol L^{-1})	291,25806
Nomenclatura da IUPAC	o-dietil-o-p-nitrofenil fosforotioato
Nomes Comerciais	Paration, Folidol, Fostox e Fosferno
Solubilidade em água (mg L^{-1})	6,54 (ligeiramente solúvel)
Ponto de Fusão e de Ebulição	$6\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $375\text{ }^{\circ}\text{C}$
Densidade (g cm^{-3})	1,26

Apesar do Paration ser o mais resistente à hidrólise química entre os organofosforados, particularmente em valores de pH na região neutra e ácida [99], o produto principal formado pela hidrólise é o nitrofenol, que também apresenta toxicidade elevada aos seres humanos. O Paration apresenta em sua estrutura o grupo nitro (NO_2), característica que o coloca na classe dos NF's. O NO_2 é um grupo eletroativo [29], que

sofre um processo de redução produzindo a hidroxilamina (NHOH) em meio de diversos eletrólitos e tipos de eletrodos. Assim, o Paration apresenta um comportamento eletroquímico que pode ser investigado por voltametria cíclica como mostra o item seguinte.

3.3.2 - Comportamento Eletroquímico do Paration

O comportamento eletroquímico de Paration sobre eletrodo de pasta de carbono (EPC) foi investigado por voltametria cíclica em função do pH e da natureza do eletrólito suporte. Os Voltamogramas Cíclicos (VC) de soluções de Paration em função do pH e tipo de eletrólito suporte estão mostrados na Figura 7.

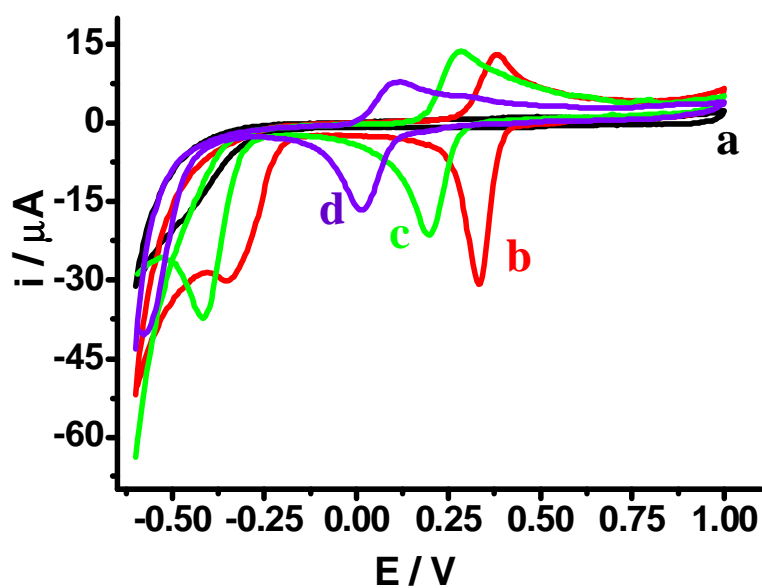


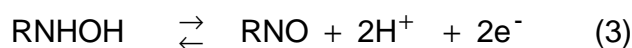
Figura 7: VC de **a** (—) HCl 0,5 mol L⁻¹ e de soluções de Paration 2,7 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em **b** (—) HCl 0,5 mol L⁻¹; **c** (—) ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹; **d** (—) tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,7) sobre EPC. Faixa de trabalho de -0,6 a 1,0 V vs Ag/AgCl, sobre eletrodo de pasta de carbono com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Observa-se nos VC's da Figura 7 a ocorrência de um processo de redução irreversível (pico catódico) e de um processo redox reversível, em potenciais que dependem

do pH da solução e da natureza do eletrólito suporte. Este comportamento está de acordo com o relatado na literatura [29]. Em HCl 0,5 mol L⁻¹ o pico catódico é observado em torno de -0,3 V, enquanto o processo redox reversível em torno de + 0,3 V. O processo ao redor de -0,3 V deve-se à redução eletroquímica do grupo -NO₂ a hidroxilamina (-NHOH), de acordo com a equação simplificada:



O composto RNHOH é oxidado reversivelmente a nitroso (-NO) em potenciais próximos de +0,3 V, conforme a equação:



Após a inversão da varredura de potencial em 1,0 V, o composto RNO, que se encontra na superfície do eletrodo, sofre redução regenerando o RNHOH, produzindo o pico redox entre 0,3 a 0,4 V vs Ag/AgCl.

De acordo com a equação (2), o potencial do processo eletroquímico depende da concentração de íons H⁺ presente na solução. A equação de Nernst para a redução do grupo nitro pode ser escrita como:

$$E = E^{0'} - \frac{0,059}{4} \log \frac{[\text{RNHOH}]}{[\text{RNO}_2][\text{H}^+]^4} \quad (4)$$

que pode ser rearranjada para:

$$E = E^{0'} - \frac{0,059}{4} \log \frac{[\text{RNHOH}]}{[\text{RNO}_2]} - 0,059 \text{ pH} \quad (5)$$

sendo que E^{0'} é o potencial padrão formal do par RNHOH / RNO₂

A redução de -NO₂ a -NHOH, é favorecida pela presença de íons H⁺. Tal fato pode ser evidenciado nos VC's da Figura 7, que mostram que o aumento da concentração de íons

H^+ favorece a redução, provocando um deslocamento do potencial de pico catódico para valores menos negativos como pode ser comprovado pela equação (5) de Nernst apresentada. Por outro lado, a equação (3) mostra que na presença de uma maior concentração de íons H^+ a oxidação de -NHOH torna-se mais difícil, deslocando este processo para valores mais positivos, como mostra a equação (6) de Nernst para esse par:

$$E = E^0 - \frac{0,059}{2} \log \frac{[RNHOH]}{[RNO]} - 0,059 \text{ pH} \quad (6)$$

sendo, E^0 o potencial padrão formal do par RNHOH / RNO

3.4 - Investigação da detecção amperométrica de Paration sob condições hidrodinâmicas

Neste estudo escolheu-se a redução do grupo nitro ($-RNO_2$), pois o processo redox envolvendo o par -NHOH/-NO só pode ser investigado se tiver ocorrido previamente a redução de $-RNO_2$. Para tanto, a determinação de Paration pela detecção do par -NHOH/-NO só é possível se um detector eletroquímico do tipo gerador-coletor estiver disponível. Neste estudo foi utilizado o ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte, pois o grupo RNO_2 é reduzido em potenciais onde não há uma interferência em relação à redução de H^+ , que é deslocada para potenciais mais negativos, minimizando a interferência deste processo no sinal amperométrico desejado.

Estudos prévios realizados com soluções de Paration $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, tendo ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte, mostraram que o eletrodo de carbono vítreo (ECV) apresentava a melhor relação sinal/ruído para a detecção amperométrica de Paration através da redução do grupo $-RNO_2$. Isso pode ser explicado pelo fato do ECV deslocar a descarga de íons H^+ para potenciais mais negativos, contribuindo para uma baixa corrente residual na região de E usada para a detecção amperométrica de $-NO_2$. A menor corrente residual favorece a relação sinal/ruído e contribui para um menor limite de detecção para Paration. Problemas de ruído na linha de base e redução de íons H^+ foram mais significativos com o EPC, limitando seu uso nas aplicações amperométricas. O eletrodo de

ouro apresentou menores problemas de ruídos da linha de base que o EPC, porém, a sensibilidade da resposta amperométrica deste eletrodo para Paration foi bem menor que a obtida com ECV. Por essa razão, o ECV foi usado nos estudos subsequentes. Cabe ressaltar que nenhuma interferência significativa em relação à redução de oxigênio foi observada na determinação de Paration nas condições experimentais investigadas.

Buscando-se definir o potencial do eletrodo no qual a redução eletroquímica de RNO_2 alcança o estado estacionário, sob condições hidrodinâmicas, monitorou-se a corrente amperométrica devido ao Paration (em ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em função do potencial aplicado ao ECV. Para este estudo utilizou-se o sistema em fluxo apresentado na Figura 3. A relação da corrente amperométrica em função do E aplicado (curva voltamétrica, sob condições hidrodinâmicas) está apresentada na Figura 8.

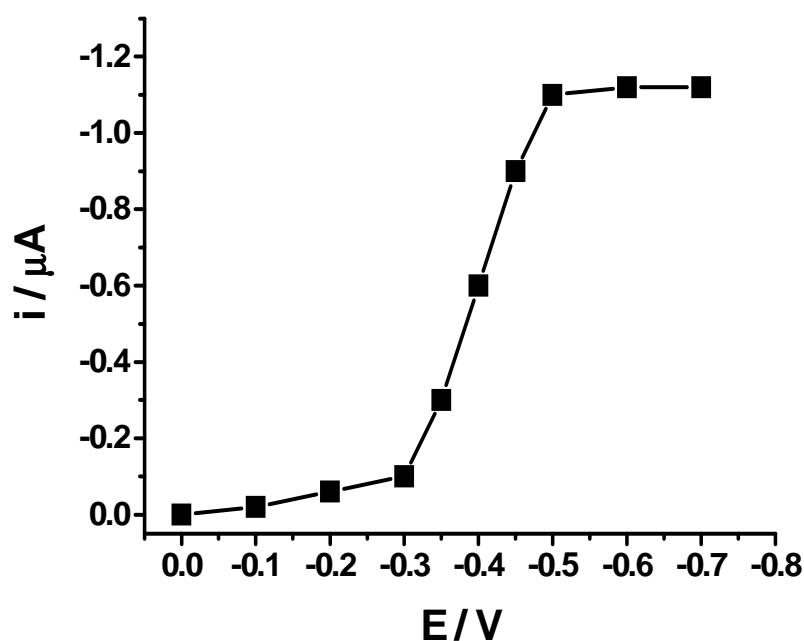


Figura 8: Dependência da corrente amperométrica em função do E aplicado, obtida da solução de Paration $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ em ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, mantida sob vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. Eletrodo: ECV.

Observa-se pela curva da Figura 8 que o processo de redução do grupo nitro inicia-se por volta de $-0,2$ V e alcança sua taxa máxima de redução em $-0,5$ V. A partir deste potencial a corrente mantém-se constante, pois depende somente da quantidade de Paration que alcança a superfície do eletrodo, que neste caso será governada pela vazão da solução e pela concentração de Paration na solução. A curva indica que a aplicação de um potencial de $-0,5$ V é suficiente para se obter a corrente amperométrica de estado estacionário. A definição deste potencial pode ser feita utilizando-se um procedimento mais simples e rápido, que será apresentado a seguir.

