



**GIOVANA DE FÁTIMA LIMA**

***DETERMINAÇÃO DE SULFETO EM ÁGUA COM  
PREPARO DE AMOSTRA “IN-LINE” POR ANÁLISE  
EM FLUXO MULTISSEGMENTADO***

**Alfenas/MG  
2010**

---

---

**GIOVANA DE FÁTIMA LIMA**

***DETERMINAÇÃO DE SULFETO EM ÁGUA COM  
PREPARO DE AMOSTRA “IN-LINE” POR ANÁLISE  
EM FLUXO MULTISSEGMENTADO***

---

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Orival Luccas

Co-orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley

**Alfenas/MG  
2010**

---

---

**GIOVANA DE FÁTIMA LIMA**

***DETERMINAÇÃO DE SULFETO EM ÁGUA COM PREPARO DE  
AMOSTRA “IN-LINE” POR ANÁLISE EM FLUXO  
MULTISSEGMENTADO***

---

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em:

Prof<sup>o</sup>. Dr. Pedro Orival Luccas

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof<sup>o</sup>. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho

Instituição: Universidade Federal de São Carlos SP

Assinatura:

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jerusa Simone Garcia

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

---

---

Dedico esse trabalho, bem como todas as minhas conquistas aos meus pais, pela dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas, aos meus irmãos pela paciência e carinho, ao meu noivo pelo companheirismo.

---

---

## AGRADECIMENTOS

*“Ainda que eu tivesse o conhecimento de todos os mistérios  
e de toda a ciência, se não tivesse amor, eu nada seria.”*

*(Adaptado de 1Cor 13)*

Agradeço primeiramente à Deus, dono de todos os meus planos, presente em todos os momentos da minha vida, por me dar força para superar as dificuldades, mostrar-me os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais Donizete e Fátima, que mesmo com todas as dificuldades e limitações, priorizaram minha educação, não poupando esforços, sacrificando muitas vezes seus sonhos em função dos meus. Com certeza estes sim são verdadeiros mestres, mestres na arte de educar e principalmente na arte de amar. AMOOO MUITO VOCÊS!!!

A minha irmã Grazielle e ao meu irmão Douglas, agradeço imensamente pela compreensão, carinho e paciência, me suportando em momentos que nem eu me suportava. Minha eterna gratidão e amor incondicional. Vocês são fundamentais em cada conquista!

Ao meu noivo Kléryson, que sempre me apoiou e me incentivou a ir além e que possivelmente hoje, é o dentista que mais tem conhecimento sobre enxofre. Obrigada pelo carinho e pelas palavras que me fizeram forte nos momentos em que perdia forças. TE AMO!

Ao meu orientador Prof. Pedro Orival Luccas. Profissional competente, pai exemplar, grande amigo, sem dúvida um exemplo a ser seguido, creio que poucos são aqueles que cultivam uma amizade tão saudável com seus orientados. Meus sinceros agradecimentos pelos caminhos trilhados desde a iniciação científica, pela confiança e principalmente pelas horas de conversas, dicas e conselhos!

Ao Prof. César Ricardo Teixeira Tarley, pela paciência, dedicação e co-orientação neste trabalho apontando caminhos a seguir e pontos a serem melhorados. Obrigada pela confiança e por contribuir e muito para meu crescimento profissional e também pelo incentivo e amizade sempre presente. Minha admiração e agradecimento!

A todos os amigos do Grupo de Limnologia e Química Analítica Instrumental em especial aos professores Célio e Maria José pela ajuda nos momentos mais críticos, pelas oportunidades, pelo suporte e contribuição durante o desenvolvimento deste trabalho.

---

---

A Lili técnica do Laboratório de Limnologia, que com carinho e amizade esteve sempre ao meu lado, grande parceira nas coletas e nos momentos mais difíceis... De coração obrigada! Um agradecimento especial também ao Ronaldo, técnico em informática, competente e adorável funcionário que prontamente sempre me socorreu, facilitando minha vida em todas as horas. Aos bibliotecários pelo auxílio e a todos os profissionais que indiretamente colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho meus agradecimentos!

Sei que cometo injustiça com alguns, mas seria inaceitável deixar de registrar aos meus amigos Sbruzzi, Isabella, Gu Pêsoa, Thiago, Fernanda Figueiredo, Fantin, Camila, Flávio, Lucas, Jorge, Ronaldo, Arley, Dayene, Mariana, Gabriel, Marcos, Ana Lúcia, Letícia, Deidineusa, Vivineusa, Heloneusa, Solineusa, Kátineusa e todas as Neusas do laboratório de Instrumental, meus sinceros agradecimentos pela ajuda, amizade, pelos momentos divertidíssimos e também pelo conhecimento trocado.

Aos meu grandes amigos Poly, Aylinha, Lipe e Lu, dos quais levarei muito mais que lembranças, uma amizade verdadeira. Juntos vocês são quase perfeitos! Obrigada pelo carinho, pelos momentos divertidos e produtivos ... Amo Vocês! Ariadne, amiga, parceira de todas as horas, parte importantíssima na execução deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos e carinho. Muito Obrigada! Aos meus amigos Luis Adriano e Roberta pelo incentivo e torcida. A minha grande amiga Karyna, que também faz parte do núcleo de dentistas bem informados sobre enxofre, agradeço pelo auxílio e pela amizade sincera.

A Unifal/MG e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela realização do curso de Mestrado. Ao Thiago secretário da Pós-Graduação, Mariluce e Thaís pela assistência e amizade. Um agradecimento especial ao Prof. Antônio Carlos Doriguetto pela confiança, amizade e por me instigar profissionalmente. A Furnas Centrais Elétricas, Fapemig e CNPq pelo suporte financeiro.

---

---

*“Temos o ser humano como criador e escravo dos novos produtos, que surgiram num instante de inspiração criadora ou, através, de paciente pesquisa. Neste momento, em que o homem liberta as forças que estavam aprisionadas pela natureza, ele é Senhor. Mas, no instante seguinte, quando a matéria foge ao seu controle, nem sempre atento, ele se torna a primeira vítima”.*

*José Luiz Ferreira*

---

## RESUMO

A presente dissertação descreve um sistema *in-line* de análise em fluxo multissegmentado para determinação de sulfeto em amostras de água explorando a reação de Fisher. As amostras de água foram coletadas, preservadas somente com hidróxido de sódio, e introduzidas no minireactor acoplado ao sistema FIA. O sulfeto liberado, após acidificação da amostra, foi transportado com o fluxo de gás nitrogênio e misturado com solução de N, N dietil p-fenilenediamina (DEPD) na presença de Fe(III). O corante azul formado foi medido em comprimentos de onda entre 672-679 nm. A avaliação do efeito dos fatores químicos e de fluxo foi realizada utilizando planejamento fatorial de dois níveis, enquanto a otimização foi efetuada pela matriz de Doehlert. O sistema apresenta duas regiões lineares, o primeiro intervalo de resposta entre 0,433  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 400  $\mu\text{g L}^{-1}$  e a segundo de 400  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 3500  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O limite de detecção e quantificação encontrados foram 0,130  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,433  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente, enquanto a frequência de leitura foi de 12  $\text{h}^{-1}$ . A precisão foi avaliada como o desvio padrão relativo ( $n = 10$ ), para 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de sulfeto, sendo encontrados 1,9 e 2,3%, respectivamente. O método apresentou seletividade satisfatória no que diz respeito aos principais interferentes presentes em amostras ambientais, tais como  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{F}^{-}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{+}$ . A exatidão do método foi avaliada com sucesso em amostras de água ambientais após comparação com o método de referência na literatura.

Palavras-chave: Sulfeto. Análise em fluxo. Análise multivariada.



## ABSTRACT

The present dissertation describes an in-line flow analysis multisegmented system for determination of sulfide in water samples exploiting the Fisher reaction. Water samples were collected, preserved only with sodium hydroxide, and introduced into minireactor accomplished to FIA system. The sulfide released, after sample acidification, was carried out with nitrogen gas flow and mixed with N, N diethyl p-phenylene diamina (DEPD) solution in the presence of Fe (III). The blue dye formed was measured at wavelength range between 672-679 nm. The evaluation of the effect of chemical and flow factors was performed using fractional factorial design of two levels, while the optimization was accomplished by Doehlert matrix. The system presented two linear regions, the first range of response between  $0.433 \mu\text{g L}^{-1}$  to  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  and the second of  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  to  $3500 \mu\text{g L}^{-1}$ . The limit of detection and quantification were found to be  $0.130 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $0.433 \mu\text{g L}^{-1}$  respectively, while the sample throughput was  $12 \text{ h}^{-1}$ . Precision was evaluated as the relative standard deviation ( $n = 10$ ), for  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  sulfide were found to be 1.9 and 2.3% respectively. The method showed satisfactory selectivity as regard the main interferent present in environmental samples, such as  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{F}^{-}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{+}$ . The accuracy of the method was successfully evaluated in environmental water samples after comparison with the reference method reported in the literature.

**Key words:** *Sulfide; Flow Injection Analysis , Multivariate analysis.*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo do Enxofre.....	20
Figura 2 -	Distribuição das espécies de sulfeto em solução aquosa em função do pH.....	20
Figura 3 -	Esquema do ácido sulfídrico em uma lago.....	21
Figura 4 -	Representação esquemática da reação química de formação do azul de metileno. DMPD –p-fenilenodiamina.....	25
Figura 5 -	Representação esquemática de um sistema de análise em fluxo segmentado (SFA).....	28
Figura 6 -	Representação esquemática de um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA).....	29
Figura 7 -	Modelo do processo de amostragem no sistema MSFA.....	30
Figura 8 -	Representação esquemática de um sistema de análise por injeção seqüencial (SIA).....	31
Figura 9 -	Representação esquemática de um sistema de análise em fluxo por multicomutação.....	32
Figura 10 -	Distribuição dos pontos experimentais do planejamento $2^2$ com ponto central mais estrela.....	38
Figura 11 -	Distribuição dos pontos experimentais de uma matriz Doehlert para otimização de dois fatores representado por um hexágono regular.....	40
Figura 12 -	(a) Detector empregado e acessórios: Espectro USB 4000 (UV – Visível), fonte de luz, fibra óptica e cela de fluxo em Z; (b) Detalhe da placa com 2 válvulas solenóides (3 vias); (c) Representação esquemática de uma válvula solenóide de 3 vias: “on” Solenóide ligado: “off” Solenóide desligado; (d) Circuito eletrônico; (e) Injetor comutador automatizado.....	46
Figura 13 -	Cela de fluxo: (a) 0,48 mL; (b) 0,24 mL; (c) cubeta em Z - $7,85 \cdot 10^{-3}$ mL.....	48
Figura 14 -	Fotos dos minireatores testados: 1- 1,7 mL; 2- 2,7 mL; 3- 1,5 mL e 4- 2,5 mL.....	49
Figura 15 -	Modelo esquemático do sistema de análise em fluxo monossegmentado proposto para determinação de sulfeto.....	51

Figura 16 -	Varredura espectral do azul de etileno obtido a partir da reação com 5 mg L <sup>-1</sup> de sulfeto.....	59
Figura 17 -	1, Cella de fluxo de 0,48 mL; 2, Cella de fluxo em Z; 3, Cella de fluxo de 0,24 mL.....	60
Figura 18 -	Avaliação do desempenho dos minireatores.....	60
Figura 19 -	Perfil dos sinais analíticos obtidos. (a) antes do tratamento; (b) após o tratamento pelo programa OriginPro 8.....	61
Figura 20 -	Comparação das previsões dos dois modelos com os valores observados. (a) Modelo Linear e (b) Modelo quadrático.....	69
Figura 21 -	(a) Superfície de resposta e (b) curvas de níveis relacionando a concentração de DEPD e concentração de Fe <sup>+3</sup> . O valor da concentração de ácido nos reagentes foi fixo em 0,04 mol L <sup>-1</sup> .....	70
Figura 22 -	(a) Superfície de resposta e (b) curvas de níveis relacionando a concentração de DEPD e concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> nos reagentes Fe <sup>+3</sup> . O valor da concentração de Fe <sup>+3</sup> foi fixo em 0,025 mol L <sup>-1</sup> .....	73
Figura 23 -	(a) Superfície de resposta e (b) curvas de níveis relacionando a concentração H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> nos reagentes e concentração de Fe <sup>+3</sup> . O valor da concentração de DEPD foi fixo em 4 g L <sup>-1</sup> .....	75
Figura 24 -	Estudo de Interferentes na determinação de sulfeto 300 µg L <sup>-1</sup> usando solução de diversos íons em diferentes concentrações.....	78
Figura 25 -	Curva de calibração para determinação de sulfeto no sistema de análise em fluxo multissegmentado.....	79
Figura 26 -	Resposta analítica expressa em termos de altura e área de pico.....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Planejamento Fatorial.....	35
Tabela 2 -	Matrizes Doehlert para dois, três e quatro fatores (117).....	41
Tabela 3 -	Etapas do sistema proposto.....	50
Tabela 4 -	Níveis dos fatores no planejamento fracionário $2^{7-3}$ .....	53
Tabela 5 -	Níveis codificados e reais da matriz de Doehlert para três fatores.....	54
Tabela 6 -	Matriz de Doehlert para três fatores.....	55
Tabela 7 -	Concentração dos concomitantes estudados para se verificar interferentes.....	56
Tabela 8 -	Matriz e resultados do planejamento fatorial de dois níveis $2^{6-3}$ para determinação “on-line” de sulfeto no sistema de análise em fluxo multissegmentado.....	62
Tabela 9 -	Média e variância dos resultados do planejamento fatorial de dois níveis $2^{7-3}$ .....	63
Tabela 10 -	Estimativas de contraste para os fatores empregados no planejamento fatorial fracionário $2^{7-3}$ .....	64
Tabela 11 -	Matriz de Doehlert para três fatores e resultados.....	66
Tabela 12 -	Análise de variância do modelo linear.....	67
Tabela 13 -	Análise de variância do modelo quadrático.....	68
Tabela 14 -	Condições de trabalho.....	77
Tabela 15 -	Comparação entre diferentes técnicas de fluxo para determinação de sulfeto.....	80
Tabela 16 -	Avaliação dos valores de recuperação para determinação de íons sulfeto em amostras de água. ND = não detectado. <sup>a</sup> Resultados expressos como média do valor $\pm$ desvio padrão com base em três repetições (n = 3).....	81
Tabela 17 -	Determinação de Sulfeto em amostras de água usando o método proposto e o método de referência.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AA</b>	-	Alça de amostragem
<b>ANOVA</b>	-	Análise de Variância, do inglês <i>Analysis of variance</i>
<b>AHCI</b>	-	Alça de HCl
<b>APHA</b>	-	<i>American Public Health Association</i>
<b>B<sub>1</sub></b>	-	Bobina dos reagentes
<b>B<sub>2</sub></b>	-	Bobina reacional
<b>CAR</b>	-	Concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> nos reagentes
<b>CCD</b>	-	<i>Central Composite Design</i>
<b>CFA</b>	-	Análise em Fluxo Multissegmentado
<b>CONAMA</b>	-	Conselho Nacional do Meio Ambiente
<b>CR<sub>1</sub></b>	-	Concentração do dietil-p-fenilenodiamina
<b>CR<sub>2</sub></b>	-	Concentração de Fe <sup>3+</sup>
<b>CV</b>	-	Coefficiente de variação
<b>DEPD</b>	-	Dietil-p-fenilenodiamina
<b>DMPD</b>	-	N, N-dimetil-p-fenilenodiamina
<b>FIA</b>	-	Análise por injeção em fluxo, do inglês <i>Flow injection analysis</i>
<b>FL</b>	-	Frequência de Leitura
<b>HPLC</b>	-	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>IUPAC</b>	-	<i>International Union Pure and Applied Chemistry</i>
<b>LD</b>	-	Limite de Detecção
<b>LOV</b>	-	<i>Lab-on-valve</i>
<b>LQ</b>	-	Limite de Quantificação
<b>MCFIA</b>	-	<i>Multi-Commutated Flow Injection Analysis</i>
<b>MPFS</b>	-	<i>Multi-Pumping Flow System</i>
<b>MSFIA</b>	-	<i>Multi-Syringe Flow Injection Analysis</i>
<b>QM</b>	-	Média Quadrática
<b>RSD</b>	-	Desvio padrão relativo
<b>RSM</b>	-	Metodologia de superfície de resposta, do inglês <i>Methodology Response Surface</i>
<b>SIA</b>	-	<i>Sequential Injection Analysis</i>
<b>SFA</b>	-	<i>Segmented Flow Analysis</i>
<b>SQ</b>	-	Soma Quadrática

- TV<sub>1</sub>** - Temporização da válvula solenóide 1
- UHE** - Usina Hidrelétrica
- VC** - Vazão na saída da cubeta
- VN<sub>2</sub>** - Vazão de nitrogênio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>O enxofre .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Fontes de enxofre .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Presença em corpos d'água.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4</b>	<b>Impactos antropogênicos no ciclo do enxofre.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5</b>	<b>Toxicidade.....</b>	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>Estratégias analíticas para detecção de sulfeto.....</b>	<b>23</b>
2.6.1	<i>Detecção espectroscópica.....</i>	24
<b>2.7</b>	<b>Sistemas em fluxo.....</b>	<b>26</b>
2.7.1	<i>Análise em Fluxo Multissegmentado (CFA).....</i>	27
2.7.2	<i>Análise por injeção em fluxo (FIA).....</i>	28
2.7.3	<i>Sistema em fluxo monossegmentado.....</i>	29
2.7.4	<i>Injeção sequencial (SIA).....</i>	30
2.7.5	<i>Injeção em fluxo por multi-comutação MCFIA.....</i>	31
2.7.6	<i>Outras técnicas de análise em fluxo.....</i>	32
<b>2.8</b>	<b>Sistemas automatizados.....</b>	<b>32</b>
<b>2.9</b>	<b>Otimização multivariada de processos em Química Analítica.....</b>	<b>33</b>
2.9.1	<i>Planejamentos fatoriais de dois níveis.....</i>	34
2.9.2	<i>Metodologia de Superfície de Resposta.....</i>	37
2.9.2.1	<i>Planejamento 2<sup>2</sup> com ponto central mais estrela.....</i>	37
2.9.2.2	<i>Planejamento de Doehlert.....</i>	38
2.9.3	<i>Critério de Lagrange.....</i>	42
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1</b>	<b>Instrumentação e acessórios.....</b>	<b>45</b>
<b>5.2</b>	<b>Reagentes.....</b>	<b>46</b>
<b>5.3</b>	<b>Estudos preliminares .....</b>	<b>47</b>
5.3.1	<i>Varredura espectral.....</i>	47
5.3.2	<i>Construção das celas de fluxo.....</i>	47

5.3.3	Construção do minireator .....	48
<b>5.4</b>	<b>Sistema de análise em fluxo multissegmentado.....</b>	<b>49</b>
<b>5.5</b>	<b>Procedimento de otimização.....</b>	<b>52</b>
5.5.1	Planejamento fatorial de dois níveis.....	52
5.5.2	Planejamento de Doehlert.....	54
<b>5.6</b>	<b>Estudo de interferentes no método proposto.....</b>	<b>55</b>
<b>5.7</b>	<b>Figuras de mérito.....</b>	<b>56</b>
5.7.1	Linearidade.....	56
5.7.2	Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ).....	57
5.7.3	Precisão.....	58
5.7.4	Frequência de Leitura (FL).....	58
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO) .....</b>	<b>59</b>
<b>6.1</b>	<b>Estudos preliminares.....</b>	<b>59</b>
6.1.1	Varredura espectral.....	59
6.1.2	Construção da cubeta de fluxo.....	59
6.1.3	Construção do minireator.....	60
<b>6.2</b>	<b>Perfil do sinal analítico no sistema em fluxo monossegmentado.....</b>	<b>61</b>
<b>6.3</b>	<b>Procedimento de otimização.....</b>	<b>62</b>
6.3.1	Planejamento fatorial de dois níveis.....	62
6.3.2	Otimização utilizando planejamento Doehlert para três fatores.....	65
<b>6.4</b>	<b>Estudo de Interferentes no método proposto.....</b>	<b>77</b>
<b>6.5</b>	<b>Figuras de Mérito e Validação do sistema FIA multissegmentado.....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>82</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>83</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Devido a sua alta toxicidade, o sulfeto é considerado um importante parâmetro para o estudo de um ecossistema e na água, geralmente, ele pode ser representado pela soma do  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HS}^-$  e  $\text{S}^{2-}$ , espécies que mantêm o seu equilíbrio, em solução aquosa<sup>1,2</sup>. Sob a forma de  $\text{H}_2\text{S}$ , o sulfeto pode ser encontrado como resultado da decomposição da matéria orgânica e também como resultado da redução do sulfato<sup>3</sup>.

Vários métodos são descritos na literatura para determinação de sulfeto, incluindo volumétrico<sup>4</sup>, espectrofotométrico<sup>5-8</sup>, cromatografia em fase gasosa<sup>9-15</sup>, quimioluminescência<sup>16,17</sup> catalítico<sup>18,19</sup>, fluorescência<sup>20,21</sup>, potenciométrico<sup>22,23</sup>, amperométrico<sup>24,25</sup> e métodos polarográficos<sup>26</sup>. No entanto, para amostras ambientais, a fim de garantir resultados confiáveis, procedimentos de pré-tratamento da amostra são necessários sendo esta etapa, geralmente, a mais difícil e demorada<sup>4</sup>.

Para determinação espectrofotométrica, o corante fenotizídico azul de metileno é o mais utilizado e estudado. Recomendado por Fischer em 1886 para a identificação de sulfeto, este baseia-se na reação com N, N-dimetil-p-fenilenodiamina (DMPD) em meio ácido e na presença de Fe (III)<sup>20,27</sup>. O mecanismo de reação tem sido descrito por vários autores<sup>28,29</sup>. Alternativamente, o dietil-fenilenodiamina (DEPD) tem sido utilizado visando substituir DMPD como reagente espectrofotométrico, porque este composto forma um análogo do azul de metileno, chamado azul de etileno<sup>30</sup>. Estudos comparativos reportam que a amina aromática DEPD leva à formação de corantes fenotiazídicos com maior absorvidade molar<sup>31</sup>. Estes resultados corroboram com os métodos anteriormente publicados, indicando a elevada sensibilidade do DEPD para determinação espectrofotométrica de sulfeto<sup>3</sup>.

O ânion sulfeto pode agir como um intermediário versátil através do qual o enxofre juntamente com outras espécies pode ser determinado, pois sua alta reatividade fornece várias estratégias de detecção<sup>32-45</sup>. Neste sentido, o acoplamento da análise em fluxo (FIA), com diferentes estratégias de detecção pode ser considerado uma boa alternativa para determinação de sulfeto, isso devido as proeminentes vantagens do sistema FIA, tais como, simplicidade, pequena manipulação da amostra, baixo consumo de reagentes e amostra e, conseqüentemente, a baixa geração de resíduos<sup>36-43</sup>. Considerando as modalidades do sistema de fluxo, a técnica de análise de fluxo segmentado<sup>43</sup> é considerada precursora dos diferentes modelos de sistemas de fluxo disponível hoje, e baseia-se na aspiração seqüencial de amostra e bolhas de ar, o que faz com que a dispersão seja mais controlada. Atualmente, existem

várias configurações de sistema de fluxo, tais como a convencional análise por injeção em fluxo contínuo e sem bolhas de ar proposto por Ruzicka<sup>44</sup>, sistemas com apenas um segmento de líquido aprisionado entre dois segmentos de gás, que foi nomeado monossegmentado, sistemas que empregam várias válvulas solenóides nomeado multicomutação e sistemas de análise sequencial<sup>45</sup>.

No presente trabalho, estratégias/configurações do FIA, tais como: multissegmentado<sup>43</sup>, multicomutação<sup>46</sup> e difusão gasosa<sup>47</sup>, foram explorados a fim de determinar sulfeto com o tratamento da amostra *in line*. Portanto, o intuito do método proposto foi à implementação de um sistema de análise multissegmentado, o que torna a determinação de sulfeto rápida e com baixo consumo de reagentes/amostras. Para tanto, um minireator de 1,5 mL de volume interno foi construído e acoplado ao sistema FIA, e usando um injetor automatizado e válvulas solenóides gerou-se o fluxo segmentado. Assim, foi realizada uma injeção sequencial de reagente cromogênico (líquido) e nitrogênio (gás), além de H<sub>2</sub>S liberado do minireator. O H<sub>2</sub>S foi misturado com o reagente formando o azul de etileno e medido espectrofotometricamente. Todos os fatores que desempenham um papel importante no sistema de fluxo foram estudados, utilizando ferramentas quimiométricas incluindo planejamento fatorial fracionário, matriz Doehlert e metodologia de superfície de resposta (RSM) na otimização<sup>48,49</sup>.

