



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**



**Programa de Pós-Graduação em Química
Curso: Mestrado
Área de Concentração: Química Analítica**

**Cinética e Dinâmica Molecular do Processo de
Dispersão Bidimensional em Sistemas de Injeção em Fluxo (FI):
Construção e Validação de um Aparato Experimental.**

Yuji Nascimento Watanabe

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina M. Quintella

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Cristina M. A. L. T. M. H. Quintella
(Orientadora – IQ/UFBA)

Prof. Dr. Mauro Korn
(DCET/UNEB)

Prof. Dr Frank Herbert Quina
(IQ/USP)

Homologada pelo Colegiado de Pós-Graduação em Química

Em ___/___/___

*“E demais filho meu, atenta: não há limites para fazer livros, e o
muito estudar é enfado da carne.*

*De tudo o que se tem ouvido é: teme a Deus, e guarda o seus
mandamentos; porque este é o dever de todo o homem.”*

Eclesiastes 12:13,14.

Aos meus pais, Shinichi e Nadja Watanabe, pela **FÉ** e
pela **ESPERANÇA**.

À minha esposa Rose pelo apoio, pela paciência e
sobretudo pelo **AMOR**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus colegas de trabalho, especialmente a Cristiane, Ângelo e Ana Paula, que contribuíram de forma inestimável para a conclusão desta obra. Ao LAPO e à Iuri Pepe, pelo suporte no desenvolvimento do sistema experimental. À minha FAMÍLIA e aos meus AMIGOS e IRMÃOS, de sangue e de espírito, pelas orações. Ao Pai da Luzes, Autor da Fé e da Ciência.

Lista de Abreviaturas

ADC – Conversor Analógico-Digital
Am - Amostra
AO – Amplificador Operacional
BP – Bomba Peristáltica
 C_0 – Concentração Inicial, sem Dispersão (Volume Infinito)
Ca – Carregador
 $C_{máx}$ – Concentração Máxima após Dispersão
D – Coeficiente de Dispersão
Des – Descarte
Det – Detetor
FI – Sistema de Injeção em Fluxo
FIA – Análise por Injeção em Fluxo
L – Lente
LIF – Fluorescência Induzida por Laser
MC – Amostragem por Multicomutação
MEG – Monoetilenoglicol
P – Polarizador
PD – Fotodiodo
PEAD – Polietileno de Alta Densidade
PEBD – Polietileno de Baixa Densidade
PLF – Fluorescência Induzida por Laser Polarizado
PTFE[®] – Teflon
R – Reagente
R6G – Rodamina 6G
RB – Rodamina B
V – Válvula Solenóide
 τ – Período Rotacional
 Φ – Rendimento Quântico
 θ_C – ângulo de Contato
 Γ_{exc} – Tempo de Vida do Estado Excitado
 Γ_{SL} – Tensão Interfacial Sólido/Líquido

Lista de Tabelas

5.1 – Ângulos de contato (θ_c) para o MEG sobre várias superfícies sólidas.....	69
5.2 – Dispersão em função da orientação molecular para a rodamina B e a rodamina 6G.....	73
5.3 – Dispersão em função da orientação molecular para a rodamina B e a rodamina 6G.....	74
5.4A – Dispersão longitudinal da rodamina B, sem a adição de Ca(II), em função da posição lateral (x) e do número de injeções por período de amostragem amostragem.....	76
5.4B – Dispersão longitudinal da rodamina B, após adição de Ca(II), em função da posição lateral (x) e do número de injeções por período de amostragem amostragem.....	92
5.5A – Rendimento da supressão da fluorescência total na presença de Ca(II) em função do número de injeções por período de amostragem.....	98
5.5B – Rendimento da supressão da fluorescência vertical na presença de Ca(II) em função do número de injeções por período de amostragem.....	98
5.5C – Rendimento da supressão da fluorescência horizontal na presença de Ca(II) em função do número de injeções por período de amostragem.....	98

Lista de Figuras

Capítulo 2

2.1 – Injetores de amostra.....	21
2.2 – Típico sinal transiente FI para duas posições diferentes na cela de detecção.....	26
2.3 – Principais configurações utilizadas em sistemas FI.....	27

Capítulo 3

3.1 – Diagrama de Jablonsky.....	37
3.2 – Representação da interação entre o campo elétrico do laser (E) e o momento de dipolo da rodamina B (μ).....	42
3.3 – Fórmulas estruturais da rodamina 6G e da rodamina B.....	44
3.4 – Representação da interação entre a rodamina B e o MEG sob fluxo na direção V.....	44
3.5 – Relação entre polarização e distribuição de velocidades.....	46

Capítulo 4

4.1 – Diagrama de blocos representando o funcionamento da interface.....	50
4.2 – Diagrama de blocos do sistema de detecção.....	53
4.3 – Montagem experimental do sistema de fluxo.....	55
4.4 – Esquema do circuito de controle das válvulas.....	56
4.5 – Cela de fluxo.....	59
4.6 – Montagem experimental do sistema ótico.....	60
4.7 – Fluorescência total induzida por laser (LIF) em função da concentração de rodamina B e da potência do laser.....	62
4.8 – Esquema do funcionamento do programa de controle e aquisição de dados.....	65

Capítulo 5

5.1 – Fotografia de uma gota de MEG sobre superfície de PTFE®.....	68
5.2 – Mapas de distribuição de concentração em função da orientação do fluxo (v) em relação à aceleração da gravidade (g).....	70
5.3 – Perfis de fluorescência em função da orientação molecular para a rodamina 6G (R6G) e a rodamina B (RB).....	72
5.4 – Representação da interação entre rodamina B e as paredes do tubo.....	73
5.5 – Mapas de distribuição de concentração (fluorescência total) em função do número de injeções por período de amostragem.....	75
5.6 – Mapa ilustrando os perfis longitudinais A (0,0mm), B (0,22mm) e C (0,44mm) e transversais D (3,75s) e E (12,0s).....	75

5.7 – Perfis de fluorescência total em função do número de injeções por período de amostragem. MC10 (10 injeções de 0,1s com intervalo de 0,1s) e MC1 (1 injeção de 1s).....	77
5.8 – Mapas de fluorescência vertical em função do número de injeções por período de amostragem.....	79
5.9 – Perfis de fluorescência vertical em função do número de injeções por período de amostragem. MC10 (10 injeções de 0,1s com intervalo de 0,1s) e MC1 (1 injeção de 1s).....	80
5.10 – Mapas de fluorescência horizontal em função do número de injeções por período de amostragem.....	81
5.11 – Perfis de fluorescência horizontal em função do número de injeções por período de amostragem. MC10 (10 injeções de 0,1s com intervalo de 0,1s) e MC1 (1 injeção de 1s).....	82
5.12 – Perfis de fluorescência em função da orientação molecular.....	82
5.13 – Mapas de polarização (P) em função do número de injeções por período de amostragem. MC10 (10 injeções de 0,1s com intervalo de 0,1s) e MC1 (1 injeção de 1s).....	85
5.14 – Perfis de polarização em função do número de injeções por período de amostragem. MC10 (10 injeções de 0,1s com intervalo de 0,1s) e MC1(1 injeção de 1s).....	87
5.15 – Mapas de fluorescência total após adição de Ca(II) em função do número de injeções por período de amostragem.....	89
5.16 - Espectros de absorção da rodamina B para várias concentrações de ca(II).....	90
5.17 – Perfis de fluorescência total após adição de Ca(II) em função do número de injeções por período de amostragem. MC10 (10 injeções de 0,1s com intervalo de 0,1s) e MC1 (1 injeção de 1s).....	91
5.18 – Mapas de fluorescência vertical após adição de Ca(II) em função do número de injeções por período de amostragem.....	92
5.19 – Perfis de fluorescência vertical após adição de Ca(II) em função do número de injeções por período de amostragem. MC10 (10 injeções de 0,1s com intervalo de 0,1s) e MC1 (1 injeção de 1s).....	93
5.20 – Mapas de fluorescência horizontal após adição de Ca(II) em função do número de injeções por período de amostragem.....	93
5.21 – Perfis de fluorescência horizontal após adição de Ca(II) em função do número de injeções por período de amostragem (1s). MC10 (10 injeções de 0,1s com intervalo de 0,1s) e MC1 (1 injeção de 1s).....	94

5.22 – Mapas de polarização (P) após adição de Ca(II) em função do número de injeções por período de amostragem. MC10 (10 injeções de 0,1s com intervalo de 0,1s) e MC1 (1 injeção de 1s).....	95
5.23 – Perfis de polarização com Ca(II) em função do número de injeções por período de amostragem. MC10 (10 injeções de 0,1s com intervalo de 0,1s) e MC1 (1 injeção de 1s).....	97
5.24 – Perfis de fluorescência total em função do tempo antes e após adição de Ca(II).....	99
5.25 – Perfis de fluorescência total em função da posição radial para os tempos de 3,75s e 12,0s.....	100
5.26 – Perfis de fluorescência vertical em função do tempo para as posições laterais $x= 0,00\text{mm}$, $0,22\text{mm}$ e $0,44\text{mm}$	101
5.27 – Perfis de fluorescência vertical em função da posição radial para os tempos de 3,75s e 12,0s.....	102
5.28 – Perfis de fluorescência horizontal em função tempo para as posições laterais $x= 0,00\text{mm}$, $0,22\text{mm}$ e $0,44\text{mm}$	102
5.29 – Perfis de fluorescência horizontal em função da posição radial para os tempos de 3,75s e 12,0s.....	103
5.30 – Perfis de polarização em função do tempo para as posições laterais $x= 0,00\text{mm}$, $0,22\text{mm}$ e $0,44\text{mm}$	104
5.31 – Perfis de polarização em função da posição radial para os tempos de 3,75s e 12,0s.....	105

**Cinética e Dinâmica Molecular do Processo de Dispersão Bidimensional
em Sistemas de Injeção em Fluxo (FI):
Construção e Validação de um Aparato Experimental.**

Este trabalho é constituído de três etapas, a saber:

- planejamento e construção de um aparato experimental para medidas de fluorescência total (LIF) e depolarização fluorescente (PLF) em sistema de injeção em fluxo (FI);
- testes operacionais visando otimizar parâmetros experimentais;
- avaliação fotoquímica/fotofísica da cinética e dinâmica molecular duma reação química em FI.

O aparato experimental automatizado é constituído de um sistema de detecção de fluorescência, um sistema FI e um sistema ótico. Permite a aquisição com alta resolução espacial (20 μ m) de perfis de distribuição de concentração (LIF) e de orientação molecular vertical e horizontal (PLF) em função do tempo de transporte do fluxo. Os perfis interpolados em mapas bidimensionais fornecem informações sobre a cinética e a dinâmica molecular dos processos de dispersão axial e radial de amostras em fluxo carregador.

Foram medidas tensões interfaciais estáticas, pelo método do ângulo de contato, para escolher a constituição química do percurso analítico e minimizar a sua influência na cinética e na dinâmica molecular de dispersão. Foi determinada a influência da aceleração gravitacional e do número de injeções por período de amostragem, dentre outros parâmetros usuais, no processo de dispersão.

Observou-se a existência de padrões de dispersão diferenciados para a Rodamina B (RB) a depender da sua orientação espacial. Isto foi atribuído ao grupo benzóico perpendicular ao grupo xantênico e comprovado pela utilização da Rodamina 6G (R6G) sob as mesmas condições.

A contribuição da cinética e da dinâmica moleculares de dispersão no rendimento de uma reação química em fluxo foi avaliado com adição de Ca(II), um agente supressor da fluorescência da RB.

ÍNDICE

1-Introdução	13
1.1-A Injeção em Fluxo.....	13
1.2-Histórico da Injeção em Fluxo.....	14
1.3-Aplicações da Injeção em Fluxo.....	16
1.4-A Dispersão da Amostra no Fluido Carregador em Sistemas de Injeção em Fluxo.....	16
1.5-Fluorescência Induzida por Laser (LIF) e Fluorescência Induzida por Laser Polarizado (PLF).....	17
2 - A Dispersão em Sistemas de Injeção em Fluxo (FI)	19
2.1-Principais Características de um Sistema FI.....	19
2.1.1-Propulsão da Amostra.....	19
2.1.2-Injeção da amostra.....	20
2.1.3-Percurso Analítico.....	23
2.1.4-Detetor.....	24
2.2-Configurações Usuais.....	26
2.2.1-Sistema em Linha Única.....	27
2.2.2-Sistema em Confluência.....	28
2.2.3-Sistema com Zonas Coalescentes (<i>Merging Zones</i>).....	28
2.2.4-Sistema com Reamostragem da Zona Dispersa (<i>Sampling Zones</i>).....	28
2.2.5-Sistema com Fluxo Monossegmentado.....	29
2.3-Dispersão em Sistemas FI.....	30
2.4-Modelos Teóricos da Dispersão.....	33
3-O Sistema Fluorescente	36
3.1-A Fluorescência.....	36
3.1.1-Detecção de Fluorescência.....	38
3.1.2-Rendimento Quântico (Φ_F) e Supressão da Fluorescência.....	40
3.2-A Polarização e a Técnica PLF.....	42
3.2.1-PLF e Alinhamento Intermolecular em Sistemas FI.....	45
3.2.2-Dinâmica Molecular de Dispersão.....	47
4- Sistema Experimental	49
4.1-Sistema de Controle e Aquisição de Dados.....	50
4.1.1-A Interface de Controle Remoto.....	50
4.1.2-Sistema de Posicionamento Automático de Amostra.....	52

4.1.3-Sistema de Detecção e Aquisição de Dados em Tempo Real.....	53
4.2-Sistema de Fluxo FI.....	55
4.3-Sistema Ótico.....	59
4.4-Sistema Químico Fluorescente.....	61
4.5-Software.....	65
4.6-Rotina de Aquisição e Tratamento de Dados.....	66
5. Resultados e Discussão.....	68
5.1-Influência da Tensão Interfacial Estática no Processo de Dispersão.....	68
5.2-Influência da Gravidade na Dispersão em Sistema FI.....	69
5.3-Influência de Diferenças Estruturais Entre a RB e a R6G no Padrão de Dispersão da Amostra em Sistemas FI.....	71
5.4-Influência da Área Interfacial Líquido-Líquido na Dispersão em Sistemas FI.....	74
5.4.1-Dispersão Total da Amostra (LIF).....	74
5.4.2-Dispersão da Amostra em Função da sua Orientação Molecular.....	72
5.4.3-Polarização.....	85
5.5-Influência do Padrão e da Dinâmica de Dispersão na Reação da RB com Ca(II).....	88
5.5.1-Dispersão Total Através de LIF.....	88
5.5.2-Dispersão em Função da Orientação Molecular na Presença de Ca(II).....	91
5.5.3-Polarização.....	95
5.5.4-Influência da Área Interfacial no Rendimento da Reação.....	98
5.5.5-Polarização.....	103
6-Conclusão.....	106
Propostas Para o Futuro.....	109
7-Referências Bibliográficas.....	111
8-ANEXOS	

1-INTRODUÇÃO

1.1- A INJEÇÃO EM FLUXO

Em função do número cada vez maior de amostras a serem analisadas em laboratório e da crescente necessidade de alguns sistemas em operar de forma ininterrupta, a automação de processos analíticos convencionais tem se tornado alvo do interesse de diversos pesquisadores em todo o mundo.