3.5 - Investigação da detecção amperométrica de Paration usando a técnica amperométrica de múltiplos pulsos (AMP) em sistema FIA

3.5.1 - Dependência do sinal amperométrico com o pulso de E

Diferentemente da técnica amperométrica convencional, na qual monitora-se a corrente num E constante, na técnica AMP, uma seqüência de até 10 pulsos de E pode ser aplicada ao sensor eletroquímico durante tempos muito curtos. Assim, durante a passagem da alíquota da amostra ($100 \mu\text{L}$) através da célula eletroquímica em fluxo, é possível obter os sinais transientes da corrente amperométrica em cada pulso de E que está sendo aplicado. Buscando-se utilizar esta técnica para investigar o potencial no qual a redução do grupo nitro alcança a taxa máxima, foram selecionados 10 pulsos de E, variando de $0,0$ até $-0,9$ V. A Figura 9 apresenta os amperogramas obtidos da injeção de alíquotas de $100 \mu\text{L}$ de solução de Paration $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ em ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para 10 pulsos de potenciais aplicados ao ECV, cada um com 100 ms de duração.

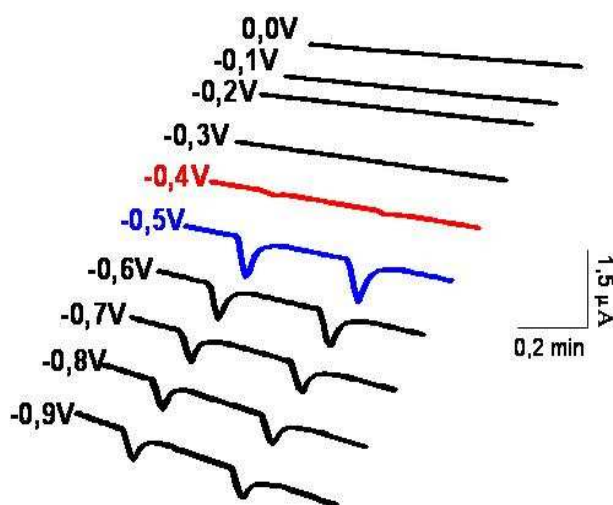


Figura 9: Amperogramas obtidos da injeção de 02 alíquotas de 100 μL de Paration $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, para 10 pulsos de potenciais aplicados ao ECV. Eletrólito suporte: ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Duração de cada pulso: 100 ms.

Os amperogramas da Figura 9 mostram que a partir de $-0,5 \text{ V}$ o sinal amperométrico não depende mais do potencial aplicado, indicando que a taxa máxima de redução do grupo nitro foi alcançada.

Estudos da aplicação da técnica AMP no modo gerador-coletor foram também conduzidos buscando-se avaliar a potencialidade desta técnica no monitoramento de produtos eletroativos formados na reação eletroquímica de determinados analitos. No presente caso, esta investigação foi realizada aplicando-se 02 pulsos de potencial: um pulso E_1 de $-0,5 \text{ V}$ para reduzir o grupo $-\text{NO}_2$ a RNHOH (hidroxilamina) e um segundo pulso E_2 para monitorar o produto formado. Os valores de E_2 investigados foram: $+0,2$; $+0,3$; $+0,4$ e $+0,5 \text{ V}$. A Figura 10 mostra os sinais amperométricos obtidos em cada pulso E_2 aplicado.

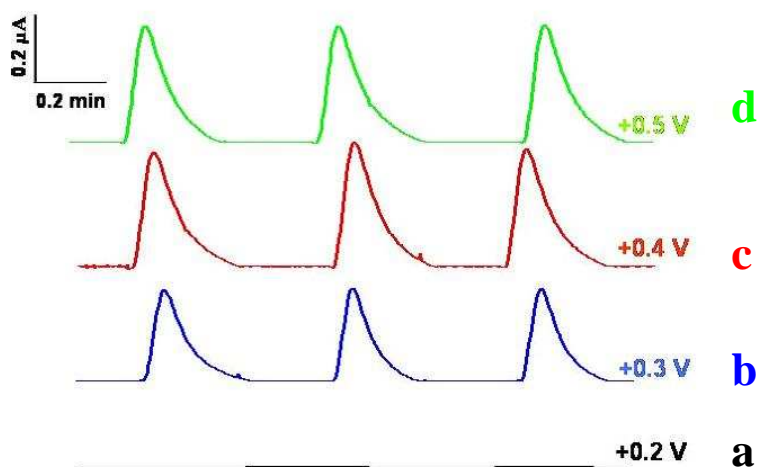


Figura 10: Amperogramas de alíquotas de 100 μL de Paration 2,0 mg L^{-1} sobre ECV com aplicação de 2 pulsos de potenciais, durante 100 ms cada, sendo o primeiro (E_1) em -0,5 V (não mostrado) e o segundo (E_2) em **a** (—) +0,2 V ; **b** (—) +0,3 V ; **c** (—) +0,4 V ; **d** (—) +0,5 V. Vazão de 2,0 mL min^{-1} . Eletrólito suporte: ácido cítrico 0,1 mol L^{-1} .

Observa-se pela Figura 10 que em + 0,2 V, nenhum processo significativo de oxidação da hidroxilamina está ocorrendo, porém quando é aplicado potencial igual ou superior a + 0,3 V o processo é observado. A taxa máxima de oxidação do grupo hidroxilamina foi atingida em + 0,4 V, pois, a partir deste potencial, a magnitude do sinal amperométrico mantém-se constante.

Estes resultados indicam que a técnica AMP pode ser usada no modo gerador-coletor para acompanhar as reações de eletrodo ou usar esse modo de detecção para aumentar a seletividade da detecção amperométrica na análise de pesticidas NF's em amostras de composição química complexa, como alimentos e amostras ambientais.

Nesse sentido, estudos foram conduzidos para avaliar se a técnica AMP aumenta a seletividade da detecção de Paration comparada com a detecção amperométrica convencional. Para tanto, um programa de 03 pulsos de potencial foi aplicado, na seqüência: um pulso E_1 de -0,5 V para reduzir o grupo $-\text{NO}_2$ a RNHOH (hidroxilamina), um segundo pulso E_2 de + 0,4 V para a oxidação de RNHOH a RNO e um terceiro pulso

E_3 para monitorar o RNO formado. Os valores de E_3 investigados foram: 0.0, -0.1 e -0.2 V. Na Figura 11 estão apresentados os respectivos amperogramas obtidos neste estudo.

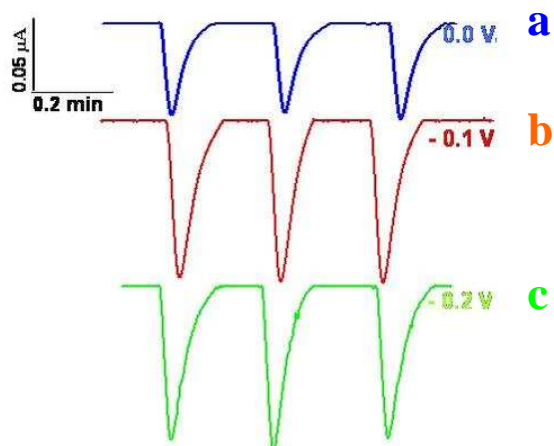


Figura 11: Amperogramas de alíquotas de 100 μL de Paration 2,0 mg L^{-1} sobre ECV com a aplicação de 03 pulsos de potencial, durante 100 ms cada, sendo o primeiro a -0,5 V (não mostrado), o segundo em + 0,4 V (não mostrado) e o terceiro em **a** (—) 0.0 V ; **b** (—) -0.1 V; **c** (—) -0.2 V. Vazão de 2,0 mL min^{-1} . Eletrólito suporte: ácido cítrico 0,1 mol L^{-1} .

Os amperogramas da Figura 11 mostram que a taxa de redução de RNO atinge o valor máximo a partir de potenciais mais negativos do que -0,1 V.

Dessa forma, os resultados apresentados nas Figuras 9, 10 e 11 mostram que a técnica AMP pode ser usada no modo gerador-coletor, em sistema de análise por injeção em fluxo contínuo, para aumentar a sensibilidade e a seletividade da detecção de nitrofosforados, como o Paration. Os valores dos potenciais estabelecidos para este modo de detecção foram: -0,5 V para redução de RNO_2 a RNHOH ; + 0,4 V para a oxidação de RNHOH a RNO e -0.1 V para redução do RNO.

3.5. 2 - Investigação do sinal obtido na detecção AMP de Paration em função da vazão do carregador e em função da alça de amostragem

Estudos do efeito da vazão da solução carregadora (ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) sobre os sinais amperométricos AMP foram também investigados. Neste estudo, os pulsos de potenciais foram aplicados, durante 100 ms na seqüência: $-0,5 \text{ V}$; $+0,4 \text{ V}$ e $-0,1 \text{ V}$. A Figura 12 mostra os respectivos sinais amperométricos de uma solução de Paration $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ obtidos num sistema FIA de linha única com alça de amostragem de $100 \mu\text{L}$.

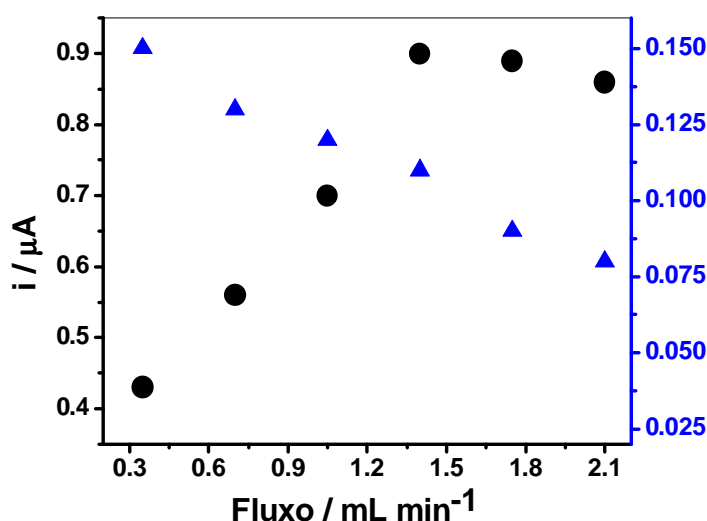


Figura 12: Altura em módulo dos sinais amperométricos em função da vazão da solução carregadora (ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), para pulsos de potencial aplicados, durante 100ms, na seqüência: (●) $-0,5 \text{ V}$ (redução de RNO_2 a RNHOH), (▲) $+0,4 \text{ V}$ (oxidação de RNHOH a RNO) e $-0,1 \text{ V}$ (redução de RNO , não apresentado). O eixo da ordenada a direita corresponde aos pontos da legenda: (▲).