## 2 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O enxofre

O enxofre, um não-metal multivalente, é um dos mais abundantes elementos químicos na natureza, apresentando como estados de oxidação mais comuns os valores  $2^-$ ,  $2^+$ ,  $4^+$  e  $6^+$ . Dentre os compostos de enxofre, presentes na atmosfera, destacam-se espécies, tais como COS, CS<sub>2</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>S, SO<sub>2</sub> e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Na troposfera a transformação destes compostos exibe uma clara tendência em direção aos estados de oxidação mais altos<sup>50</sup>.

Na forma de H<sub>2</sub>S ele apresenta-se como um gás incolor, fétido, podendo adormecer os centros respiratórios mesmo em baixas concentrações<sup>51</sup>. Quando combinado ao ferro e metais básicos este elemento ocorre no estado nativo ou elementar. O enxofre é encontrado no gás natural como sulfeto de hidrogênio e em grande número de compostos orgânicos complexos, sendo este também de grande importância para as plantas, homens e animais, uma vez que está presente em várias estruturas biológicas, fazendo parte da estrutura de coenzimas, vitaminas, agentes redutores e hormônios<sup>52</sup>.

O enxofre é também um elemento essencial a todas as formas de vida. Nas plantas, ele faz parte de alguns aminoácidos e de todas as proteínas. Dentre as formas do enxofre o sulfato é a mais estável e abundante estando disponível para uso dos organismos vivos na biosfera<sup>52</sup>, é um dos principais componentes de águas naturais. O SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> exerce a função de ativador enzimático, o -SH é um grupo ativo de enzimas e de coenzimas (ácido lipóico, tiamina, biotina), participa na fotossíntese e reações de fosforilação, sendo essencial no processo de fixação de nitrogênio pelas leguminosas, garantindo um crescimento mais vigoroso e incrementando a produção de sementes. A natureza recicla enxofre sempre que um animal ou planta morre, ao se decomporem, o sulfato combinado com a água pode ser absorvido pelas raízes das plantas. Assim, os animais obtêm sulfato, através da ingestão de vegetais e outros animais.

## 2.2 Fontes de enxofre

Dúvidas com relação às fontes, reações e destino das espécies de enxofre na atmosfera ainda são muitas. No entanto, sabe-se que as espécies de enxofre presentes na atmosfera, principalmente na forma de  $\text{SO}_2$ , são em grande parte oriundas de fontes antropogênicas. Dentre as fontes antropogênicas, destacam-se os processos de extração, transporte e refino de petróleo, enxofre e gás natural, isso porque o ácido sulfídrico geralmente está presente nos depósitos destas fontes energéticas; os aterros são outra fonte de  $\text{H}_2\text{S}$  para o ambiente, já que a liberação deste corresponde a 1% do volume dos gases provenientes de aterros. Além disso, atividades industriais como indústria de cimento, metalurgia, têxtil, curtumes, fábricas de papel (Kraft), queima de combustíveis fósseis e biomassa também são consideradas importantes fontes de emissão de gases contendo enxofre. As fontes naturais são responsáveis por aproximadamente 90% do ácido sulfídrico total da atmosfera, merecendo destaque as atividades vulcânicas e geotérmicas, águas estagnadas, decomposição da matéria orgânica e a vaporização da água do mar que são consideradas as principais fontes de emissões naturais de espécies gasosas de enxofre<sup>50,53</sup>.

## 2.3 Presença em corpos d'água

O ácido sulfídrico é uma das principais espécies do ciclo do enxofre (FIGURA 1). Em água a espécie  $\text{H}_2\text{S}$  se dissolve como um ácido diprótico fraco tendo como seus sais correspondentes os sulfetos ( $\text{S}^{2-}$ ) e hidrogeno sulfeto ( $\text{HS}^-$ ), apresentando em solução os equilíbrios apresentados nas Equações 1 e 2<sup>54</sup>.

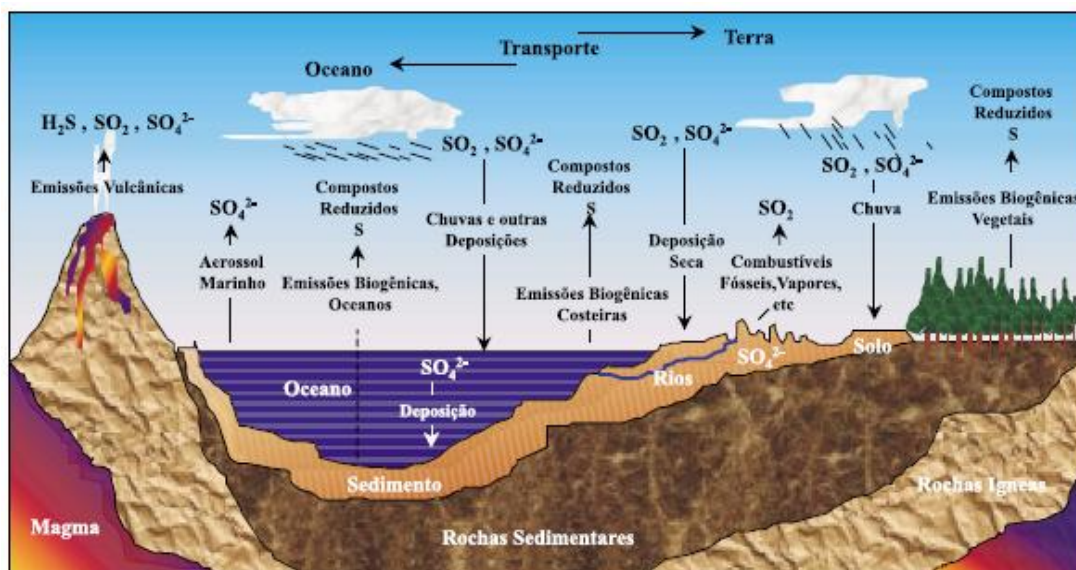


Figura 1 - Ciclo do Enxofre.

Fonte: MARTINS e ANDRADE, (2002, p. 260)<sup>50</sup>.



Como pode ser visto pelas curvas das frações ( $\alpha$ ) de cada espécie (FIGURA 2) a distribuição das espécies provenientes do  $H_2S$  variam com o pH em meio aquoso.

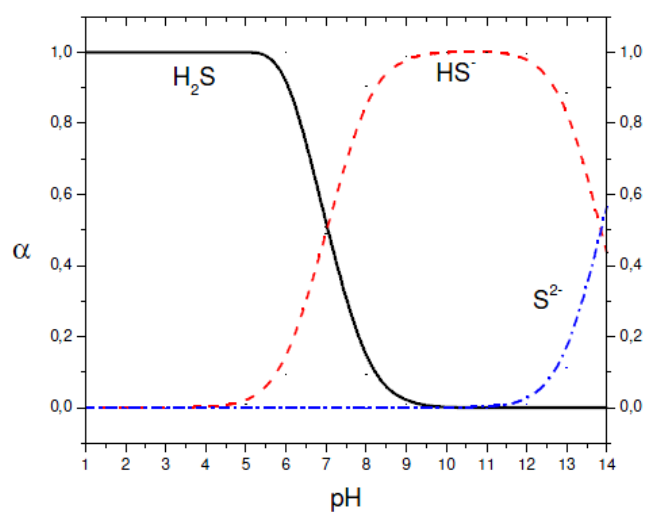
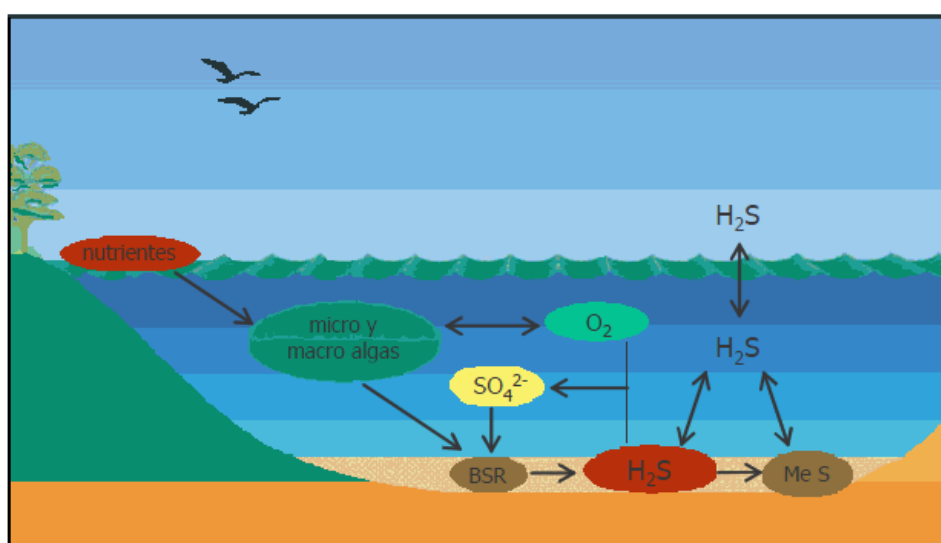


Figura 2 - Distribuição das espécies de sulfeto em solução aquosa em função do pH.

O  $\text{H}_2\text{S}$  da atmosfera é dissolvido diretamente na água e pode ser facilmente oxidado pelo oxigênio presente na superfície. Podendo ainda difundir-se na coluna d'água, com baixa quantidade de oxigênio, e juntar-se à argila e matéria orgânica, formando parte do material particulado em suspensão e posteriormente o sedimento. Quando consumido pelas bactérias presentes nos sedimentos e na água, este é oxidado a enxofre elementar, o qual ao reagir com sulfeto de ferro associado aos minerais e sedimento converte-se em pirita ( $\text{FeS}_2$ ). Podendo este também, em presença de luz e ausência de oxigênio, ser oxidado pelas bactérias fotossintéticas a enxofre e sulfato (FIGURA 3)<sup>55</sup>.



**Figura 3** - Esquema do ácido sulfídrico em uma lagoa. BSR, bactérias sulfato redutoras; MÊS, sulfetos metálicos.

Fonte: FERRER, L. et al., (2007, p. 14)<sup>55</sup>.

O enxofre possui um importante papel nos processos biogeoquímicos, formando sais insolúveis com vários metais que podem estar presentes na água e nos sedimentos, atuando também na liberação de metais no ambiente aquático devido a mobilização bacteriana do enxofre presente em minerais<sup>56</sup>. Em ambientes anóxicos, o ácido sulfídrico controla a biodisponibilidade dos metais pesados. Na interface água-sedimentos a disponibilidade de oxigênio (condição redox) tem papel relevante no ciclo de nutrientes e metais pesados. O potencial redox decresce com o aumento da profundidade ocorrendo assim a redução do sulfato formando sulfetos. Os sulfetos de metais, devido sua baixa solubilidade mantêm os metais não biodisponíveis e, geralmente, uma baixa concentração de sulfeto livre na água.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Resolução nº 357 de 17 de março de 2005 e nº 397 de 3 de abril de 2008, estabelece os seguintes limites máximos permissíveis: Águas Doces: Classes 1 e 2, Sulfeto ( $\text{H}_2\text{S}$  não dissociado) 0,002 mg/L  $\text{S}^{2-}$ ; Classe 3 - Sulfeto (como  $\text{H}_2\text{S}$  não dissociado) 0,3 mg/L  $\text{S}^{2-}$ . Águas Salinas: Classe 1 e 2, Sulfetos ( $\text{H}_2\text{S}$  não dissociado) 0,002 mg/L  $\text{S}^{2-}$ . Águas Salobras: Classe 1 - Sulfetos (como  $\text{H}_2\text{S}$  não dissociado) 0,002 mg/L  $\text{S}^{2-}$ . Lançamento de efluentes, Sulfeto 1,0 mg/L de Sulfeto<sup>57</sup>.

## 2.4 Impactos antropogênicos no ciclo do enxofre

O enxofre, devido a vasta quantidade de compostos que forma, possui inúmeras aplicações, sendo a produção de ácido sulfúrico pela indústria química uma das mais importantes. Este elemento é amplamente usado também na fabricação de fertilizantes, inseticidas, explosivos, borrachas e no preparo de polpa de madeira para a fabricação de papel. Outra importante aplicação é o emprego de sulfato de bário na indústria química na fabricação de cosméticos, pigmento de tintas e para conferir a coloração em papéis e tecidos. Seu uso difundido tem afetado enormemente o ciclo do enxofre<sup>58</sup>, fazendo com que o mesmo seja alvo em debates sobre a chuva ácida.

As atividades humanas, embora crescentes e dependentes dos ciclos econômicos, são relativamente constantes em comparação com a alta variabilidade de algumas emissões naturais, como a explosiva atividade vulcânica. Desde o início do século XX, a industrialização global teve um efeito considerável sobre o ciclo do enxofre, talvez, mais notadamente no aumento de acidez na fase aquosa e à formação de sulfato particulado no aerossol atmosférico. Havendo também um aumento na liberação de enxofre em rios, devido a mineração, industrialização e, em particular a agricultura<sup>50,58</sup>.

## 2.5 Toxicidade

A toxicidade de uma substância gasosa pode ser descrita em função de seu poder asfixiante. Os asfixiantes podem ser subdivididos em: (1) simples, que são aqueles cujo perigo está relacionado à sua alta concentração que, devido à redução da pressão parcial de

oxigênio, eles produzem seus efeitos adversos ao deslocar ou eliminar o oxigênio do ar inspirado (ex. etano, metano, nitrogênio); (2) anestésicos, que são capazes de provocar depressão do sistema nervoso central, interferindo no sistema neurotransmissor (ex. hidrocarbonetos derivados do petróleo) e (3) asfixiantes químicos, os quais diminuem a capacidade de transportar oxigênio, por produzirem anóxia tissular, ou seja, baixa oxigenação dos tecidos (ex. monóxido de carbono). O sulfeto pode ainda formar complexos com o ferro nos citocromos mitocondriais parando o metabolismo aeróbico<sup>57,59</sup>. Portanto o gás sulfídrico é um asfixiante químico.

A presença de sulfeto geralmente pode ser detectada, muitas vezes independentemente do seu estado real, devido a liberação do ácido sulfídrico, este gás provoca um odor característico mesmo em níveis traço. Embora o nariz humano consiga detectar níveis tão baixos quanto 0,02 ppm, normalmente há uma sensibilidade de um máximo de aproximadamente 5 ppm. Acima deste nível ou por meio de exposição prolongada, a percepção do gás é bastante comprometida, isso porque os efeitos neurotóxicos agem sobre os nervos olfativos. O sulfeto atua nas células desativando a respiração aeróbia levando a morte geralmente por asfixia. A dose letal, dependendo da exposição, pode variar de 300-1000 ppm, deixando dúvidas de maior toxicidade quando comparado ao cianeto de hidrogênio a níveis semelhantes<sup>20</sup>.

Os casos clínicos de envenenamento por sulfeto variam de 30 a 3000 mg L<sup>-1</sup><sup>9</sup>. A alta reatividade do sulfeto e baixo potencial acumulativo desta espécie tende a minimizar o risco de exposição diária a níveis que não são susceptíveis a causar efeitos adversos graves a saúde<sup>60</sup>. A Portaria 3214/78, NR – 15, Anexo 11 do Ministério do Trabalho estabelece os limites de 8 ppm (12 mg m<sup>-3</sup>) para o gás sulfídrico, 4 ppm (10 mg m<sup>-3</sup>) para o dióxido de enxofre (ppm - partes de vapor ou gás por milhão de partes de ar contaminado, mg m<sup>-3</sup>- miligramas por metro cúbico de ar) e grau de insalubridade máximo para ambos, considerando uma exposição ocupacional de 48 horas semanais<sup>61</sup>.

## 2.6 Estratégias analíticas para detecção de sulfeto

Em consequência de sua toxicidade e riscos associados a exposição ocupacional, a detecção de sulfeto tem ganhado significativa importância dentro da comunidade analítica<sup>20</sup>. De acordo com a *American Public Health Association* (APHA) dois métodos considerados



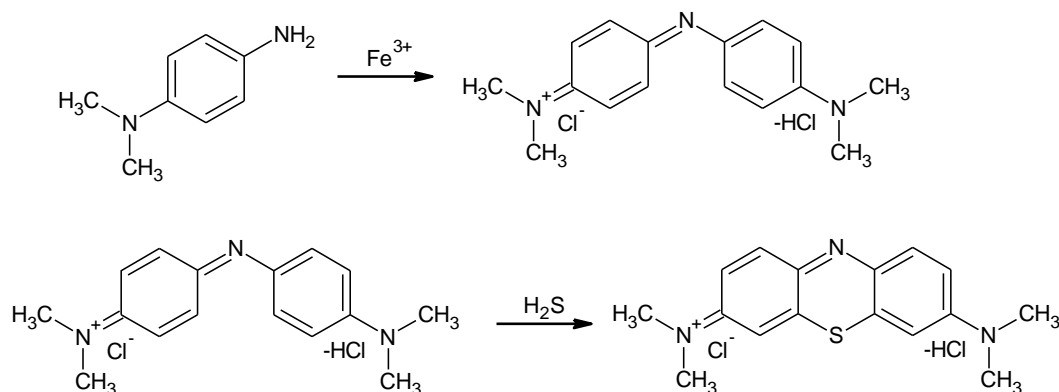
padrão podem ser usados para a determinação de sulfeto em águas: um espectrofotométrico e outro iodométrico<sup>4</sup>. Trabalhos descritos na literatura revelam que os procedimentos espectroscópicos<sup>18,62,63</sup> são os mais comuns em determinação de sulfeto estando os procedimentos eletroquímicos<sup>64-67</sup> e cromatográficos<sup>24,68-70</sup> em segunda e terceira posições, respectivamente. Apesar dos expressivos avanços em instrumentação a maioria dos sistemas de detecção ainda dependem de alguma forma de manipulação da amostra para a seletividade.

A volatilidade do H<sub>2</sub>S geralmente fornece rotas mais fáceis para a separação do sulfeto em matrizes compostas, sua liberação e posterior coleta, usualmente em meio alcalino, muitas vezes pode contornar interferências. Esse recurso tem sido bastante explorado e aplicado em muitos sistemas, independentemente do método utilizado para sua detecção<sup>9,35,65</sup>. Segundo Lawrence *et al*, as técnicas frequentemente utilizadas na determinação de sulfeto são: a detecção espectroscópica, que será mais detalhada no item 2.6.1; as técnicas clássicas baseadas em iodimetria, consiste na titulação de sulfeto por uma solução padrão de iodo em meio ácido formando enxofre elementar, a simplicidade deste método tem significativas limitações em termos de sensibilidade e seletividade quando se trabalha com amostras reais, sendo a titulação direta com iodo geralmente evitada devido à perda de amostra por volatilização e ou oxidação aérea; a detecção eletroquímica (potenciométrico, coulométrica e amperométrico), sendo a potenciométrica a mais comumente explorada, estes sistemas tendem a envolver sulfeto de prata como o principal elemento de detecção. O elevado tempo de resposta, os desvios Nernstianos e os problemas com os componentes do eletrodo de referência causados pelo sulfeto têm limitado o uso de eletrodos seletivos a sulfeto. Alternativamente são desenvolvidas outras estratégias potenciométricas visando resolver esta limitação; as técnicas cromatográficas como cromatografia em fase gasosa e HPLC foram aplicadas na detecção de sulfeto várias matrizes, incluindo preparações farmacêuticas, efluentes, amostras de solo, água de processamento de papel, fluídos corporais e sangue humano<sup>20</sup>.

### 2.6.1 Detecção espectroscópica

Dentre os métodos analíticos para determinação de sulfeto em diversas matrizes, considera-se o teste do azul de metileno a abordagem mais comum para sua determinação<sup>21, 28-31,71-92</sup>. Este envolve a reação do sulfeto com N, N dimetil-p-fenileno em presença de íons

ferro dando origem a uma coloração azul característica, correspondente a produção do corante tiazio heterocíclico, azul de metileno, como mostrado na Figura 4.



**Figura 4** - Representação esquemática da reação química de formação do azul de metileno. DMPD –p-fenilenodiamina.

Relatada primeiramente em 1886 por Emil Fischer<sup>60</sup>, a reação do azul de metileno mantém significativo valor ainda hoje, isso devido a sua simplicidade, seletividade e sensibilidade. A quantificação do azul de metileno é favorável a espectrofotometria UV/Visível uma vez que este corante possui máximo de absorção próximo a 670 nm. Além disso, os limites de detecção alcançados pela espectrofotometria UV/Visível podem ser comparados favoravelmente aos obtidos por técnicas como cromatografia gasosa, eletroforese capilar, HPLC, cromatografia iônica dentre outras<sup>20</sup>. No entanto, apesar da absorção espectroscópica UV/visível ser tradicionalmente escolhida para detecção do corante, há uma flexibilidade considerável de instrumentação para esta abordagem. As técnicas de fluorescência<sup>72</sup> e HPLC<sup>73</sup> têm sido usadas para detectar o heterocíclico resultante do enxofre, sendo a última bastante útil em situações em que a turbidez da solução dificulta a avaliação espectroscópica.

Estudos voltados aos mecanismos da reação<sup>28,29</sup> e tentativas de manipular os componentes de reação, como a substituição do dimetilfenilenodiamina pelo derivado dietil correspondentes ou por p-aminofenol, constantemente são alvos de pesquisas. A Espectroscopia também tem sido aplicada a determinação quase direta de sulfeto. A abordagem mais comum utiliza espectrofotometria de absorção molecular<sup>74-77</sup>, mas não pode ser descrita como uma técnica puramente direta devido a necessidade de implementação de

uma etapa de preparo de amostra. A volatilização do sulfeto presente na amostra é induzida e o  $\text{H}_2\text{S}$  liberado é arrastado para uma célula de absorção com a detecção da espécie em aproximadamente 190-200 nm. As limitações desta abordagem estão nos problemas e perdas associadas ao manuseio do gás sulfídrico<sup>20</sup>.

Técnicas de espectroscopia atômica e quimioluminescência tem sido também investigada, mas com uma contribuição menor, sendo a quimioluminescência comumente empregada na análise de espécies reduzidas de enxofre, como o dimetilsulfeto. A Espectroscopia de infravermelho e técnicas de transmitância também podem ser utilizadas na detecção de sulfeto<sup>20</sup>.

Um vasto número de procedimentos usando fluxo contínuo foram propostos para a determinação de sulfeto usando quimioluminescência, eletrodos seletivos, detector de emissão molecular em cavidade, difusão gasosa e potenciométrica, fluorimetria, técnica de conversão em espectrofotometria de absorção atômica e difusão gasosa com amperometria. No entanto, grande parte dos métodos mencionados não foram aplicados à análise de amostras reais<sup>62</sup>. Além disso, o tratamento inicial da amostra é normalmente difícil e moroso, devido aos complexos componentes das amostras ambientais<sup>2</sup>. Neste contexto, o desenvolvimento de novos métodos que possibilitem a determinação e quantificação de sulfeto de forma mais simples e menos trabalhosa torna-se atraente e de grande significado. Considerando-se às vantagens da proeminente simplicidade processual, resposta rápida e baixo custo, os sistemas automatizados de análise em fluxo associados ao método espectrofotométrico baseado na produção de azul de etileno apresentam-se como uma alternativa viável na determinação de sulfeto.

## 2.7 Sistemas em fluxo

Inicialmente, surgiu o conceito de sistema em fluxo contínuo segmentado (CFA), o qual apresentou-se como uma opção interessante uma vez que grande maioria das separações e conversões químicas eram efetuadas em meio aquoso. Posteriormente, no início dos anos 70 passaram a ser desenvolvidos sistemas em fluxo (FIA) sem a referida segmentação das amostras, tendência que acabou por consolidar o desenvolvimento de uma nova metodologia denominada Análise por Injeção em Fluxo<sup>78</sup>.

A técnica FIA baseia-se em combinar a injeção da amostra, dispersão controlada e tempo exato. A manipulação reprodutível das zonas de amostra e reagentes através de tempo preciso, e o cálculo quantitativo da concentração do analito sob condições termodinâmicas de não equilíbrio são aspectos básicos do sistema FIA<sup>79</sup>.