O termo análise por injeção em fluxo (FIA) pode ser entendido como um conjunto de procedimentos analíticos automatizados, ou semi-automatizados, no qual uma amostra, ou reagente, é injetada num fluxo carregador, sem segmentação, sendo conduzida até uma cela de detecção. Esta é a tradução mais usual para a expressão, em inglês, “*flow injection analysis*”, da qual deriva a sigla FIA. Atualmente, em função da crescente aplicação de sistemas de injeção em fluxo em outros campos que não a análise química, tornou-se comum referir-se à técnica simplesmente como injeção em fluxo, ou FI, do inglês “*flow injection*”.

Boa parte dos méritos atribuídos ao FI se deve ao fato de que nem toda a amostra chega ao detector simultaneamente, ou seja, existe uma distribuição no tempo de residência desta no chamado percurso analítico. O fenômeno denominado dispersão torna possível a utilização de técnicas de pré-tratamento como diluição de amostras muito concentradas, reações químicas, extrações líquido-líquido, etc. Isto é devido a este fenômeno determinar o grau de mistura entre um analito e reagente ou solução carregadora num sistema de fluxo. Além disto, a frequência com que alíquotas consecutivas podem ser introduzidas, sem que ocorra superposição dos sinais das mesmas, depende do tempo que a amostra leva para ser retirada do caminho analítico (lavagem do percurso) e, portanto, deste tempo total de residência. O grau de dispersão é um dos principais fatores relacionado ao desempenho de um sistema de análise em fluxo.

1.2- HISTÓRICO DA INJEÇÃO EM FLUXO

Referida pela primeira vez na literatura por Ruzicka e colaboradores no ano de 1975 [Ruzicka 75], em 1996 mais de quarenta países já possuíam grupos de pesquisa dedicados ao aprimoramento de técnicas e desenvolvimento de novas metodologias e aplicações do sistema FI em análise química. Só no Brasil são aproximadamente 148 pesquisadores, distribuídos em todo o território nacional, produzindo em FI segundo dados do Sistema Lattes do CNPq em 10 de agosto de 2002.

Segundo K. K. Stewart [Stewart 81] a história da análise por injeção em fluxo tem sua origem ainda na década de cinquenta quando Skeggs desenvolveu em 1957 um sistema automatizado para análise de amostras discretas usando fluxo contínuo segmentado. Bolhas de ar eram usadas para segmentar, ou separar, as zonas de amostra com objetivo de minimizar uma diluição excessiva pelas forças dispersivas inerentes ao fluxo laminar do sistema. Além disto evitavam a sobreposição dos sinais de alíquotas consecutivas, lavando o percurso até o detetor. O artifício de utilizar a segmentação por ar, além de evitar diluições na amostra, tinha como objetivo gerar regiões turbulentas no fluxo de forma que a mistura entre reagente e analito fosse otimizada. Entretanto alguns inconvenientes estavam associados aos analisadores baseados neste princípio, como por exemplo, a dificuldade de se removerem as bolhas de ar instantes antes da zona de amostragem ser introduzida na cela de detecção e a demora na análise devido à baixa frequência analítica.

Ainda segundo Stewart [Stewart 81] a referência mais remota ao que hoje se chama análise em fluxo contínuo data de 1970 quando Nagy, Feher e Pungor descreveram um sistema que utilizava eletrodos de grafite para medidas voltamétricas de amostra injetadas em um sistema de fluxo contínuo não segmentado. Em 1973 Frantz e Hare descrevem um sistema para determinação de sílica em nível de submicrogramas fazendo uso de um sistema de fluxo contínuo não segmentado. No ano de 1974 K. K. Stewart, Beecher, e Hare apresentam um novo sistema de análise baseado no conceito de amostragem segmentada de Skeggs, mas utilizando um sistema de reação em fluxo não segmentado

concebido por Spackman, Stein e Moore. Finalmente em 1975 Ruzicka e Hasen [Ruzicka 75] publicam o primeiro artigo no qual usam o termo “*flow injection analysis*”, o primeiro de uma série nos quais descrevem teoria, prática e modelos matemáticos.

A grande vantagem do sistema FI, em relação aos modelos predecessores baseados em fluxo segmentado, reside no fato de que a ausência de ar não só permite reduzir as dimensões do módulo de análise como também aumenta a frequência analítica. Um outro fator importante é que, enquanto as bolhas de ar num fluxo segmentado evitam a dispersão da amostra, no fluxo não segmentado esta dispersão pode ser controlada tornando o sistema mais versátil.

Com efeito, pode-se controlar em linha a diluição de uma amostra com concentração acima das limitações do equipamento utilizado para detecção além de, mantendo-se a vazão constante, promover reações sem a necessidade de alcançar o equilíbrio antes da aquisição do sinal [Reis 96]. Segundo Stewart [Stewart 81] esta propriedade em particular levantou desde o início a possibilidade de se utilizarem módulos de análise por injeção em fluxo para estudos de cinética química como no sistema proposto por Dutt e Mottola neste mesmo ano.

Em 1977 Ruzicka e Hansen [Ruzicka 77] publicam mais um artigo da série com a descrição de um sistema para determinação de potássio, sódio e nitrato em soro sanguíneo e extratos de solo com eletrodos íon-seletivo, no qual começa a discussão sobre teoria em FI. Em 1978 um novo artigo [Ruzicka 78] discute a variância do pico nas curvas de resposta baseado no conceito de distribuição do tempo de residência, introduzindo o conceito de dispersão. Em 1980 Reijn e col. [Reijn 80] publicam um artigo no qual apresentam expressões simples para o processo de dispersão da amostra baseadas em soluções numéricas para equação de difusão-convecção.

1.3- APLICAÇÕES DA INJEÇÃO EM FLUXO

Dentre os diversos métodos automatizados de análise química desenvolvidos até hoje, os sistemas FI têm se destacado ao longo dos últimos 26 anos por sua versatilidade, rapidez, sensibilidade, repetibilidade e acurácia, sendo atualmente empregada no pré-tratamento de amostras, como pré-concentração [Valcarcel 87] e extração [Nord 84]. Mais recentemente foi utilizado para dissolução em linha [Luque de Castro 97], bem como na determinação de espécies químicas nas mais diversas áreas, como controle de qualidade em processos industriais [Sosnitza 98], análise clínica [Riley 86], agricultura [Bergamin 78], monitoramento ambiental [Ranger 90], etc.

Além de sua clássica aplicação em análise química, desde os primórdios desta técnica diversos módulos de análise vêm sendo adaptados para estudos de cinética química [Stults 87], no entanto não são encontrados na literatura, ao que o autor saiba, trabalhos visando a compreensão da cinética e dinâmica moleculares envolvidos nos processos de dispersão da amostra e reação responsáveis pelos resultados obtidos pelos sistemas de injeção em fluxo utilizados em análises químicas.

1.4-A DISPERSÃO DA AMOSTRA NO FLUIDO CARREGADOR EM SISTEMAS DE INJEÇÃO EM FLUXO

Diversos fatores contribuem para a versatilidade, precisão e acurácia num sistema FI, dentre estes podemos destacar, a propósito deste trabalho, a dispersão controlada da amostra no fluido carregador. Quando o analito é conduzido a vazão constante, é possível que este chegue sob condições de não equilíbrio da reação e/ou de não homogeneidade da mistura à cela de detecção. A principal consequência é a possibilidade de dosar uma determinada espécie química sem que a necessária reação química seja concluída, de forma que a curva de resposta não somente forneça informações acerca da concentração do analito, mas também da cinética da reação.

Em função da possibilidade de se estudar através da sua curva de reposta FI tanto as propriedades químicas quanto físicas de sistemas químicos, muitos pesquisadores têm se dedicado ao estudo da dispersão em FI. Não faltam na literatura referências a módulos de análises especialmente desenvolvidos para estudos de cinética de reação [Stults 87], além de tentativas de determinar coeficientes de dispersão ou coeficientes de difusão radial e axial de uma amostra num sistema de fluxo [Zou 97].

Pode-se ainda encontrar referências de modificações nos sistemas de fluxo propostas para incrementar o processo de dispersão da amostra, como reatores de geometrias diferentes [van Akker 98], sistemas de comutação que favorecem a dispersão pelo aumento da área interfacial, como na amostragem binária [Kronka 96] ou ainda o desenvolvimento de técnicas baseadas na exploração do gradiente de concentração gerado no percurso analítico para promover diluições, titulações ou ainda a calibração do instrumento de análise em linha [Hansen 88].

Até hoje, no entanto, o que se propôs em termos de dispersão em FI são padrões de distribuição de concentração longitudinal, mapeados em apenas uma dimensão, e modelos teóricos [Kolev 95] baseados em dados estatísticos relacionados às curvas de respostas e em conceitos da mecânica de fluidos que apenas simulam o fenômeno bidimensionalmente sem levar em conta o influência do alinhamento intermolecular em todo o processo.

1.5-FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER (LIF) E FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER POLARIZADO (PLF)

A proposta deste trabalho é determinar experimentalmente e com alta resolução espacial, a dispersão longitudinal e radial de uma amostra num fluxo carregador, através da técnica LIF, que consiste na indução de fluorescência na amostra (fluoróforo) utilizando um feixe laser como fonte de excitação. Além disto será também estudado o alinhamento intermolecular através da fluorescência

induzida por laser polarizado (PLF) [Kenyon 91]. Estes métodos se baseiam na absorção de radiação laser por um corante fluorescente, ou fluoróforo (que pode ser a amostra, reagente, o produto ou apenas uma sonda), e no subsequente decaimento radiativo com emissão de fluorescência [Lakowicz 83]. O método PLF fotoseleciona, através da absorção de radiação laser, moléculas com momento de dipolo paralelo ao campo elétrico do laser. Através da polarização de sua fluorescência é possível obter informações acerca da dinâmica da dispersão.

Para que este trabalho pudesse ser efetivado foi construído um aparato experimental automatizado que permite, através da medida de fluorescência total emitida pela amostra (LIF), mapear bidimensionalmente o comportamento da amostra durante o processo de dispersão e obter perfis axiais e radiais de distribuição de concentração em função do tempo. Tais perfis, quando interpolados, possibilitam obter experimentalmente mapas bidimensionais. A fluorescência total emitida pode ser resolvida nas suas componentes paralela e perpendicular ao campo elétrico do laser de excitação (PLF) o que nos permite calcular a depolarização fluorescente da amostra (polarização e a anisotropia), informações que nos permitem interpretar o alinhamento intermolecular, isto é a dinâmica da dispersão de sistemas químicos em fluxo.

2 - A DISPERSÃO EM SISTEMAS DE INJEÇÃO EM FLUXO (FI)

2.1 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DE UM SISTEMA FI

O sistema de análise química por injeção em fluxo tem como uma de suas principais características a versatilidade. Pode-se conceber desde sistemas muito simples, com o único objetivo de conduzir a amostra ao detetor, a montagens extremamente complexas que possibilitem o pré-tratamento da amostra em condições complexas como reação e detecção em diferentes condições de acidez, temperatura, determinação simultânea de espécies diferentes, etc. Em grande parte, isto se deve ao fato de um sistema FI ser modulado, ou seja, é composto por partes, ou módulos, que podem ser organizados de acordo com a necessidade do procedimento. Por exemplo, pode-se utilizar um mesmo sistema de fluxo com sistemas de detecção diferentes (espectrofluorímetros ou espectrofotômetros) sem a necessidade de alterar quaisquer das demais partes.

De forma geral podemos dividir um sistema de injeção em fluxo em quatro partes: propulsor dos fluidos, injetor da amostra, reator (também chamado de percurso analítico) e detetor. Cada uma destas partes apresenta significativa relevância para o processo de dispersão da amostra e podem ser modificadas para atender as necessidades do procedimento que se deseja empregar.

2.1.1 - Propulsão da Amostra

A propulsão dos fluidos é geralmente classificada em propulsão a pressão constante ou a vazão constante. No primeiro caso o fluido é geralmente conduzido até o detetor pela própria aceleração da gravidade. Nestas condições a vazão vai depender do sistema de fluxo empregado, isto é, alterações na impedância hidrodinâmica, como aumento de viscosidade, diminuição no diâmetro interno do tubo de conexão, ou mesmo um aumento na distância entre o ponto de injeção da amostra e o detetor, podem

provocar uma diminuição proporcional da vazão alterando a velocidade analítica. Em contrapartida, a propulsão baseada em pressão constante apresenta um fluxo mais estável uma vez que a pulsação é minimizada, visto ser induzida pelo uso de bombas (normalmente peristálticas).