Os resultados apresentados na Figura 12 indicam que quanto maior a vazão da solução carregadora, maior é a intensidade do sinal da redução de RNO_2 . Em $1,4 \text{ mL min}^{-1}$, o sinal alcança um valor máximo, sofrendo pequeno decréscimo em vazões superiores. Isto pode ser explicado, pois, em vazões muito altas, diminui a possibilidade de monitorar o

Paration presente no centro da zona da amostra injetada, onde se obtém o maior sinal amperométrico. Esta dependência é inversa para o sinal da oxidação de RNHOH. A maior intensidade do sinal de redução de RNO_2 com o aumento da vazão da solução de eletrólito suporte é atribuída ao aumento da taxa de transporte de massa de RNO_2 do *bulk* da solução para a superfície do eletrodo, com conseqüente diminuição da camada de difusão de Nernst, fazendo com que um maior número de espécies RNO_2 alcancem a superfície do eletrodo por unidade de tempo. Como conseqüência, um maior sinal amperométrico será obtido. Um efeito inverso é observado para o sinal da oxidação de RNHOH. Em menores fluxos, uma maior quantidade de RNHOH, gerado da redução de RNO_2 , encontra-se na superfície do eletrodo, contribuindo para a maior intensidade do sinal amperométrico. A mesma dependência foi encontrada para o sinal amperométrico correspondente à redução de RNO.

Considerando os sinais amperométricos de todos os processos eletroquímicos envolvidos, o fluxo de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$ foi o que apresentou a melhor condição para a detecção AMP de Paration em sistema FIA. Apesar deste fluxo atenuar a resposta da detecção de RNHOH, o aumento da resposta devido ao grupo $-\text{NO}_2$ é mais significativo e pode ser usado para a detecção de Paration.

Estudos da dependência dos sinais amperométricos com o volume da alíquota da amostra (alça de amostragem) foram também realizados. Os resultados da detecção AMP de uma solução de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Paration em função da alça de amostragem estão apresentados nos amperogramas da Figura 13.

Observa-se pela Figura 13 que as alturas de ambos sinais amperométricos, em $-0,5 \text{ V}$ e em $+0,4 \text{ V}$, aumentam para alíquotas de até $300 \text{ }\mu\text{L}$. Após este volume, ambos sinais amperométricos mantêm-se constantes. Esse fato ocorre devido ao efeito de dispersão da amostra, do ponto de injeção até o detector eletroquímico. Quanto menor o volume da alíquota, menor a magnitude do sinal amperométrico porque a dispersão da amostra estende-se por toda a zona da mesma. Assim, as melhores condições foram: alça de amostragem de $300 \text{ }\mu\text{L}$ e vazão da solução de eletrólito suporte de $1,4 \text{ mL L}^{-1}$.

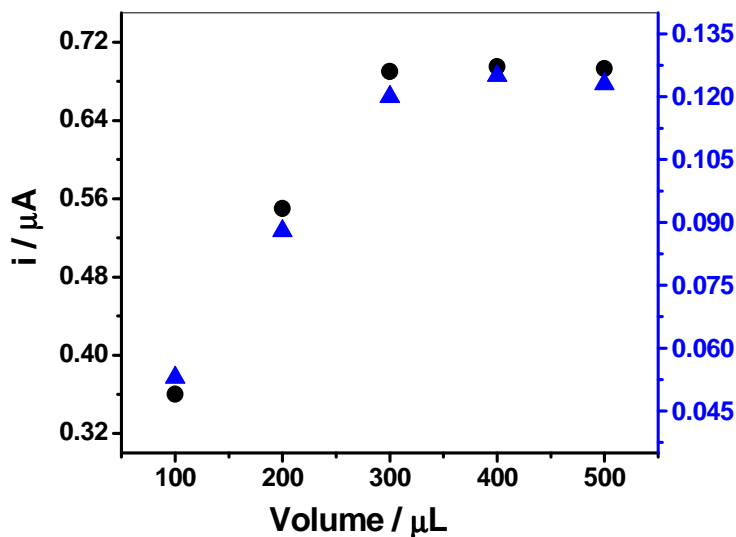


Figura 13: Altura em módulo dos sinais amperométricos em função do volume da alíquota da amostra injetada no sistema FIA, correspondentes aos pulsos de potenciais aplicados, durante 100 ms, na seqüência: (●) -0,5 V, para a redução de RNO_2 , a RNHOH , (▲) + 0,4 V, para a oxidação de RNHOH a RNO e em -0,1 V, para a redução de RNO (não apresentado). Vazão = $1,4 \text{ mL min}^{-1}$. Solução de Paration = $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. O eixo da ordenada a direita corresponde aos pontos da legenda: (▲).

3.5.3 - Investigação do tempo de aplicação dos pulsos de E sobre o sinal amperométrico

A corrente amperométrica monitorada durante a aplicação de um pulso de E é governada por dois componentes de corrente: corrente capacitiva, I_C (envolvida no carregamento da dupla camada elétrica quando um pulso de E é aplicado) e corrente faradaica, I_F (devido ao processo eletroquímico no eletrodo) [100]. A participação de I_F na corrente amperométrica depende da presença de espécies eletroativas que podem ser oxidadas ou reduzidas no eletrodo, sob o pulso de E aplicado. Assim, numa análise que envolve a detecção amperométrica em fluxo, quando apenas o eletrólito está passando

através da célula eletroquímica, a magnitude de I_F dependerá da concentração de impurezas eletroativas (em geral bem baixa) que se encontram presentes na solução do eletrólito. Por outro lado, quando a zona da amostra passa através da célula eletroquímica, a magnitude de I_F será governada pela quantidade de analito que alcança a superfície do sensor amperométrico, uma vez que, no pulso de E aplicado, a taxa de transferência de carga entre o eletrodo e o analito é máxima. A dependência de I_F e de I_C com o tempo de aplicação do pulso é diferente. A componente I_C é alta no início da aplicação do pulso de E, mas diminui rapidamente com o tempo da aplicação do pulso ($I_C \propto e^{-t}$). Para uma solução que contém um analito eletroativo, a dependência da componente I_F com o tempo de aplicação do pulso depende das condições do transporte de massa do analito. Sob condições estacionárias, I_F diminui menos rapidamente que I_C com o tempo de aplicação do pulso ($I_F \propto t^{-1/2}$). Sob condições de fluxo contínuo, I_F mantém-se constante se a quantidade de analito que alcança a superfície do eletrodo for mantida constante. Assim, se a vazão da solução do eletrólito suporte contendo a alíquota da amostra é mantida constante, a taxa do transporte de massa será constante e, por conseqüência, a magnitude de I_F dependerá somente da concentração do analito na zona da amostra que alcança o eletrodo.

Considerando-se a dependência de I_F e de I_C com o tempo de aplicação do pulso, tem-se que, quanto maior o tempo de aplicação do pulso de E, menor será a contribuição de I_C para a corrente amperométrica monitorada. Entretanto, deve-se ressaltar que, apesar da contribuição de I_C ser maior quando pulsos de E são aplicados por curtos períodos de tempo, esta contribuição não afetará o sinal amperométrico de interesse, pois, a corrente amperométrica está sendo medida continuamente, antes, durante e após a passagem da zona da amostra. Dessa forma, a contribuição de I_C será a mesma antes, durante e após a passagem da zona da amostra, que contém o analito de interesse. Por conseqüência, durante a passagem da zona da amostra, monitora-se somente a contribuição de I_F (devido ao analito) para o sinal amperométrico. Como I_F depende somente da concentração do analito no fluído de solução que passa através do eletrodo, o tempo de aplicação do pulso de E governará a quantidade de analito que sofrerá reação no eletrodo. Baseado neste fato investigou-se a dependência do sinal amperométrico para Paration com o tempo de aplicação do pulso para a redução do grupo $-RNO_2$ a $-RNHOH$. O sinal amperométrico correspondente à quantidade de $-RNHOH$ produzido nesta reação foi também monitorado.

Na Figura 14 encontra-se a altura dos picos amperométricos obtidos de alíquotas da solução de Paration $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ em função do tempo de aplicação do pulso de potencial de $-0,5 \text{ V}$, para reduzir o grupo $-\text{RNO}_2$ a $-\text{RNHOH}$.

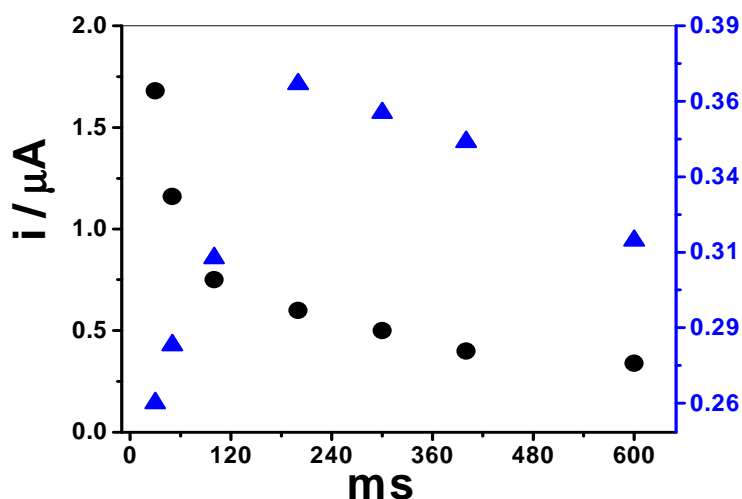


Figura 14: Altura em módulo dos sinais amperométricos obtidos da injeção de $300 \mu\text{L}$ de solução Paration $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ em dois potenciais de pulso: (●) $-0,5 \text{ V}$, aplicado durante períodos de tempo variados, para a redução de RNO_2 a RNHOH e (▲) $+0,4 \text{ V}$, aplicado durante 100 ms , para a oxidação de RNHOH . Eletrólito suporte: ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Vazão = $1,4 \text{ mL min}^{-1}$. O eixo da ordenada a direita corresponde aos pontos da legenda: (▲).

Observa-se pela Figura 14 que, quanto menor o tempo de aplicação do pulso de potencial, maior é o sinal amperométrico da redução do grupo $-\text{RNO}_2$. Este sinal cai rapidamente com o aumento do tempo de aplicação do pulso até $100\text{-}120 \text{ ms}$, a partir do qual diminui mais lentamente. O acentuado decréscimo pode ser explicado considerando-se que, durante a aplicação do pulso de $-0,5 \text{ V}$ por tempos muito curtos, tem-se a redução de moléculas de Paration que se encontram próximas da superfície do eletrodo. Assim, a corrente amperométrica tem valor alto, pois a quantidade de moléculas Paration que se encontram na superfície do eletrodo no momento da medida da corrente é alta. À medida

que o pulso de E é aplicado durante um período de tempo maior, uma maior quantidade de moléculas Paration é rapidamente reduzida, levando ao esgotamento das mesmas nas proximidades do eletrodo e, por conseqüência, à diminuição da corrente amperométrica. Com o aumento do tempo de aplicação do pulso para valores suficientemente elevados (~ 400 ms), tem-se o esgotamento completo de moléculas Paration na superfície do eletrodo. A partir deste tempo, a corrente amperométrica é governada pela taxa de transporte de moléculas de Paration para a superfície do eletrodo que, neste caso, depende da concentração de Paration na solução amostra e da vazão com que a zona da amostra é introduzida na célula eletroquímica.