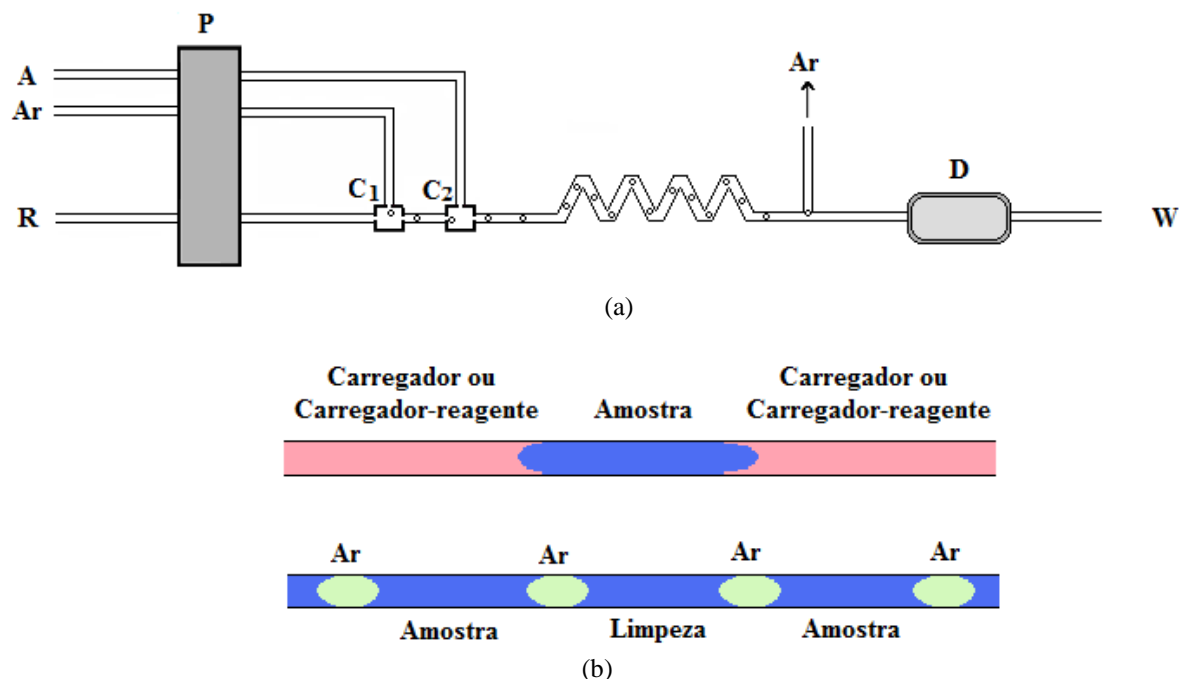
Nos sistema de análise em fluxo, amostras e reagentes são inseridos em um fluxo carregador, geralmente impulsionados através de uma bomba peristáltica numa vazão previamente estudada. A interpenetração da amostra no espaço ocupado pela mesma até o detector proporciona um gradiente de concentração em consequência de um processo de dispersão. Dentre as vantagens desta técnica destacam-se o baixo consumo de reagentes e amostra e alta frequência de amostragem<sup>79</sup>.

Com o desenvolvimento de pesquisas voltadas a análise em fluxo e devido sua viabilidade econômica, estes sistemas passaram por uma evolução e diversificação, tendo hoje ampla possibilidades de configurações de sistemas em fluxo como: Fluxo segmentado SFA, Injeção em fluxo (FIA), Injeção sequencial (SIA), Injeção em fluxo por multicomutação (MCFIA), Multiseringa (MSFIA) e uma nova geração de análise em fluxo. Atualmente, os sistemas em fluxo se destacam, nos mais diferentes ramos da ciência e, principalmente, em química analítica sendo o termo Injeção em Fluxo (FI) também utilizado em conjunção com técnicas analíticas, tais como potenciometria por injeção em fluxo, amperometria por injeção em fluxo, espectrofotometria por injeção em fluxo, etc.

### 2.7.1 Análise em Fluxo Multissegmentado (CFA)

A Figura 5 representa um esquema do sistema de análise em fluxo segmentado (SFA, *Segmented Flow Analysis*), os quais foram baseados no conceito de Skeegs<sup>80</sup>. Como pode ser visto, a amostra é introduzida no sistema e direcionada ao detector pelo transportador. A corrente que flui é segmentada por bolhas de ar que acondicionam a mistura de soluções da amostra e dos reagentes em pequenos volumes no percurso analítico, visando facilitar a mistura e evitar a contaminação entre amostras sucessivamente processadas<sup>38,78</sup>. Propostas empregando a segmentação por diferentes gases e solventes também foram exploradas. Convencionalmente, com o emprego de desborbulhadores, as bolhas de ar podem ser removidas nas proximidades do detector, antes de passarem pelo mesmo.

A SFA foi a primeira técnica implementada em laboratórios que requerem um elevado número de análises. Os métodos de análise em fluxo contínuo segmentado, comercializados com o nome de Autoanalisador pela marca Technicon<sup>®</sup>, foram baseados nos experimentos descritos por Skeggs em 1957<sup>43</sup>.



**Figura 5** - Representação esquemática de um sistema de análise em fluxo segmentado (SFA). (a) Esquema de uma configuração SFA; (b) visão do fluxo segmentado. A, Amostra; R, Reagente; P, Bomba peristáltica; C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>, Confluências; D, Detector; W, Descarte.

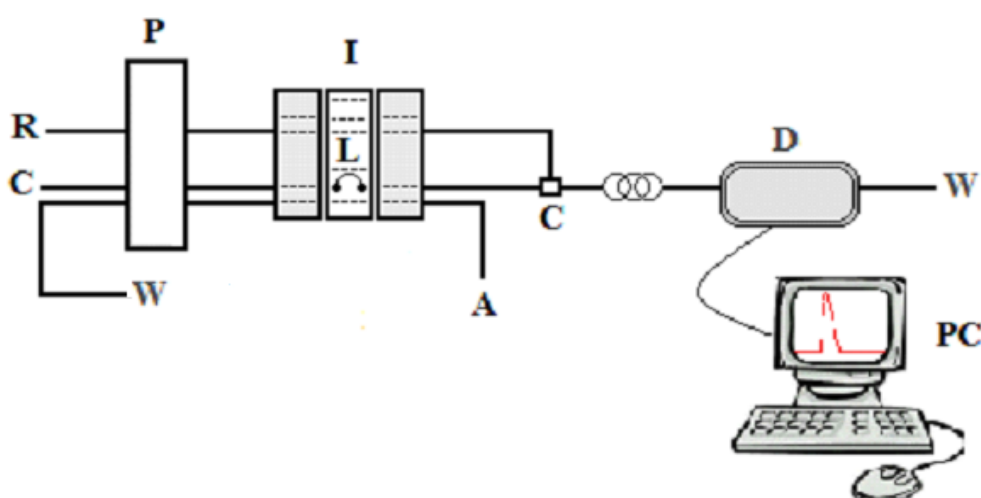
Fonte: CALATAYUD, J. M. (1995, p. 11)<sup>38</sup>.

### 2.7.2 Análise por injeção em fluxo (FIA)

A análise por injeção em fluxo (FIA, Flow Injection Analysis), proposta por Ruzicka e Hansen em 1975<sup>44,80</sup> envolve a injeção rápida de uma amostra em um fluxo contínuo não-segmentado de carregador, sendo as amostras processadas individualmente (amostragem discreta)<sup>78</sup>. A zona de amostra ao ser inserida no fluxo mistura-se com as soluções carregadora e reagente sofrendo dispersão, sendo então direcionada ao detector onde ocorrerão as medidas sendo posteriormente descartada. O volume de amostra injetado, o

comprimento da bobina de reação, as vazões do carregador e reagentes e o diâmetro interno da tubulação são fatores que controlam a dispersão<sup>80</sup>.

Atualmente, os sistemas FIA figuram-se como alternativas atraentes, devido à sua ampla utilização em diversas técnicas como a eletroquímica, espectrometria de absorção atômica<sup>39</sup>, espectrometria de emissão atômica, cromatografia, espectrofotometria, entre outros<sup>38,79</sup>. A Figura 6 apresenta o esquema de um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA)



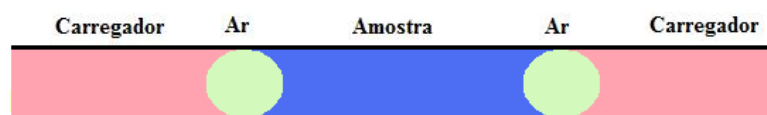
**Figura 6** - Representação esquemática de um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA). P, Bomba peristáltica; R, Reagente; C, Carregador; A, Amostra; I, Injetor Comutador; L, Alça de amostragem; C, Confluência; D, detector; W, Descarte; PC, Registrador.

### 2.7.3 Sistema em fluxo monossegmentado (MSFA)

Na busca por unificar as vantagens inerentes ao FIA como, equipamento de baixo custo, alta frequência de amostragem, leitura em estado não estacionário, com as características interessantes associadas ao CFA, como baixa dispersão, baixo limite de detecção e adequado às reações lentas, em 1985 Pasquini e Oliveira introduziram o conceito de análise em fluxo monossegmentado (MSFA). Nestes sistemas o processamento da amostra-teste pode ser considerado como intermediário entre CFA e FIA, um exemplo denomina-se Análise em Fluxo Monossegmentado (MSFA), no qual a alíquota da amostra injetada é intercalada entre duas bolhas de ar<sup>81</sup>.

Um dos benefícios desta técnica é minimizar significativamente a dispersão da zona da amostra na solução transportadora, o que é importante nas determinações de analitos em baixas concentrações, além de possibilitar uma ampla flexibilidade na alteração dos fatores de otimização, podendo viabilizar a determinação de analitos em diferentes níveis de concentrações. Uma vantagem ainda está no fato de que além da dispersão ser mínima, a mistura das soluções reagentes é homogênea, possibilitando diluições da zona de amostra inserindo-se no monossegmentado volume do reagente em excesso ou outra solução, desde que seja inerte à reação.

No sistema em fluxo monossegmentado a mistura das soluções é inserida e mantida no percurso analítico separada da solução transportadora por duas bolhas de ar, com a zona da amostra formando um único segmento, conforme apresentado na Figura 7. Com o emprego de desborbulhador ou câmara com membrana permeável a gás é possível remover as bolhas de gás nas proximidades do detector antes que estas passem pelo mesmo. Contudo, com o aperfeiçoamento das técnicas de detecção e aquisição de sinais, a necessidade de se retirar bolhas tem sido eliminada.

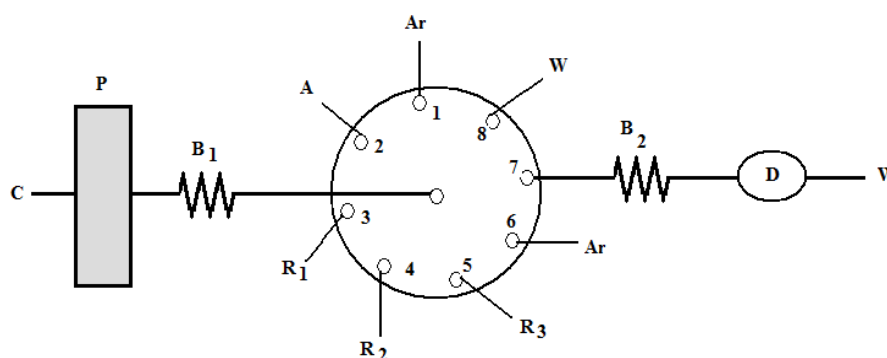


**Figura 7** - Modelo do processo de amostragem no sistema MSFA.

#### 2.7.4 Injeção sequencial (SIA)

Os sistemas baseados em injeção sequencial (SIA, *Sequential Injection Analysis*), surgiram com trabalhos de Ruzicka e Marshall em 1990<sup>45</sup> tendo sido proposto inicialmente para monitoramento de processos industriais, nos quais o equipamento deve funcionar por longo período, sem que seja necessário recalibrações e manutenção frequentes<sup>82</sup>. Seus componentes básicos são um direcionador líquido com um único fluido carregador, uma válvula de seleção multi-posição e um detector. No SIA empregando-se um propulsor de líquidos e um dispositivo de seleção, uma quantidade de zonas não-segmentadas, bem

definidas, é agrupada em uma bobina. No percurso até o detector ocorre a interpenetração entre as zonas de amostra misturando seus componentes, originando assim uma ou mais espécies detectáveis que são então detectados. Estes sistemas destacam-se por sua versatilidade, uma vez que a válvula de seleção de multi-posição permite ao mesmo uma gama de possibilidades de modificação de metodologias<sup>80</sup>. A Figura 8 demonstra uma representação esquemática de um sistema de análise por injeção seqüencial (SIA).



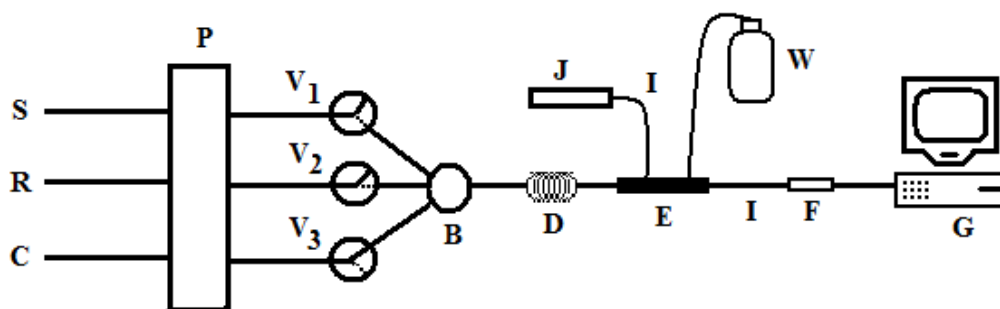
**Figura 8** - Representação esquemática de um sistema de análise por injeção seqüencial (SIA). C, Carregador; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, reagentes; B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, Bobinas; D, Detector; P, Bomba peristáltica.

Fonte: VIEIRA, J. A. et al (1998, p. 258)<sup>93</sup>

### 2.7.5 Injeção em fluxo por multi-comutação (MCFIA)

Comutação pode ser definida como a mudança de um injetor proporcional, ou a mudança nas portas de uma válvula, no ato de inserir amostra e reagentes no percurso analítico. A análise em fluxo por multi-comutação (MCFIA, *Multi-Commutated Flow Injection Analysis*), representada na Figura 9, foi proposta por Reis *et al.* em 1994 e é baseada no uso de válvulas solenóides de comutação rápida. O uso destas válvulas tem crescido nos últimos anos, podendo estas ser implementadas em sistemas de fluxo segmentado e não-segmentado<sup>46</sup>, como uma alternativa as técnicas em fluxo clássicas, como SFA, FIA e SIA<sup>83,94</sup>.





**Figura 9** - Representação esquemática de um sistema de análise em fluxo por multicomutação. C, carregador; S, amostra; R, reagente; P, bomba peristáltica; V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub> e V<sub>3</sub>, válvulas solenóides de três vias; B confluência; D, bobina; E, célula de fluxo; F, Detector; G, computador; W, descarte, I, fibras ópticas J, fonte de radiação.

Fonte: SALAMI, F. H. et al (2009, p. 105)<sup>94</sup>.

### 2.7.6 Outras técnicas de análise em fluxo

Nos últimos anos tem surgido novas técnicas de análise em fluxo, dentre estas destaca-se: a análise por injeção em fluxo multiseringa (MSFIA, *Multi-Syringe Flow Injection Analysis*) proposta em 1999 pelo Grupo de Química Analítica, Automação e Meio Ambiente do Departamento de Química da Universidade das Ilhas Baleares (UIB)<sup>85,95</sup>; Os sistemas Lab-on-valve (LOV) proposto por Ruzicka em 2000<sup>86</sup> e o sistema multibomba (MPFS, *Multi-Pumping Flow System*) proposto por Lapa *et al.*, em 2002<sup>87</sup>.

## 2.8 Sistemas automatizados

Pesquisas são realizadas no sentido de aperfeiçoamento de técnicas e métodos de análise, visando a minimização da intervenção humana na manipulação de soluções e consequentemente, diminuição de erros resultantes de diferentes fontes. O elevado número de amostras laboratoriais em áreas como clínicas e ambientais, aliados a necessidade de técnicas rápidas e confiáveis operando durante longos períodos, levaram a crescente necessidade de automatizar procedimentos analíticos<sup>43</sup>.

A automação dos sistemas de análise em fluxo tem se mostrado atraente por melhorar o desempenho do método. Segundo Pasquini e Faria, quatro pontos nos sistemas FIA são

passíveis de serem automatizados: (1) injeção da amostra, (2) apresentação de amostra para a análise, (3) controle do detector e (4) a aquisição dos dados de interface<sup>81</sup>.

Uma das vantagens marcantes obtidas com automação está na economia, visto que instrumentos automatizados tendem a diminuir os custos no laboratório, oferecem maior reprodutibilidade dos resultados, além de possibilitarem uma velocidade de aquisição maior quando comparado aos sistemas manuais. A melhoria na precisão pode ser conferida a alta reprodutibilidade no tempo das seqüências de operação dos instrumentos automatizados<sup>54</sup>.

## **2.9 Otimização multivariada de processos em Química Analítica**

O desenvolvimento de metodologias analíticas envolve a otimização de diversos parâmetros que afetam a eficiência na determinação do analito. Assim, no desenvolvimento de um procedimento analítico eficiente e reprodutível, a otimização destes parâmetros experimentais de relevância é um passo crucial e possivelmente uma das etapas mais críticas do trabalho científico. Nesta etapa do processo são consumidos tempo e grande quantidade de reagentes e trabalho, principalmente em se tratando de uma otimização univariada.

A técnica univariada convencional, ou seja, o clássico sistema onde se varia um fator por vez, não só consome tempo e reagentes como também negligencia as interações existentes entre os fatores, levando a resultados que podem não corresponder às condições que conduzem ao ótimo verdadeiro, isto porque nos sistemas químicos, os fatores geralmente estão correlacionados, interagindo por meio de mecanismo que geram efeitos sinérgicos e antagonicos. Ao se ignorar tal fato, o processo de otimização apresenta pouco valor<sup>88,89</sup>.

Nos últimos anos, a otimização de métodos analíticos tem passado por mudanças perceptíveis, a utilização de técnicas multivariadas no delineamento experimental vem se difundindo e demonstrando sua utilidade em diversos campos do conhecimento, merecendo destaque os estudos envolvendo processos biotecnológicos, processos químicos, sínteses orgânicas, psicologia e otimização de processos industriais<sup>89</sup>. Na comunidade analítica os procedimentos multivariados estão substituindo os dispendiosos processos univariados<sup>90,91</sup>. Uma das principais características deste método é avaliar simultaneamente a influência de todos os fatores selecionados num sistema, bem como suas interações. Quando comparada a otimização univariada, a multivariada possui como principais vantagens o menor número de experimentos requeridos, menor tempo de execução e menor consumo de reagentes<sup>49</sup>.

Convencionalmente, a otimização multivariada em procedimentos analíticos implica primeiramente na aplicação de um planejamento fatorial e, em seguida, uma função matemática entre a resposta analítica e os fatores significantes do processo são obtidos, e então os valores ótimos são calculados. A função resposta pode ser obtida, aplicando-se planejamentos como a metodologia de superfície de resposta<sup>49</sup>.

### *2.9.1 Planejamentos fatoriais de dois níveis*

Numa etapa inicial, nas investigações preliminares, onde se deseja saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta analítica, e não se está preocupado, ainda, com uma descrição muito rigorosa dessa influência, os planejamentos fatoriais de dois níveis são comumente utilizados. Num planejamento fatorial, a influência de todos os fatores experimentais bem como suas interações, pode ser estudada. Se os fatores são explorados em 2 níveis é comum codificá-los usando os sinais (+), para o nível superior e, (-) para o nível inferior, podendo ser incluído um nível zero (0) como centro nos quais todas os fatores estão em seu valor médio. Com as combinações dos  $k$  fatores investigados em dois níveis, tem-se um planejamento composto de  $2^k$  experimentos.

Os sinais são atribuídos aos níveis superiores ou inferiores de forma aleatória não interferindo na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados, através destes sinais é possível esquematizar o planejamento na forma de matrizes de planejamento, as quais são tabelas utilizadas na organização das informações relacionadas ao desenvolvimento de um planejamento fatorial. Os planejamentos fatoriais de dois níveis para 2, 3 e 4 fatores experimentais estão apresentados na Tabela 1<sup>92</sup>.

**Tabela 1** - Planejamento Fatorial.

Experimento	Fatores Experimentais								
	2 Fatores		3 Fatores			4 Fatores			
	$X_{1a}$	$X_{2a}$	$X_{1b}$	$X_{2b}$	$X_{3b}$	$X_{1c}$	$X_{2c}$	$X_{3c}$	$X_{4c}$
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	+	-	-	+	-	-	-
3	-	+	-	+	-	-	+	-	-
4	+	+	+	+	-	+	+	-	-
5			-	-	+	-	-	+	-
6			+	-	+	+	-	+	-
7			-	+	+	-	+	+	-
8			+	+	+	+	+	+	-
9						-	-	-	+
10						+	-	-	+
11						-	+	-	+
12						+	+	-	+
13						-	-	+	+
14						+	-	+	+
15						-	+	+	+
16						+	+	+	+

A aplicação do planejamento fatorial permite obter informações dos efeitos individuais e das interações de cada fator relacionado ao sistema. Define-se efeito como a mudança ocorrida na resposta quando se passa do nível inferior (-) para o nível superior (+), podendo ser classificado em efeitos principais (aquele causado por um dos fatores) e efeitos de interação (causado pela interação entre fatores, podendo ser de segunda, terceira ou de ordem superior)<sup>49</sup>.

Sabendo-se que o número de experimentos é dado por  $2^k$ , e que o número de ensaios necessários para a execução de um planejamento fatorial completo aumenta rapidamente com  $k$ , pode-se dizer que para seis fatores seriam  $2^6 = 64$  ensaios. Assim, quando se deseja apenas fazer uma triagem inicial de muitos fatores, é vantajoso aplicar um planejamento fatorial

incompleto (fracionário). Os planejamentos fracionários são possíveis e válidos, pois, apesar do número de efeitos de interações de ordem elevada aumentar com o número de fatores, esses efeitos podem ser destituídos de qualquer importância prática por serem, na maioria dos casos, valores pequenos, além disso, quando o número de fatores aumenta, crescem as chances de que um ou mais fatores não afetem significativamente a resposta, seja por meio dos efeitos principais, seja por meio de efeitos de interações<sup>48</sup>.

Os planejamentos fatoriais completos ou fracionários com dois níveis fornecem equações resultantes de primeira ordem (EQUAÇÃO 3) que expressam a relação entre os fatores estudados e a resposta, como segue abaixo:

$$Y = a + bA + cB \quad (3)$$

onde  $Y$  é a resposta experimental,  $A$  e  $B$  representam os fatores a serem otimizados,  $a$  é um termo independente,  $b$  e  $c$  representam coeficientes dos termos lineares. Nestes modelos, torna-se impossível obter condições ótimas experimentais uma vez que os valores obtidos desta equação mostram apenas uma tendência dos efeitos dos fatores na resposta.

As funções polinomiais de segunda ordem, por outro lado, geram maior e melhor informação que os tipos de ordem primária porque elas não apenas determinam a influência dos fatores a serem otimizados sobre a resposta, mas também possibilita a obtenção de um ponto ótimo. Para ser capaz de determinar um ótimo é necessário que a função polinomial contenha termos quadráticos de acordo com a equação quadrática (EQUAÇÃO 4) demonstrada abaixo.

$$Y = a + bA + cB + dA^2 + eB^2 + fAB \quad (4)$$

onde,  $d$  e  $e$  são os coeficientes dos termos quadráticos e  $f$  é o coeficiente do termo de interação.

Visando obter a condição ótima experimental e de posse dos resultados obtidos na etapa de triagem, realizam-se planejamentos mais completos que fornecem equações quadráticas. Os dois principais planejamentos utilizados são: (a) planejamento  $2^2$  com ponto central mais estrela, também conhecido como planejamento estrela<sup>49</sup> e (b) planejamento ou

matriz de Doehlert<sup>96</sup>. A aplicação destes planejamentos, inclui um grupo de técnicas matemáticas/estatísticas, que permite selecionar a combinação de níveis ótimos na obtenção da melhor resposta para uma dada situação através de modelos matemáticos de segunda ordem.

### 2.9.2 Metodologia de Superfície de Resposta

A Metodologia de Superfície de Resposta (SMR, do inglês *Surface Response Methodology*) compreende um conjunto de procedimentos estatísticos usados na modelagem matemática de respostas e é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais<sup>49</sup>. Para descrever o sistema em estudo são usados Funções polinomiais lineares ou quadráticas as quais fornecem condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização<sup>48</sup>.