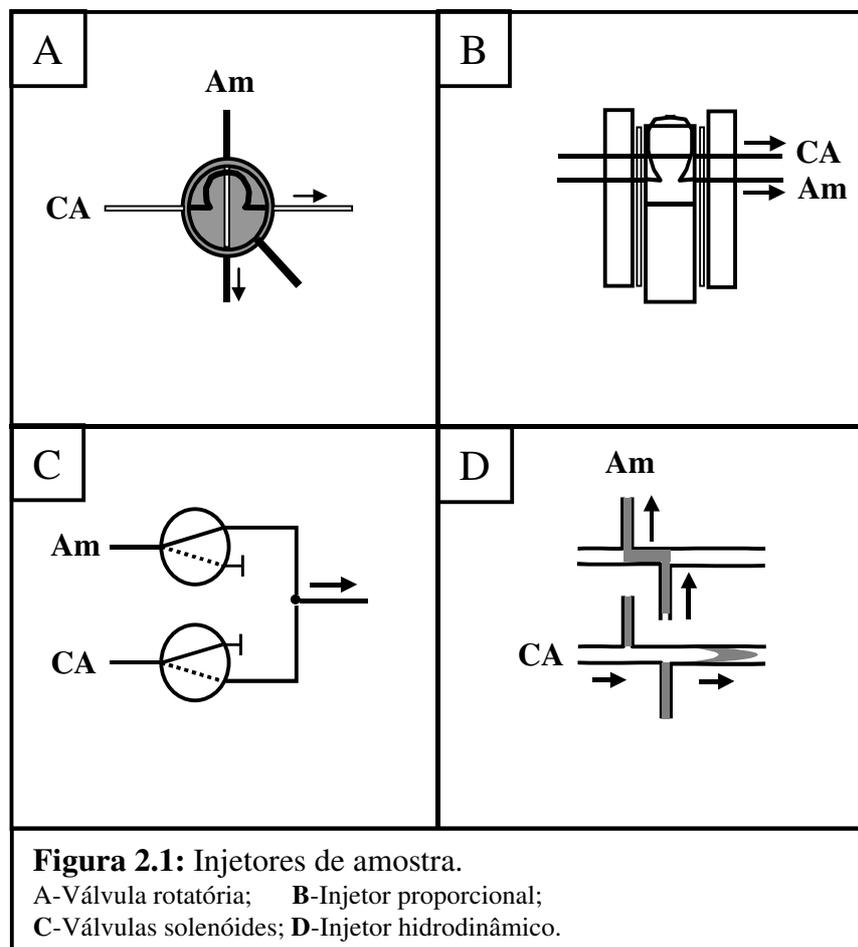
No sistema de propulsão baseado em pressão constante o fluido é impelido até o detetor por uma bomba. É muito comum o uso de bombas peristálticas em função de seu baixo custo, facilidade de operação e versatilidade para aplicações analíticas. Para manter a vazão do fluido constante a pressão exercida sobre o sistema deve ser alterada de acordo com as condições de fluxo. Aumentando-se a pressão podem-se corrigir reduções na vazão provocadas por variações na impedância hidrodinâmica do sistema. Outros sistemas alternativos de bombeamento têm sido empregados com o objetivo de diminuir a pulsação gerada neste sistema de propulsão, que é mais crítico quando são empregadas bombas peristálticas.

2.1.2 - Injeção da amostra

O dispositivo para injeção da amostra tem como principal função, como não poderia deixar de ser, introduzir um volume definido e reprodutível de amostra no sistema de fluxo. Além disto pode-se utilizar o injetor para introduzir quantidades conhecidas de um reagente ou de uma solução tampão, bem como para selecionar diferentes vazões para amostra, reagente e carregador.

Os mais variados artefatos já foram utilizados para esta finalidade, começando com seringas hipodérmicas, passando por válvulas mecânicas, como a válvula rotatória (fig. 2.1A) desenvolvida por Ruzicka [Ruzicka 77] e o injetor proporcional desenvolvido por Bergamin e col. [Bergamin 78] (fig. 2.1B), sendo atualmente muito utilizadas também válvulas eletromecânicas, especialmente as solenóides. De foram geral qualquer destes sistemas apresenta alta versatilidade, sendo o injetor proporcional o mais difundido no Brasil, não apenas por ter sido desenvolvido no país, mas por causa

do seu baixo custo, podendo ser confeccionado pelo próprio analista, e pela variada gama de configurações que podem ser empregadas utilizando este dispositivo.



Mais recentemente o uso de válvulas eletromecânicas têm aumentado significativamente. Uma vantagem destes dispositivos sobre os demais está na possibilidade de desenvolver sistemas com um maior grau de autonomia. Utilizando-se microcomputadores pode-se controlar remotamente todo o funcionamento de um módulo de análise FI, desde o sistema

de propulsão de fluidos até a aquisição do sinal analítico, passando pela injeção da amostra e reagentes.

Os dispositivos de injeção determinam o modo como os componentes do sistema de fluido são introduzidos no circuito, isto é, são responsáveis pela comutação. O desenvolvimento da técnica de injeção em fluxo está diretamente relacionado com o aprimoramento destes artefatos que, desde o princípio da técnica, são os responsáveis por sua versatilidade e precisão. A literatura descreve pelo menos três sistemas usuais de comutação [Krug 86]:

- Injeção Baseada em Alça - Neste método a amostra é aspirada de forma a preencher uma alça de amostra (*loop*) com volume definido. Em seguida uma porção do percurso analítico é substituído pela alça cheia de amostra que será conduzida até o detector. Normalmente são

utilizados injetores proporcionais ou válvulas rotatórias e o volume de amostra ou reagente injetado é definido pelo comprimento e pelo diâmetro interno da alça. Apresenta alta reprodutibilidade e simplicidade de operação. Normalmente um único dispositivo de comutação (válvula) é suficiente, mesmo quando se faz necessário fazer mais de uma injeção por ciclo de amostragem. Em alguns trabalhos a alça de amostragem é substituída por uma coluna preenchida com resina de troca iônica, possibilitando o desenvolvimento de técnicas de pré-concentração e separação em linha.

- Injeção baseada em tempo – Aqui um dispositivo de comutação eletronicamente operado desvia o fluxo de amostra em direção ao detetor por um período de tempo. Após o volume de amostra desejado ter sido introduzido no circuito, o comutador é operado de forma a restabelecer o fluxo da solução carregadora no percurso analítico. Neste caso o volume injetado de amostra é definido pela vazão do fluxo e pelo intervalo de tempo de comutação. Em função da necessidade de se ter um controle apropriado do intervalo de tempo em que a amostra está sendo injetada, é necessário o uso de dispositivos operados eletronicamente, normalmente válvulas solenóides (figura 2.1C). Este tipo de injeção é indicada para volumes relativamente grandes devido à dificuldade de se trabalhar com intervalos de tempo muito pequenos e por flutuações na taxa de fluxo. As desvantagens são o preço das válvulas (~USD 70,00 em janeiro de 2001) em relação aos injetores proporcionais e a necessidade de várias unidades para formar um módulo de comutação.
- Injeção hidrodinâmica – Proposto por Ruzicka e Hansen em 1983 [Ruzicka 83], consiste na aspiração da amostra através de um ducto transversal ao percurso analítico, como mostra a figura 2.1D. Após o ducto haver sido completamente preenchido (1 na figura 2.1D) o fluxo da solução carregadora é responsável pela condução da amostra até o detetor (2 na figura 2.1D). Tem a vantagem de permitir, com precisão, a injeção de volumes menores que 1 μ L. Uma desvantagem é o volume

morto provocado pela difusão da amostra, efeito que pode ser mais reprodutível operando o sistema eletronicamente.

Estes três principais sistemas de injeção podem ainda dar origem a outras metodologias de comutação, como injeção seqüencial [Legnerová 02], “*nested injection*” [Dasgupta 85], multicomutação [Kronka 96] e amostragem binária [Paim 98], cada uma das quais pode ser implementada pela adaptação de pelo menos um dos métodos descritos acima, a depender das condições requeridas pelo procedimento empregado.

Neste trabalho, conforme descrito no capítulo 4 (Sistema Experimental), foram utilizados dois sistemas de injeção por multicomutação baseados em tempo. Este modo de comutação é caracterizado pela injeção não simultânea de amostra e reagente num fluxo carregador. A introdução da amostra foi realizado de duas formas, no primeiro caso foi realizado um único pulso por período de amostragem, no outro pequenas quantidades de amostra e reagente foram introduzidas alternadamente no percurso analítico com o objetivo de aumentar a interface de contato entre os elementos de fluido, visando incrementar o grau de mistura.

2.1.3 - Percurso Analítico

O percurso analítico pode ser definido como o espaço percorrido pela amostra do ponto de injeção até a cela de detecção [Reis 96], no entanto pode-se considerar que o significado do percurso analítico para um sistema FI excede esta definição. Este espaço entre o injetor e o detetor é, na verdade, um dos principais parâmetros de um sistema de análise química em fluxo. Apesar de inicialmente ter sido proposto para conduzir a amostra até o sistema de detecção, ou para promover alguma reação química necessária à análise, atualmente pode-se desenvolver nele todo o pré-tratamento da amostra.

O percurso analítico é o principal parâmetro de controle no desenvolvimento de sistemas FI, uma vez que este define as condições em que o analito chega até a cela de detecção. Normalmente seu tamanho é definido empiricamente em função das necessidades do procedimento, levando em consideração se apenas uma diluição ou reação será necessária para a determinação da espécie de interesse ou se procedimentos de pré-tratamento mais complexos, como pré-concentração, extração ou dissolução, por exemplo, serão empregados.

No percurso analítico acontece a dispersão controlada da amostra, característica responsável pela versatilidade dos sistemas FI. Este fenômeno pode eliminar algumas etapas de pré-tratamento da amostra, como diluição por exemplo, uma vez que se pode ajustar em linha a concentração do analito às condições de operação do instrumento. Permite também um número elevado de determinações num curto espaço de tempo, visto este processo ser reproduzível a vazão constante, possibilitando a leitura do sinal analítico sob condições de não equilíbrio da reação e/ou não homogeneidade da mistura. Isto torna possível o emprego de percursos com comprimento menor do que o necessário para se completar a reação. Como o comprimento do percurso analítico define o tempo de residência total da amostra, a velocidade analítica pode ser em muito incrementada.

2.1.4 - Detetor

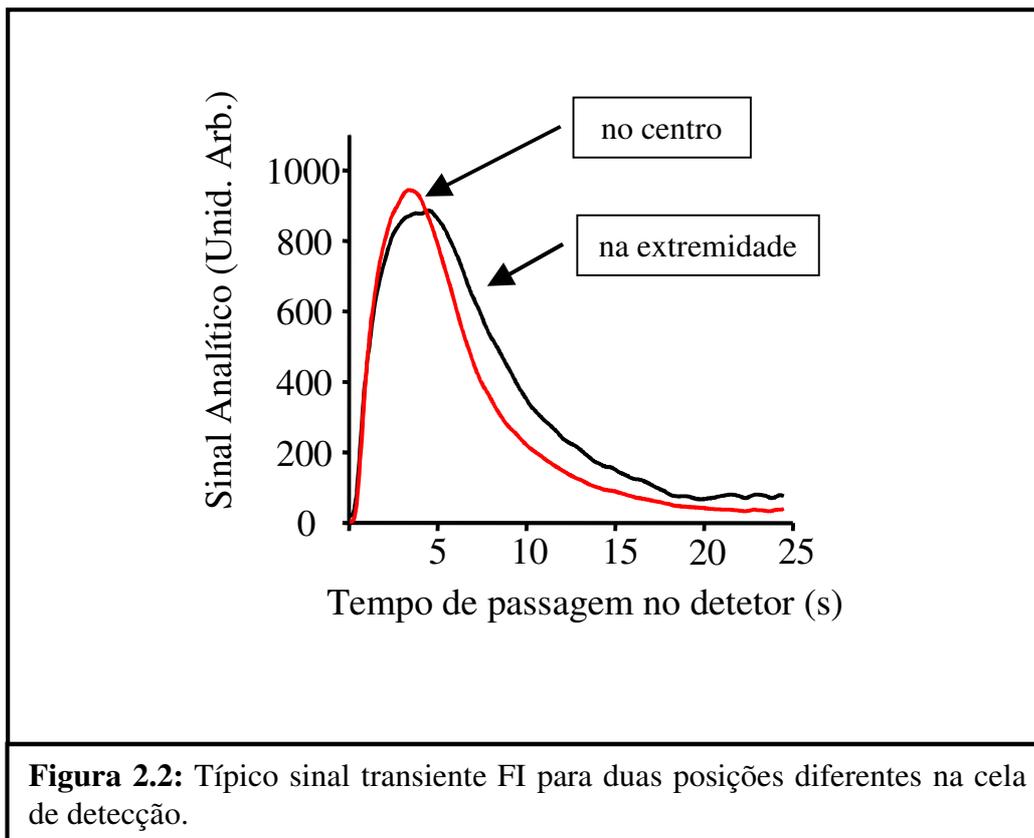
Os transdutores são dispositivos eletrônicos capazes de transformar uma grandeza física em outra. Os detetores utilizados em análise instrumental são na verdade transdutores responsáveis por transformar uma grandeza química impossível de ser compreendida numa grandeza física passível de ser processada e interpretada. Frequentemente, as técnicas de análise química são definidas pelo tipo de detetor empregado.

Uma grande virtude do sistema de injeção em fluxo é a possibilidade deste ser adaptado a praticamente qualquer técnica de análise química. Ruzicka, em seu VII artigo da série FIA, [Ruzicka

78] já propõe o uso de eletrodos íon-seletivos para detecção potenciométrica, em alternativa às aplicações espectrofotométricas desenvolvidas desde o início da técnica. Atualmente é comum encontrar na literatura trabalhos empregando absorção atômica [Calixto 01], emissão atômica com plasma indutivamente acoplado [Ferreira 99], fluorimetria [Ensafi 98] ou amperometria [Pasco 98], entre outros. Por conta disto atualmente o termo injeção em fluxo é utilizado em conjunção com o nome da técnica analítica empregada [Zagatto 99], como por exemplo, potenciometria por injeção em fluxo.

A utilização de uma gama tão grande de técnicas analíticas em módulos de análise FI criou uma demanda no desenvolvimento de toda uma instrumentação adequada aos sistemas de fluxo. Em função disto pode-se atualmente adquirir comercialmente cubetas de fluxo apropriadas para determinações espectrofotométricas, bem como eletrodos tubulares especialmente desenvolvidos para fins de análise em fluxo. Têm sido também implementadas técnicas mais sofisticadas como imobilização de enzimas em eletrodos para detecção amperométrica [Lima 98], a utilização de laser como fonte de radiação em espectrometria de lente térmica [Pogacnik 99] ou fluorescência induzida por laser [Amador-Hernández 01].

A resposta do detetor também é influenciada pelo processo de dispersão da amostra, de forma que o sinal analítico adquire um perfil transiente característico de sistemas FI (fig. 2.2), geralmente com uma subida rápida e uma queda mais lenta. A depender da simetria do pico pode-se avaliar a concentração do analito como seu máximo, a largura a meia altura do pico ou como a área total da curva. Como a forma do pico depende tanto do grau de dispersão longitudinal da amostra [Korenaga 92] como da contribuição da difusão radial [van der Linden 82], podem-se inferir informações acerca da dinâmica do processo químico, sendo o FI também largamente empregado em estudos de cinética química.