A altura do pico correspondente à oxidação de RNHOH que foi produzida durante a aplicação do pulso de -0,5 V também está apresentada na Figura 14. Este sinal amperométrico foi monitorado em +0,4 V, aplicado durante períodos de 100 ms. Verifica-se que a intensidade do sinal em +0,4 V sofre grande influência do tempo de aplicação do pulso de -0,5 V, usado para reduzir o grupo nitro. Quando este potencial é aplicado durante períodos de tempo muito curtos (30 ms), o sinal amperométrico devido à oxidação de RNHOH é significativamente baixo. Este sinal amperométrico aumenta rapidamente até 180 ms, a partir do qual começa a diminuir. Estes resultados podem ser explicados considerando-se que a magnitude do sinal amperométrico monitorado em +0,4 V depende da quantidade de RNHOH formada em -0,5 V, que por sua vez depende do tempo t_1 de aplicação deste pulso, e do tempo t_2 de aplicação do pulso de +0,4 V. O tempo t_2 governa a quantidade de moléculas RNHOH que é oxidada, bem como a intensidade do sinal amperométrico que é monitorado, pois a corrente é medida somente no final da aplicação do pulso de +0,4 V. Assim, dependendo da quantidade de RNHOH que é formada em -0,5 V, se t_2 for suficientemente grande, pouco RNHOH será monitorado no final da aplicação do pulso de +0,4 V. Além deste fato, o sinal amperométrico de RNHOH depende também da taxa de difusão das moléculas de RNHOH, da superfície do eletrodo para regiões mais afastadas, que é favorecida pelas condições hidrodinâmicas existentes durante a medida.

A Figura 15 mostra a altura dos sinais amperométricos correspondentes à oxidação de RNHOH em função do tempo de aplicação do pulso de +0,4 V. Neste caso, o tempo de aplicação do pulso de -0,5 V (para a redução de RNO_2) foi mantido fixo em 30 ms. Observa-se na Figura 15 que a aplicação de +0,4 V durante 30 ms fornece o máximo sinal

amperométrico. Este sinal diminui rapidamente à medida que aumenta o tempo de aplicação do pulso de E até 400 ms, quando um sinal de estado estacionário é alcançado.

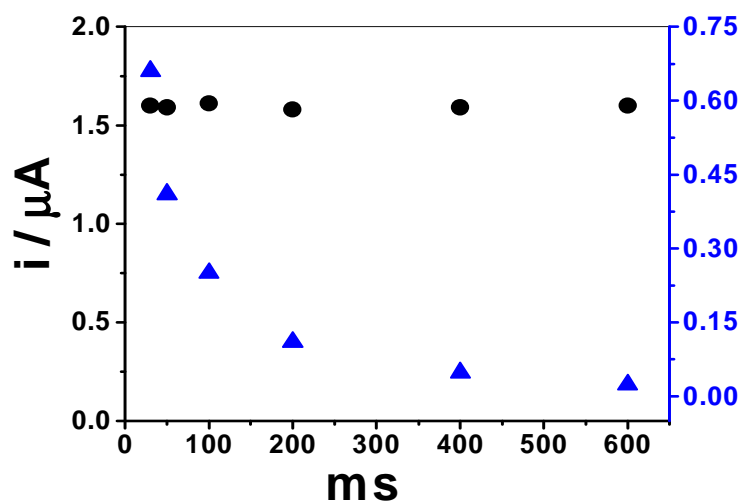


Figura 15: Altura em módulo dos sinais amperométricos correspondentes à (●) redução de RNO_2 em $-0,5\text{ V}$, durante 30 ms e (▲) oxidação de RNHOH em $+0,4\text{ V}$, em função do tempo de aplicação do pulso. Solução de Paration $2,0\text{ mg L}^{-1}$. Volume injetado: $300\ \mu\text{L}$. Eletrólito suporte: ácido cítrico $0,1\text{ mol L}^{-1}$. O eixo da ordenada a direita corresponde aos pontos da legenda: (▲).

Os resultados da Figura 15 confirmam que o monitoramento de RNHOH (formado em $-0,5\text{ V}$) deve ser feito com a aplicação de pulsos de $+0,4\text{ V}$ durante tempos tão curtos quanto 30 ms, quando a quantidade de Paration na superfície do eletrodo encontra-se ainda elevada. Tempos menores do que 30 ms não foram estudados devido à limitação pelo equipamento. A diminuição do sinal amperométrico com o aumento do tempo de aplicação do pulso pode ser também explicado com base no esgotamento de RNHOH da superfície do eletrodo. A Figura 15 mostra ainda que a magnitude do sinal para a redução de RNO_2 em $-0,5\text{ V}$ mantém-se praticamente constante, indicando que quantidade de moléculas Paration na região próxima da superfície do eletrodo (camada de difusão) é renovada antes de cada

pulso aplicado. Estes resultados indicam que as condições hidrodinâmicas foram mantidas constantes durante a realização do estudo. Esse fato comprova também que o volume de amostra injetada (300 μL) produz sinais amperométricos estáveis em ambos os potenciais, -0,5 V e +0,4 V.

Estudos da dependência da intensidade do sinal amperométrico em -0,1 V, devido à redução de RNO (gerado da oxidação de RNHOH em +0,4 V), com o tempo de aplicação do pulso também demonstraram que a aplicação de pulsos durante 30 ms fornece o maior sinal amperométrico. A Figura 16 mostra os amperogramas obtidos com a aplicação de três pulsos de potenciais, na seqüência, -0,5 V; +0,4 V; -0,1 V, durante 30 ms.

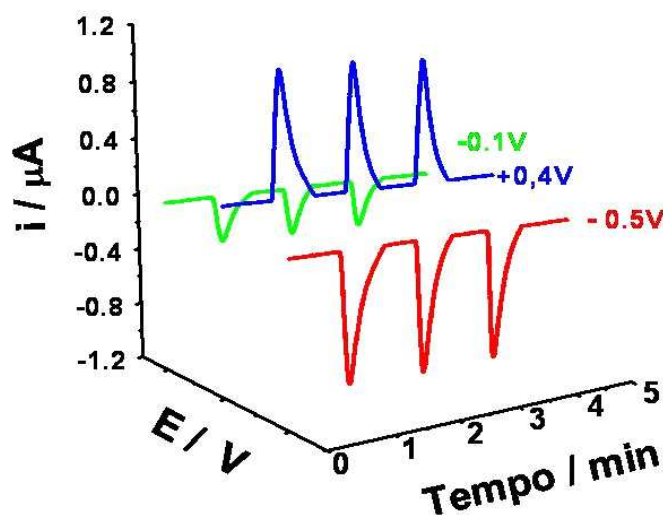


Figura 16: Amperogramas de alíquotas de 300 μL de Paration 2,0 mg L⁻¹ sobre ECV em 3 pulsos de potenciais aplicados, durante 30 ms, na seqüência: (—) -0,5 V; (—) +0,4 V; (—) -0,1 V. Vazão de 1,4 mL min⁻¹. Eletrólito suporte: ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹.

3.5.4 - Comparação das técnicas amperométricas, AMP e APD, em sistema de análise FIA, para a detecção de Paration

Na Figura 17 encontram-se os sinais amperométricos obtidos com as técnicas, amperometria de múltiplos pulsos e amperometria de pulso diferencial. Nesta última

técnica, um sinal amperométrico diferencial (ΔI) foi monitorado, a partir dos sinais amperométricos obtidos com pulsos de $-0,5$ e $+0,4$ V, dado por:

$$\Delta I = I_{-0,5 \text{ V}} - I_{+0,4 \text{ V}}$$

onde, $I_{-0,5 \text{ V}} - I_{+0,4 \text{ V}}$ são os sinais amperométricos devido à redução de RNO_2 e da oxidação de RNHOH , respectivamente. Como $I_{+0,4 \text{ V}}$ tem sinal contrário ao de $I_{-0,5 \text{ V}}$, o valor de ΔI corresponde à soma destes sinais, levando, por consequência a um sinal maior.

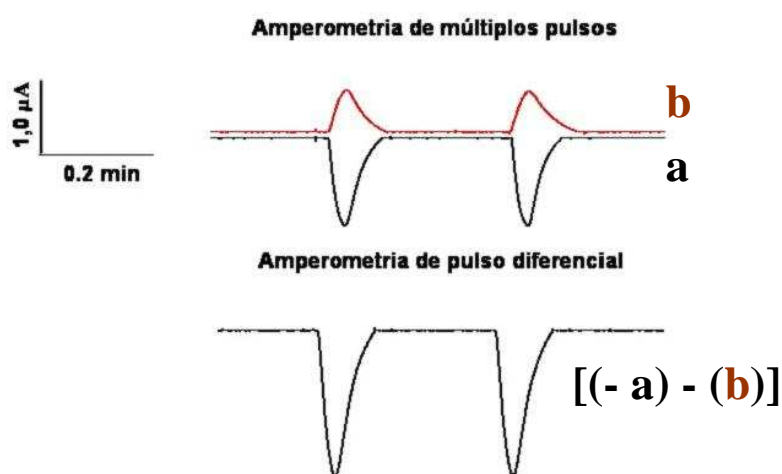


Figura 17: Amperogramas obtidos de alíquotas de $300 \mu\text{L}$ de solução de Paration $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, usando a ; detecção amperométrica com pulsos de E aplicados, durante 30 ms, na seqüência: (—) $-0,5 \text{ V}$, (—) $+0,4 \text{ V}$ e detecção amperométrica de pulso diferencial ($\Delta I = I_{-0,5 \text{ V}} - I_{+0,4 \text{ V}}$). Vazão = $1,4 \text{ mL min}^{-1}$.

A Figura 17 mostra que os sinais amperométricos obtidos na detecção amperometria de pulso diferencial (APD) são bem maiores. Entretanto, a detecção APD apresenta um ruído na linha de base bem superior ao da detecção de múltiplos pulsos, levando a uma maior relação sinal/ruído e, por consequência, a um maior limite de detecção. O ruído na linha de base em técnicas pulsadas é uma desvantagem comumente apresentada em vários sistemas, devido à mudança brusca no valor do pulso de potencial aplicado ao eletrodo.

Assim, a corrente residual obtida na detecção APD corresponderá a um sinal maior (ΔI_R) do que os encontrados na detecção AMP e amperometria a potencial constante porque ΔI_R vem dado pela soma das correntes residuais observadas em -0,5 V e +0,4 V.