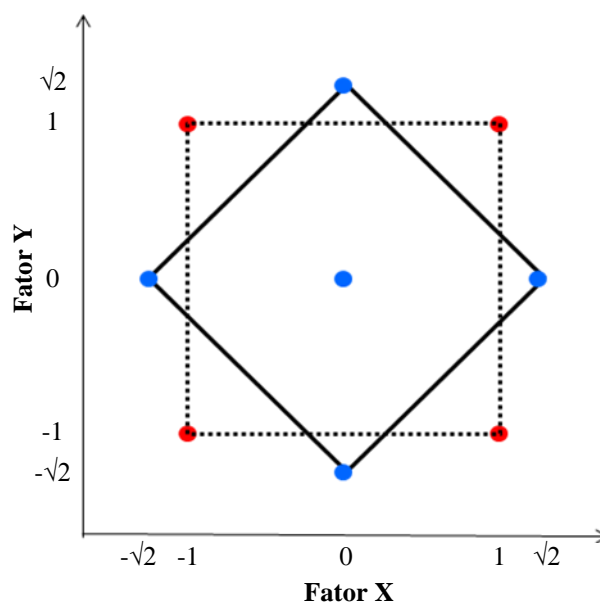
Alguns critérios são desejáveis a um planejamento experimental construído para estimar coeficientes, este deve proporcionar boas estimativas para todos os coeficientes, exigindo poucos experimentos e, fornecer condições de avaliação dos coeficientes e do modelo, ou seja, da regressão e da falta de ajuste. As classes de planejamentos mais utilizadas para o ajuste de modelos quadráticos são Composto Central “CCD - Central Composite Design” e Doehlert, visto que apresentam todos os critérios descritos acima, dentre outros<sup>48</sup>.

#### 2.9.2.1 Planejamento $2^2$ com ponto central mais estrela

Apresentados por Box e Wilson, em 1951, os planejamentos compostos centrais (CCD), foram considerados uma evolução dos planejamentos  $3^3$ , que necessitavam de muitos experimentos para um pequeno número de fatores, mesmo para planejamentos fracionários. Na sua construção faz-se necessário definir o número de fatores em estudo ( $k$ ), qual planejamento fatorial será empregado (completo  $2k$  ou fracionário  $2k-b$ ) e quantos experimentos serão realizados no ponto central ( $2k$ ), sendo o número de experimentos a ser realizado dado por  $2k+2k+1$ <sup>48</sup>.

O planejamento estrela é aplicado quando experimentos prévios do tipo  $2^2$  com ponto central mostram os melhores resultados na região central do planejamento, podendo este

também ser aplicado diretamente desde que se conheça bem o sistema. Assim, deslocamentos são repetidos tantas vezes quanto forem necessários, com o objetivo de atingir uma região ótima na parte central do planejamento. Ainda, neste planejamento cinco níveis são avaliados para cada variável estudada resultando num número total de 11 experimentos (com triplicada no ponto central). Na Figura 10 são ilustrados os pontos experimentais (escalas codificadas) envolvendo dois fatores para o planejamento  $2^2$  com ponto central mais estrela.



**Figura 10** - Distribuição dos pontos experimentais do planejamento  $2^2$  com ponto central mais estrela.

#### 2.9.2.2 Planejamento de Doehlert

Discutiu-se até então desenhos simétricos, ou seja, aqueles que possuem o mesmo número de níveis para cada fator em estudo. No entanto, em algumas situações é vantajoso usar desenhos em que diferentes fatores são estudados em diferentes números de níveis<sup>97</sup>. Proposto por David H. Doehlert em 1970, o planejamento Doehlert ou matriz de Doehlert<sup>98</sup>, possui uma importante propriedade com respeito ao número de níveis que cada fator possui. Com quatro fatores, por ex., o número de níveis é 5, 7, 7 e 3, assim é possível avaliar os fatores considerados mais importantes, ou seja, que apresentam efeitos mais pronunciados em um número maior de pontos do espaço estudado<sup>48</sup>.

O planejamento Doehlert apresenta ainda maior eficiência ( $\phi$ ). Este valor pode ser facilmente determinado dividindo-se o número de coeficientes da equação quadrática ( $p$ ) pelo

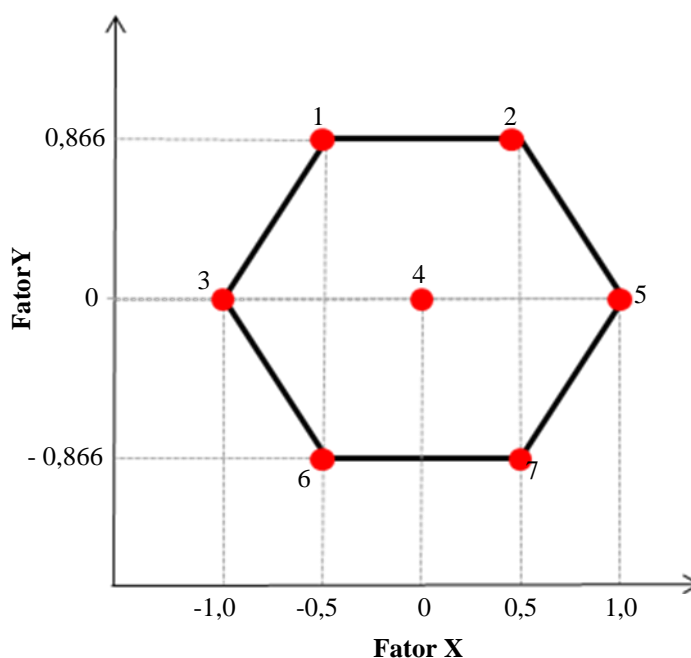
número de experimentos (N) requeridos no experimento<sup>99</sup>. Para um planejamento Doehlert com 3 fatores ( $k = 3$ ), são necessários 13 experimentos. Como p (numero de coeficientes) é 10, o valor de eficiência é de 0,77. Já no planejamento Composto Central para um mesmo numero de fatores ( $k = 3$ ), o N é 15 e p = 10 obtendo assim uma eficiência de 0,67<sup>90</sup>. Para modelos de segunda ordem onde a otimização envolve três fatores ( $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ ) e uma resposta experimental (Y) os dados experimentais ajustam a Equação 5:

$$Y = b_0 + b_1(X_1) + b_2(X_2) + b_3(X_3) + b_4(X_1)^2 + b_5(X_2)^2 + b_6(X_3)^2 + b_7(X_1)(X_2) + b_8(X_1)(X_3) + b_9(X_2)(X_3) \quad (5)$$

onde, (Y) é a resposta experimental, ( $b_0$ ) é o termo constante, ( $b_1$ ), ( $b_2$ ), e ( $b_3$ ) são coeficientes do termo linear, ( $b_4$ ), ( $b_5$ ), e ( $b_6$ ) são coeficientes do termo quadrático, e ( $b_7$ ), ( $b_8$ ), e ( $b_9$ ) são coeficientes de interação entre os três fatores.

Em suma, o planejamento Doehlert mostra-se mais adequado e vantajoso em detrimento ao planejamento estrela devido ao menor número de experimentos requeridos e à possibilidade de empregar um número maior e mais extenso de níveis para aqueles fatores mais significativos ou problemáticos. O planejamento fatorial em conjunto com matriz de Doehlert vem sendo empregado como uma ferramenta estatística importante no desenvolvimento de métodos analíticos envolvendo a otimização destes sistemas. A Figura 11 representa a distribuição dos pontos para o planejamento Doehlert com dois fatores.





**Figura 11** - Distribuição dos pontos experimentais de uma matriz Doehlert para otimização de duas fatores representado por um hexágono regular.

Na construção do modelo o número de experimentos ( $N$ ) necessários é dado por  $K^2 + C_0$  onde  $K^2$  é o número de fatores e  $C_0$  é o número de experimentos no ponto central. Cada modelo é definido de acordo com o número de fatores e os valores codificados da matriz experimental, sendo a relação entre os valores codificados e os reais dado pela Equação 6<sup>98</sup>. A Tabela 2 demonstra os valores codificados das matrizes do planejamento Doehlert para dois, três e quatro fatores.

$$C_i = \frac{(X_i - X_i^0)\alpha}{\Delta X_i} \quad (6)$$

onde o  $C_i$  é o valor codificado para o nível do fator  $i$ ,  $X_i$  é o seu valor experimental,  $X_i^0$  é o valor experimental no ponto central,  $\Delta X_i$  é a distância entre o valor experimental no ponto central e o experimental no nível superior ou inferior e  $\alpha$  é o valor limite codificado para cada fator.

**Tabela 2** - Matrizes Doehlert para dois, três e quatro fatores <sup>92</sup>.

<b>Fatores Experimentais – Matriz de Doehlert</b>									
	<b>2 Fatores</b>		<b>3 Fatores</b>			<b>4 Fatores</b>			
	$X_{1a}$	$X_{2a}$	$X_{1b}$	$X_{2b}$	$X_{3b}$	$X_{1c}$	$X_{2c}$	$X_{3c}$	$X_{4c}$
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	1	0	0	1	0	0	0
3	0,5	0,866	0,5	0,866	0	0,5	0,866	0	0
4	-1	0	0,5	0,289	0,817	0,5	0,289	0,817	0
5	-0,5	-0,866	-1	0	0	0,5	0,289	0,204	0,791
6	0,5	-0,866	-0,5	-0,866	0	-1	0	0	0
7	-0,5	0,866	-0,5	-0,289	-0,817	-0,5	-0,866	0	0
8			0,5	-0,866	0	-0,5	-0,289	-0,817	0
9			0,5	-0,289	-0,817	-0,5	-0,289	-0,204	-0,791
10			-0,5	0,866	0	0,5	-0,866	0	0
11			0	0,577	-0,817	0,5	-0,289	-0,817	0
12			-0,5	0,289	0,817	0,5	-0,289	-0,204	-0,791
13			0	-0,577	0,817	-0,5	0,866	0	0
14						0	0,577	-0,817	0
15						0	0,577	-0,204	-0,791
16						-0,5	0,289	0,817	0
17						0	-0,577	0,817	0
18						0	0	0,613	-0,791
19						-0,5	0,289	0,204	0,791
20						0	-0,577	0,204	0,791
21						0	0	-0,613	0,791

A resposta experimental obtida a partir dos planejamentos citados acima fornece uma função polinomial que pode ser perfeitamente empregada na construção das superfícies de resposta. Para obter as condições de ótimo a partir destas superfícies, basta derivar a equação obtida do planejamento em função do fator de interesse e igualá-la a zero. Contudo, outra alternativa mais apurada de averiguação da existência de pontos máximo ou mínimo sobre a superfície de resposta se dá por meio do critério de Lagrange<sup>92</sup>.

### 2.9.3 Critério de Lagrange

O critério de Lagrange é baseado no cálculo da determinante de Hessian para Y, que para o caso de dois fatores A e B é dado pela Equação 7:

$$H(A, B) = \left( \frac{\partial^2 Y}{\partial A^2} \right) \left( \frac{\partial^2 Y}{\partial B^2} \right) - \left( \frac{\partial^2 Y}{\partial A \partial B} \right)^2 \quad (7)$$

Quando o valor da determinante é maior que zero, ou seja,  $H(a_0, b_0) > 0$  e, ainda,  $\delta^2 Y / \delta A^2 (a_0, b_0) < 0$ , tem-se um ponto crítico  $(a_0, b_0)$  máximo, porém, ele é mínimo se  $H(a_0, b_0) > 0$  e  $\delta^2 Y / \delta A^2 (a_0, b_0) > 0$ . Já uma sela existe se  $H(a_0, b_0) < 0$ .

Considerando a presença de um máximo sobre a superfície, os pontos ótimos são encontrados pela resolução do sistema de equação, conforme mostrado pela Equação 8.

$$\frac{\partial Y}{\partial A} = 0 \quad \text{e} \quad \frac{\partial Y}{\partial B} = 0 \quad (8)$$

Devido à complexidade dos cálculos envolvidos, emprega-se um programa estatístico para processar os dados analíticos obtidos nos ensaios baseados na matriz de planejamento Doehlert, visando a:

- obtenção da equação que representa o modelo estatístico;
- elaboração dos gráficos das superfícies de resposta;
- análise da função da superfície de resposta a partir do Critério de Lagrange; e
- determinação das coordenadas do ponto crítico.

### 3 JUSTIFICATIVA

A determinação de compostos de enxofre é reconhecidamente importante para inferir sobre o ecossistema, porém os métodos para a determinação, em particular para sulfeto, são morosos e de difícil execução. Embora bem conhecida, a reação do azul de metileno é frequentemente aplicada em métodos “off-line”. Assim, o presente trabalho visou desenvolver um método alternativo que permite as determinações de sulfeto, desde o preparo da amostra, até a leitura do sinal em sistemas “*in-line*”. Cabe lembrar que todo o processo de otimização dos fatores pertinentes ao sistema foi realizado por meio de técnicas multivariadas.

Esta dissertação está inserida em um projeto maior, em andamento: Avaliação do aporte de Nutrientes e de metais tóxicos e suas relações com a biodiversidade das comunidades planctônicas e bentônicas nos tributários do reservatório da UHE de Furnas MG (Braço Sapucaí).

## 4 OBJETIVOS

Nesse estudo objetivou-se o desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de sulfeto em amostras de água, com tratamento da amostra “in-line”. Foram explorados a reação de Fisher, sistema em fluxo multissegmentado integrado a um minireator utilizando como técnica de quantificação a espectrofotometria molecular na região visível e técnicas multivariadas (planejamento fatorial e matriz de Doehlert) na otimização. Por fim o método foi empregado na determinação de sulfeto em amostras de água da UHE de Furnas MG (Braço Sapucaí).

## 5 PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Instrumentação e acessórios

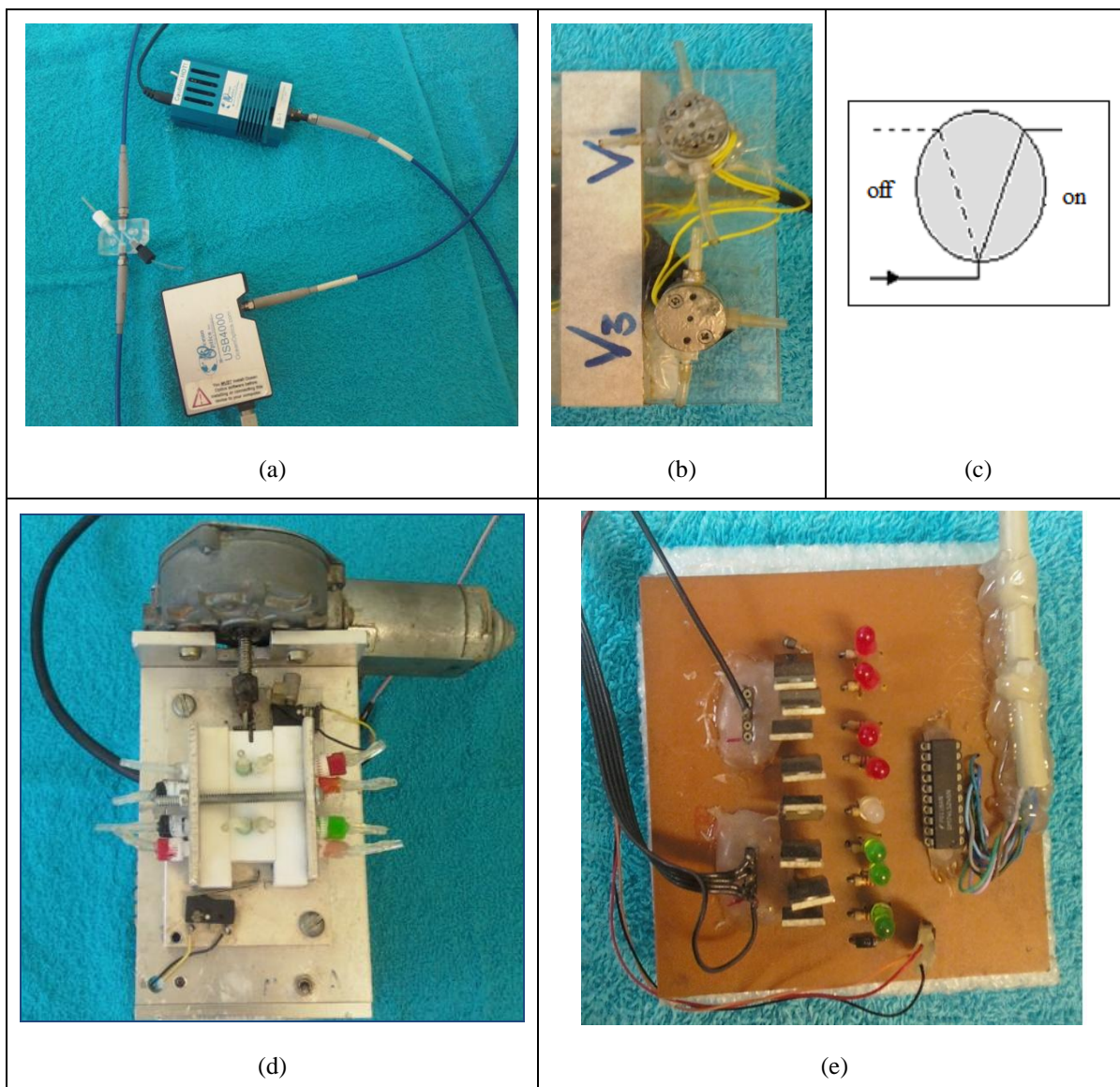
As medidas no sistema de análise em fluxo multissegmentado foram efetuadas utilizando um espectrofotômetro modelo USB 4000 (FIGURA 12(a)) Ocean Optics (UV – Visível), equipado com fibra óptica, lâmpada de tungstênio e uma cela de fluxo com 1,0 cm de caminho ótico. A aquisição de dados foi realizada por meio do *Software Spectroscopy Spectra Suíte* e os registros feitos em um microcomputador PC.

Para propulsão dos fluidos empregou-se uma bomba peristáltica Ismatec (Zurique-Suíça) ISM931C de oito canais contendo tubos de Tygon<sup>®</sup> de diferentes diâmetros. Tubos de polietileno de 0,8 e 1,2 mm de diâmetro interno também foram utilizados na interconexão e condução dos fluidos.

Um conjunto com duas válvulas solenóides de três vias *Incorporated Research* (NR) foi usado na multicomutação. Este tipo de válvula possui duas posições: “on” e “off”, as quais permitem a conexão de um canal comum a dois diferentes canais de entrada e saída [FIGURA 12(b) e 12(c)], mediante a ativação ou desativação do solenóide. A incorporação destas válvulas ao sistema proposto permite a injeção precisa de volumes bem definidos de reagentes, bem como a reprodutibilidade nos tempo de limpeza, uma vez que a programação das válvulas é pré-estabelecida de acordo com as necessidades do sistema, além de permitir o retorno dos reagentes aos seus respectivos reservatórios nas etapas em que estes não são necessários.

A Figura 12 (d) apresenta o injetor comutador automatizado feito em Teflon<sup>®</sup>, o qual também compõe o sistema proposto e é controlado através da interface paralela, sendo esta interface também responsável pelo controle do sistema eletrônico [Figura 12(e)], montado no próprio laboratório de pesquisa, cuja função era acionar ou desligar as válvulas solenóides mencionadas anteriormente.

Outros acessórios como: Sistema desionizador Mili – Q Academic (Millipore<sup>®</sup>); frascos Eppendorf<sup>®</sup>; Cubetas de acrílico e vidrarias de grau analítico foram necessários para a execução deste projeto.



**Figura 12** - (a) Detector empregado e acessórios: Espectro USB 4000 (UV – Visível), fonte de luz, fibra óptica e cela de fluxo em Z; (b) Detalhe da placa com 2 válvulas solenóides (3 vias); (c) Representação esquemática de uma válvula solenóide de 3 vias: “on” Solenóide ligado; “off” Solenóide desligado; (d) Injetor comutador automatizado; (e) Circuito eletrônico.

## 5.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados na execução deste trabalho foram de grau analítico e todas as soluções preparadas em água desionizada em sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Brasil). A fim de minimizar contaminações das amostras, todas as vidrarias foram mantidas em solução de  $\text{HNO}_3$  10% v/v durante 24h, posteriormente estas foram enxaguadas com água deionizada e secas em ambiente livre de poeira.

As soluções ácidas de DEPD (Fluka) foram preparadas pela dissolução em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e as soluções ácidas de  $\text{Fe}^{3+}$  pela dissolução do  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich) também em  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Soluções de  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{F}$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  foram preparadas para os testes de interferência. A solução contida no minireator ( $\text{HCl}$   $6 \text{ mol L}^{-1}$ ) foi preparada por diluição do ácido concentrado e soluções de acetato de zinco por dissolução  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  PA cristal em água. A solução padrão estoque de sulfeto ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi preparada diariamente em  $\text{NaOH}$  ( $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ ) visando sua preservação e, posteriormente, foi padronizada como descrito em APHA<sup>4</sup>. As soluções de trabalho também foram preparados em  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{NaOH}$  pela diluição apropriada da solução estoque.

### 5.3 Estudos preliminares

#### 5.3.1 Varredura espectral

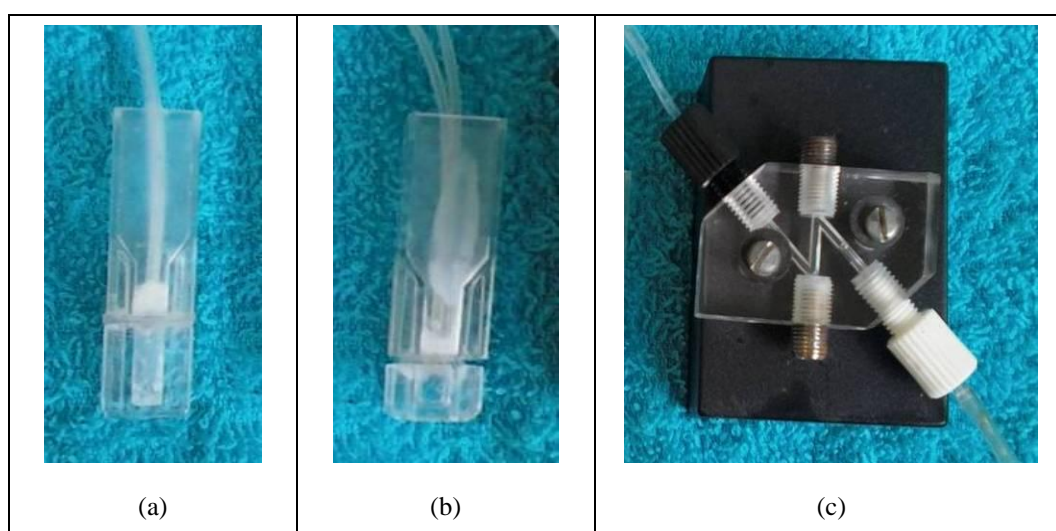
Efetuiu-se uma varredura espectral de 550 a 800 nm com intuito de avaliar o perfil de absorção do azul de etileno. Este estudo foi realizado usando soluções de  $\text{FeCl}_3$   $0,022 \text{ mol L}^{-1}$ , DEPD  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  ambas preparadas em meio  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  e sulfeto  $5 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{NaOH}$   $0,025 \text{ mol L}^{-1}$  e sistema FIA em linha única. De maneira a distinguir se o sinal gerado estava sendo afetado por contaminação proveniente dos próprios reagentes, fez-se a leitura do branco das soluções.

#### 5.3.2 Construção das celas de fluxo

A partir de cubetas quadradas de acrílico, construiu-se 2 celas de fluxo de volumes distintos e caminho óptico de 1 cm, para tanto foram usados tubos de Tygon<sup>®</sup> e tubos de polietileno que permitiram a entrada e saída do fluxo [FIGURA 13 (a) e 13 (b)], as cubetas foram então vedadas com resina acrílica. Cabe lembrar, que a cela de fluxo em Z [FIGURA 13 (c)] é vendida comercialmente e possui volume de  $7,85 \mu\text{L}$ .



Com o objetivo de avaliar o desempenho das celas de fluxo construídas e da cela em Z comercial e selecionar a melhor para o estudo, ou seja, aquela que forneceria uma maior resposta analítica efetuou-se testes usando sistema FIA em linha única, mantendo as seguintes condições experimentais: espectrofotômetro de fibra óptica Ocean Optics USB 4000; comprimento de onda 666 nm; bobina reacional de 250  $\mu\text{L}$ ; carregador,  $\text{H}_2\text{O}$ , vazão de 2  $\text{mL min}^{-1}$ ; alça de amostragem de 250  $\mu\text{L}$ ; amostra: solução padrão de azul de metileno  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .



**Figura 13** - Celas de fluxo: (a) 0,48 mL; (b) 0,24 mL; (c) cubeta em Z -  $7,85 \cdot 10^{-3}$  mL.

### 5.3.3 Construção do minireator

Inicialmente, construiu-se minireatores de diversos volumes a fim de selecionar o minireator a ser empregado no estudo. No procedimento de elaboração dos mesmos utilizou-se tubos tipo eppendorf de tampas rosqueadas com volumes de 1,7, 2,5 e 2,7 mL. Perfurou-se a tampa dos tubos em 3 pontos inserindo 2 tubos de polietileno de 0,8 mm e 1 tubo de 1,2 mm, os quais permitiram a entrada de amostra e nitrogênio, bem como a saída de gás do minireator e limpeza do mesmo. Posteriormente, os tubos foram vedados com resina epóxi (Araldite<sup>®</sup> HOBBY Cola Epóxi Brascola). Visando obter um minireator de volume 1,5 mL, cortou-se a parte inferior de um tubo de 1,7 mL, vedando o mesmo com Araldite<sup>®</sup> e usando como suporte a tampa de outro tubo. A Figura 14 apresenta os minireatores construídos.

Avaliou-se o desempenho dos minireatores utilizando o sistema de análise em fluxo multissegmentado demonstrado na Figura 15. As condições experimentais foram: amostra, 350  $\mu\text{L}$  de sulfeto  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ; 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$ ; vazão de nitrogênio em  $400 \text{ mL min}^{-1}$ , vazão de DEPD ( $\text{VR}_1$ ) bem como a de  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{VR}_2$ ) em  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  e vazão na saída da cubeta em  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ .



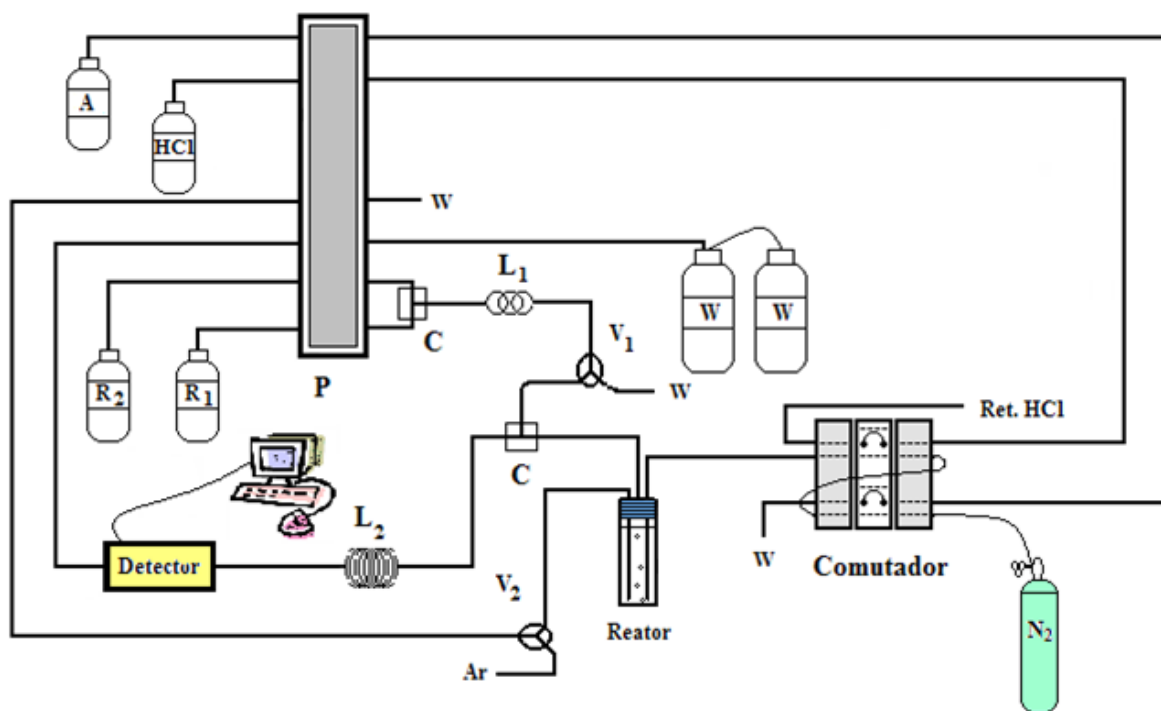
**Figura 14** - Fotos dos minireatores testados: 1- 1,7 mL; 2- 2,7 mL; 3-1,5 mL e 4- 2,5 mL.

#### 5.4 Sistema de análise em fluxo multissegmentado

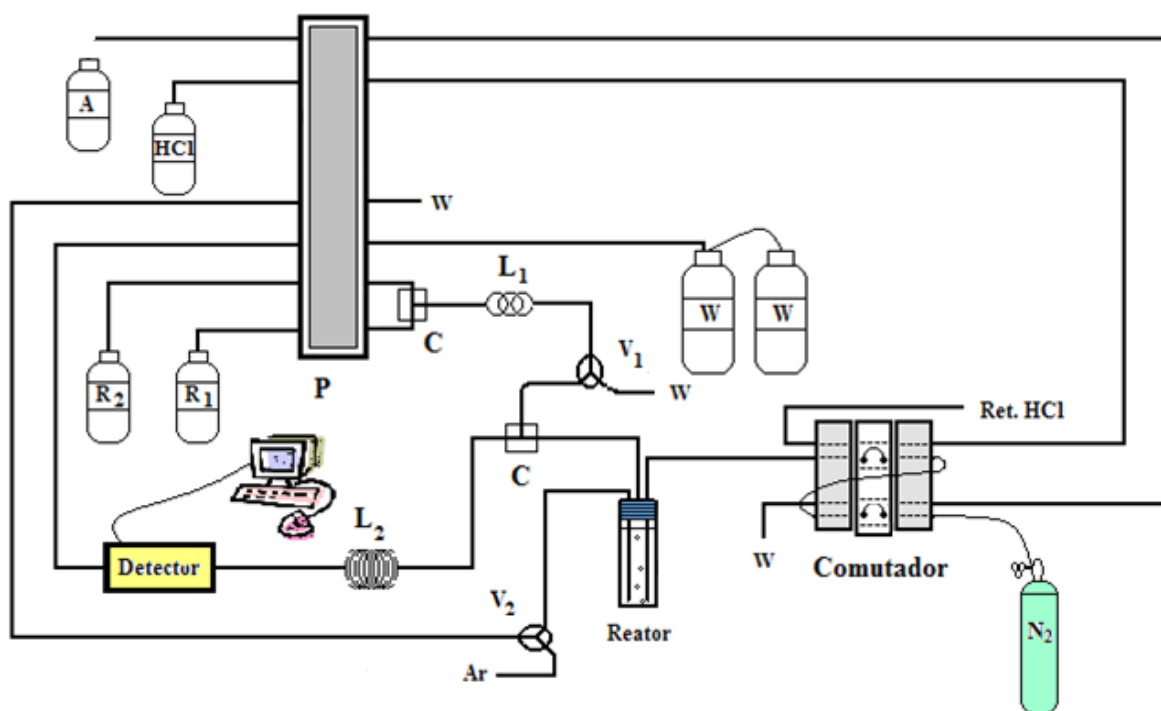
O diagrama esquemático do sistema de análise em fluxo multissegmentado para determinação de sulfeto com tratamento de amostra *in line* é mostrado na Figura 15. A válvula solenóide 1 funciona constantemente alternando seu status nos tempos de 2 segundos na posição ligada (inserção do reagente cromogênico) e doze segundos na posição desligada (inserção do gás), esta válvula propicia a formação de um fluxo segmentado necessário para a difusão de gás sulfídrico ao reagente cromogênico. A Tabela 3 apresenta as etapas do programa elaborado para o sistema proposto. Na primeira etapa a válvula ( $\text{V}_2$ ) encontra-se desligada e o comutador na posição de amostragem [FIGURA 15(a)] nessa situação ocorre o preenchimento das alças de amostra e de ácido bem como a finalização da limpeza do sistema referente aos resíduos gasosos do ciclo anterior. Na etapa 2, a válvula 2 continua desligada e o comutador passa para a posição de inserção [FIGURA 15(b)], então ocorre a leitura do sinal. Na etapa 3, aciona-se a válvula 2 propiciando a limpeza do minireator retirando-se o conteúdo líquido desse e finalizando o ciclo de amostragem/leitura.

**Tabela 3** - Etapas do sistema proposto.

<b>Etapas</b>	<b>Descrição</b>	<b>V<sub>2</sub></b>	<b>Comutador</b>	<b>Tempo/s</b>
<b>1</b>	Amostragem/Limpeza	Desligada	Desligado	80
<b>2</b>	Inserção / Leitura	Desligada	Ligado	180
<b>3</b>	Limpeza do minireator	Ligada	Ligado	40



(a)



(b)

**Figura 15** - Modelo esquemático do sistema de análise em fluxo multissegmentado proposto para determinação de sulfeto. (a) etapa de amostragem; (b) posição de inserção de amostra. Amostra; HCl, Solução do reator ( $6 \text{ mol L}^{-1}$ ); R<sub>1</sub>, DEPD  $4,09 \text{ g L}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; R<sub>2</sub>,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; P - Bomba Peristáltica; L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub> - bobinas; C - confluência; V<sub>1</sub> e V<sub>2</sub> - válvulas solenóides; W - descarte contendo acetato de zinco 3% (m/v); N<sub>2</sub>,  $400 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

## 5.5 Procedimento de otimização

Os fatores pertinentes ao sistema proposto são: concentração do DEPD ( $CR_1$ ), concentração de  $Fe^{3+}$  ( $CR_2$ ), vazão do nitrogênio ( $VN_2$ ), concentração de  $H_2SO_4$  nos reagentes ( $CAR$ ), volume da alça de amostragem ( $AA$ ), volume da alça de HCl ( $AHCl$ ), volume da bobina dos reagentes ( $B_1$ ), volume da bobina reacional ( $B_2$ ), temporização da válvula solenóide ( $TV_1$ ), concentração de HCl no reator, vazão na saída da cubeta ( $VC$ ) e vazão de DEPD ( $VR_1$ ) e  $Fe^{3+}$  ( $VR_2$ ). Entretanto, investigar com esse elevado número de fatores seria inviável, desta forma efetuou-se uma revisão bibliográfica buscando a possibilidade de fixar alguns fatores, no intuito de diminuir o número de experimentos no estudo. Assim, em todo processo de otimização utilizou-se o sistema de análise em fluxo multissegmentado descrito na Figura 15, mantendo-se as seguintes condições: Solução de  $5\text{ mg L}^{-1}$  de sulfeto preparada diariamente e previamente padronizada, volume da alça e a concentração de HCl em  $100\text{ }\mu\text{L}$  e  $6\text{ mol L}^{-1}$  respectivamente, vazão de nitrogênio em  $400\text{ mL min}^{-1}$ , vazão de DEPD ( $VR_1$ ) bem como a de  $Fe^{3+}$  ( $VR_2$ ) em  $0,5\text{ mL min}^{-1}$  e vazão na saída da cela de fluxo em  $2,5\text{ mL min}^{-1}$ .

O parâmetro utilizado como resposta analítica foi a área de pico. Os dados experimentais foram processados usando-se o programa *STATISTICA 7.0* (StatSoft, Tulsa, USA), estabelecendo significância estatística com nível de confiança 95%. A otimização do sistema proposto utilizou um planejamento fatorial fracionário  $2^{7-3}$  seguido pela Matriz de Doehlert. Estes experimentos foram realizados em duplicata e em ordem aleatória.

### 5.5.1 Planejamento fatorial de dois níveis

Os fatores selecionados para estudo foram: concentração do DEPD, concentração de  $Fe^{3+}$ , concentração de  $H_2SO_4$  nos reagentes, alça de amostragem ( $AA$ ), volume da bobina dos reagentes, volume da bobina reacional ( $B_2$ ), temporização da válvula solenóide ( $TV_1$ ). O efeito dos 7 fatores selecionados foram investigados utilizando-se o planejamento fatorial fracionário  $2^{7-3}$  envolvendo 16 experimentos em duplicata, cuja combinação dos níveis e matriz do planejamento encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4** - Níveis dos fatores no planejamento fracionário  $2^{7-3}$ 

Sigla	Fator	Níveis	
		Mínimo (-)	Máximo (+)
CR <sub>1</sub>	Concentração DEPD (g L <sup>-1</sup> )	1,5	3,0
CR <sub>2</sub>	Concentração FeCl <sub>3</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	0,03	0,12
CAR	Concentração H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> nos reagentes (mol L <sup>-1</sup> )	0,05	0,5
AA	Alça de amostragem (μL)	500	1000
B <sub>1</sub>	Bobina dos reagentes (μL)	150	350
B <sub>2</sub>	Bobina reacional (μL)	200	700
TV <sub>1</sub>	Temporização de V <sub>1</sub> (seg)	2	4

Ensaio	CR <sub>1</sub>	CR <sub>2</sub>	CAR	AA	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	TV <sub>2</sub>
1	- (1,5)	- (0,03)	- (0,05)	- (500)	- (150)	- (200)	- (2)
2	+ (3,0)	- (0,03)	- (0,05)	- (500)	+ (350)	- (200)	+ (4)
3	- (1,5)	+ (0,12)	- (0,05)	- (500)	+ (350)	- (200)	- (2)
4	+ (3,0)	+ (0,12)	- (0,05)	- (500)	- (150)	+ (700)	+ (4)
5	- (1,5)	- (0,03)	+ (0,5)	- (500)	+ (350)	+ (700)	+ (4)
6	- (1,5)	- (0,03)	+ (0,5)	- (500)	- (150)	+ (700)	- (2)
7	+ (3,0)	+ (0,12)	+ (0,5)	- (500)	- (150)	- (200)	+ (4)
8	- (1,5)	+ (0,12)	+ (0,5)	- (500)	+ (350)	- (200)	- (2)
9	+ (3,0)	- (0,03)	- (0,05)	+ (1000)	- (150)	+ (700)	+ (4)
10	- (1,5)	- (0,03)	- (0,05)	+ (1000)	+ (350)	+ (700)	- (2)
11	+ (3,0)	+ (0,12)	- (0,05)	+ (1000)	+ (350)	- (200)	+ (4)
12	- (1,5)	+ (0,12)	- (0,05)	+ (1000)	- (150)	- (200)	- (2)
13	- (1,5)	- (0,03)	+ (0,5)	+ (1000)	+ (350)	- (200)	- (2)
14	+ (3,0)	- (0,03)	+ (0,5)	+ (1000)	- (150)	- (200)	+ (4)
15	- (1,5)	+ (0,12)	+ (0,5)	+ (1000)	- (150)	+ (700)	- (2)
16	+ (3,0)	+ (0,12)	+ (0,5)	+ (1000)	+ (350)	+ (700)	+ (4)

Os valores entre parênteses expressam os níveis reais dos fatores estudados.

### 5.5.2 Planejamento Doehlert

De posse da significância estatística dos fatores investigados no planejamento  $2^{7-3}$ , um planejamento Doehlert para três fatores ( $CR_1$ ,  $CR_2$  e CAR) foi realizado empregando RSM para otimização final do método. Os níveis para a montagem do planejamento de Doehlert foram escolhidos tendo em vista a revisão bibliográfica realizada, o conhecimento químico do sistema e sua viabilidade. A Tabela 5 apresenta os níveis reais e codificados da matriz de Doehlert para três fatores e a Tabela 6 descreve o planejamento de Doehlert utilizado na otimização do sistema de análise em fluxo multissegmentado para determinação *in-line* de sulfeto.

**Tabela 5** - Níveis codificados e reais da matriz de Doehlert para três fatores.

Fatores		Níveis Codificados e Reais					
$CR_1$ (g L <sup>-1</sup> )		-1 (3)	-0,5 (3,5)	0 (4)	0,5 (4,5)	1 (5)	
$CR_2$ (mol L <sup>-1</sup> )	-0,866 (0,010)	-0,577 (0,015)	-0,289 (0,020)	0 (0,025)	0,289 (0,030)	0,577 (0,035)	0,866 (0,040)
CAR (mol L <sup>-1</sup> )			-0,817 (0,02)	0 (0,04)	0,817 (0,06)		

Valores entre parênteses correspondem aos níveis reais.

**Tabela 6** - Matriz de Doehlert para três fatores.

<i>Ensaio</i>	<i>Fatores</i>		
	$CR_1$ (g L <sup>-1</sup> )	$CR_2$ (mol L <sup>-1</sup> )	CAR (mol L <sup>-1</sup> )
<b>1</b>	0 (4,0)	0 (0,025)	0 (0,04)
<b>2</b>	0 (4,0)	0 (0,025)	0 (0,04)
<b>3</b>	0 (4,0)	0 (0,025)	0 (0,04)
<b>4</b>	1 (5,0)	0 (0,025)	0 (0,04)
<b>5</b>	0,5 (4,5)	0,866 (0,04)	0 (0,04)
<b>6</b>	0,5 (4,5)	0,289 (0,030)	0,817 (0,06)
<b>7</b>	-1 (3,0)	0 (0,025)	0 (0,04)
<b>8</b>	-0,5 (3,5)	-0,866 (0,010)	0 (0,04)
<b>9</b>	-0,5 (3,5)	-0,289 (0,020)	-0,817 (0,02)
<b>10</b>	0,5 (4,5)	-0,866 (0,010)	0 (0,04)
<b>11</b>	0,5 (4,5)	-0,289 (0,020)	-0,817 (0,02)
<b>12</b>	-0,5 (3,5)	0,866 (0,04)	0 (0,04)
<b>13</b>	0 (4,0)	0,577 (0,035)	-0,817 (0,02)
<b>14</b>	-0,5 (3,5)	0,289 (0,030)	0,817 (0,06)
<b>15</b>	0 (4,0)	-0,577 (0,015)	0,817 (0,06)

### 5.6 Estudo de interferentes no método proposto

Avaliou-se a influência de concomitantes no sistema de análise em fluxo multissegmentado por meio da comparação do sinal analítico obtido para uma solução padrão de sulfeto 300 µg L<sup>-1</sup> com aquela contendo concomitantes em concentrações inferiores e superiores ao nível estabelecido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)<sup>57</sup>, e quando estes níveis não eram estabelecidos pelo órgão regulamentador adicionou-se duas concentrações diferentes do concomitante.



Testou-se a interferência dos principais compostos comumente presentes em águas, avaliando-se também alguns compostos que embora não sejam encontrados normalmente foram estudados com a finalidade de se obter mais dados a respeito do sistema proposto. A Tabela 7 apresenta os concomitantes analisados.

**Tabela 7** - Concentração dos concomitantes estudados para se verificar interferentes

Concomitantes	Limites máximos estabelecidos		Concentrações de concomitante ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
	pelo CONAMA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
Al	200	100	400	
Cd	10	5	20	
Cu	13	6,5	26	
Zn	5000	2500	10000	
Fe	5000	2500	10000	
Ag	NE	25	NT	
$\text{CO}_3^{-2}$	NE	300	3000	
$\text{F}^-$	1400	700	2800	
Na	NE	300	10000	
$\text{SO}_4^-$	NE	12500	50000	

NE, não estabelecido pelo CONAMA; NT, não testado.

## 5.7 Figuras de mérito

### 5.7.1 Linearidade

A linearidade pode ser definida como a habilidade que uma metodologia possui de demonstrar que os resultados obtidos, em uma faixa específica (faixa linear dinâmica), são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Desta forma, determinou-se a linearidade a partir do coeficiente de correlação, obtido na curva analítica de sulfeto<sup>100</sup>.

A curva de calibração foi construída mediante a injeção de 1 mL de padrões de sulfeto nas concentrações 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2500 e 3500, 4500, 5500, 6500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , preparados em NaOH 0,025  $\text{mol L}^{-1}$  por diluições apropriadas da solução estoque previamente padronizada e também em NaOH 0,025  $\text{mol L}^{-1}$ . As condições experimentais foram: volume da alça e concentração de HCl, 100  $\mu\text{L}$  e 6  $\text{mol L}^{-1}$  respectivamente; vazão de nitrogênio em 400  $\text{mL min}^{-1}$ ; concentração de DEPD e  $\text{Fe}^{3+}$  4,09  $\text{g L}^{-1}$  e 0,020  $\text{mol L}^{-1}$  respectivamente, ambos preparados em meio  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,041  $\text{mol L}^{-1}$ ; a vazão de DEPD ( $\text{VR}_1$ ) bem como a de  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{VR}_2$ ) em 0,5  $\text{mL min}^{-1}$  e a vazão na saída da cubeta em 2,5  $\text{mL min}^{-1}$ .

### 5.7.2 Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ)

Na determinação de espécies químicas em baixas concentrações o cálculo dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) é de grande importância para avaliar o desempenho do método analítico. Define-se o limite de detecção como a menor quantidade de analito detectável por um método, no entanto, sem precisão e exatidão satisfatórias. Podendo ser ainda definido como a menor quantidade que pode ser detectada estatisticamente diferente do branco. O limite de quantificação é mais adequado e traduz, com precisão e exatidão consideráveis, a menor quantidade do analito que pode ser medida na amostra. Segundo a IUPAC (*International Union Pure and Applied Chemistry*)<sup>101</sup>, matematicamente os cálculos referentes ao limite de detecção e quantificação baseiam-se na razão entre o desvio padrão obtido de dez leituras do branco ( $S_{br}$ ) e o coeficiente angular da curva analítica ( $b$ ) da equação da curva analítica. Multiplicando-se o valor obtido por três obtém-se o LD (Equação 9) e multiplicando-se por dez o LQ (Equação 10).

$$LD = \frac{3 S_{br}}{b} \quad (9)$$

$$LQ = \frac{10 S_{br}}{b} \quad (10)$$

### 5.7.3 Precisão

A precisão expressa, sob condições determinadas, a dispersão de resultados entre ensaios independentes, reproduzidos de um mesmo padrão, mesma amostra ou amostras semelhantes<sup>98</sup>. Pode-se representar a precisão pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), conhecido também como coeficiente de variação (CV). Uma maneira simples de melhorar a precisão é aumentar o número de replicatas. Assim avaliou-se a precisão em termos do desvio padrão relativo (n=10), para soluções contendo 50 µg L<sup>-1</sup> e 100 µg L<sup>-1</sup> de sulfeto segundo a Equação 11, onde, *s* é desvio padrão e  $\bar{x}$  é o valor da média do conjunto de dados.

$$RSD(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (11)$$

### 5.7.4 Frequência de Leitura (FL)

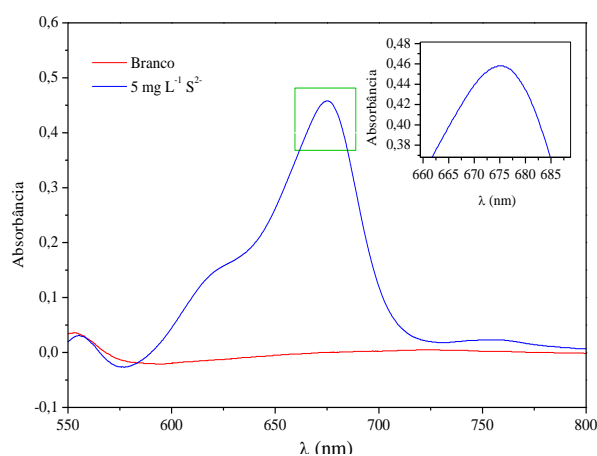
Corresponde ao número de leituras que podem ser realizadas por intervalo de tempo. No presente trabalho foi considerado além do tempo de limpeza inerente ao sistema FIA, também o tempo necessário para a completa troca do conteúdo gasoso dentro do minireator.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Estudos preliminares

#### 6.1.1 Varredura espectral

Como pode ser observado na Figura 16, a varredura espectral realizada nas condições descritas no item 5.3.1, inicialmente mostrou uma maior absorbância em uma faixa de comprimento de onda variando de 672 a 679 nm, não sendo detectada interferência proveniente dos próprios reagentes, esse valor foi condizente com o obtido em outros trabalhos<sup>55</sup>. Assim, os experimentos referentes a otimização e desenvolvimento do sistema foram realizados nesse intervalo de comprimento de onda.