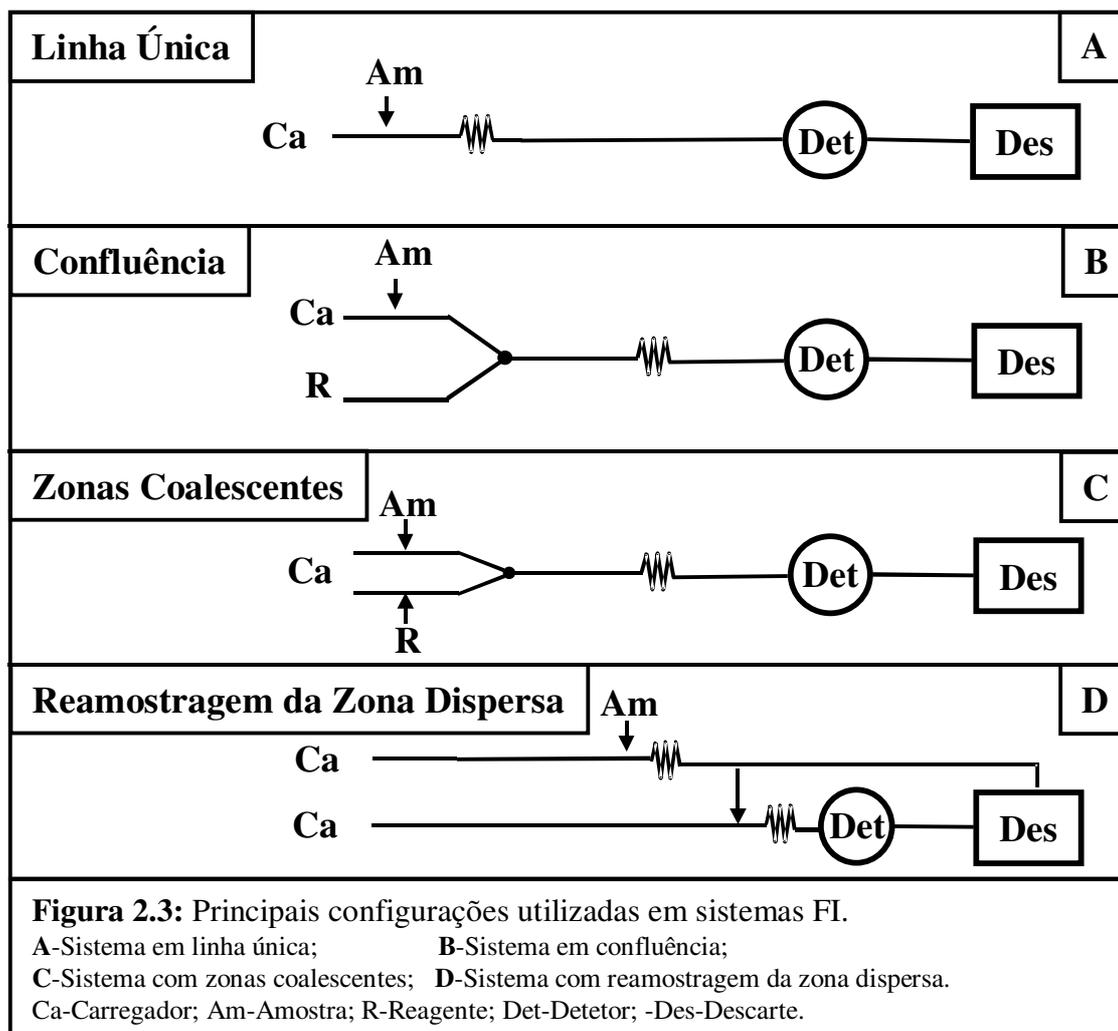
2.2 - CONFIGURAÇÕES USUAIS

Para cada aplicação analítica específica é necessária uma nova configuração FI, isto é, uma combinação dos principais componentes de um sistema FI, brevemente discutidos neste texto, de forma a permitir realizar em linha todo o protocolo experimental requerido para o procedimento em questão.

Ao longo dos anos de desenvolvimento da técnica FI várias configurações foram propostas dentre as quais pretendemos comentar resumidamente as mais importantes.

2.2.1 - Sistema em Linha Única

A primeira configuração empregada em métodos FI é também a mais simples. A amostra é diretamente injetada num fluxo carregador inerte, que promove a dispersão da amostra enquanto a conduz até o detetor como mostra a figura 2.3A.



Ainda hoje este diagrama é empregado quando não há necessidade de reação e quando a amostra deve sofrer uma intensa diluição. Neste sistema a dispersão é constantemente induzida por um gradiente de velocidades característicos de um fluxo laminar [Ruzicka 78]. Como não existem outros dispositivos de fluxo, exceto o próprio tubo de conexão do percurso analítico, a mistura entre carregador e amostra ou amostra e reagente ocorre exclusivamente por dispersão. Pode-se usar

também um reagente em lugar de um carregador inerte. No entanto a configuração em linha única requer um alto consumo do reagente, tendo sido esta a principal motivação para o desenvolvimento de novos diagramas para análise em fluxo.

2.2.2 - Sistema em Confluência

Esta configuração surge com o objetivo de minimizar o consumo de reagentes em substituição ao sistema em linha única. Baseia-se na introdução de confluências responsáveis pela inserção de um ou mais reagentes no fluxo carregador (fig 2.3B). Utilizando uma vazão maior para o carregador pode-se economizar reagente, no entanto ambos são constantemente bombeados em direção ao detetor.

2.2.3 - Sistema com Zonas Coalescentes (*Merging Zones*)

Em sistemas coalescentes (fig 2.3C) apenas o fluxo carregador é continuamente bombeado para o detetor. Nesta configuração amostra e reagente são introduzidos simultaneamente no percurso analítico passando a reagir logo após a confluência, quando ocorre sua mistura. Este sistema representa um avanço em relação ao diagrama em confluência pois evita o consumo de reagente na ausência da amostra.

2.2.4 - Sistema com Reamostragem da Zona Dispersa (*Sampling Zones*)

Mantendo-se um percurso analítico de comprimento fixo, quanto menor o volume de amostra injetado no sistema, mais intenso será o processo de dispersão e, conseqüentemente, maior será o fator de diluição. Assim quando o sinal da amostra está acima da faixa de trabalho do detetor pode-se manipular o fenômeno da dispersão com o objetivo de ajustar a concentração do analito. Em alguns

casos, no entanto, o elevado sinal da espécie de interesse pode exigir uma redução de volume maior que o possível para o sistema de injeção utilizado. Isto pode ser devido à limitação na alça de amostra para comutação utilizando válvulas mecânicas, ou no tempo de chaveamento de válvulas solenóides para comutação baseada em tempo.

O sistema de reamostragem da zona dispersa [Reis 81] (fig 2.3D) foi desenvolvido para os casos em que é desejada uma diluição muito intensa do analito. Baseia-se em dois percursos analíticos distintos e comutados. Inicialmente a amostra é injetada no primeiro percurso analítico sofrendo dispersão, em seguida uma fração desta mistura de amostra e carregador é aprisionada e inserida no segundo percurso analítico, sofrendo novamente o processo de dispersão enquanto é conduzida até o detector. O fator de diluição pode ser ajustado variando a fração do volume de amostra dispersa no primeiro percurso analítico que será aprisionada.

Acoplado este sistema ao de zonas coalescentes foi possível automatizar o método das adições padrões [Giné 83], usando uma solução concentrada para gerar, em linha, padrões mais diluídos que serão acrescentados à amostra ou utilizados para construção de curvas de calibração.

2.2.5 - Sistema com Fluxo Monossegmentado

Neste sistema de fluxo a zona da amostra é introduzida no percurso analítico entre duas bolhas de ar [Pasquini 02]. Como a dispersão acontece em função da miscibilidade do analito na solução carregadora, a presença de um fluido imiscível entre carregador e amostra, no caso uma bolha de ar, evita o processo de dispersão. Esta variante da injeção em fluxo é indicada tanto para análises em que a dispersão da amostra não é desejada, como para quando se deseja aumentar o tempo de residência da amostra sem diminuir a frequência analítica. Assim é possível enfileirar vários plugues de amostra sem que haja contaminação. Este sistema apresenta um inconveniente, já que em diversas análises como,

por exemplo, as baseadas em espectrometria de absorção molecular ou atômica é necessária a remoção da bolha (purgar o sistema) antes que a zona de amostra alcance o detetor.

Apesar de ser tradicionalmente considerada como uma configuração FI, uma recente recomendação da IUPAC [Zagatto 99], recomenda uma classificação alternativa para injeção em fluxo monossegmentado, não mais como uma variante da análise por injeção em fluxo. Agora, além de evidenciar a característica de fluxo monossegmentado, é imprescindível discriminar o fluido separador quando este não for ar, por exemplo injeção em fluxo monossegmentado por N₂.

2.3-DISPERSÃO EM SISTEMAS FI

Tão logo a análise química por injeção em fluxo se difundiu na comunidade científica mundial seus aspectos teóricos começaram a ser discutidos. No X artigo da série FIA, Ruzicka e Hansen [Ruzicka 78] definem a dispersão da amostra em sistemas FI como a relação de concentração antes e após acontecer o processo de dispersão nos elementos de fluido. Por analogia com reatores químicos de mistura de fluidos em larga escala, eles propõem uma descrição teórica baseada no modelo de tanques-em-série. São discutidos os principais fatores que podem afetar o processo de dispersão como difusão radial e axial, convecção e características intrínsecas ao sistema de fluxo como rugosidade e diâmetro dos tubos de conexão, vazão do carregador, número de Reynolds, geometria do reator, etc. São sugeridas cinco regras para a manipulação da dispersão necessária à metodologia analítica empregada. Neste artigo, no entanto, a discussão se resume ao processo de dispersão ocorrido no transporte da amostra.

Em 1980 van der Linden, e col. [Reijn 80] utiliza o modelo de tanques-em-série e a mecânica de fluidos, para fornecer uma descrição teórica sobre FI. Este modelo consiste de um fluxo laminar simples sem difusão e considera a variância no sinal como decorrente do método de injeção e detecção empregados. No ano seguinte Vanderslice, e col. [Vanderslice 81] definem o tempo de residência total

da amostra no sistema como a soma do tempo de viagem da amostra mais a dispersão em um sistema FI simples. Ainda na década de 80, em 1982, o mesmo van der Linden [van der Linden 82] sugere padrões de dispersão diferentes para tipos de reatores diferentes. Além disto propõe um modelo de reator que intensifica a mistura entre reagente e amostra, denominado por ele SBSR, do inglês “*single bead string reactor*”.

O interesse por uma descrição teórica sobre a dispersão não se trata de mera curiosidade mas, como vimos, seu controle é fundamental para qualquer aplicação de sistemas FI. Portanto, compreender as leis e fatores que regem a dispersão, abre novas perspectivas para o desenvolvimento de diagramas e dispositivos de fluxo que otimizem o funcionamento de qualquer módulo de análise. Isto significa diminuir ainda mais o consumo de reagentes e os limites de detecção e aumentar a sensibilidade e velocidade analítica, favorecendo o desenvolvimento de novas aplicações tanto na análise química quanto nos estudos de cinética química e, no caso deste trabalho mais recentemente, na dinâmica molecular.

Fazendo uma relação entre teoria e prática Korenaga [Korenaga 92] estuda a dispersão de um plugue de amostra injetada num sistema de fluxo laminar ideal, com o objetivo de desenvolver um modelo hidrodinâmico que permita desenvolver sistemas FI com maior precisão e sensibilidade. A dispersão foi estudada sob várias condições de operação diferentes e os padrões foram determinados de acordo com constantes obtidas experimentalmente.

Neste mesmo ano Murugaiah e Synovec [Murugaiah 92] publicam um trabalho no qual utilizam um laser de He-Ne para determinar pesos moleculares de polietilenoglicóis (PEG's, numa aplicação da dispersão em sistemas FI para estudos físico-químicos. O experimento basicamente consiste na geração hidrodinâmica de gradientes de concentração pela injeção de um plugue de amostra em um tubo cilíndrico. A forma do perfil de concentração é definida pela razão entre velocidade radial e axial, devido aos efeitos de difusão e convecção. Um sensor mede a diferença de fase no feixe de He-Ne provocada pelo gradiente do índice de refração devido à distribuição radial de concentração. Os dados

são convertidos numa relação assimétrica que é correlacionada com o coeficiente de difusão do analito e, então, com o seu peso molecular. Este trabalho evidencia a importância da compreensão dos fatores determinantes na dispersão da amostra bem como a versatilidade da injeção em fluxo, não apenas como instrumentação em química analítica, mas como uma poderosa ferramenta nas mais diversas especialidades da química.

No entanto, aparentemente dois aspectos reduzem sua resolução espacial: A entrada e a saída de fluido da cela de detecção é lateral e os dados são obtidos com caminho ótico de 10mm, sendo uma média do que realmente está acontecendo.

Wentzell e col [Wentzel 93], utiliza simulação do tipo “*random walk*” para avaliação de perfis de dispersão em sistemas FI. Os estudos se limitam a casos de dispersão em tubos com fluxo laminar, sem reação. A simulação teórica é comparada com resultados experimentais de dispersão longitudinal com uma boa aproximação. No entanto, apesar de simular teoricamente mapas bidimensionais de distribuição de concentração, a comparação com dados experimentais se resumiu às curvas de resposta características longitudinais unidimensionais.

Explorando mais uma vez a dispersão da amostra no intuito de otimizar um sistema FI Li e col. [95], evidenciam a influência da difusividade química na forma do pico de resposta. Para tal utilizam reagente e amostra com difusividades diferentes e variam o tipo de comutação num sistema de linha única, ora injetando o reagente na amostra, num procedimento denominado por ele injeção do reagente, ora injetando a amostra no reagente, ou simplesmente injeção da amostra. O autor conclui que, em um sistema FI de linha única, a forma do pico e a diferença no tempo de residência da amostra são afetados pela posição relativa de amostra e reagente. Em consequência disto, injetando o reagente com menor difusividade no de maior difusividade, a sensibilidade do método deve ser incrementada em relação ao modo de injeção oposto.

Mais recentemente ZOU, e col. [ZOU 97], descrevem dois métodos teóricos baseados na solução da equação de difusão-convecção para determinação de coeficientes de difusão em sistemas FI, os

métodos foram testados em condições experimentais unidimensionais, isto é, longitudinais, e os resultados apresentaram um erro de cerca de 6%.