Investigações da repetibilidade dos sinais amperométricos obtidos para Paration usando a detecção AMP, nas condições definidas previamente, foram realizados. A Figura 18 indica que a técnica AMP oferece uma boa repetibilidade para os sinais amperométricos monitorados. O desvio padrão relativo para os sinais obtidos em -0,5 V foi de 1,5 % ; de 2,0 % para os sinais obtidos em +0,4 V e de 1,4 % para os sinais obtidos em -0,1 V. Além da boa repetibilidade dos sinais, a técnica AMP oferece também vantagens como seletividade e sensibilidade quando usada no modo gerador-coletor. Este modo de detecção aumenta a seletividade da técnica AMP porque possibilita diferenciar o sinal de analitos do sinal de interferentes eletroativos por meio da aplicação de pulsos de E adequadamente escolhidos para monitorar os produtos eletroativos formados nas reações de eletrodo destes analitos.

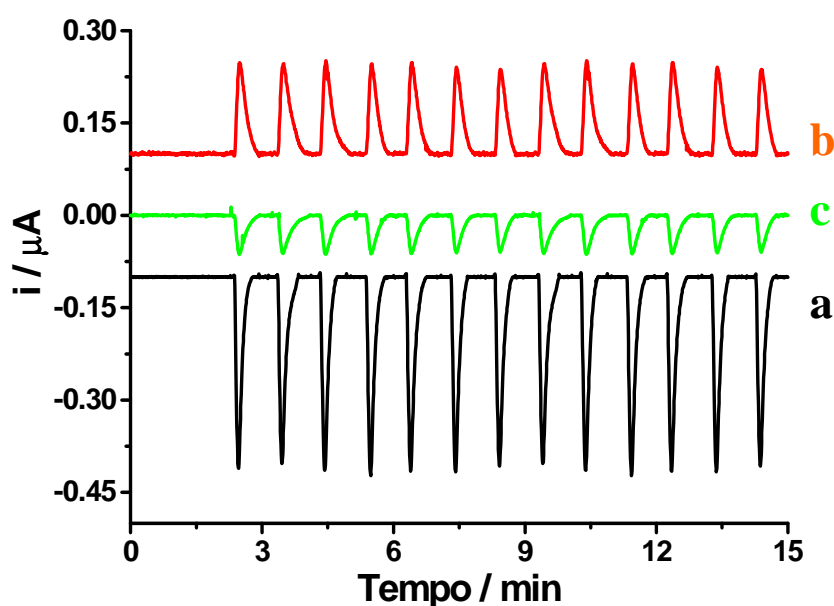


Figura 18: Amperogramas de alíquotas de 300 μL de solução de Paration 200 $\mu g L^{-1}$ obtidos da aplicação de 03 pulsos de potenciais, durante 30 ms, na seqüência: **a** (—) - 0,5 V, **b** (—) +0,4 V e **c** (—) -0.1 V. Vazão = 1,4 $mL min^{-1}$. Eletrólito suporte: ácido cítrico 0,1 $mol L^{-1}$.

Os sinais amperométricos obtidos pela técnica AMP nas mesmas condições experimentais estão, apresentados na Figura 19. Nesta Figura também é mostrado o sinal obtido da somatória em modulo dos sinais amperométrico monitorados em $-0,5$ V, $+0,4$ V e $-0,1$ V, usando o software gráfico.

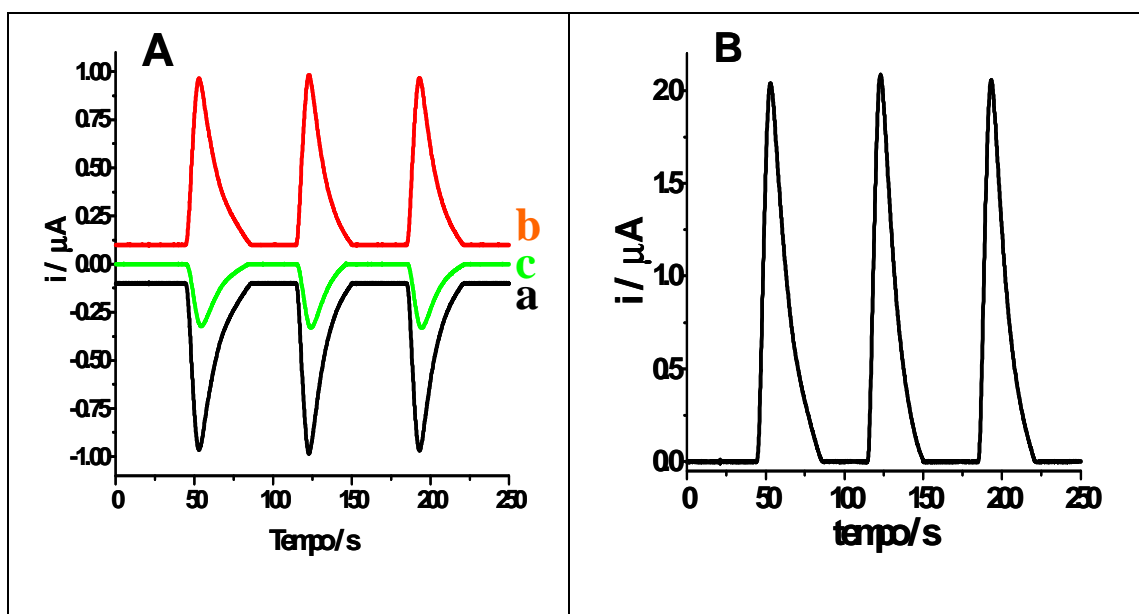


Figura 19: A) Amperogramas de alíquotas de $300 \mu\text{L}$ de solução de Paration $200 \mu\text{g L}^{-1}$ obtidos da aplicação de 03 pulsos de potenciais, durante 30 ms, na seqüência: **a** (—) - $0,5$ V, **b** (—) $+0,4$ V e **c** (—) $-0,1$ V. Vazão = $1,4 \text{ mL min}^{-1}$. Eletrólito suporte: ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. B) Sinal obtido da somatória em modulo dos sinais amperométrico.

Observa-se pela Figura 19 B que a soma dos sinais é maior do que o dobro do sinal de redução em $-0,5$ V mostrado na Figura 19 A, possibilitando à técnica AMP um limite de detecção menor (menos da metade) que o obtido pela técnica amperométrica a potencial constante, pois esta última monitora somente o sinal amperométrico devido à redução do grupo nitro.

3.6 – Parâmetros analíticos e recuperação do sinal amperométrico de Paration, fortificado em amostras aquosas.

Investigações da resposta do detector nos pulsos de E aplicados de -0,5V, +0,4 V e -0,1 V, durante 30 ms, nas condições experimentais otimizadas (Figura 18), foram realizadas em função da concentração de Paration. A Figura 20 mostra o respectivo fiograma obtido.

A partir dos respectivos sinais amperométricos obtidos da Figura 20 foram obtidas as curvas de calibração apresentadas na Figura 21. Estas curvas apresentaram boa linearidade ($R = 0,99$) para todos os potenciais aplicados. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram obtidos em cada potencial aplicado, conforme descrito na Parte Experimental. Os valores de LD e LQ encontram-se na Tabela 4.

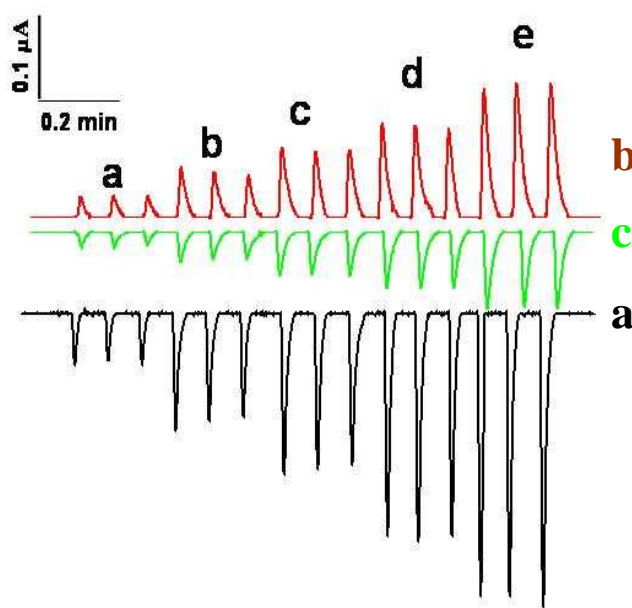


Figura 20: Fiograma de soluções de Paration nas seguintes concentrações: a) 50, b) 100, c) 150, d) 200 e) 250 $\mu\text{g L}^{-1}$. Condições experimentais da Figura 18.

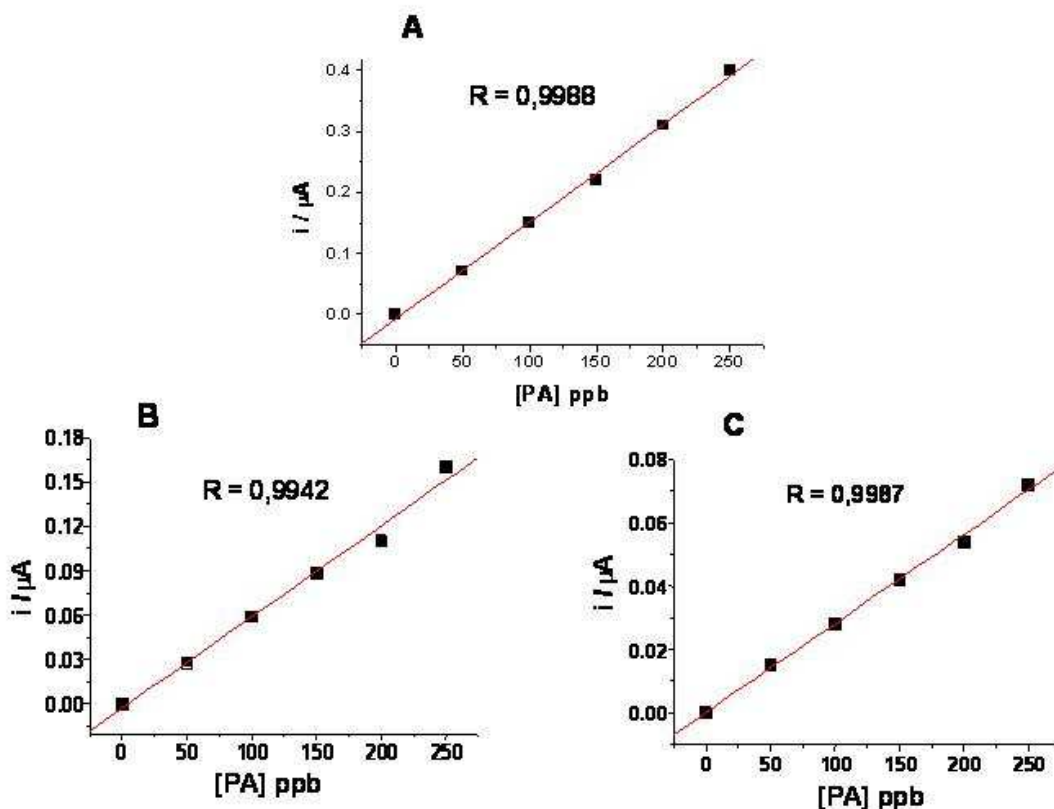


Figura 21: Curvas de Calibração obtidas para Paration. **A)** em $-0,5\text{V}$, envolvendo a redução de RNO_2 ; **B)** em $+0,4\text{ V}$, envolvendo a oxidação de RNHOH e **C)** em $-0,1\text{ V}$, envolvendo a redução de RNO .