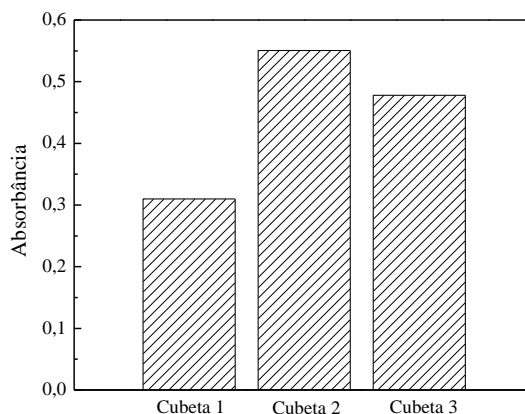


**Figura 16** - Varredura espectral do azul de etileno obtido a partir da reação com 5 mg L<sup>-1</sup> de sulfeto.

#### 6.1.2 Construção da cubeta de fluxo

Observando-se os resultados (Figura 17) obtidos nas condições descritas no item 5.3.2, nota-se que a melhor resposta analítica em termos de absorbância foi fornecida pela cela em Z. Deste modo, esta foi adotada no desenvolvimento do sistema em fluxo

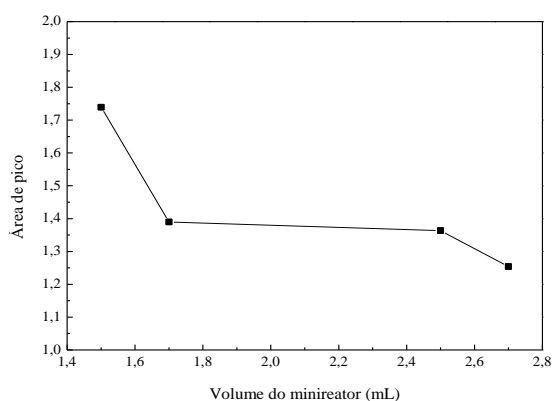
multissegmentado. Os menores sinais obtidos com as cubetas construídas no laboratório podem ser atribuídos ao aumento da dispersão devido o maior volume interno das mesmas.



**Figura 17** - 1 Cela de fluxo de 0,48 mL; 2, Cela de fluxo em Z; 3, Cela de fluxo de 0,24 mL.

### 6.1.3 Construção do minireator

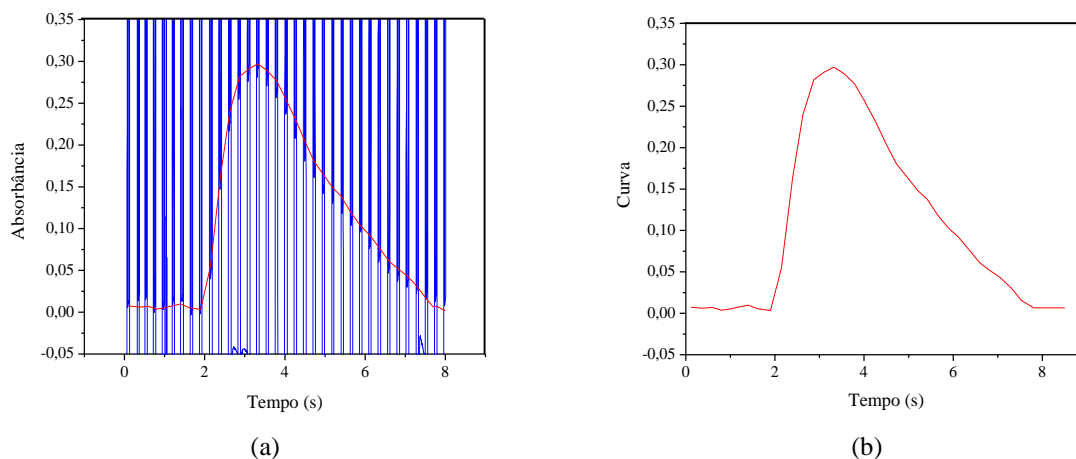
Com base nos resultados apresentados na Figura 18 nota-se que o sinal analítico mostrou-se diminuído com o volume do minireator, o que pode ser atribuído ao tempo que o  $H_2S$  leva para deixar o mesmo. Em um minireator maior a taxa de retirada do  $H_2S$  é menor provocando maior dispersão do sinal analítico. Dessa forma, a concentração de  $H_2S$  na porção gasosa tende a ser menor e, conseqüentemente, o sinal analítico diminui. Portanto, no sistema proposto optou-se pelo minireator de 1,5 mL, pois este forneceu melhor resposta analítica em termos de área de pico.



**Figura 18** - Avaliação do desempenho dos minireatores

## 6.2 Perfil do sinal analítico no sistema em fluxo multissegmentado

Uma vez que o sistema de análise em fluxo multissegmentado não fazia uso de um desborbulhador, fez-se necessário o tratamento dos sinais através de um programa desenvolvido em ambiente Windows empregando o OriginPro 8, o qual após tratar o sinal analítico fornecia uma curva referente ao pico em questão e sua resposta em termos de área. A Figura 19 apresenta o perfil de um sinal analítico antes e após o tratamento.



**Figura** - Perfil dos sinais analíticos obtidos. (a) antes do tratamento e (b) após o tratamento pelo programa desenvolvido.

## 6.3 Procedimento de otimização

### 6.3.1 Planejamento fatorial de dois níveis

Os resultados experimentais obtidos com o planejamento fatorial fracionário  $2^{7-3}$  são apresentados na Tabela 8, a denominação dos fatores está descrita no item 5.5. A média e a variância dos resultados do planejamento fatorial de dois níveis  $2^{7-3}$  estão apresentados na Tabela 9. A fim de avaliar a importância das estimativas de contraste dos fatores, inicialmente calculou-se a estimativa conjunta da variância ( $Sp^2$ ), com 16 graus de liberdade, segundo a Equação 12.

**Tabela 8** - Matriz e resultados do planejamento fatorial de dois níveis  $2^{6-3}$  para determinação “on-line” de sulfeto no sistema de análise em fluxo multissegmentado.

<i>Ensaio</i>	<i>Fatores</i>							<i>Área</i>	
	<b>CR<sub>1</sub></b>	<b>CR<sub>2</sub></b>	<b>CAR</b>	<b>AA</b>	<b>B<sub>1</sub></b>	<b>B<sub>2</sub></b>	<b>TV<sub>1</sub></b>		
<b>1</b>	- (1,5)	- (0,03)	- (0,05)	- (500)	- (150)	- (200)	- (2)	0,7656	0,7958
<b>2</b>	+ (3,0)	- (0,03)	- (0,05)	- (500)	+ (350)	- (200)	+ (4)	0,5452	0,5388
<b>3</b>	- (1,5)	+ (0,12)	- (0,05)	- (500)	+ (350)	+ (700)	- (2)	0,0693	0,0808
<b>4</b>	+ (3,0)	+ (0,12)	- (0,05)	- (500)	- (150)	+ (700)	+ (4)	0,2711	0,2832
<b>5</b>	- (1,5)	- (0,03)	+ (0,5)	- (500)	+ (350)	+ (700)	+ (4)	0,1962	0,1965
<b>6</b>	+ (3,0)	- (0,03)	+ (0,5)	- (500)	- (150)	+ (700)	- (2)	0,4057	0,4278
<b>7</b>	- (1,5)	+ (0,12)	+ (0,5)	- (500)	- (150)	- (200)	+ (4)	0,3169	0,3162
<b>8</b>	+ (3,0)	+ (0,12)	+ (0,5)	- (500)	+ (350)	- (200)	- (2)	0,5269	0,5501
<b>9</b>	- (1,5)	- (0,03)	- (0,05)	+ (1000)	- (150)	+ (700)	+ (4)	0,7523	0,7043
<b>10</b>	+ (3,0)	- (0,03)	- (0,05)	+ (1000)	+ (350)	+ (700)	- (2)	1,4455	1,4169
<b>11</b>	- (1,5)	+ (0,12)	- (0,05)	+ (1000)	+ (350)	- (200)	+ (4)	0,2550	0,2974
<b>12</b>	+ (3,0)	+ (0,12)	- (0,05)	+ (1000)	- (150)	- (200)	- (2)	0,4505	0,4688
<b>13</b>	- (1,5)	- (0,03)	+ (0,5)	+ (1000)	+ (350)	- (200)	- (2)	0,2574	0,2232
<b>14</b>	+ (3,0)	- (0,03)	+ (0,5)	+ (1000)	- (150)	- (200)	+ (4)	0,3093	0,3079
<b>15</b>	- (1,5)	+ (0,12)	+ (0,5)	+ (1000)	- (150)	+ (700)	- (2)	0,6852	0,7043
<b>16</b>	+ (3,0)	+ (0,12)	+ (0,5)	+ (1000)	+ (350)	+ (700)	+ (4)	0,4638	0,4779

Os valores entre parênteses expressam os níveis reais dos fatores estudados.

**Tabela 9** - Média e variância dos resultados do planejamento fatorial de dois níveis  $2^{7-3}$ .

<i>Ensaio</i>	<i>Fatores</i>							<i>Área</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	
	<b>CR<sub>1</sub></b>	<b>CR<sub>2</sub></b>	<b>CAR</b>	<b>AA</b>	<b>B<sub>1</sub></b>	<b>B<sub>2</sub></b>	<b>TV<sub>1</sub></b>				
1	-	-	-	-	-	-	-	0,7656	0,7958	0,7807	0,00046
2	+	-	-	-	+	-	+	0,5452	0,5388	0,5420	0,00002
3	-	+	-	-	+	+	-	0,0693	0,0808	0,0751	0,00007
4	+	+	-	-	-	+	+	0,2711	0,2832	0,2772	0,00007
5	-	-	+	-	+	+	+	0,1962	0,1965	0,1964	0,00000
6	+	-	+	-	-	+	-	0,4057	0,4278	0,4168	0,00024
7	-	+	+	-	-	-	+	0,3169	0,3162	0,3166	0,00000
8	+	+	+	-	+	-	-	0,5269	0,5501	0,5385	0,00027
9	-	-	-	+	-	+	+	0,7523	0,7043	0,7283	0,00115
10	+	-	-	+	+	+	-	1,4455	1,4169	1,4312	0,00041
11	-	+	-	+	+	-	+	0,2550	0,2974	0,2762	0,00090
12	+	+	-	+	-	-	-	0,4505	0,4688	0,4597	0,00017
13	-	-	+	+	+	-	-	0,2574	0,2232	0,2403	0,00058
14	+	-	+	+	-	-	+	0,3093	0,3079	0,3086	0,00000
15	-	+	+	+	-	+	-	0,6852	0,7043	0,6948	0,00018
16	+	+	+	+	+	+	+	0,4638	0,4779	0,4709	0,00010

$$s_p^2 = \frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2 + \dots + (n_{16}-1)s_{16}^2}{(n_1-1) + (n_2-1) + \dots + (n_{16}-1)} \quad (12)$$

onde,  $n$  é o número de repetições em cada ensaio e  $s^2$  a variância obtida em cada ensaio. O valor de  $S_p^2$  encontrado foi  $2,89 \times 10^{-4}$ . De posse do valor de  $S_p^2$ , calculou-se a variação experimental ( $V$ ) pela Equação 13.



$$V(\text{estimativa de contraste}) = V[\bar{R}(+)] + V[\bar{R}(-)] = \frac{s_p^2}{n} + \frac{s_p^2}{n} \quad (13)$$

onde  $n$  (neste caso 16) é o número de respostas positivas e negativas. A variância experimental obtida  $3,61 \times 10^{-5}$  e, conseqüentemente, o erro experimental (erro padrão da estimativa) foi calculado, extraindo a raiz da variância experimental, sendo  $6,01 \times 10^{-3}$ . Usando a distribuição *t de Student*, é possível construir intervalos de confiança para os valores das estimativas e, como consequência, verificar quais fatores são significativos. Multiplicando-se o erro padrão da estimativa pelo valor de  $t_{16}$  (2,120) com 95% de confiança, encontra-se o erro padrão de  $1,27 \times 10^{-2}$ <sup>49</sup>. Como verificado na Tabela 10, todas as estimativas dos fatores são maiores que o erro padrão experimental e naturalmente todos os fatores investigados são estatisticamente significativos no domínio experimental.

**Tabela 10** - Estimativas de contraste para os fatores empregados no planejamento fatorial fracionário 2<sup>7-3</sup>.

Fatores	Estimativa de Contraste
CR <sub>1</sub>	0,1421
CR <sub>2</sub>	-0,1919
CAR	-0,1734
AA	0,1833
B <sub>1</sub>	-0,0265
B <sub>2</sub>	0,1034
TV <sub>1</sub>	-0,1919

CR<sub>1</sub>, concentração de DEPD; CR<sub>2</sub>, concentração de Fe<sup>3+</sup>; CAR, concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nos reagentes; AA, Alça de amostragem; B<sub>1</sub>, Bobina dos reagentes; B<sub>2</sub>, Bobina reacional; TV<sub>1</sub>, Temporização da válvula 1.

A alça de amostragem (AA) apresentou estimativa de contraste positiva (0,1833), mostrando que acréscimos no volume de amostragem contribuem para o aumento no sinal analítico. No entanto, como este fator é limitado pelo volume do minireator (1,5 mL), o melhor volume de amostra adotado foi de 1 mL. A estimativa do contraste de TV<sub>1</sub> foi negativa (-0,1919), indicando que o nível inferior deste fator (2 s) favorece a resposta analítica. Como essa válvula controla o volume de reagente (DEPD + Fe<sup>3+</sup>) inserido no gás H<sub>2</sub>S liberado do reator, o uso de tempos maiores (4 s) acarreta excesso de reagente que reagiria com o H<sub>2</sub>S e, como consequência, seria observado um efeito de diluição do corante

azul de etileno, explicando assim a diminuição do sinal analítico. Por outro lado, a diminuição excessiva da  $TV_1$  não seria viável, porque o volume de líquido que passaria pelo detector seria muito pequeno. Portanto, a temporização de 2 s para a válvula 1 foi escolhido como o melhor valor.

A bobina reacional ( $B_2$ ), com uma estimativa de 0,1034 indica que com o aumento do nível deste fator (200-700  $\mu\text{L}$ ), há um acréscimo na resposta analítica, que pode ser explicado pela lenta reação de formação de azul de etileno. Contudo, quando se aumenta a bobina reacional a frequência analítica é consideravelmente afetada. Assim, a bobina reacional ( $B_1$ ) de 700  $\mu\text{L}$  foi utilizada neste estudo. Quanto a bobina dos reagentes ( $B_1$ ), observou-se uma estimativa de contraste negativa (-0,0265). Tal comportamento sugere que o aumento da bobina dos reagentes, provavelmente leva à instabilidade do intermediário formado pela oxidação do DEPD por  $\text{Fe}^{3+}$ . Assim, o valor do fator  $B_2$  escolhido foi 150  $\mu\text{L}$ .

A concentração do  $\text{Fe}^{3+}$  ( $CR_2$ ) apresentou uma estimativa de contraste negativa (-0,1919). Esse resultado era esperado, já que o excesso de reagente pode levar à formação de sulfeto de ferro, o que interfere na segunda etapa da reação, reduzindo a quantidade de produto formado. A concentração de ácido sulfúrico nos reagentes (CAR), também apresentou uma estimativa de contraste negativa (-0,1734), indicando que meios fortemente ácido desfavorecem a oxidação do DEPD pelo  $\text{Fe}^{3+}$  e, conseqüentemente, a formação do composto intermediário a ser reduzido pelo  $\text{H}_2\text{S}$ . A estimativa do contraste de 0,1421 apresentada pela concentração de N, N, dietil-p-fenilenodiamina (DEPD) demonstra que o aumento na concentração deste fator (1,5 a 3,0  $\text{g L}^{-1}$ ) favorece a resposta analítica.

### 6.3.2 Otimização utilizando planejamento Doehlert para três fatores

Após a triagem dos fatores, os valores ótimos para  $CR_1$ ,  $CR_2$  e CAR foram obtidos utilizando Matriz de Doehlert para três fatores<sup>92</sup> (TABELA 11). A fim de verificar o ajuste dos dados experimentais com o modelo estatístico, os modelos linear e quadrático foram avaliados de acordo com a análise de variância (ANOVA). O modelo linear é representado pela Equação 14.

**Tabela 11** - Matriz de Doehlert para três fatores e resultados obtidos.

<i>Ensaíos</i>	<i>Fatores</i>			<i>Área</i>
	$CR_1$ (g L <sup>-1</sup> )	$CR_2$ (mol L <sup>-1</sup> )	$CAR$ (mol L <sup>-1</sup> )	
<b>1</b>	0 (4,0)	0 (0,025)	0 (0,04)	2,684
<b>2</b>	0 (4,0)	0 (0,025)	0 (0,04)	2,729
<b>3</b>	0 (4,0)	0 (0,025)	0 (0,04)	2,761
<b>4</b>	1 (5,0)	0 (0,025)	0 (0,04)	1,594
<b>5</b>	0,5 (4,5)	0,866 (0,04)	0 (0,04)	0,826
<b>6</b>	0,5 (4,5)	0,289 (0,030)	0,817 (0,06)	0,990
<b>7</b>	-1 (3,0)	0 (0,025)	0 (0,04)	0,793
<b>8</b>	-0,5 (3,5)	-0,866 (0,010)	0 (0,04)	1,751
<b>9</b>	-0,5 (3,5)	-0,289 (0,020)	-0,817 (0,02)	0,980
<b>10</b>	0,5 (4,5)	-0,866 (0,010)	0 (0,04)	1,947
<b>11</b>	0,5 (4,5)	-0,289 (0,020)	-0,817 (0,02)	1,109
<b>12</b>	-0,5 (3,5)	0,866 (0,04)	0 (0,04)	0,651
<b>13</b>	0 (4,0)	0,577 (0,035)	-0,817 (0,02)	1,069
<b>14</b>	-0,5 (3,5)	0,289 (0,030)	0,817 (0,06)	0,872
<b>15</b>	0 (4,0)	-0,577 (0,015)	0,817 (0,06)	2,322

$$\begin{aligned} \text{Área} = & -1,38 + 0,30(CR_1) + 58,02(CR_2) + 67,93(CAR) - 0,70(CR_1)(CR_2) \\ & - 0,10(CR_1)(CAR) - 2359,17(CR_2)(CAR) \end{aligned} \quad (14)$$

A análise de variância (ANOVA) do modelo linear é representada na Tabela 12. A razão entre  $QM_{\text{regressão}}/QM_{\text{resíduo}}$  de 0,56 foi inferior a  $F_{3,11} = 3,59$  (no nível de 95%), este valor indica que a regressão não é significativa neste nível de confiança. Analisando-se ainda a razão entre  $QM_{\text{faj}}/QM_{\text{ep}} = 1794,91$  observa-se claramente que há falta de ajuste do modelo

uma vez que 1794,91 é superior a  $F_{9,2} = 19,38$ , ao nível de 95% de confiança.

**Tabela 12** - Análise de variância do modelo linear.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Grau de Liberdade (gl)	Media Quadrática (QM)	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Regressão	2,990759	6	0,996920	0,56	3,59
Resíduo	5,375169	8	0,4886517		
Falta de ajuste (faj)	5,372176	6	0,5969084	1794,91	19,38
Erro puro (ep)	0,002993	2	0,0014965		
SQ Total	8,365928	14			

% de variação explicada pela regressão:35,75; máxima % de variação explicada:99,96 de  $SQ_{total}$ .

A ANOVA do modelo quadrático (Equação 15) é mostrada na Tabela 13 e confirma a superioridade do modelo quadrático, uma vez que reproduz 99,96% da variação total, comparado a 35,75% do modelo linear. Como pode ser observado, o  $QM_{regressão}/QM_{resíduo}$  de 181,94 é maior que o valor observado no modelo linear (0,56).

$$\begin{aligned} \text{Área} = & -31,54 + 12,55(CR_1) - 1,53(CR_1)^2 + 286,48(CR_2) - 4658,33(CR_2)^2 + 267,72(CAR) \\ & - 2532,22(CAR)^2 - 0,70(CR_1)(CR_2) - 0,10(CR_1)(CAR) - 2247,78(CR_2)(CAR) \end{aligned} \quad (15)$$

**Tabela 13** - Análise de variância do modelo quadrático.

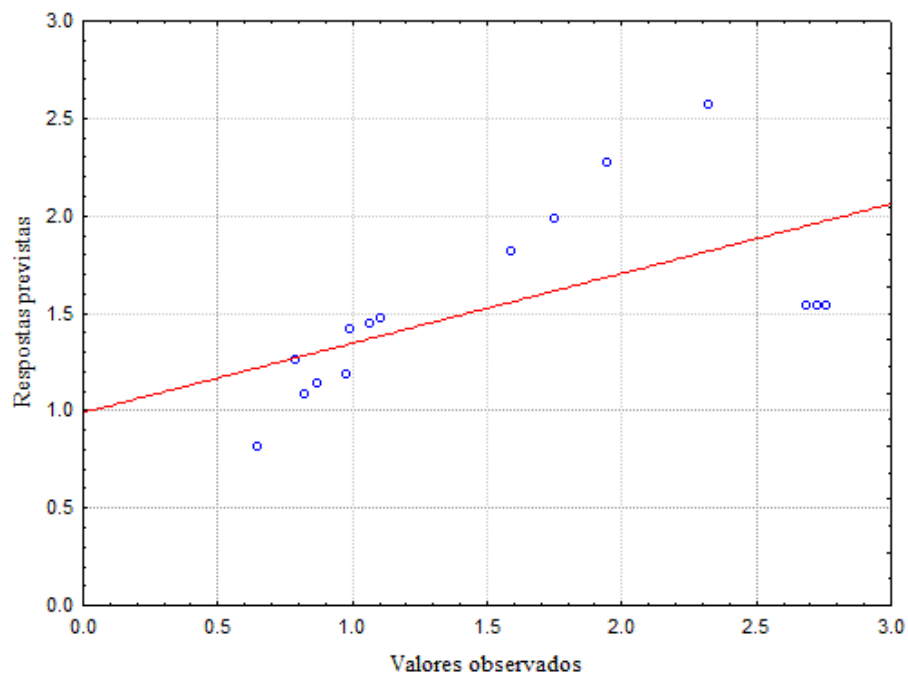
Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Grau de Liberdade (gl)	Média Quadrática (QM)	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Regressão	8,383973	9	1,656795	181,94	3,48
Resíduos	0,081955	5	0,009106		
Falta de ajuste (faj)	0,078962	3	0,011280	7,54	19,35
Erro puro (ep)	0,002993	2	0,001496		
SQ Total	8,365928	14			

% de variação explicada pela regressão:99,02; máxima % de variação explicada:99,96 de SQ<sub>total</sub>.

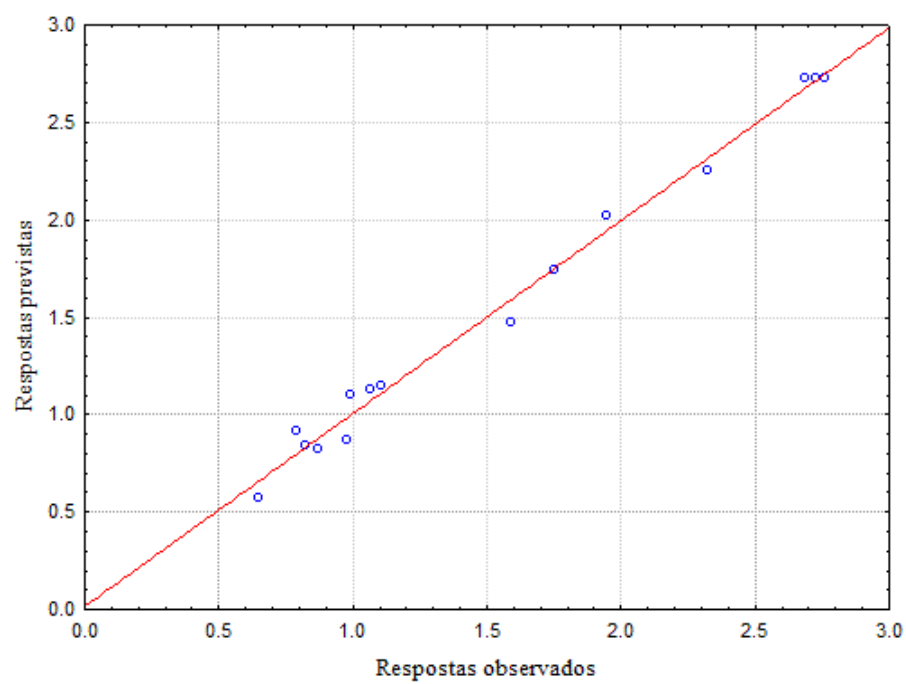
Além disso, a razão  $QM_{faj} / QM_{ep}$  de 7,54 é inferior ao valor crítico de  $F_{7,2} = 19,35$  ao nível de 95% de confiança, confirmando desta forma que não há falta de ajuste no modelo quadrático. O melhor ajuste do modelo quadrático em relação ao linear com os dados experimentais pode ser visto na Figura 20.

Usando o modelo quadrático, três superfícies de resposta foram construídas (FIGURA 23, 24 e 25), cuja presença de pontos de máximo foi confirmada pelo critério de Lagrange<sup>32</sup>. A Equação 15 apresentou a equação completa do modelo quadrático validada pela ANOVA, porém como se tem uma resposta e três fatores é impossível construir superfícies em 4 dimensões. Assim, construiu-se as superfícies de resposta sempre envolvendo dois fatores e mantendo o terceiro fator fixo no ponto central.

A superfície de resposta apresentada na Figura 21 é descrita pela Equação 16 e ilustra a relação entre concentração de DEPD, concentração de  $Fe^{+3}$  e a resposta analítica (área).