Certamente uma série de outros trabalhos poderia ser aqui referida, no entanto existem na bibliografia diversas revisões de boa qualidade [Kolev 95]. Aqui o objetivo é ressaltar a importância do estudo da dispersão no universo dos sistemas FI e, sobretudo, evidenciar as possibilidades decorrentes de um melhor entendimento deste fenômeno.

2.4-MODELOS TEÓRICOS DA DISPERSÃO

Diversos aspectos práticos da injeção em fluxo já são conhecidos e extensivamente aplicados, como se pode observar na literatura. Por outro lado, os fundamentos teóricos ainda são um campo vasto a ser explorado. Em boa parte isto se deve à complexidade dos fenômenos envolvidos nesta técnica devido à grande variedade de configurações de sistemas experimentais desenvolvidos ao longo do tempo, sendo que cada um tem efeitos específicos relacionados com a dispersão, como difusão e convecção.

Muitos modelos matemáticos tem sido aplicados por inúmeros pesquisadores na árdua tarefa de descrever teoricamente o sistema de injeção em fluxo. Inicialmente foram utilizados basicamente modelos da mecânica de fluidos adaptados às condições de “microfluxo” dos sistemas FI. Atualmente outras áreas como a estatística e a inteligência artificial, por exemplo, tem contribuído na construção de descrições teóricas para estes sistemas.

Podemos classificar os modelos FI em dois grupos principais [Kolev 95], os analítico-experimentais e os “*black box*”.

Os “*black box*” são particularmente indicados em sistemas complexos, quando é difícil, ou impossível, estabelecer a estrutura das relações entre os parâmetros que governam o comportamento do sistema. Este tipo de modelagem descreve o processo baseando-se apenas na relação entre o que

entra e o que sai do sistema de fluxo, sem se importar com os fenômenos reais responsáveis pela transformação do fluido de entrada no de saída. Os principais exemplos são redes neurais, regressão de equações, funções impulso-resposta e momentos estatísticos. A grande vantagem destes métodos é a relativa simplicidade no tratamento matemático, não sendo necessário o uso de computadores muito rápidos. Em contrapartida, além de exigir um grande número de experimentos para o seu desenvolvimento, sua aplicabilidade se resume ao sistema para o qual foi desenvolvido, sem aprofundamento nos processos químicos e físicos que ocorreram.

Por sua vez as aproximações do tipo analítico-experimentais sintetizam as descrições matemáticas de grandezas importantes da mecânica de fluido como: padrão de fluxo, transferência de massa e calor e cinética das reações químicas no sistema modelado. São baseados em constantes físicas fundamentais e parâmetros medidos diretamente. Frequentemente consistem de modelos semi-empíricos nos quais são incluídos parâmetros que só podem ser determinados com base em dados experimentais.

Esta classe se divide em dois outros grupos de acordo com as condições necessárias ao desenvolvimento dos cálculos. O modelo “*random walk*” considera um plugue de amostra como um número discreto de moléculas, sendo que o intervalo de tempo de observação é dividido em um número de subintervalos exatamente iguais. Durante cada subintervalo as moléculas são transportadas no sentido do fluxo por convecção, tendo em seguida a sua posição modificada numa das três dimensões do espaço aleatoriamente. Por conta do seu caráter aleatório este modelo é classificado como probabilístico.

O segundo grupo é chamado de determinístico, pois cada variável pode ser designada como um número, ou um conjunto de números, fixos para qualquer condição do sistema. Neste grupo podemos destacar o modelo de tanques-em-série, proposto por Ruzicka e Hansen [Ruzicka78] no X artigo da série FIA, e o modelo de plugue de fluxo disperso axialmente proposto mais recentemente por Kolev e colaboradores [Kolev 86].

Pode-se observar que a grande maioria dos modelos é desenvolvida com base em conceitos macroscópicos (dinâmica de fluidos) e na dispersão axial da amostra durante o seu transporte até o detector, não sendo, em geral, considerado o processo de dispersão radial da amostra. Uma característica importante do trabalho aqui relatado é, além de fornecer informações empíricas sobre dispersão axial e radial em sistemas FI, propor uma interpretação molecular tanto para os fenômenos físicos quanto químicos no transporte da amostra até a cela de detecção, avaliando experimentalmente os diversos fatores físicos e químicos envolvidos neste processo.

3-O SISTEMA FLUORESCENTE

Como foi evidenciado no capítulo 2 (A Dispersão em Sistemas de Injeção em Fluxo) os sistemas FI podem ser adaptados a uma variedade de técnicas analíticas. Portanto, trabalhos empregando fluorescência em análises químicas em fluxo não são novidade.

A contribuição deste trabalho em relação a outros que utilizam fluorescência associada a sistemas FI está no fato de que não existem, ao que o autor sabe, relatos da aplicação de técnicas baseadas na detecção de fluorescência nas seguintes condições:

- Aquisição de mapas bidimensionais de fluorescência total em FI;
- Aplicação da técnica PLF na determinação de alinhamento molecular em FI (PLF-FI);
- Aquisição de mapas bidimensionais de alinhamento intermolecular em FI (polarização).

A utilização de técnicas fluorescentes é mais freqüente em análises químicas que estão relacionadas com o monitoramento de processos biológicos. A utilização de corantes fluorescentes como traçadores é comum e diversos sistemas FI já foram desenvolvidos. Recentemente a detecção de fluorescência polarizada pontual tem sido empregada no estudo da cinética e dinâmica molecular em sistemas dinâmicos como processos de polimerização [Bur 00] por exemplo.

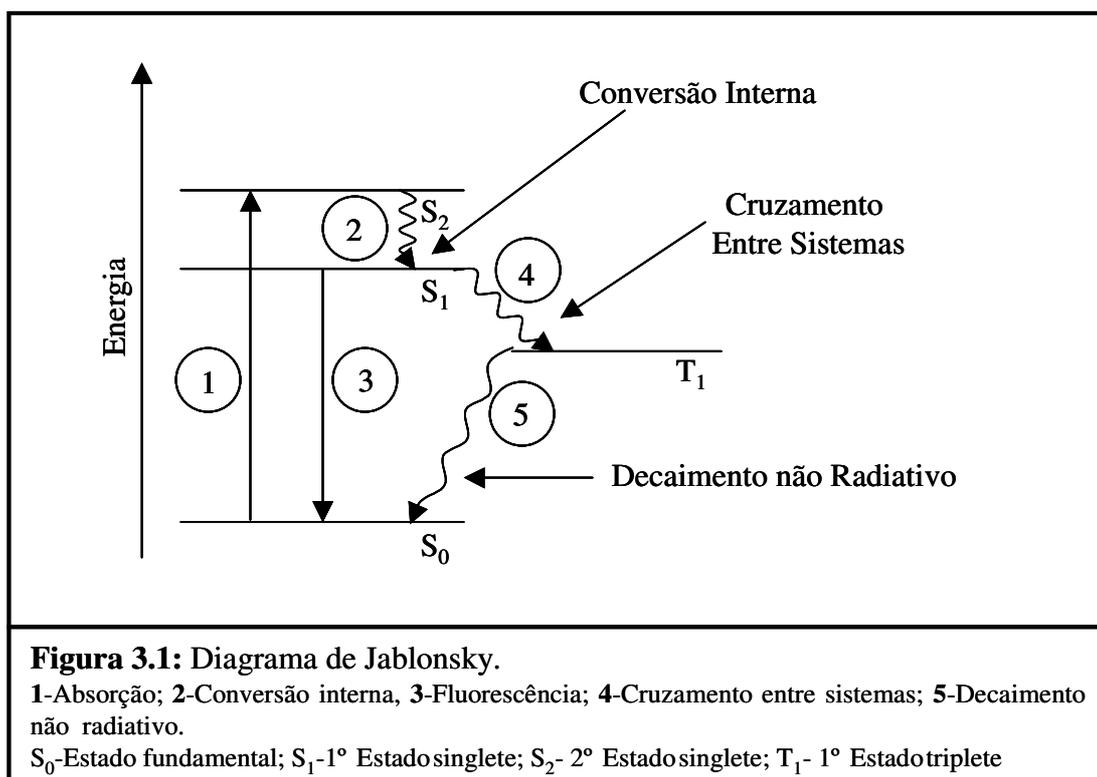
A utilização de fluorescência polarizada neste trabalho, além de ser inédita em FI, se justifica na possibilidade de estudar empiricamente a cinética e a dinâmica molecular do processo de dispersão da amostra no fluxo carregador.

3.1-A FLUORESCÊNCIA

O processo que dá origem ao fenômeno de fluorescência acontece basicamente em três etapas: absorção de energia pela molécula e emissão de fótons com existência ou não de conversão interna para níveis de energia mais baixos acompanhado de decaimento não radiativo.

Moléculas capazes de emitir fluorescência são designadas por fluoróforos ou corantes fluorescentes. Um exemplo típico são as que possuem cadeias de hidrocarbonetos poliaromáticas ou heterocíclicas.

A figura 3.1, diagrama de Jablonsky, mostra uma representação genérica das transições eletrônicas e transferências de energias responsáveis por processos fotoluminescentes como a fluorescência.



Na primeira etapa o fluoróforo absorve fótons de uma fonte de luz externa como, no caso deste trabalho, um laser (1 na figura 3.1). A absorção de radiação aumenta a população de elétrons no estado singlete excitado S_2 por um período de tempo cuja vida média é denominada tempo de vida do estado excitado (Γ_{exc}). Normalmente esta segunda etapa dura um tempo médio da ordem de 10^{-9} s, sendo o tempo de vida do estado excitado da RB cerca de 10×10^{-9} s nas nossas condições experimentais [Scully 91].

Nesta segunda etapa os elétrons no nível S_2 sofrem decaimento não radiativo, dissipando parte de sua energia por relaxação vibracional, por emissão de calor e colisões, o que provoca uma conversão

interna para o estado S_1 (2 na figura 3.1). É importante observar que nem todos os elétrons neste nível voltam ao estado fundamental por emissão de fluorescência, uma série de outros mecanismos podem desativar o estado S_1 sem que haja emissão de fótons. Principalmente colisões e transferências de energia que podem gerar um cruzamento intersistemas, isto é, os elétrons podem ser levados a um estado de tripleto (4 na figura 3.1) e voltam ao estado fundamental de forma não radiativa (5 na figura 3.1).

A terceira etapa é caracterizada pela emissão de fótons por parte dos elétrons que ocupam o estado S_1 , quando estes voltam ao estado fundamental (3 na figura 3.1). A razão entre o número de fótons emitidos na fluorescência e o número de fótons absorvidos é conhecida como rendimento quântico (Φ_F) fluorescente. Este determina a eficiência de um determinado fluoróforo. Considerando que antes da emissão os elétrons dissiparam parte da energia na forma de calor deve existir uma diferença entre os comprimentos de onda de excitação e emissão. Esta diferença entre a frequência da luz absorvida e emitida é fundamental para as técnicas analíticas baseadas na detecção de fluorescência, uma vez que a radiação luminosa pode ser coletada sem a interferência dos fótons de excitação. Este processo é chamado deslocamento de Stokes e é responsável pela alta sensibilidade dos métodos fluorescentes de análise química.

3.1.1-Detecção de Fluorescência

O sistema de detecção de fluorescência não difere muito dos demais métodos óticos de análise. Basicamente é composto por uma fonte de excitação, a amostra, que pode ter fluoróforos adicionados como sondas fluorescentes, um sistema de filtros para eliminar a luz de fundo proveniente da fonte de excitação e um fotodetector. Para detecção de fluorescência polarizada com razão sinal ruído alta é necessária a utilização de um laser. O fotodetector pode ser uma fotomultiplicadora (sinais fracos), um

fotodiodo (sinais intensos) ou um sensor CCD para detecção de imagens bi e tridimensionais (neste caso gerando hologramas).

Duas configurações diferentes são normalmente empregadas na detecção de fluorescência. Estas duas variações diferem entre si no que diz respeito ao posicionamento do fotodetector. Quando a cela de detecção, ou a amostra, é transparente o suficiente e a luz de excitação pode ser devidamente atenuada com filtros sem prejuízo no sinal, o detetor pode ser posicionado em linha, na mesma direção do feixe de excitação, após a amostra. Já a detecção frontal é feita na mesma face da amostra iluminada pela fonte de excitação quando não é possível posicionar o sistema para detecção em linha. Esta alternativa é empregada nos casos em que a radiação de fundo está numa ordem de grandeza superior ao próprio sinal da amostra, ou quando a amostra é opaca.

Qualquer sistema de detecção de fluorescência possui o que se chama de polarização intrínseca, isto é, mesmo na ausência de fluxo as moléculas adquirem um alinhamento característico pela interação com as superfícies da cela, imposta pela própria montagem experimental e pela malha de forças intermoleculares. Nos casos em que se utiliza o sistema de detecção frontal a polarização medida frequentemente é maior do que em sistemas em linha. Isto se deve ao fato de que na detecção frontal normalmente a fluorescência é coletada em um ângulo diferente de zero em relação ao feixe de excitação. Para molécula retangular, quando este ângulo é da ordem de aproximadamente 47° (ângulo de Brëwster) a fluorescência emitida com o campo elétrico paralelo ao campo elétrico do feixe de excitação (aqui denominada fluorescência vertical) [Kawski 90, Kawski 94] atravessa a parede da cela de fluxo, sendo a fluorescência perpendicular (aqui chamada de horizontal) refletida internamente. Isto gera uma distribuição anisotrópica espacial da fluorescência polarizada, ou seja, nestas condições a polarização intrínseca será maior do que o esperado. No capítulo 4 (Sistema Experimental) será discutida a polarização intrínseca da fluorescência obtida para o sistema experimental desenvolvido neste trabalho.

Existem no mercado diversos equipamentos que se baseiam em sistemas fluorescentes, como espectrofluorímetros, citômetros de fluxo e sistemas de microscopia fluorescente, entre outros. De forma geral qualquer destes espectrômetros apresentam simplicidade de operação, podem ser adaptados a uma interface de controle remoto e em alguns casos possuem versatilidade suficiente para a aplicação em diversas metodologias de análise.

Apesar de todas estas vantagens a grande maioria dos sistemas oferecidos pelos fabricantes de instrumentação analítica não preenche os requisitos necessários à detecção de fluorescência polarizada e bidimensional, muito menos apresentam a versatilidade e a resolução espacial necessária aos estudos de dispersão em FI proposto neste trabalho. Em função disto, um sistema experimental automatizado foi especialmente desenvolvido para este estudo. Ele é capaz de, não apenas detectar a polarização da fluorescência induzida por laser, mas também quantificar a fluorescência total emitida pela amostra, neste caso utilizando fluorescência induzida por laser (LIF do inglês “*laser induced fluorescence*”). Tem resolução espacial suficiente para fornecer mapas de polarização e de distribuição de concentração em função do tempo para sistemas FI com tubos milimétricos, e será amplamente descrito no capítulo 4 (Sistema Experimental).