Observa-se pelas curvas de calibração da Figura 21 que uma relação linear na faixa de concentração de 50 a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Paration foi obtida para todas as curvas. A soma, em módulo, dos sinais amperométricos obtidos nos três processos proporciona um aumento na sensibilidade da detecção de Paration, pois a inclinação da reta torna-se maior. Neste sentido, investigações foram realizadas com a finalidade de se avaliar o ganho de sensibilidade deste modo de detecção. A Figura 22 mostra os sinais amperométricos obtidos para soluções de Paration na faixa de concentração de 10 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para uma amostra de água de rio (Rio Uberabinha) fortificada com 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Paration. Na Figura 23 está apresentada a respectiva curva de calibração. Os limites de detecção e quantificação para esse procedimento estão apresentados na Tabela 4.

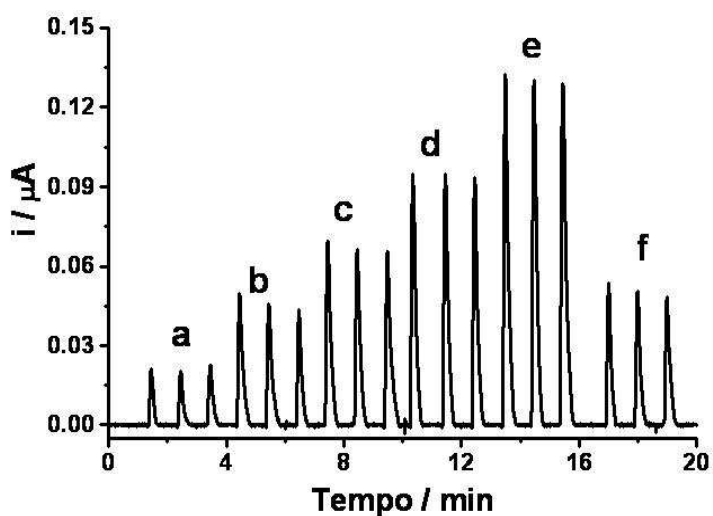


Figura 22: Diagrama de soluções de Paration nas seguintes concentrações: a) 10 b) 20 c) 30 d) 40, e) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e f) amostra fortificada com 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Paration. Condições experimentais da Figura 18. Os sinais amperométricos correspondem à soma dos sinais (em módulo) amperométricos obtidos em -0,5 V, +0,4 V e -0,1 V.

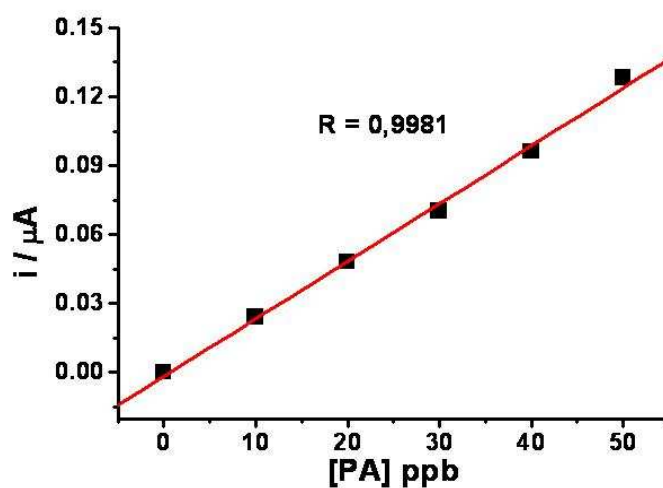


Figura 23: Curva de Calibração obtida do diagrama apresentado na Figura 22.

Verifica-se pela Figura 23 que uma relação linear na faixa de concentração de 10 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Paration foi obtida. A partir desta curva calculou-se a % de recuperação do sinal amperométrico do Paration numa amostra de rio fortificada com 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ desse pesticida. Uma recuperação de 102% foi encontrada, com desvio padrão de 1,7%. Estes resultados indicam que a Σ dos sinais amperométricos, em módulo, (Σ | sinais amperométricos |) pode ser utilizada para aumentar a sensibilidade da técnica AMP, possibilitando a determinação de Paration e de seus derivados em águas Classe 3, segundo a Resolução CONAMA 357/05.

Tabela 4. Limites de detecção e de quantificação na determinação de Paration obtidos em função do pulso de E aplicado.

Pulso de E aplicado, V (grupo funcional envolvido)	Limite de Detecção (LD), $\mu\text{g L}^{-1}$	Limite de quantificação (LQ), $\mu\text{g L}^{-1}$
-0,5 (-NO ₂)	0.28	0.95
+0,4 (-NHOH)	0.70	2.34
-0,1 (-NO)	1.61	5.36
Σ sinais amperométricos	0.14	0.46

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a metodologia baseada na detecção AMP, em sistema FIA, pode ser usada na determinação de nitrofosforados totais em águas destinadas ao abastecimento público, sem a necessidade de etapas prévias exigidas pelos métodos cromatográficos.

CAPÍTULO 4:
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

4.1 – Conclusões

A pressão gerada por uma coluna de água em combinação com um mini-compressor de ar mostrou-se eficiente no controle da vazão de sistemas de análise em fluxo, com detecção voltamétrica. Além da simplicidade e do custo reduzido, o sistema gera uma vazão livre de pulsações e com grande estabilidade, mesmo após longos períodos de uso. Estudos realizados com a técnica de voltametria cíclica hidrodinâmica demonstraram que a vazão gerada pelo sistema proposto apresenta nível de ruído 60 vezes menor do que a apresentada por uma bomba peristáltica (Gilson), possibilitando dessa forma uma elevada repetibilidade da detecção amperométrica de múltiplos pulsos em análise por injeção em fluxo.

Apesar de alguns estudos terem sido realizados utilizando-se uma coluna de água de até 150 cm de altura, que podem gerar vazões de até $14,0 \text{ mL min}^{-1}$, boa parte dos estudos ou análises em fluxo são realizados sob vazões em torno de $1,0$ ou $2,0 \text{ mL min}^{-1}$, facilmente alcançadas por meio de uma coluna de água gerada numa proveta de 1 litro.

As investigações realizadas neste trabalho mostraram que a detecção de Paration pode ser feita por três processos eletroquímicos: redução de RNO_2 a RNHOH , oxidação de RNHOH a RNO e redução de RNO . Os resultados indicaram que a técnica amperométrica de múltiplos pulsos oferece uma boa reprodutibilidade dos resultados, seletividade e sensibilidade, possibilitando ainda aumentar a sensibilidade através da somatória dos sinais amperométricos obtidos nos pulsos de E aplicados. Estudos de recuperação obtidos de amostras de água de rio fortificadas com $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Paration mostraram que a técnica amperométrica de pulso em sistema FIA pode ser usada para a determinação de outros compostos nitrofosforados totais em água.

Os estudos investigados neste trabalho demonstraram que a metodologia proposta não necessita de etapas de pré-concentração e separação do analito dos extratos das amostras, normalmente necessárias em grande parte dos métodos utilizados para a determinação de vários pesticidas organofosforados. Assim sendo, uma metodologia simples, de baixo custo e rápida para a determinação de nitrofosforados totais em amostras de água foi desenvolvida.

4.2 – Propostas de continuidade

A validação da metodologia para determinação de Paration, bem como de nitrofosforados totais em amostras aquosas, será realizada utilizando-se a técnica CLAE com detecção UV.

Considerando-se, que o sistema de detecção proposto não permite a discriminação dos nitrofosforados presentes nos extratos das amostras reais, pretende-se investigar o uso da célula eletroquímica acoplada à CLAE, para determinar nitrofosforados eluídos da coluna cromatográfica empregando-se a detecção AMP, no modo gerador-coletor. A alta seletividade e sensibilidade da detecção AMP simplifica os procedimentos prévios de tratamento da amostra, exigidos pela técnica cromatográfica.

Outros pesticidas organofosforados que possuem grupos eletroativos diferentes, como o Diazinon que contem o grupo azo (-N=N-) eletroativo, poderão ser investigados pela técnica AMP, possibilitando desenvolver metodologia de determinação simultânea de pesticidas sem a utilização de métodos cromatográficos.

CAPÍTULO 5:
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Peres, F.; Rosemberg, B. Alves, R. S.; Moreira, C. J.; Silva, O. J. J.; *Pesticide use reporting in a rural area of Rio de Janeiro state, Brazil, Saúde Pública*, **2001**, 35, 6-14
- 2 - *Relatório da ONU sobre o Desenvolvimento Mundial da Água: Água para os Povos, Água para Vida*. Um resumo executivo (36 páginas) está disponível em sete línguas: http://www.unesco.org/water/wwap/wwdr/ex_summary, **2003**, acesso em 10/09/2006.
- 3 - Holand, P. T.; *Glossary of Terms Relating to Pesticides, Pure Applied Chemistry*, **1996**, 68, 1167-1193.
- 4 - Galli, A.; Souza, D.; Garbellini, G. S.; Coutinho, C. F.B.; Mazo, L. H.; Avaca L. A.; Machado, S. A. S.; *Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos, Química. Nova*, **2006**, 29, 105-112
- 5 - Coutinho, C. F. B.; Tanimoto, S. T.; Galli, A.; Garbellini, G. S.; Takayama, M.; Amaral, R. B.; Mazo, L.H.; Avaca, L. A.; Machado, S. A. S.; *Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez, Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, **2005**, 15, 64-72..
- 6 - Boletim publicado pela *World Health Organization*, Geneva, **1985**, 63: 11–26.
- 7 - BAIRD, C.; *Química Ambiental*, 2^a ed. Porto Alegre, Bookman, **2002**, 622.
- 8 - *Vigilância Epidemiológica de Doenças e Agravos Específicos*, in *Guia de Vigilância Epidemiológica. Capítulo 5. Disponível em <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/GVE/GVE0515G.htm>*, acesso em 10/01/2006.
- 9 - Barceló, D. ; Porte, C.; Cid, J.; Aibaigés, J. *Determination of organophosphorus compounds in mediterranean coastal waters and biota samples using gas-chromatography with nitrogen-phosphorus and chemical ionization mass-spectrometric detection, International Journal of Environmental Analytical Chemistry*,**1990**, 38, 199-209.
- 10 - Kandell, E. R.; Schwartz, J.H.; Jessel, T. M.; *Fundamentos da Neurociência e do Comportamento*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, **2000**.