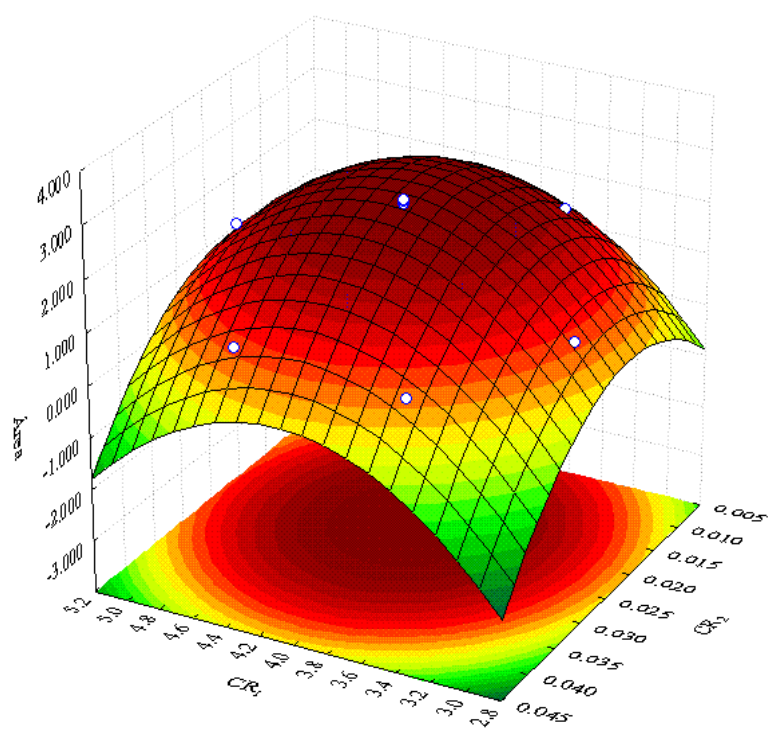


(a)

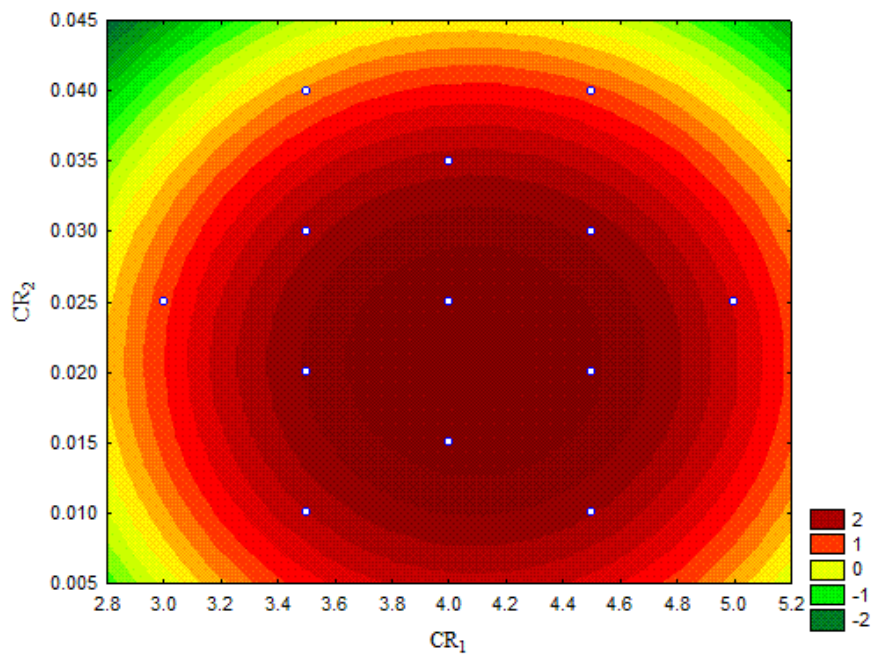


(b)

**Figura 20** - Comparação das previsões dos dois modelos com os valores observados. (a) Modelo Linear e (b) Modelo quadrático.



(a)



(b)

**Figura 21** - (a) Superfície de resposta e (b) curvas de níveis relacionando concentração de DEPD e concentração de  $Fe^{+3}$ . O valor da concentração de ácido nos reagentes foi fixo em  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ .

$$\begin{aligned} \text{Área} = & -31,458 + 12,527(\text{CR}_1) - 1,531(\text{CR}_1)^2 + 283,678(\text{CR}_2) - 4658,333(\text{CR}_2)^2 \\ & - 2247,778(0,04)(\text{CR}_2) + 6,641 \end{aligned} \quad (16)$$

A aplicação do critério de Lagrange nesta equação demonstra que a superfície de resposta possui um máximo, uma vez que foram encontrados valores de  $H(\text{CR}_1, \text{CR}_2) > 0$  e  $\left(\frac{\partial^2 \text{Área}}{\partial \text{CR}_1^2}\right)^2 < 0$  nas Equações 17 e 18.

$$H(\text{CR}_1, \text{CR}_2) = \left(\frac{\partial^2 \text{Área}}{\partial \text{CR}_1^2}\right) \left(\frac{\partial^2 \text{Área}}{\partial \text{CR}_2^2}\right) - \left(\frac{\partial^2 \text{Área}}{\partial \text{CR}_1 \partial \text{CR}_2}\right)^2 = 28530,739 \quad (17)$$

$$\left(\frac{\partial^2 \text{Área}}{\partial \text{CR}_1^2}\right)^2 = -3,062 \quad (18)$$

A fim de encontrar o valor de máximo resolveu-se as equações 19 e 20 em função da  $\text{CR}_1$  e  $\text{CR}_2$ . Desta forma, os valores correspondentes a área máxima são:  $\text{CR}_1 = 4,09 \text{ g L}^{-1}$  e  $\text{CR}_2 = 0,020$ , onde a área prevista é encontrada pela equação 21.

$$\frac{\partial \text{Área}}{\partial \text{CR}_1} = 12,527 - 3,162(\text{CR}_1) = 0 \quad (19)$$

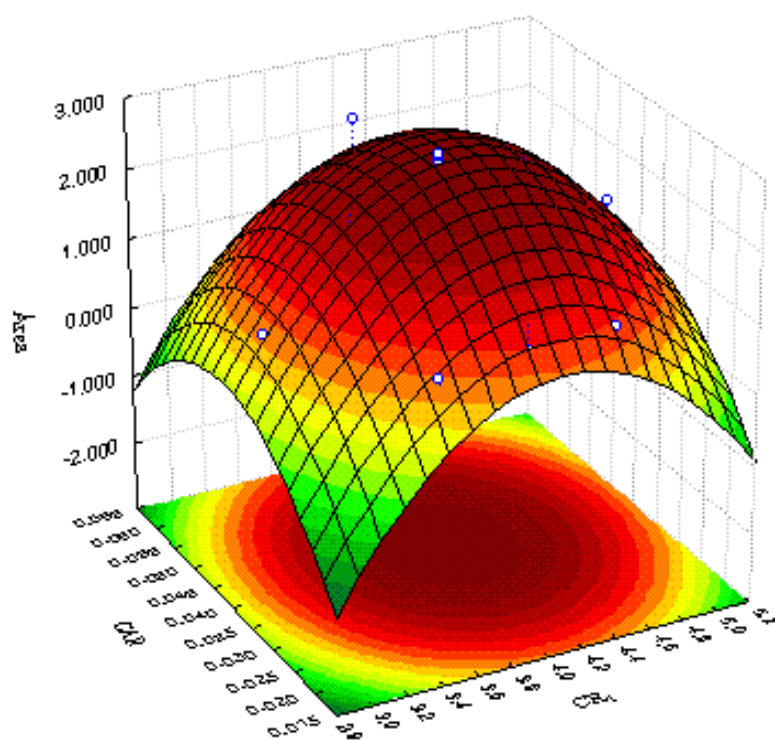
$$\frac{\partial \text{Área}}{\partial \text{CR}_2} = 283,778 - 9316,667(\text{CR}_2) - 89,911 = 0 \quad (20)$$

$$\begin{aligned} \text{Área}_{\text{prevista}} = & -31,458 + 12,527(4,09) - 1,531(4,09)^2 + 283,778(0,020) - 4658,333(0,020)^2 \\ & - 2247,778(0,04)(0,020) + 6,641 \end{aligned} \quad (21)$$

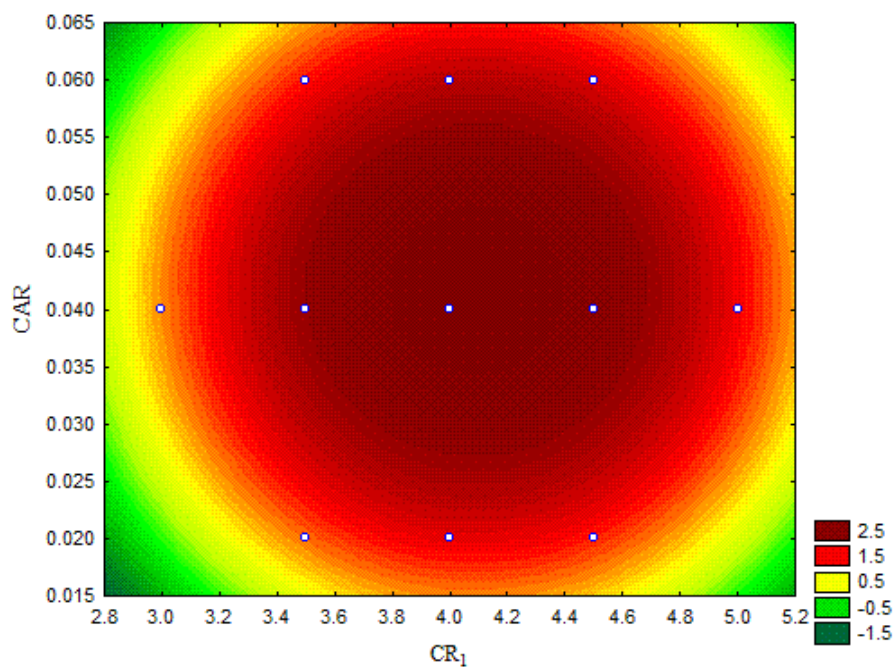


$$\text{Área}_{\text{prevista}} = 2,816$$

A superfície de resposta apresentada na Figura 22 relaciona a concentração de DEPD, concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nos reagentes e resposta analítica (área), e é descrita pela Equação 22.



(a)



(b)

**Figura 22** - (a) Superfície de resposta e (b) curvas de níveis relacionando concentração de DEPD e concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nos reagentes Fe<sup>+3</sup>. O valor da concentração de Fe<sup>+3</sup> foi fixo em 0,025 mol L<sup>-1</sup>.

$$\begin{aligned} \text{Área} = & -31,458 + 12,527(\text{CR}_1) - 1,531(\text{CR}_1)^2 + 267,322(\text{CAR}) - 2532,222(\text{CAR})^2 \\ & - 2247,778(0,025)(\text{CAR}) + 4,180 \end{aligned} \quad (22)$$

De acordo com a aplicação do critério de Lagrange na equação 22 é possível ressaltar a presença de um ponto de máximo, pois como demonstram as equações 23 e 24 foram encontrados valores de  $H(\text{CR}_1, \text{CAR}) > 0$  e  $\left(\frac{\partial^2 \text{Área}}{\partial \text{CR}_1^2}\right) < 0$ .

$$H(\text{CR}_1, \text{CAR}) = \left(\frac{\partial^2 \text{Área}}{\partial \text{CR}_1^2}\right) \left(\frac{\partial^2 \text{Área}}{\partial \text{CAR}^2}\right) - \left(\frac{\partial^2 \text{Área}}{\partial \text{CR}_1 \partial \text{CAR}}\right)^2 = 15509,017 \quad (23)$$

$$\left(\frac{\partial^2 \text{Área}}{\partial \text{CR}_1^2}\right) = -3,062 \quad (24)$$

Resolvendo-se as equações 25 e 26 em função da  $\text{CR}_1$  e  $\text{CAR}$  encontrou-se os valores de máximo, sendo a  $\text{CR}_1 = 4,09 \text{ g L}^{-1}$  e  $\text{CAR} = 0,041$ , onde a área prevista encontrada pela equação 27 é 2,743.

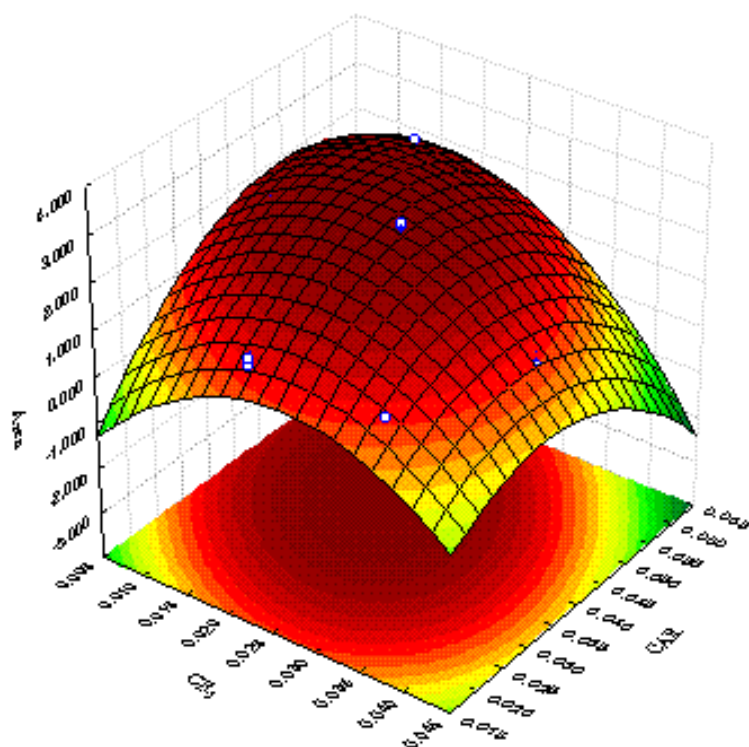
$$\frac{\partial \text{Área}}{\partial \text{CR}_1} = 12,527 - 3,162(\text{CR}_1) = 0 \quad (25)$$

$$\frac{\partial \text{Área}}{\partial \text{CAR}_2} = 267,322 - 5064,444(\text{CAR}) - 56,194 = 0 \quad (26)$$

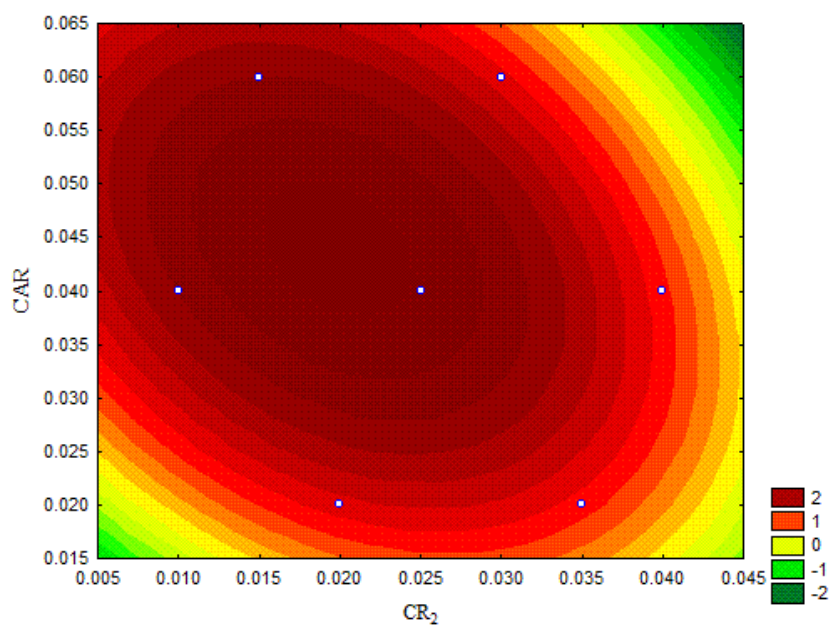
$$\begin{aligned} \text{Área}_{\text{prevista}} = & -31,458 + 12,527(4,09) - 1,531(4,09)^2 + 267,322(0,041) - 2532,222(0,041)^2 \\ & - 2247,778(0,025)(0,041) + 4,180 \end{aligned} \quad (27)$$

$$\text{Área}_{\text{prevista}} = 2,743$$

A superfície de resposta descrita pela equação 28 ilustra a relação entre concentração de  $\text{Fe}^{+3}$ , concentração de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  nos reagentes e a resposta analítica (área), e é apresentada na Figura 23.



(a)



(b)

**Figura 23** - (a) Superfície de resposta e (b) curvas de níveis relacionando concentração  $\text{H}_2\text{SO}_4$  nos reagentes e concentração de  $\text{Fe}^{+3}$ . O valor da concentração de DEPD foi fixo em  $4 \text{ g L}^{-1}$ .

$$\begin{aligned} \text{Área} = & -31,458 + 283,678(CR_2) - 4658,333(CR_2)^2 + 267,322(CAR) - 2532,222(CAR)_2 \\ & - 2247,778(CR_2)(CAR) + 25,609 \end{aligned} \quad (28)$$

Como pode ser confirmado pelos valores encontrados de  $H(CR_1, CR_2) > 0$  e  $\left(\frac{\partial^2 \text{Área}}{\partial CR_1^2}\right)^2 < 0$  nas equações 29 e 30, a aplicação do critério de Lagrange na equação 28 também indica um valor de máximo.

$$H(CR_2, CAR) = \left(\frac{\partial^2 \text{Área}}{\partial CR_2^2}\right) \left(\frac{\partial^2 \text{Área}}{\partial CAR^2}\right) - \left(\frac{\partial^2 \text{Área}}{\partial CR_2 \partial CAR}\right)^2 = 15509,017 \quad (29)$$

$$\left(\frac{\partial^2 \text{Área}}{\partial CR_2^2}\right)^2 = -9316,67 \quad (30)$$

Resolvendo-se as equações 31 e 32 confirmou-se os valores correspondentes a área máxima, onde a  $CR_1 = 4,09 \text{ g L}^{-1}$  e  $CAR = 0,041$ , e a área prevista encontrada pela equação 33 é 2,743. A Tabela 14 resume as condições experimentais após a otimização do sistema.

$$\frac{\partial \text{Área}}{\partial CR_2} = 283,678 - 9316,667(CR_2) - 2247,778(CAR) = 0 \quad (31)$$

$$\frac{\partial \text{Área}}{\partial CAR} = 267,322 - 5064,444(CAR) - 2247,778(CR_2) = 0 \quad (32)$$

$$\begin{aligned} \text{Área}_{\text{prevista}} = & -31,458 + 283,678(CR_2) - 4658,333(CR_2)^2 + 267,322(CAR) - 2532,222(CAR)^2 \\ & - 2247,778(CR_2)(CAR) + 25,609 \end{aligned}$$

$$\text{Área}_{\text{prevista}} = 2,743 \quad (33)$$

**Tabela 14** - Condições de trabalho.

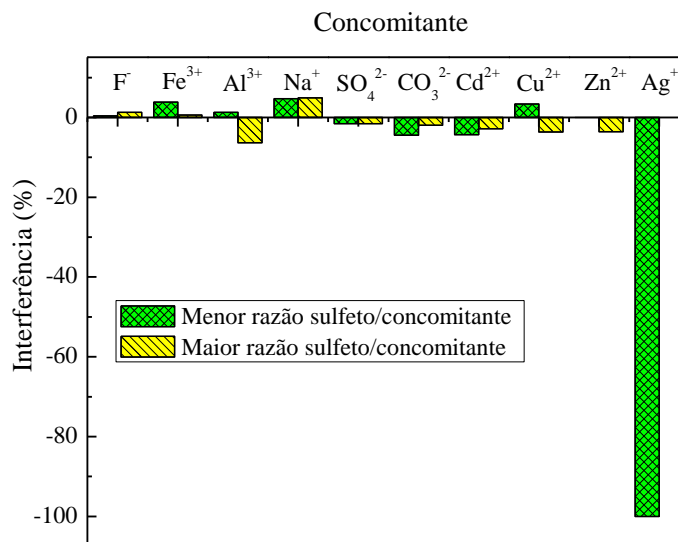
<b>Fator</b>	<b>Condição Otimizada</b>
Concentração de HCl no reator	6 mol L <sup>-1</sup>
Volume da alça de HCl	100 µL
Vazão de nitrogênio	400 mL min <sup>-1</sup>
Vazão de DEPD (VR <sub>1</sub> )	0,5 mL min <sup>-1</sup>
Vazão de Fe <sup>3+</sup> (VR <sub>2</sub> )	0,5 mL min <sup>-1</sup>
Vazão na saída da cela de fluxo	2,5 mL min <sup>-1</sup>
Volume do minireator	1,5 mL
Cela de fluxo	cela em Z
Alça de amostragem (AA)	1 mL
Temporização da válvula 1 (TV <sub>1</sub> )	2 s
Bobina reacional (B <sub>1</sub> )	150 µL
Bobina dos reagentes (B <sub>2</sub> )	700 µL
Concentração de DEPD (CR <sub>1</sub> )	4,09 g L <sup>-1</sup>
Concentração de Fe <sup>3+</sup> (CR <sub>2</sub> )	0,020 mol L <sup>-1</sup>
Concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (CAR)	0,041 mol L <sup>-1</sup>

#### 6.4 Estudo de interferentes no método proposto

No método proposto, a presença de alguns concomitantes poderia causar perda ou aumento do sinal analítico devido à formação de compostos voláteis passíveis de reagir com o N,N Dietil-p-etilenodiamina, bem como pela formação de compostos insolúveis com o sulfeto presente na amostra. A interferência aqui foi conferida a uma variação superior ou inferior a 10% na recuperação do sinal analítico de sulfeto em relação ao sulfeto na ausência de concomitantes.

Como pode ser observado na Figura 24 apenas a prata apresentou interferência considerável, isso devido a formação de Ag<sub>2</sub>S que é insolúvel. Porém, ressalta-se que em águas naturais este metal normalmente não é encontrado, mesmo em baixas concentrações. Portanto, a seletividade do método mostrou-se satisfatória em presença de concomitantes

frequentemente encontrados em amostras reais, sugerindo então que o método proposto pode ser aplicado com sucesso para a determinação de sulfeto em amostras ambientais.

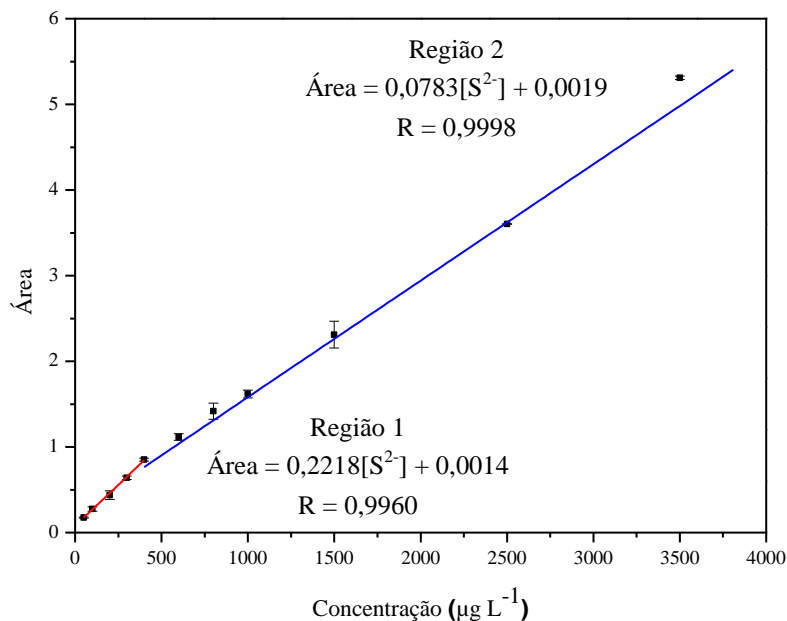


**Figura 24** - Estudo de Interferentes na determinação de sulfeto  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  usando solução de diversos íons em diferentes concentrações.