3.1.2-Rendimento Quântico (Φ_F) e Supressão da Fluorescência

A eficiência de uma sonda fluorescente [Lakowicz 83] pode ser medida em função de Φ_F e depende da eficiência do fluoróforo em absorver fótons de excitação, representado pelo coeficiente de extinção molar ou absorvidade (ϵ) ou rendimento quântico de absorção (Φ_A), da proporção destes fótons que são emitidos pela molécula como radiação fluorescente e reprodutividade deste ciclo de absorção e emissão. Isto significa que o sinal fluorescente depende dos mesmos parâmetros que regem outros métodos espectrométricos de análise química, inclusive da lei de Lambert-Beer e, por conseguinte, também suas conseqüências.

Tanto ϵ quanto Φ_F podem ser determinados experimentalmente. O valor de ϵ é definido com relação a um comprimento de onda específico, normalmente o máximo de absorção, já o Φ_F pode ser medido integrando todo o espectro de emissão fluorescente. A intensidade de fluorescência, em alguns casos, pode ser considerado proporcional ao produto de ϵ por Φ_F [Johnson 96, Lakowicz 83].

A eficiência do fluoróforo depende do ambiente químico, isto é, a depender do meio em que o processo de fluorescência ocorre alguns mecanismos podem provocar a desativação do estado excitado sem emissão de radiação, sendo designados supressão da fluorescência.

A supressão é um processo bimolecular normalmente provocado por dois fatores principais, presença de espécies paramagnéticas como o O_2 , ou átomos pesados em solução, como I ou metais. Estas espécies são capazes de desativar, por transferência de energia não radiativa, o estado excitado do fluoróforo, extinguindo a fluorescência.

Além da possibilidade da fluorescência ser suprimida por fatores extrínsecos, como os citados acima, é possível também que o próprio fluoróforo atue como supressor. Neste caso o fenômeno é denominado auto-supressão e está normalmente relacionado com interações transientes do estado excitado, supressão colisional ou formação de espécies cujo estado excitado tem baixo θ_F . A transferência de energia para dímeros não fluorescentes, ou que fluorescem em outros comprimentos de onda, também pode provocar a extinção da fluorescência.

Normalmente os processos de supressão estão associados com o raio crítico de Förster, que pode ser definido como a distância radial mínima entre os fluoróforos capaz de permitir a transferência de energia não emissiva de uma molécula para outra. Além de estar relacionado com a extinção da fluorescência de forma não radiativa, o raio Förster pode provocar desvios consideráveis nas medidas de polarização, uma vez que as moléculas excitadas pela fonte de radiação podem transferir sucessivamente energia para outras moléculas próximas, com um pequeno desvio na orientação do campo elétrico, numa seqüência que pode culminar na emissão de fluorescência por uma molécula diferente daquela que foi inicialmente excitada. Em outras palavras a fluorescência medida não revela

apenas a evolução do estado do sistema excitado, e, portanto as informações obtidas não correspondem à observação desejada.

3.2- A POLARIZAÇÃO E A TÉCNICA PLF

A polarização é uma das medidas possíveis do grau de alinhamento intermolecular. Em sistemas dinâmicos, isto é, onde o líquido flui, é normalmente obtida por intermédio de fluoróforos, neste caso chamados de sondas fluorescentes, dissolvidos no meio. Em outras palavras, a polarização revela a percentagem média do deslocamento, ou não deslocamento, angular do fluoróforo que ocorre entre a absorção e subsequente emissão de um fóton [Lakowicz 83]. Utilizando sondas fluorescentes adequadas, de preferência moléculas de geometria assimétrica em duas ou três dimensões, pode-se calcular o grau de alinhamento intermolecular entre as moléculas do solvente utilizando polarização.

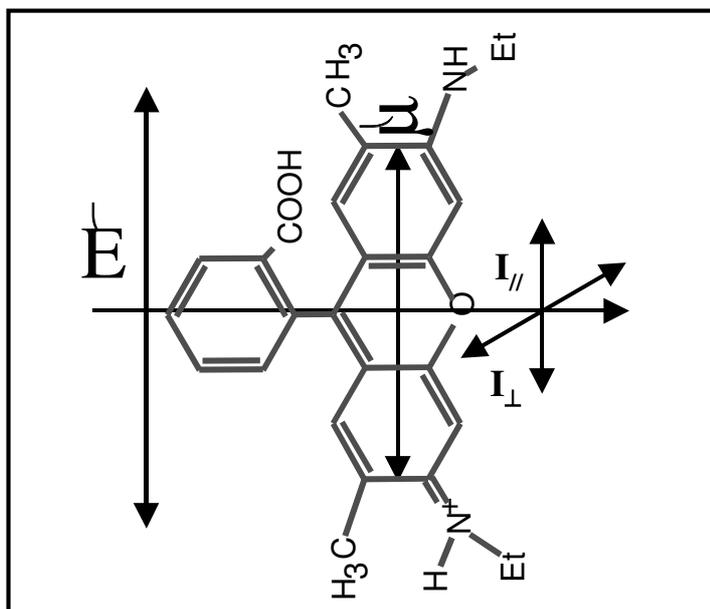


Figura 3.2: Representação da interação entre o campo elétrico do laser (E) e o momento de dipolo da rodamina B (μ).

I_{\perp} -Componente perpendicular da fluorescência;
 $I_{//}$ -Componente paralela da fluorescência.

A polarização se baseia no princípio da fotoseleção, isto é, a probabilidade de absorção de radiação por um fluoróforo com um momento de dipolo elétrico μ oscilante é proporcional ao $\cos^2\theta$, em que θ é o ângulo que o dipolo de absorção da molécula fluorescente faz com a componente elétrica da radiação de excitação (figura 3.2). Como a distribuição espacial da energia irradiada por esta molécula é idêntica à energia irradiada por uma antena, que segundo a física clássica, também é um dipolo oscilante,

pode-se relacionar a intensidade de luz polarizada absorvida pelo sistema com a intensidade da

fluorescência polarizada emitida. Assim, durante a etapa de excitação a fotoseleção permite que apenas moléculas com momento de dipolo quase paralelo ao campo elétrico do feixe de excitação absorvam a radiação, comportando-se como antenas.

Antes de sofrer decaimento radiativo uma parte destas moléculas podem rotacionar, em função das condições impostas pelo solvente em fluxo, emitindo fluorescência polarizada em outras direções. Medindo a proporção de moléculas que permaneceram alinhadas, isto é, a intensidade de fluorescência polarizada paralelamente ao campo elétrico do feixe de excitação e comparando com a fluorescência perpendicular, pode-se obter a polarização do sistema. A utilização de laser como fonte polarizada de excitação constitui a base da técnica denominada de fluorescência polarizada induzida por laser (PLF do inglês “*polarized laser induced fluorescence*”). Esta técnica permite quantificar a fluorescência polarizada emitida pela amostra através do cálculo da polarização.

A equação 3.1 mostra como a polarização pode ser calculada para a luz linearmente polarizada em função das componentes paralela e perpendicular da fluorescência emitida.

$$P = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}} \quad \text{[Equação 3.1]}$$

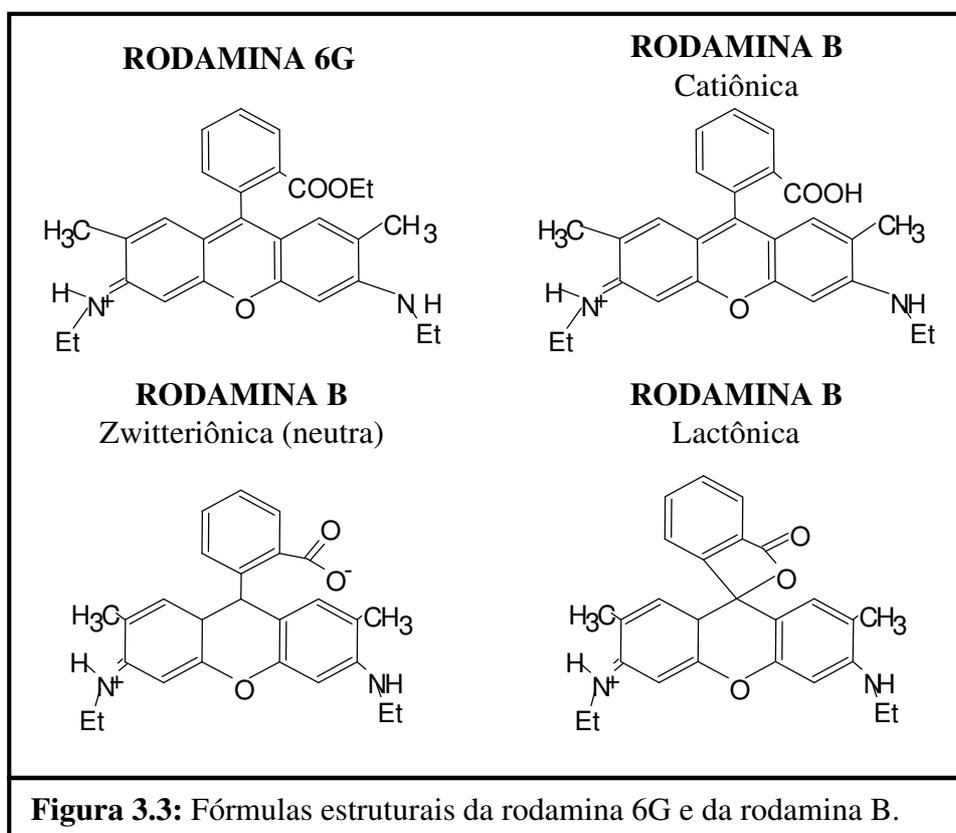
onde P é polarização. $I_{//}$ a intensidade da fluorescência paralela ao campo elétrico do feixe de excitação e I_{\perp} a intensidade da fluorescência perpendicular ao campo elétrico do feixe de excitação.

Considerando a luz laser utilizada é 100% polarizada na vertical, a equação 3.1 pode ser escrita da seguinte forma:

$$P = \frac{V - H}{V + H} \quad \text{[Equação 3.2]}$$

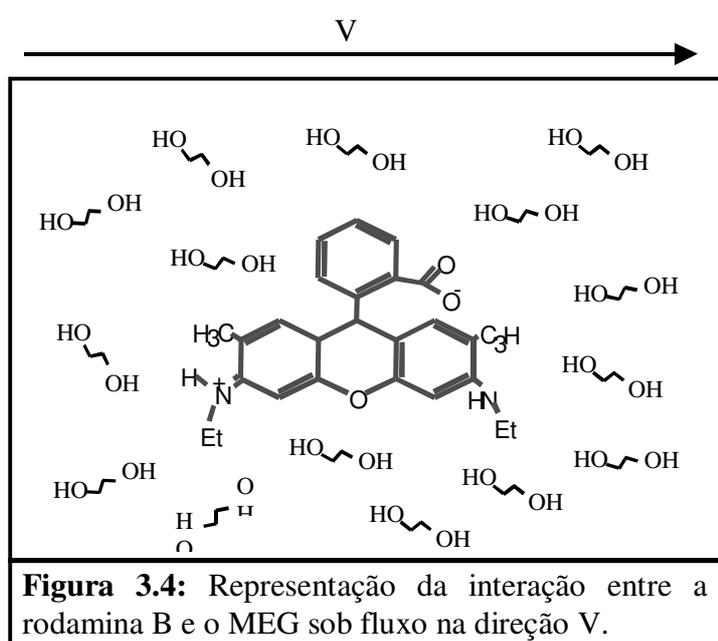
As medidas de polarização em fluxos líquidos usualmente encontradas na literatura [Kenyon 91, Quintella 01] consistem de medidas indiretas, uma vez que se baseiam na interação entre uma sonda fluorescente e as moléculas do solvente. De fato, apenas a polarização da sonda fluorescente pode ser medida. Esta grandeza pode ser estendida a todo o sistema desde que exista uma correlação entre a

difusão rotacional da sonda no solvente e o tempo de vida de seu estado excitado (Γ_{exc}). Assim, o que de fato é medido é a liberdade rotacional na molécula fluorescente no meio em que está dissolvida.



Neste trabalho foram utilizadas como sondas fluorescente as Rodaminas 6G (R6G) (figura 3.3A) e B (RB) (figura 3.3B,C e D), corantes catiônicos da família dos xantenos. A exposição desta molécula à luz polarizada na região do máximo de absorção (470 e 560nm) gera uma

oscilação da carga elétrica ao longo da direção admitida para o seu momento de dipolo $\vec{\mu}$, o grupo xantênico [Kenyon 91].



O solvente escolhido foi monoetilenoglicol (MEG), devido a ser uma espécie altamente polar. Quando dissolvida neste sistema a molécula de RB passa a interagir fortemente com a malha de forças intermoleculares existentes, tendo o seu momento de dipolo alinhado com o do MEG, como mostra a figura 3.4. Controlando a temperatura do fluido pode-se ajustar a

viscosidade da solução de forma que o período de rotação da sonda fluorescente, τ_{rot} , seja da mesma ordem de grandeza do seu tempo de vida do estado excitado, Γ_{exc} . Assim, é possível aplicar a técnica PLF na determinação do alinhamento intermolecular entre as moléculas de RB. Como as moléculas do corante estão interagindo fortemente com as moléculas do solvente através dos seus momentos de dipolo, as medidas de polarização obtidas com a técnica PLF podem ser utilizadas para inferir o alinhamento intermolecular entre as moléculas do fluido de forma geral.

Como foi citado anteriormente as medidas de polarização normalmente são baseadas na interação entre a sonda e as moléculas do fluido que se quer estudar. Na primeira fase deste trabalho a rodamina RB foi a própria espécie de interesse, sendo determinado a distribuição de concentração do corante enquanto este se dispersava no fluido carregador.

Na segunda fase o trabalho foi direcionado para a determinação do alinhamento intermolecular, medindo-se a polarização do fluido (MEG + RB) presente no sistema de fluxo. Isto evidencia a possibilidade de realizar tanto medidas da distribuição de concentração da amostra em função de sua orientação espacial quanto do alinhamento intermolecular entre amostra e carregador, ou reagente, durante o processo de análise química em fluxo.