- 11 - Vanloon, G. W.; Duffy, J. *Environmental Chemistry. A global Perspective*. Oxford, University Press, **2001**.
- 12 - **Resolução Conama N° 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Publicado no publicada no Diário Oficial da União de 18/03/2005, Seção 1, páginas 58 a 63, disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res357/res35705.html>, acesso em 20/09/2006.
- 13 - **Resolução Conama N° 20, de 18 de junho de 1986**. Classifica as águas doces, salobras e salinas essencial à defesa de seus níveis de qualidade, avaliados por parâmetros e indicadores específicos, de modo a assegurar seus usos preponderantes. Publicado no DOU de 30/07/86, disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html>, acesso em 20/06/2005.
- 14 - De Paoli, M.; Barbina, M. T.; Damiano, V.; Fabbro, D.; Bruno, R.; *Simplified determination of combined residues of prochloraz and its metabolites in vegetable, fruit and wheat samples by gas chromatography*, *Journal of Chromatography A*, **1997**, 765, 127–131.
- 15 - Dulaurenta, S.; Saint-Marcoux, F.; Marqueta, P.; Lachâtre, G.; *Simultaneous determination of six dialkylphosphates in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry*, *Journal of Chromatography B*, **2006**, 831, 223–229.
- 16 - Ballesteros, E.; Parrado, M. J.; *Continuous solid-phase extraction and gas chromatographic determination of organophosphorus pesticides in natural and drinking waters*, *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1029, 267-273.
- 17 - You J.; Lydy M. J.; *Determination of pyrethroid, organophosphate and organochlorine pesticides in water by headspace solid-phase microextraction*, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **2006**, 86, 381-389
- 18 - Jiménez, J.J.; Bernal, J.L.; Del Nozal, M.J.; Rivera, J.M.; *Determination of pesticide residues in waters from small loughs by solid-phase extraction and combined use of*

- gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection and high-performance liquid chromatography with diode array detection, Journal of Chromatography A, 1997, 778, 289-300.*
- 19 - Longobardi, F.; Solfrizzo, M.; Compagnone, D.; Del Carlo M.; Visconti, A.; *Use of Electrochemical Biosensor and Gas Chromatography for Determination of Dichlorvos in Wheat, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53, 9389-9394.*
- 20 - Jones, A.; McCoy C.; *Supercritical Fluid Extraction of Organophosphate and Carbamate Insecticides in Honeybees. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45, 2143-2147.*
- 21 - De Souza, D.; Codognoto, L.; Malagutti, A. R.; Toledo, R. A.; Pedrosa, V. A.; Oliveira, R. T. S.; Mazo, L. H.; Avaca, L. A.; Machado, S. A. S.; *Square Wave Voltammetry. Second Part: Applications, Química Nova, 2004, 27, 790.*
- 22 - Massaroppi, M. R. C.; Machado, S. A. S.; *Electroanalytical determination of the herbicide picloram in natural waters by square wave voltammeter, Journal of Brazilian Chemical Society, 2003, 14, 113-119.*
- 23 - Tsai, Y. C.; Coles, B. A.; Houte, K.; Foord, J. S.; Marken, F.; Compton, R.G.; *Microwave-Enhanced Anodic Stripping Detection of Lead in a River Sediment Sample. A Mercury-Free Procedure Employing a Boron-Doped Diamond Electrode, Electroanalysis, 2001, 13, 831-835.*
- 24 - Oskan, S. A.; Uslu, B.; *Electrochemical study of fluvastatin sodium - analytical application to pharmaceutical dosage forms, human serum, and simulated gastric juice, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002, 372, 582-586.*
- 25 - Ni Y.; Qiu P.; Kokot S.; *Simultaneous determination of three organophosphorus pesticides by differential pulse stripping voltammetry and chemometrics, Analytica Chimica Acta, 2004, 516, 7-17*

- 26 - Yilmaz, S.; Uslu, B.; Oscan, S. A.; *Anodic oxidation of etodolac and its square wave and differential pulse voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum*, *Talanta*, **2001**, 54, 351-360.
- 27 - Liu, G.; Lin, Y.; *Electrochemical stripping analysis of organophosphate pesticides and nerve agents*, *Electrochemistry Communications*, **2005**, 7, 339-343.
- 28 - Liu, G.; Lin, Y.; *Electrochemical Sensor for Organophosphate Pesticides and Nerve Agents Using Zirconia Nanoparticles as Selective Sorbents*, *Analytical Chemistry*, **2005**, 77, 5894-5901.
- 29 - Zen, J. M.; Jou, J. J.; Kumar, A. S.; *A sensitive voltametric method for the determination of parathion insecticide*, *Analytica Chimica Acta*, **1999**, 396, 39-44.
- 30 - Pedrosa, V.A.; Miwa, D.; Machado, S.A.S.; Avaca, L.A.; *On the utilization of boron doped diamond electrode as a sensor for Parathion and as an anode for electrochemical combustion of Parathion*, *Electroanalysis*, **2006**, 18, 1590-1597.
- 31 - Pedrero, M.; Galvez, R.; Rodriguez, E.; Manuel de Villena, F. J.; Pingarrón, J. M.; *Determination of the herbicide desmetryne in organised media by adsorptive stripping voltammetry*, *Talanta*, **2001**, 53, 991-999.
- 32 - Pogacnik, L.; Franko, M.; *Determination of organophosphate and carbamate pesticides in spiked samples of tap water and fruit juices by a biosensor with photothermal detection*, *Biosensors and Bioelectronics*, **1999**, 14, 569-578.
- 33 - Kolosova, A. Y.; Park, J. H.; Eremin, S. A.; Park, S. J.; Kang, S. J.; Shim, W. B.; Lee, H. S.; Lee, Y. T.; Chung, D. H.; *Comparative study of three immunoassays based on monoclonal antibodies for detection of the pesticide parathion-methyl in real samples*, *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 511, 323-331
- 34 - Zou, M. Q.; Yang, R.; Wang, D. N.; Li, J. F.; Jin, Q. H.; *A novel immobilized cholinesterase for on-site screening of organophosphate and carbamate compounds*, *Pesticide Biochemistry And Physiology*, **2006**, 86, 162-166.

- 35 - Blasco, C.; Font, G.; Manes, J.; Pico, Y.; *Screening and evaluation of fruit samples for four pesticide residues*, *Journal of AOAC International*, **2005**, 88, 847-853.
- 36 - Prieto-Simon, B.; Campas, M.; Andreescu, S.; Marty, J. L.; *Trends in flow-based biosensing systems for pesticide assessment*, *Sensors*, **2006**, 6, 1161-1186.
- 37 - Guyton, A. C.; *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro, Interamericana Ltda, **1984**.
- 38 - Qiu, Y. N, P.; Kokot, S.; *Simultaneous determination of three organophosphorus pesticides by differential pulse stripping voltammetry and chemometrics*. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 516, 7–17.
- 39 - Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; *Part I. A new concept of fast continuous flow analysis*, *Analytica Chimica Acta*, **1975**, 78, 145-157.
- 40 - Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; *Flow injection analysis : Part X. theory, techniques and trends*, *Analytica Chimica Acta*, **1978**, 99, 37-76.
- 41 - Ruzicka, J.; Stewart, J. W. B.; *Flow injection analysis: Part II. Ultrafast determination of phosphorus in plant material by continuous flow spectrophotometry*, *Analytica Chimica Acta*, **1975**, 79, 79-91.
- 42 - Stewart, J. W. B.; Ruzicka, J.; Bergamin, H. F.; Zagatto, E.A.; *Flow injection analysis: Part III. Comparison of continuous flow spectrophotometry and potentiometry for the rapid determination of the total nitrogen content in plant digests*, *Analytica Chimica Acta*, **1976**, 81, 371-386.
- 43 - Ruzicka, J.; Stewart, J. W. B.; Zagatto, E.A.; *Flow injection analysis: Part IV. Stream sample splitting and its application to the continuous spectrophotometric determination of chloride in brackish waters*, *Analytica Chimica Acta*, **1976**, 81, 387-396.

- 44 - Ruzicka, J.; Stewart, J. W. B.; *Flow injection analysis: Part V. Simultaneous determination of nitrogen and phosphorus in acid digests of plant material with a single spectrophotometer*, *Analytica Chimica Acta*, **1976**, 82, 137-144.
- 45 - Hansen, E. H.; Ruzicka, J.; *Flow injection analysis: Part VI. The determination of phosphate and chloride in blood serum by dialysis and sample dilution*, *Analytica Chimica Acta*, **1976**, 87, 353-363.
- 46 - Ruzicka, J.; Stewart, J. W. B.; Zagatto, E.A.; *Flow injection analysis : Part VII. Use of ion-selective electrodes for rapid analysis of soil extracts and blood serum. Determination of potassium, sodium and nitrate*, *Analytica Chimica Acta*, **1977**, 88, 1-16.
- 47 - Hansen, E. H.; Ruzicka, J.; Rietz, B.; *Flow injection analysis : Part VIII. Determination of glucose in blood serum with glucose dehydrogenase*, *Analytica Chimica Acta*, **1977**, 89, 241-254.
- 48 - Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; Mosbaeck, H.; *Flow injection analysis : Part IX. A New Approach to Continuous Flow Titrations*, *Analytica Chimica Acta*, **1977**, 92, 235-239.
- 49 - Deandrade, J. C.; Pasquini, C.; Baccan, N.; Vanloon, J. C.; *Cold vapor atomic-absorption determination of mercury by flow-injection analysis using a teflon membrane phase separator coupled to the absorption cell*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, **1983**, 38, 1329-1338.
- 50 - Silva, M. M.; Krug, F. J.; Oliveira, P. V.; Nobrega, J. A.; Reis, B. F.; Pentead, D. A. G.; *Separation and preconcentration by flow injection coupled to tungsten coil electrothermal atomic absorption spectrometry*, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, **1996**, 51, 1925-1934.
- 51 - Zaitso, K.; Nakayama, M.; Ohkura, Y.; *Sensitive flow-injection determination of lactate in human blood with immobilized enzyme columns and fluorimetric detection*, *Analytica Chimica Acta*, **1987**, 201, 351-355.