### 6.5 Figuras de Mérito e Validação do sistema FIA multissegmentado

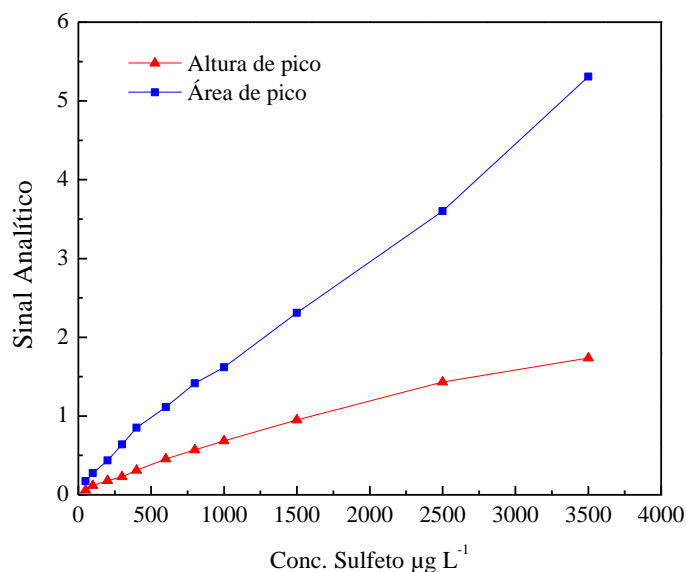
Visando a descrição do desempenho analítico do sistema de análise em fluxo multissegmentado para determinação de sulfeto “*in line*”, as seguintes figuras de mérito foram investigadas: faixa linear da curva analítica, limites de detecção e quantificação, precisão, frequência de leitura e exatidão.

Como pode ser visto na Figura 25, o método proposto apresentou duas regiões lineares na curva analítica, sendo a primeira faixa de resposta entre  $0,433 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  e a segunda de  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $3500 \mu\text{g L}^{-1}$ . Analisando-se a regressão linear das duas regiões da curva de calibração observa-se que os valores de coeficientes de correlação obtidos para o sistema estão em concordância com o estipulado ( $r$  mínimo aceitável = 0,99) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária<sup>100</sup>.



**Figura 25** - Curva de calibração para determinação de sulfeto no sistema de análise em fluxo multissegmentado.

A Figura 26 apresenta a resposta analítica do sistema de análise em fluxo multissegmentado para a determinação de sulfeto, apresentada em termos de absorbância (Altura de pico) e área de pico. Com base nos resultados obtidos observa-se que a resposta analítica em termos de área de pico apresenta maior magnitude, o que justifica a adoção desta no sistema proposto.



**Figura 26** - Resposta analítica, expressa em termos de altura e área de pico.



Os limites de detecção e quantificação encontrados foram respectivamente 0,130 e 0,433  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A precisão foi avaliada em termos do desvio padrão relativo ( $n=10$ ), para 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de sulfeto sendo 1,9 e 2,3% respectivamente. No sistema proposto sabe-se que o tempo gasto para uma análise é de 5 minutos (90 seg de tempo de residência da amostra no reator e 300 segundos para limpeza e leitura no espectrofotômetro). Dessa forma, pode-se dizer que teoricamente em uma hora de análise são efetuadas cerca de 12 leituras.

Segundo a Tabela 15, uma comparação do método proposto com aqueles relatados na literatura mostra que o sistema FIA multissegmentado para determinação de sulfeto sem pré-tratamento da amostra, apresenta ampla faixa linear, limite de detecção inferior ou similar e a ausência de interferência frente aos íons comumente encontrados em amostras ambientais, dificuldades relatadas em outros métodos. Além disso, o destaque do método proposto se deve ao fato de não requerer tratamento prévio da amostra e reduzido consumo de amostra e reagente.

**Tabela 15** - Comparação entre diferentes técnicas de fluxo para determinação de sulfeto.

Método	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Faixa Linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Frequência de Leitura ( $\text{h}^{-1}$ )	Volume Amostra (mL)	Ref.
FIA	0,1	1-10	5	12	28
MSFIA- Optrodo + GD	1,3	20-500	5	2,2	50
SI-MSFA	40	170-1000	38	0,12	102
SAI	40	50-2000	60	0,15	103
FIA	1,7	5-50	12	0,5	104
FIA reverso	500	500-5000	48	2,63	105
MSFA	0,130	0,433 - 400 400 - 3500	12	1	Método Proposto

A fim de verificar a exatidão do método para determinação de sulfeto em amostras de água, foi realizado testes de adição e recuperação. Os bons resultados de recuperação obtida (96,3 - 99,4%), apresentados na Tabela 16, indicam a eficiência do método proposto. Utilizou-se também técnicas de comparação visando avaliar os resultados obtidos no método proposto com um método de referência publicado na literatura<sup>4</sup>. De acordo com a Tabela 16, estatisticamente não há diferença (teste t pareado, 95% de confiança entre o método proposto e o método de referência), assim, confirma mais uma vez a exatidão do método para determinação de sulfeto em amostras de água<sup>106</sup>.

**Tabela 16** - Avaliação dos valores de recuperação para determinação de íons sulfeto em amostras de água. ND = não detectado. <sup>a</sup>Resultados expressos como média do valor  $\pm$  desvio padrão com base em três repetições (n = 3).

Amostras	Íons S <sup>2-</sup> adicionados ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Íons S <sup>2-</sup> encontrados ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação (%)
Água de Mina	0	ND	---
	300	289 $\pm$ 2,46	96,33
Água de Rio	0	ND	---
	300	296,78 $\pm$ 1,26	98,93
Água Represa	0	198,37 $\pm$ 6,29	---
	3000	3180,55 $\pm$ 4,09	99,44

**Tabela 17** - Determinação de Sulfeto em amostras de água usando o método proposto e o método de referência.

Amostras	S <sup>2-</sup> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	
	Valor encontrado no método proposto	Valor encontrado no método referência
Fonte Termal A	3,05 $\pm$ 0,06	2,84 $\pm$ 0,23
Fonte Termal B	1,15 $\pm$ 0,01	1,10 $\pm$ 0,14
Água Mineral	3,09 $\pm$ 0,07	2,86 $\pm$ 0,18

Adicionado 3  $\text{mg L}^{-1}$  de S<sup>2-</sup>. n = 3; Valor *t* calculado = 2,12; valor *t* crítico = 4,303, com 95% de confiança

## 7 CONCLUSÕES

Os métodos de quantificação de sulfeto publicados, frequentemente necessitam de uma etapa de preparo da amostra que torna a análise demorada e suscetível a erros. Além disso, os limites de detecção, quantificação e faixa linear, muitas vezes são desfavoráveis à sua aplicação em amostras ambientais, devido aos baixos níveis de sulfeto em amostras de água. Tais inconvenientes podem ser superados pelo presente método. Destaca-se ainda algumas características do método, incluindo o reduzido consumo de amostra/reagentes, baixo custo, seletividade satisfatória e, principalmente, não requerer pré-tratamento da amostra, uma vez que a amostra pode ser inserida diretamente no minireator, sugerindo sua aplicação em análises de rotina. Finalmente, o método também está associado ao conceito de Química Limpa, pois além da baixa geração de resíduo esse é borbulhado em uma solução contendo acetato de zinco, a fim de evitar a liberação de sulfeto para a atmosfera.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 PATNAIK, P. A **Comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances**. 3. ed. New York: Wiley, 1999.
- 2 LIU, L. et al. A novel inhibition biosensor constructed by layer-by-layer technique based on biospecific affinity for the determination of sulfide. **Sensors and Actuators B**, v. 129, p. 218-224, 2008.
- 3 SINGH, V. et al. Solid-phase extraction and spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in air and water utilizing ethylene blue formation. **Analyst**, v. 125, p. 1185-1188, 2000.
- 4 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington, DC, 1998.
- 5 KOH, T. et al. Spectrophotometric determination of trace amounts of sulphide and hydrogen sulphide by formation of thiocyanate. **Analyst**, v. 115, p. 1133–1137, 1990.
- 6 GUENTHER, E. A.; JOHNSON, K. S.; COALE, K. H. Direct ultraviolet spectrophotometric determination of total sulfide and iodide in natural waters, **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 3481–3487, 2001.
- 7 WOOD, C. F.; MARR, I. L. Improvements to the ethylene blue method for the determination of hydrogen sulphide in air. **Analyst**, v. 113, p. 1635-1638, 1988.
- 8 SHANTHI K.; BALASUBRAMANIAN N. Method for sampling and analysis of hydrogen sulfide. **Analyst**, v. 121, p. 647 - 650, 1996.
- 9 HAN, K.; KOCH, W. F. Determination of sulfide at the parts-per-billion level by ion chromatography with electrochemical detection. **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 1016–1020, 1987.
- 10 HOWARD, A. G.; YEH, C. Y.; Sulfide Measurement by Flow Injection Analysis with Flame Photometric Detection. **Analytical Chemistry**, v. 70, 4868–487, 1998.
- 11 WILLIAMS, R. J.; Determination of inorganic anions by ion chromatography with ultraviolet absorbance detection. **Analytical Chemistry**, v.55, p. 851–854, 1983.

12 HASSAN, S. M. Sulfur speciation: Methodology and application studies at the sediment-water interface. **Chemosphere**, v. 29, p. 2555-2569, 1994.

13 HURSE, T. J.; ABEYDEERA, W.P.P. Quantification of sulfur and sulfur containing compounds in wastewater by means of combination of liquid chromatographic methods, **Journal of Chromatography A**, v. 942, p. 201-210, 2002.

14 CASELLA, I. G.; GUASCITO, M. R.; DESIMONI, E. Sulfide measurements by flow injection analysis and ion chromatography with electrochemical detection. **Analytical Chimica Acta**, v. 409, p. 27-34, 2000.

15 MESTRES, M.; BUSTO, O.; GUASCH, J. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 569-581, 2000.

16 SAFAVI, A.; KARIMI, M. A. Flow injection chemiluminescence determination of sulfide by oxidation with *N*-bromosuccinimide and *N*-chlorosuccinimide. **Talanta**, v. 57, p. 491-500, 2002.

17 DU, J.; LI, Y.; LU, J. Investigation on the chemiluminescence reaction of luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-S<sup>2-</sup>/R-SH system. **Analytica Chimica Acta**, v. 448, p. 79-83, 2001.

18 PUACZ, W.; SZAHUN, W. Catalytic Determination of Sulfide in Blood. **Analyst**, v. 120 p. 39-941, 1995.

19 MOUSAVI, M. F.; SHAMSIPUR, M., Spectrophotometric determination of traces amounts of sulfide ion based on its catalytic reduction of toluidine blue. **Bulletin Chemistry Society of Japan**, v. 65, p. 2770-2772, 1992.

20 LAWRENCE, N. S.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Analytical strategies for the determination of sulfide: a review. **Talanta**, v. 52, p. 771-784, 2000.

21 VOLKAN, M. et al. A novel sorbent tube for ambient hydrogen sulfide determination **Talanta**, v. 47, p. 585-593, 1998.

22 BERNER, R. A.; Electrode studies of hydrogen sulfide in marine sediments. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 27, p. 563-575, 1963.

23 VALLEJO, B. et al. Determination of sulphide in liquid and solid samples by integrated pervaporation-potentiometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 436, p. 301-307, 2001.

- 24 KURZAWA, J. Determination of sulphur (II) compounds by flow injection analysis with application of the induced iodine/azide reaction. **Analytical Chimica Acta**, v. 173, p. 343-346, 1985.
- 25 NYGAARD, D. D. Electrochemical determination of sulfide and sulfite ions by pneumatoamperometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 127, p. 257-261, 1981.
- 26 BRENDEL, P. J.; LUTHER, G. W. Development of a Gold Amalgam Voltammetric Microelectrode for the Determination of Dissolved Fe, Mn, O<sub>2</sub>, and S(-II) in Porewaters of Marine and Freshwater Sediments. **Environmental Science Technology**, v. 29, p. 751-761, 1995.
- 27 ALMY, L.H.; A method for the estimation of hydrogen sulfide in proteinaceous food products. **Journal of the American Chemical Society**, v. 47, p. 1381-1390, 1925.
- 28 KUBÁŇ, V.; DASGUPTA, P. K.; MARX, J. N. Nitroprusside and methylene blue methods for silicone membrane differentiated flow injection determination of sulfide in water and wastewater. **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 36 - 43, 1992.
- 29 LAWRENCE, N. S. et al. Electrochemical determination of hydrogen sulfide at carbon nanotube modified electrodes. **Electroanalysis**, v. 17, p. 131-137, 2004.
- 30 REES, T. D.; GYLLENSPETZ, A. B.; DOCHERTY A. C. The determination of traces amounts of sulphide in condensed steam with N,N-diethyl-p-phenylenediamine. **Analyst**, v. 96, p. 201-208, 1971.
- 31 SANTOS, J. C. C.; SANTOS, E. B. G. N.; KORN, M. A comparison of flow injection methods for sulfide determination based on phenothiazine dyes produced from diverse aromatic amines. **Microchemical Journal**, v. 90, p. 1-7, 2008.
- 32 GARCIA-CALZADA, M.; MARBAN, G.; FUERTES, A. B. Potentiometric determination of sulphur in solid samples with a sulphide selective electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 380, p. 39-45, 1999.
- 33 BATINA, N.; CIGLENECKI, I.; COSOVIC, B. Flow Injection Separation and Preconcentration. **Analytica Chimica Acta**, v. 267, p. 157- 164 , 1992.
- 34 WALL, J. et al. Analysis for sulfur as hydrogen sulfide incorporating zirconia pretreatment and preconcentration. **Talanta**, v. 45, p. 85-90, 1997.

- 35 MOLINERO, A. L. et al. Sulphate determination after its reduction to hydrogen sulphide and volatile separation by molecular absorption spectrometry. **Talanta**, v. 43, p. 1565-1572, 1996.
- 36 RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. **Flow injection analysis**, 2. ed, New York: Wiley, 1998.
- 37 VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, M. S. **Automatización y miniaturización en Química Analítica**, Barcelona: Springer, 2000.
- 38 CALATAYUD, J. M. **Flow injection analysis of pharmaceuticals: automation in the laboratory**, London: Taylor & Francis, 1995.
- 39 BURGUERA, J. L. **Flow injection atomic spectroscopy**, London: Taylor & Francis, 1989.
- 40 TROJANOWICZ, M. **Flow Injection Analysis Instrumentation and Applications**, USA: World Scientific Publishing, 2000.
- 41 FANG, Z. **Flow injection separation and preconcentration**. Weinheim: VCH, 1993.
- 42 KARLBERG, B.; PACEY, G. E. **Flow injection analysis: a practical guide**, New York: Elsevier, 1989.
- 43 ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C.H. Classificação e definição de métodos de análises em fluxo (Recomendações IUPAC). **Química Nova**, v. 22, p. 143-146, 1999.
- 44 RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow Injection Analysis, Part I, A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, p. 145-157, 1975.
- 45 RUZICKA, J.; MARSHAL, G. D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Analytical Chimica Acta**, v. 237, p. 329-343, 1990.
- 46 REIS, B. F. et al. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 93, p. 129-137, 1994.

47 FERRER, L. et al. Interfacing in-line gás-diffusion separation with optrode sorptive preconcentration exploiting multisyringe flow injection analysis. **Talanta**, v. 68, p. 343-350, 2005.

48 TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C.; Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

49 BARROS NETO, B. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. **Como fazer experimentos: planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Campinas: Unicamp, 1996.

50 MARTINS, C. R.; ANDRADE, J. B. Química atmosférica do enxofre (IV): Emissões, reações em fase gasosa e impacto ambiental. **Química Nova**, v.25, p. 259-272, 2002.

51 QUAGLIANO, J. V.; VALLARINO, L. M. **Química**. 3. ed., Rio de Janeiro: Guanabara, 1973.

52 KOMARNISKY, L. A.; CHRISTOPHERSON, R. J.; BASU, T. K. Sulfur: its clinical and toxicologic aspects, **Nutrition**, v.19, p. 54-61, 2003.

53 AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, US (2001), Annual Report. [www.atsdr.cdc.gov](http://www.atsdr.cdc.gov)

54 SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentals of analytical chemistry**. 7. ed. Flórida: Saunders College Publishing, 1996.

55 FERRER, L. **Desarrollo de métodos automáticos de análisis automáticos de análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) para la determinación del ion sulfuro em aguas**. 2007. 171f. Tesis Doctoral em Química – Universidad de Las Islas Baleares, Palma de Mallorca, 2007.

56 FORSTNER, U. **Biogedynamics of Pollutants in Soils and Sediments**, W. Salomons, associated with the extraction of oil and natural gas. Environmental Protection Agency, US. EPA/453/R-93-045. NTIS publication PB131224.

57 CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/conama/legiano.cfm?codlegitipo=3>. Acesso em : 17 nov. 2009.



58 BRIMBLECOMBE, P. **The Global Sulfur Cycle**. In: Treatise on Geochemistry, Amsterdam: Schlesinger WH, 2003.

59 OGA, SEIZI.; BATISTUZZO, J. A.; CAMARGO, M. M. A. **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008, 696 f.

60 GREENWOOD, N. N.; EARNSHAW, A. **Chemistry of the Elements**. 2.ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997, p. 645-736.

61 BRASIL. Ministério do Trabalho. **Portaria 3214/78, NR – 15**. Determina atividades e operações insalubres. Disponível em [http://www.mte.gov.br/legislacao/normas\\_regulamentadoras/nr\\_15.asp](http://www.mte.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/nr_15.asp)

62 CASSELLA, R. J.; SANTELLI, R. E. Determinação de sulfeto em águas doces e salinas usando sistema de injeção em fluxo contínuo (FIA) e espectrofotometria com nitroprussiato. **Química Nova**, v. 18, p. 536- 540, 1995.

63 CHOI, M. M. F.; HAWKINS, P. Development of sulphide-selective optode membranes based on fluorescence quenching. **Analytica Chimica Acta**, v. 344, p. 105-110, 1997.

64 STANIC, V. Et al. Determination of sulfur compounds in the sol-gel processing of GeS<sub>2</sub> by potentiometric titration. **Electrochimica Acta**, v. 43, p. 2639-2647, 1998.

65 MA, Y. L. et al. Potentiometer selective determination of hydrogen sulfide by an electropolymerized membrane electrode based on binaphthyl-20-crown-6. **Analytica Chimica Acta**, v. 289, p.21-26, 1994.

66 MULLER, B.; STIERLI, R. In situ determination of sulfide profiles in sediment porewaters with a miniaturized Ag/Ag<sub>2</sub>S electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 401, p. 257-264, 1999.

67 NASCIMENTO, P. C.; BOHRER, D.; TRAMONTINA, D. Automated Polarographic Determination of Sulfide as Contaminant in Parenteral Amino Acid Solutions. **Analyst**, v. 122, p. 835-838, 1997.

68 RAMSTAD, T. et al. Analysis of hydrogen sulfide gas from a pharmaceutical drug formulation by cryofocused headspace gas chromatography. **Analyst**, v. 120, p. 2775-2780, 1995.

69 OGASAWARA, Y. et al. Determination of trace amounts of sulphide in human red blood cells by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection after derivatization with *p*-phenylenediamine and iron(III). **Analyst**, v. 116, p. 1359 - 1363, 1991.

70 GRU, C. et al. Determination of reduced sulfur compounds by high-performance liquid chromatography in hydrothermal seawater and body fluids from *Riftia pachyptila*. **Analyst**, v. 123, p. 1289-1293, 1998.

71 OKUMURA, M. et al. In situ preconcentration method for trace dissolved sulfide in environmental water samples using solid-phase extraction followed by spectrophotometric determination. **Analytical Sciences**, v. 15, p. 427-431, 1996.

72 SPAZIANI, M. A. et al. On line Determination of Sulfide by the Methylene Blue Method With Diode-laser-based Fluorescence Detection. **Analyst**, v. 122, p. 1555-1557, 1997.

73 HADDAD, P. R.; HECKENBERG, A. L. Trace determination of sulfide by reversed-phase ion-interaction chromatography using pre-column derivatization. **Journal of Chromatography**, v. 447, p. 415-420, 1998.

74 SANZ, J. S.; CABREDO, J.; GALBAN. Sulphide Determination in Water by Gas-Phase Molecular Absorption Spectrometry. **Analytical Letters**. v.25, p. 2095-2105, 1992.

75 PINILLOS, S. C. et al. Simultaneous determination of sulphide and sulphite by gas-phase molecular absorption spectrometry. Comparative study of different calculation methods. **Talanta**, v. 42, p. 937-943, 1995.

76 EBDON, L.; et al. Automated determination of sulfide as hydrogen sulfide in waste streams by gas-phase molecular absorption spectrometry. **Analyst**, v. 22, p. 689-693, 1997.

77 JIN, Q.H. et al. Trace determination of sulphide and sulphur dioxide by vapor molecular absorption spectrometry using magnesium and tellurium hollow cathode lamps. **Talanta**, v. 39, p. 967.-970, 1992.

78 VIEIRA, J. A. **Estudo comparativo de sistemas de análises químicas em fluxo empregando FIA com multicomutação e amostragem binária, FIA com amostragem sanduíche, fluxo monossegmentado e injeção sequencial**. 2001, 108f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

79 VALCARCEL, M.; CASTRO, L. M. D. **Análisis por inyección en flujo**. Implenta San Pablo: Cordoba, 1984.

80 ARRUDA, M. A.; COLLINS, C. H. Informações essenciais para a caracterização de um sistema de análise em fluxo. **Química Nova**, v. 18, p. 739-742, 2005.

81 PASQUINI, C.; OLIVEIRA, W. A. Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium(VI), ammonia, and phosphorous. **Analytical Chemistry**, v. 57, p. 2575-2579, 1985.

82 SILVA, M.; SOLITRENICK, P.; MASINI, J. C. Acoplamento de cela de difusão gasosa a sistema de análise por injeção sequencial visando a determinação espectrofotométrica de sulfeto. **Química Nova**, v. 27, p. 545-549, 2004.

83 CERDÀ, V.; PONS, C. Multicommutated flow techniques for developing analytical methods. **TRAC-Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 236-242, 2006.

84 CERDÀ, V.; et al. Flow techniques in water analysis. **Talanta**, v. 50, p. 695-705, 1999.

85 ALBERTÚS, F. et al. A robust multisyringe system for process flow analysis . Part I. On-line dilution and single point titration of protolytes. **Analyst**, v. 124, p. 1373-1381, 1999.

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

87 LAPA, R. A. S. et al. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. **Analytica Chimica Acta**, v. 466, p. 125-132, 2002.

88 IMANDI, S. B. et al. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1367-1372, 2007.

89 ZAMORA P. P.; MORAIS, J. L. D.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 10, p. 106-110, 2005.

90 SORIANO, S.; NETTO, A. D. P. Multivariate optimization of a microwave-assisted leaching procedure using dilute acid solutions, for FAAS determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in multivitamin/multimineral supplements. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n.3, p. 1113-1120, 2007.

91 FERREIRA, S. L. C. et al. Application of Doehlert designs for optimisation of an on-line preconcentration system for copper determination by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 61, p. 295-303, 2003.

92 LUNDSTEDT, L. et al. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, p. 3 – 40, 1998.

93 VIEIRA, J. A. et al. Sampling strategies in sequential injection analysis: Exploiting the monossegmented-flow approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, p. 257-262, 1998.

94 SALAMI, F. H.; BONIFÁCIO, V. G.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação espectrofotométrica em fluxo de cloro em água usando célula de longo caminho óptico e multicomutação. **Química Nova**, v. 32, p. 112-115, 2009

95 CERDÀ, V.; PONS, C. Multicommutated flow techniques for developing analytical methods. **TRAC-Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 236-242, 2006.

96 BOSQUE-SENDRA, J. M. et al. Optimization of analytical methods by using doehlerts designs. **Analytical Proceeding Including Analytical Communications**, v. 32, p. 375-377, 1995.

97 FERREIRA, S. L. C. et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 2-14, 2007.

98 Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

99 CAMPAÑA, A. M. G. et al. Sequential response surface methodology for multioptimization in analytical chemistry with three-variable Doehlert designs. **Analytica Chimica Acta**, v. 348, p. 237–246, 1997.

100 BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução **RE nº 899 de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de jun. 2003.

101 ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. Recommendation for definition, estimation and use of the detection limit. **Analyst**. v. 112. p. 199 - 204, 1987.

102 SILVA, M. S. P.; GALHARDO, C. X.; MASINI, J. C. Application of sequential injection-monosegmented flow analysis (SI-MSFA) to spectrophotometric determination of sulfide in simulated waters samples. **Talanta**, v. 60, p. 45-52, 2003.

103 SILVA, M. S. P. et al. Spectrophotometric determination of acid volatile sulfide in river sediments by sequential injection analysis exploiting the methylene blue reaction. **Talanta**, v. 53, p. 843-850, 2001.

104 CASELLA, R. J. et al. Determination of sulfide in waters by flow-injection solid phase spectrophotometry. **Analyst**, v. 125, p. 1835, 2000.

105 RIOS, A.; CASTRO, M. D. L.; VALCARCEL, M. New approach to the simultaneous determination of pollutants in waste waters by flow injection analysis. Part A. Anionic pollutants. **Analyst**, v. 109, p. 1487-1492, 1984.

106 HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**, 6. ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Ed. S. A., 2005.