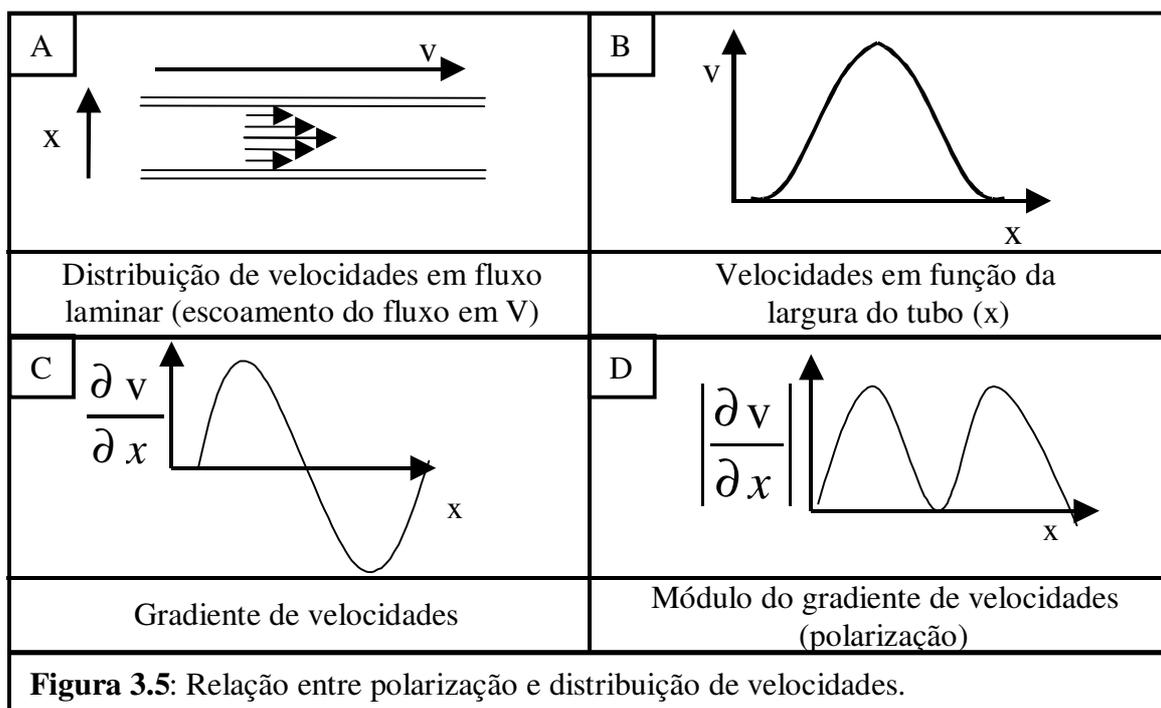
3.2.1-PLF e Alinhamento Intermolecular em Sistemas FI

Fluidos em movimento podem determinar regimes de fluxo turbulentos ou laminares. Em tubos abertos este regime será definido de acordo com variáveis experimentais como diâmetro interno do tubo, viscosidade do fluido e taxa de fluxo, grandezas que geram o número de Reynolds (Re). É sabido que as condições necessárias para que sistemas FI operem de forma otimizada determinam regimes de fluxo altamente laminares [Ruzicka 78]. O sistema montado para a realização deste trabalho tem Re 7.

O fluxo laminar é caracterizado pela existência de um gradiente de velocidades, isto é, existem correntes de fluxo que se deslocam no sistema com velocidades que gradativamente diminuem do

centro em direção à periferia do tubo, tendendo a zero na camada limite como mostram as figura 3.5 A e B. Nas regiões de maior tensão de cisalhamento entre estas correntes de fluxo, determinadas pelo gradiente de velocidade (figuras 3.5C), é gerado um alto grau de alinhamento entre moléculas não esféricas.

A polarização, portanto pode ser entendida como o módulo do gradiente da velocidade gerado pelo fluxo altamente laminar dos sistemas FI (figuras 3.5D), conforme demonstrado experimentalmente [Quintella 02a]. Deste modo a utilização da técnica PLF pode ser extremamente útil na compreensão do fenômeno de dispersão em FI, uma vez que, conforme referido por Ruzicka e col. [Ruzicka 78], em sistema de linha única a dispersão ocorre exclusivamente por causa da existência deste gradiente de velocidades.



A aplicação da técnica PLF, em sistemas FI (PLF-FI) se justifica ao permitir observar diretamente o mecanismo molecular de dispersão da amostra num fluido carregador. Isto possibilita definir posteriormente novas constantes de correlação entre as forças dispersivas inerentes ao fluxo e parâmetros microscópicos associados à difusão molecular de reagente e amostra. A aplicação de PLF-FI também possibilitará a compreensão de fenômenos de interface extremamente importantes em

análises FI mas pouco estudados, como: sistemas líquido-líquido (amostra-carregador, amostra-reagente, reagente-carregador); sistemas de extração em fase líquida; interface entre o fluido líquido e a superfície sólida (paredes do percurso analítico, cela de detecção, células de pré-concentração) e extração como as de resinas de troca iônica. A consequência pode ser o desenvolvimento de diagramas de fluxo e reatores mais eficientes levando ao aumento da versatilidade, da sensibilidade e da frequência analítica.

Uma outra possibilidade é aplicação desta técnica em estudos de cinética e dinâmica molecular de processos químicos, permitindo obter dados mais precisos a respeito do comportamento microscópico do sistema, incluindo a influência da orientação espacial das moléculas dos reagentes durante a interação.

3.2.2-Dinâmica Molecular de Dispersão

A proposta inicial deste trabalho é estudar empiricamente o fenômeno da dispersão em FI. Para tanto foi definida a fluorescência como método de detecção. Com já foi mencionado anteriormente o aparato experimental desenvolvido, a ser discutido no capítulo 4 (Sistema Experimental), possibilita tanto a detecção da fluorescência total (LIF) emitida pela amostra quanto a obtenção de dados de alinhamento intermolecular através das medidas de fluorescência polarizada (PLF).

Esta característica permite estudar a dispersão da amostra em sistemas FI sobre dois aspectos importantes, a distribuição de concentração do analito dentro da cela de detecção, como uma função das variáveis tradicionais de fluxo, e a distribuição do alinhamento molecular do analito sob estas mesmas condições.

As informações possíveis de serem obtidas destes mapas de concentração e polarização dizem respeito a dois aspectos importantes relacionados com o fenômeno de dispersão. O primeiro permite a determinação de padrões de dispersão dependentes das condições de operação do sistema FI, como

taxa de fluxo, comprimento do percurso analítico, sistemas de comutação e propulsão. Obviamente são grandezas macroscópicas estudadas desde os primórdios desta técnica de análise química, principalmente pela mecânica de fluidos, e são amplamente utilizadas por muitos autores na elaboração de modelos teóricos que tentam descrever, ou simular, o processo de dispersão em sistemas por fluxo contínuo (vide capítulo 2-Dispersão em Sistemas FI).

Os dados de alinhamento molecular, no entanto, vão além da dinâmica macroscópica dos fluidos presentes no circuito FI ao possibilitar o estudo e a compreensão dos fenômenos moleculares associados ao processo de dispersão da amostra, dinâmica molecular de dispersão, caracterizados neste trabalho através dos mapas de polarização.

Este diferencial pode ser extremamente útil na definição de novos parâmetros relacionados ao comportamento dos elementos de fluido num sistema de análise química em fluxo, tendo em vista que o comportamento macroscópico destes elementos, até então única fonte de informação sobre a dispersão, é definido justamente pelos fenômenos moleculares como as interações entre as moléculas do fluido e as paredes do tubo na camada limite ou a interação entre camadas moleculares de amostra e carregador, ou ainda amostra e reagente nas correntes de fluxo impostas pelo escoamento laminar do fluido.

Compreender a dinâmica microscópica da dispersão representa decifrar as leis e variáveis moleculares que de fato regem os sistemas de injeção em fluxo, possibilitando avanços importantes no desenvolvimento teórico desta técnica e, conseqüentemente, trazendo novas possibilidades metodológicas e de aplicação tecnológica.

4- SISTEMA EXPERIMENTAL

Normalmente a aquisição de dados em sistemas FI é feita em um único ponto da cela de detecção, tanto na área de aplicação quanto no estudo de parâmetros experimentais para o aprimoramento de modelos teóricos. Alguns poucos trabalhos [Murugaiah 92] chegam a medir o sinal analítico em mais de um ponto, mas sem a resolução adequada à obtenção de mapas bidimensionais de distribuição de concentração que permitam a observação direta do fenômeno de dispersão.

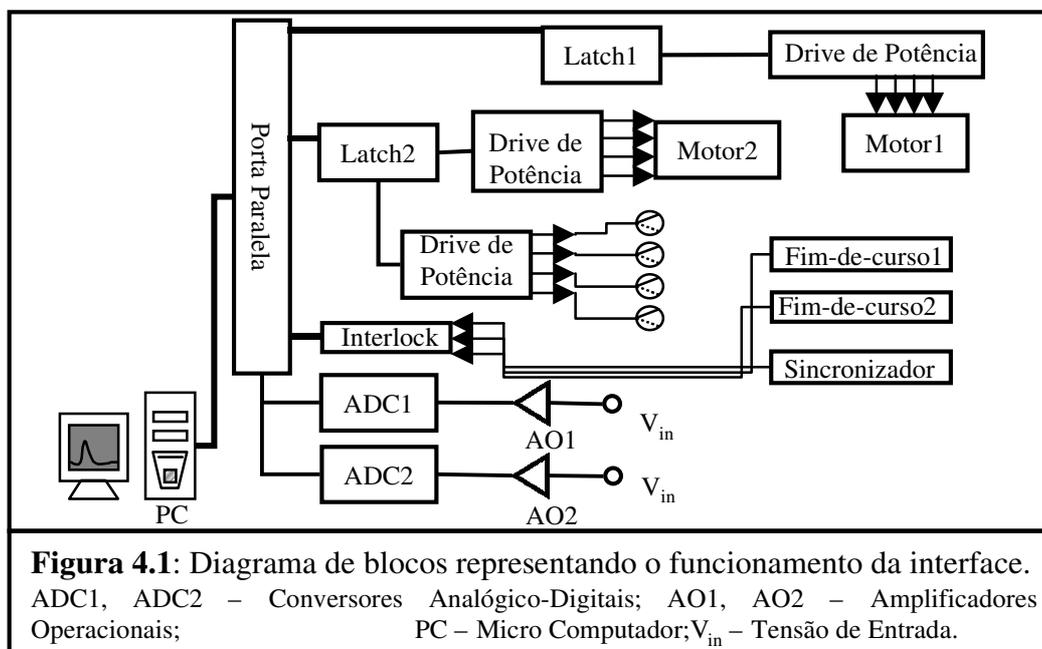
Neste trabalho foi desenvolvido, em colaboração com o Laboratório de Propriedades Óticas (LAPO) do Instituto de Física da UFBA um equipamento automatizado que permite medidas bidimensionais do fenômeno da dispersão em sistema de injeção em fluxo. Quando aplicado às técnicas de fluorescência induzida por laser (LIF) e fluorescência induzida por laser polarizado em FI (PLF-FI) este sistema pode mapear bidimensionalmente a distribuição de concentração e a polarização em função do tempo com alta resolução espacial. Isto possibilita determinar empiricamente o padrão de dispersão de uma amostra num fluxo carregador, bem como a cinética e a dinâmica molecular envolvidas no processo.

O desenvolvimento e a aplicação de dispositivos eletrônicos na química permite, dentre outras coisas, o controle automatizado de processos, diminuindo a interferência humana. A consequência imediata é o aumento da precisão, da confiabilidade, da velocidade e, sobretudo o desenvolvimento de técnicas e metodologias impossíveis de serem executadas pelo homem sem auxílio de uma máquina.

4.1- SISTEMA DE CONTROLE E AQUISIÇÃO DE DADOS

4.1.1- A Interface de Controle Remoto

O diagrama de blocos da figura 4.1 mostra o esquema básico da interface paralela desenvolvida em colaboração com o LAPO. Ela conta com 12 saídas digitais, responsáveis pelo controle de quatro válvulas solenóides e dois motores de passo, 3 entradas digitais para sincronização da bomba peristáltica e monitoramento do fim de curso dos motores, e 2 entradas analógicas para aquisição de dados de fluorescência em tempo real.



A interface (anexo 4.1) é composta, além de dispositivos discretos, por 2 chips 74LS374 (*LATCH*), 2 chips 74LS244 (*buffers*) e um chip 74LS138 (endereçador). O *latch* funciona como uma memória do barramento de dados, responsável pelo controle dos dispositivos ligados à interface, tais como os motores de passo do posicionador de amostra e as válvulas solenóides do sistema de fluxo. Os *buffers* funcionam como isoladores, estabilizando o trânsito de dados, enquanto o endereçador determina o dispositivo para os quais os bits de dados serão enviados.

Nas saídas digitais foram montados um total de 12 transistores de potência (arranjo Darlington), 8 dos quais funcionam como “*drivers*” para os 2 motores de passo do posicionador automático de amostra, enquanto os outros 4 controlam o chaveamento das válvulas solenóides. Em cada uma das duas entradas analógicas foram montados um amplificador operacional e um conversor analógico-digital de 12 bits (ADC1 e ADC2) para processamento e conversão do sinal de fluorescência, analógico para o domínio digital.

A opção por utilizar uma interface paralela, ao invés de uma serial, foi definida pela maior velocidade na transmissão de dados. Uma vantagem adicional desta interface é a possibilidade de ser controlada diretamente pela porta LPT1 (porta de impressora), sem a necessidade de modificações no hardware do PC. Além disto, esta arquitetura põe à disposição outras linhas de comando que possibilitam o monitoramento do “*status*” do sistema, como fim de curso dos motores de passo ou sincronização da bomba e da conversão do sinal analógico para a linguagem digital pelos ADC’s.

Duas entradas digitais são dedicadas ao monitoramento de duas chaves eletrônicas que determinam o fim de curso mecânico dos motores de passo descritos no tópico 4.1.2 (Sistema de Posicionamento Automático da Amostra), enquanto que uma outra entrada, também digital, é responsável pela sincronização da bomba peristáltica com o chaveamento das válvulas solenóides.