- 52 - Zheng, X. W.; Zhang, Z. J.; *Flow-injection chemiluminescence determination of isoniazid using on-line electrogenerated BrO⁻ as oxidant*, *Analyst*, **1999**, 124,763-766.
- 53 - Michawski, J.; Marek, A. K.; Trojano W.; Szostek B. E.; Zagatto, A. G.; *Simultaneous determination of sucrose and reducing sugars using indirect flow-injection biamperometry*, *Analytica Chimica Acta*, **1993**, 271, 239-246.
- 54 - Twu, H. S.; Ling, T. R.; Chou, T. C.; Yang M. C.; *Ultrasonic irradiation effect in the impregnation-reduction process of preparing Pt/Nafion (R) NH₄⁺ sensor*, *Ultrasonics Sonochemistry*, **2001**, 8, 41-47.
- 55 - Matos, R. C.; Gutz, I. G. R.; Angnes, L.; Fontenele, R. S.; Pedrotti, J. J.; *A versatile and pulsation free pneumatic impeller for flow analysis systems*, *Química Nova* **2001**, 24, 795-798.
- 56 - Daniel, D.; Gutz, I. G. R.; *Microfluidic cells with interdigitated array gold electrodes: Fabrication and electrochemical characterization*, *Talanta*, **2005**, 68, 429-436.
- 57 - Daniel, D.; Gutz, I. G. R.; *Electronic micropipettor: A versatile fluid propulsion and injection device for micro-flow analysis*, *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 571, 218-227.
- 58 - Melchert, W. R.; Rocha, F. R. P.; *A green analytical procedure for flow-injection determination of nitrate in natural waters*, *Talanta*, **2005**, 65, 461-465.
- 59 - Rocha, F. R. P.; Nobrega, J. A.; Fatibello, O.; *Flow analysis strategies to greener analytical chemistry. An overview*, *Green Chemistry*, **2001**, 3, 216-220.
- 60 - Macpherson J. V.; Unwin, P. R.; *Radial flow microring electrode: Development and characterization* *Analytical Chemistry*, **1998**, 70, 2914-2921.
- 61 - Macpherson J. V.; Simjee, N.; Unwin, P. R.; *Hydrodynamic ultramicroelectrodes: kinetic and analytical applications*, *Electrochimica Acta*, **2001**, 47, 29-45
- 62 - Kubiak, W. W.; Strozik, M. M.; J. *Study of the flow dependence of microelectrode and semi-microelectrode voltammetric signals*, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1996**, 417, 95-103

- 63 - Chaniotakis, N. A.; Tsagatakis, J. K.; Moschou, E. A.; West, S. J.; Wen, X. W.; *Magnesium ion-selective electrode: optimization and flow injection analysis application*, *Analytica Chimica Acta*, **1997**, 356, 105-111.
- 64 - Albertus, F.; Horstkotte, B.; Cladera, A.; Cerda, V.; *A robust multisyringe system for process flow analysis - Part I. On-line dilution and single point titration of protolytes* *Analyst*, **1999**, 124, 1373-1381.
- 65 - Du, W. B.; Fang, Q.; He, Q. H.; Fang, Z. L.; *High-throughput nanoliter sample introduction microfluidic chip-based flow injection analysis system with gravity-driven flows*, *Analytical Chemistry*, **2005**, 77, 1330-1337.
- 66 - Cai, Z. X.; Chen, H. W.; Chen, B.; Huang, C. B.; *A gravity driven micro flow injection wetting film extraction system on a polycarbonate chip*, *Talanta*, **2006**, 68, 895-901.
- 67 - Vieira, J. A.; Raimundo, I. M.; Reis, B. F.; *Turbidimetric determination of sulphate employing gravity flow-based systems*, *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 438, 75-81.
- 68 - Matos, R. C.; Augelli, M. A.; Lago, C. L.; Angnes, L.; *Flow injection analysis- amperometric determination of ascorbic and uric acids in urine using arrays of gold microelectrodes modified by electrodeposition of palladium*, *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 404, 151-157.
- 69 - Azevedo, C. M.N.; Araki, K.; Toma, H. E.; Angnes, L.; *Determination of sulfur dioxide in wines by gas-diffusion flow injection analysis utilizing modified electrodes with electrostatically assembled films of tetra-ruthenated porphyrin*, *Analytica Chimica Acta*, **1999**, 387, 175-180.
- 70 - Daniel, D.; Gutz, L. G. R.; *Electronic micropipettor: A versatile fluid propulsion and injection device for micro-flow analysis*, *Analytica Chimica Acta* **2006**, 571, 218-227.
- 71 - Matos, R. C.; Coelho, E. O.; de Souza, C. F.; Guedes, F. A.; Matos, M. A.; *Peroxidase immobilized on Amberlite IRA-743 resin for on-line spectrophotometric detection of hydrogen peroxide in rainwater*, *Talanta* **2006**, 69, 1208-1214.

- 72 - Da Silva, I. S.; Richter, E.M.; do Lago, C. L.; Gutz, I. G. R.; Tanaka, A. A.; Angnes L.; *FIA-potentiometry in the sub-Nernstian response region for rapid and direct chloride assays in milk and in coconut water*, *Talanta* **2005**, 67, 651-657.
- 73 - De Oliveira, A. C. A.; Assis, V.C.; Matos, M. A. C.; Matos, R. C.; *Flow-injection system with glucose oxidase immobilized on a tubular reactor for determination of glucose in blood samples*, *Analytica Chimica Acta* **2005**, 535, 213-217.
- 74 - Richter, E. M.; Rocha, F. R. P.; Angnes, L.; *Multímetro interfaceado de baixo custo para aquisição de dados*, *Química Nova*, **2004**, 27, 313-314.
- 75 - Paixão, T. R. L. C.; Matos, R.C.; Bertotti, M.; *Development of a dual-band amperometric detector for determination of ascorbic acid and glucose*, *Electroanalysis*, **2003**, 15, 1884-1889.
- 76 - Richter, E. M.; de Jesus, D. P.; Neves, C. A.; do Lago, C. L.; Angnes, L.; *Aplicações eletroanalíticas com eletrodos de prata confeccionados a partir de CDs graváveis*, *Química Nova*, **2003**, 26, 839-843.
- 77 - Richter, E. M.; da Silva, J. A. F.; Neves, C. A.; Angnes, L.; do Lago, C. L.; Livro de Resumos da 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, Brasil, **2006**.
- 78 - Brett, A. M. O.; Brett, C. M. A.; *Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*, 1^a ed. Coimbra, Livraria Almedina, 1993, 338.
- 79 - Barroso, M. F.; Vaz, M. C. V. F.; Vaz, Sales, M.G.F.; Paíga, P.;Delerue, C. M.; *Electroanalytical Study of the Pesticide Ethiofencarb*, *Analytical Letters*, **2006**, 39, 2387-2403.
- 80 - Arribas A. S.; Bermejo E.; Chicharro M.; Zapardiel A.; Luque G. L.; Ferreyra N. F.; Rivas G. A.; *Analytical applications of a carbon nanotubes composite modified with copper microparticles as detector in flow systems*, *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 577 183–189.

- 81 - Ivandini, T. A.; Sato, R.; Makide, Y.; Fujishima, A.; Einaga, Y.; *Electrochemical Detection of Arsenic(III) Using Iridium-Implanted Boron-Doped Diamond Electrodes*, *Analytical Chemistry*, **2006**, 78, 6291-6298.
- 82 - Fanjul, P. B.; Gonzalez, M. B. G.; Costa, A. C.; *Flow screen-printed amperometric detection of p-nitrophenol in alkaline phosphatase-based assays*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, 385, 1202-1208.
- 83 - Lu, W.; Wallace, G.G.; Imisides, M. D.; *Development of Conducting Polymer Modified Electrodes for the Detection of Phenol*, *Electroanalysis*, **2002**, 14, 325-332.
- 84 - Paixão, T. R. L. C.; Corbo D.; Bertotti. M.; *Amperometric determination of ethanol in beverages at copper electrodes in alkaline medium*, *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 472, 123-131.
- 85 - Richter, E. M., Augelli, M. A.; Kume, G. H.; Mioshi, R. N.; Angnes, L.; *Gold electrodes from recordable CDs for mercury quantification by flow injection analysis*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **2000**, 366, 444-448.
- 86 - Ivaska, A.; Ryan, T. H.; *Application of a Voltametric Flow-Through Cell to Flow-Injection-Analysis (FIA)*, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **1981**, 46, 2865-2970.
- 87 - Xia, J.; Kotani, A.; Hakamata, H.; Kusu, F.; *Determination of hesperidin in Pericarpium Citri Reticulatae by semi-micro HPLC with electrochemical detection*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, 41, 1401-1405.
- 88 - Sato, N.; Okuma, H.; *Amperometric simultaneous sensing system for D-glucose and L-lactate based on enzyme-modified bilayer electrodes*, *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 565, 250-254.
- 89 - De Carvalho, R. M., Freire, R. S., Rath, S., Kubota, L.T., *Effects of EDTA on signal stability during electrochemical detection of acetaminophen*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2004**, 34, 871-878.

- 90 - Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed. Porto Alegre, Bookman, **2002**, 27.
- 91 - Lo Coco, F.; Filippi, F. M.; Montaldo, D.; Lanuzza, F.; *Determination of glucose, fructose, sucrose, and lactose in chocolate based matrices using HPIC with pulsed amperometric detection*, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2006**, 29,2733-2739.
- 92 - Lingling, X.; Genfu, W.; Yan Z.; *Analysis of etimicin sulfate by liquid chromatography with pulsed amperometric detection*, *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1115, 202–207.
- 93 - Li, C.; Wang, C.; Ma, Y.; Bao, W.; Hu S.; *A novel amperometric sensor and chromatographic detector for determination of parathion*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2005**, 381, 1049-1055.
- 94 - Almeida, E. G. N.; Santos, W. T. P.; Albuquerque, Y. D. T.; Richter, E. M.; Anais do I Encontro de Química do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, IV mostra de Pós Graduação e III Jornada Científica de Química, ISBN: 978-85-98616-11-7, Uberlândia, Brasil, **2006**.
- 95 - Almeida, E. G. N.; Ferreira, H. E. A.; Santos, W. T. P.; Albuquerque, Y. D. T.; Richter, E. M. Livro de Resumos da XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de química de Minas Gerais, São João Del Rei, Brasil, **2006**.
- 96 - Reis, B. F.; Bergamin H. F.; *Evolução dos Injetores Empregados em Sistemas de Análise Química por Injeção em Fluxo*, *Química Nova*, **1993**, 6, 570-574.
- 97 - Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed. Porto Alegre, Bookman, **2002**, 27.
- 98 - Sigma Production, T7755- Enzyme Assay and T7755 - Product Information Sheet, disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com> , acesso em 29/06/2004.

- 99 - Barik, S.; Sethunathan, N.; *Biological Hydrolysis of Parathion in Natural Ecosystems, Journal of Environmental Quality*, **1978**, 7, 346-348.
- 100 - Bard, A. J.; Faulkner L R.; *Electrochemical Methods*, 1^a ed. New York, John Wiley & Sons, **1980**, 391.