O anexo 4.2 mostra o esquema elétrico do dispositivo de sincronização que chaveia, à partir de um fotoacoplador, a quinta linha de entrada de dados da porta de impressora (C \bar{D}). Esta chave ótica foi posicionada de tal forma que um disco dentado fixado ao cabeçote da bomba interrompe periodicamente a luz emitida pelo LED da chave. Neste momento um sinal elétrico é aplicado a uma porta do chip HEF4011BB, que é um “*buffer*”, mandando um bit 1 para a interface. O software entende o segundo bit 1 consecutivo como o início do ciclo de amostragem disparando automaticamente a rotina de aquisição de dados.

O sincronizador, também projetado em colaboração com o LAPO e construído durante este trabalho, tem por finalidade informar a posição dos roletes da bomba peristáltica ao computador.

Recebendo esta informação, o software de controle sincroniza o acionamento das válvulas com a rotação do cabeçote da bomba. Estes roletes que compõem o cabeçote comprimem os tubos peristálticos gerando um gradiente de pressão que impulsiona o fluido no circuito FI. Os sistemas de injeção baseados em tempo, como os utilizados neste trabalho, precisam ser sincronizados com a pulsação do fluxo, de forma que a injeção aconteça sempre nas mesmas condições de pressão, uma vez que variações na pressão geram flutuações na taxa de fluxo e, por conseguinte no volume injetado de amostra.

A utilização de um “*buffer*” c-mos (4011), que se caracteriza por um baixo consumo, se fez necessária pelo fato de que a impedância do sinal originário da porta paralela não permitia que a tensão de saída do acoplador ótico caísse para o nível de tensão baixo ($<0,8$ V), que corresponde a um estado lógico zero. Como o sinal era sempre alto a rotina de aquisição não era iniciada.

4.1.2- Sistema de Posicionamento Automático de Amostra

O desenvolvimento de um posicionador automático de amostra, realizado anteriormente por Gonçalves e col. [Gonçalves 00, Quintella 02b], tem como principal objetivo permitir um controle preciso e confiável do posicionamento da cela de fluxo em relação à fonte de excitação. A grande vantagem de se conseguir isto é a possibilidade de medir a intensidade de fluorescência emitida pela amostra em pontos diferentes da cela de detecção. As curvas correspondentes a cada um destes pontos de coleta podem ser interpoladas gerando mapas bidimensionais.

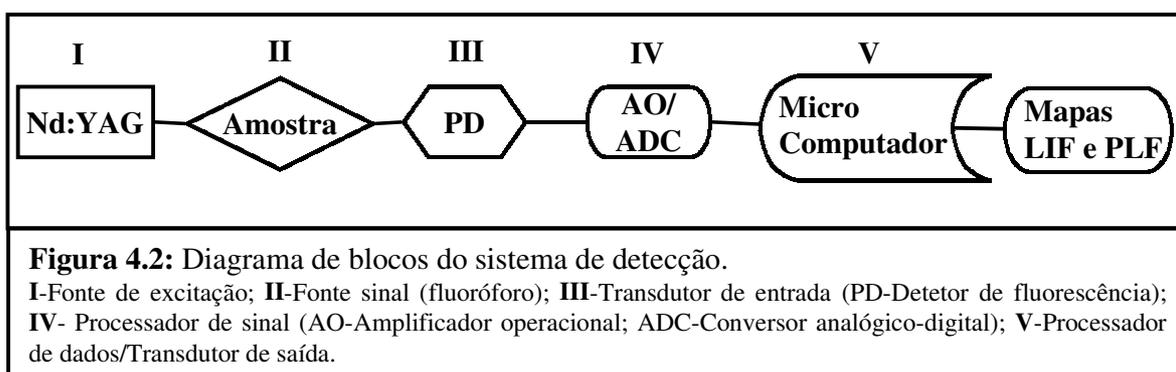
O arranjo mecânico do posicionador consiste de dois parafusos-sem-fim perpendiculares entre si, montados numa base de latão. Dois motores de passo estão acoplados em cada um dos parafusos e são responsáveis pela translação bidimensional da amostra. O sistema ainda pode ser equipado com um fixador de amostra com liberdade de movimento em três dimensões.

O sistema desenvolvido pode varrer uma região de 30,9 mm de largura por 25,4 mm de altura, totalizando uma área de aproximadamente 850 mm². A precisão dos motores é de 10µm em cada direção, com um erro menor que 0,1%. A depender do diâmetro do feixe de excitação a resolução dos mapas pode alcançar a marca de 400 pontos por mm² [Quintella 02b].

Por medida de segurança um sistema de chaves eletrônicas determinam o fim-de-curso dos parafusos evitando assim danos provocados por manobras inadequadas.

4.1.3- Sistema de Detecção e Aquisição de dados em tempo real

Os métodos instrumentais de análise química normalmente se baseiam na medida de um sinal físico-químico (sinal analítico) e na transformação deste para uma forma passível de ser manipulada e compreendida pelo analista. Em outras palavras, os instrumentos de análise química utilizam transdutores, ou detetores, que funcionam como uma interface entre o observador e o sistema em observação, transformando uma grandeza química, como concentração, num sinal elétrico que pode ser mais facilmente armazenado, tratado e analisado.



O sistema de detecção desenvolvido neste trabalho (figura 4.2) consiste de uma fonte de excitação (I), a ser discutida ainda neste capítulo, um transdutor de entrada (III) e um processador de sinal (IV).

Como transdutor de entrada foi montado um circuito opto-eletrônico (anexo 4.3), utilizando um fotodiodo BPW21/RSHF5 RS-Eletronics, com $7,5 \text{ mm}^2$ de superfície ativa, campo de visão máximo de 124° , sensibilidade de 7 nA/Lux , e um espectro de resposta (anexo 4.4) com máximo de sensibilidade em 560 nm e amplificador operacional S9D076T da Burr Brown. Foi escolhido por apresentar uma faixa de operação adequado para a detecção do sinal fluorescente do corante utilizado como amostra.

Como o nível de corrente gerada normalmente é muito baixo, o sinal proveniente deste dispositivo passa por um estágio de pré-amplificação, através da montagem em série de um amplificador operacional (AO) e de resistores em paralelo que permitem o ajuste do ganho quando selecionados por uma chave.

A função do AO poderia ser realizada por outros dispositivos eletrônicos discretos (transistores), no entanto, o AO tem baixo consumo de energia, alta impedância de entrada, alta rejeição de modo comum baixo coeficiente de deriva térmica, baixo nível de tensão *off-set*, baixo custo, versatilidade e tamanho reduzido favorecendo sua utilização como alternativa para amplificação de sinais analógicos em instrumentação científica.

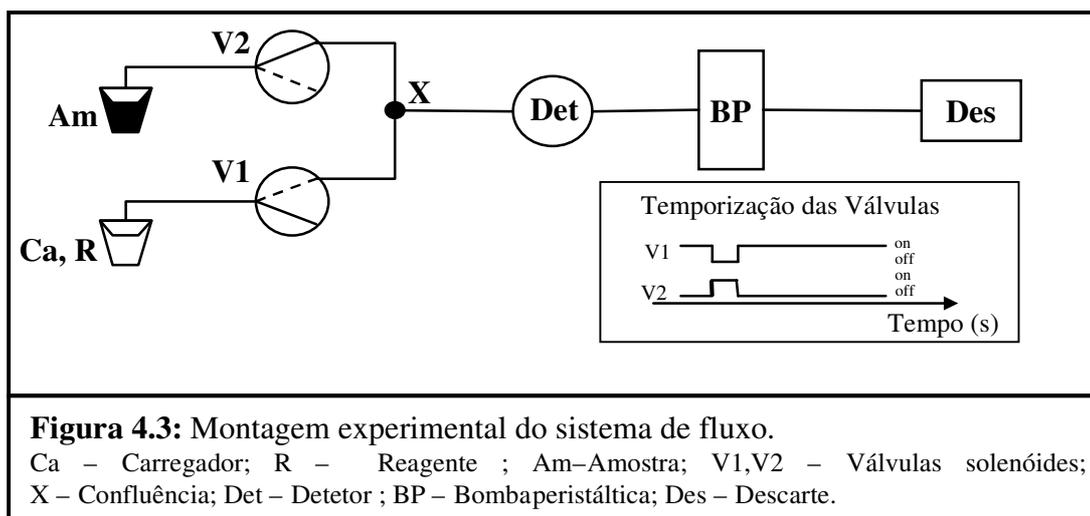
O sinal elétrico produzido no fotodiodo é transmitido por meio de cabos coaxiais do tipo BNC a entrada analógica da interface quando passam por um novo estágio de amplificação. Para converter o sinal analógico gerado no fotodetector para o domínio digital em cada uma das entradas analógicas foi montado um conversor analógico digital de 12 bits (anexo 4.1), modelo ADS7804 de fabricação Burr Brown.

O ADS7804 utilizado neste sistema é um conversor paralelo que apresenta resolução de 12Bits, com taxa de amostragem de $100 \text{ KHz} \cdot \text{min}^{-1}$, tempo de conversão de $10 \mu\text{s}$ e é baseado na arquitetura de aproximações sucessivas. Este modelo foi escolhido por conta do baixo custo, da confiabilidade, da disponibilidade no mercado, da resolução e precisão ($\frac{1}{2} \text{ LSB}$). Quanto maior o número de bits utilizados maior o número binário que o ADC pode produzir e por conseqüência maior a sua

resolução. Um ADC de 12 bits, como o utilizado neste trabalho, alcança um valor máximo 4095 contagens com resolução de uma unidade. Como a comunicação com porta paralela é de apenas 4 bits, o processo de leitura da conversão do ADC precisa ser dividido em três etapas por software, isto é, na primeira fase o conversor envia para o processador do PC o número correspondente aos primeiros 4 bits de conversão, mandando em seguida duas outras palavras de 4 bits.

4.2-SISTEMA DE FLUXO FI

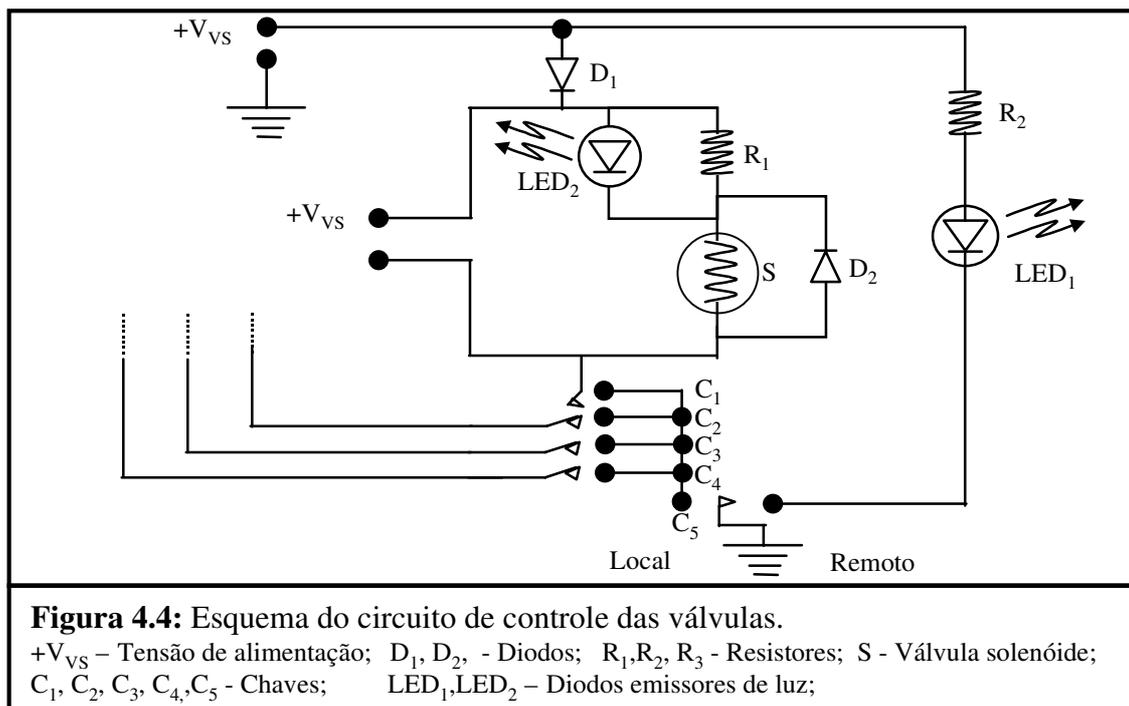
O sistema de fluxo utilizado neste trabalho tem configuração em linha única, como mostra a figura 4.3.



O carregador é aspirado até o descarte, sendo o seu fluxo interrompido quando a amostra é injetada por um dispositivo de comutação baseado em tempo. A injeção da amostra é realizada por duas válvulas solenóides 161K031 Neptune Research de três vias. O sistema de propulsão consiste de uma bomba peristáltica MP4 da Gilson, com quatro canais, e taxa de fluxo máxima de $6,58 \text{ mLmin}^{-1}$ para tubo peristáltico de 1,75mm de diâmetro interno. Os tubos de conexão utilizados no percurso analítico são de polietileno de baixa densidade (PEBD) e, com exceção da bomba, todo o sistema é controlado automaticamente via PC.

A escolha dos tubos foi definida com o objetivo de minimizar a influência da tensão interfacial entre fluido líquido e superfície sólida do percurso analítico no processo de dispersão. Para tanto, foram medidas as tensões interfaciais relativas pelo método do ângulo de contato para o material do tubo de conexão e da cela de detecção. Os resultados serão discutidos no capítulo 5 (Resultados e Discussão).

As válvulas são comandadas remotamente por transistores acionados pelo computador, que controla não apenas a seqüência com que os dispositivos são acionados, mas também o tempo em que estes permanecerão abertos. Foi montado um circuito que permite a opção entre controle remoto ou local do conjunto de válvulas para facilitar ajustes no sistema antes de iniciar a rotina de amostragem. A figura 4.4 mostra o circuito de controle das válvulas.



Estas estão fixadas numa superfície plástica que recobre uma caixa na qual está fixada a placa com o circuito. A opção entre controle remoto ou local pode ser selecionada com uma chave. A alimentação das válvulas é feita através de uma fonte de tensão ajustável Minipa modelo MPS-3003 ligada diretamente a este módulo e a comunicação com a interface é feita por meio de um conector DB15 ligado às saídas digitais do sistema de controle.

Os estudos de dispersão foram realizados utilizando dois sistemas de injeção por multicomutação baseados em tempo (já descritas no capítulo 2-Dispersão em FI). No primeiro caso a amostra foi injetada no carregador inerte, ou na solução do reagente, por um período de 1s (MC1), o que representa um volume de aproximadamente 85 μL . No segundo caso as válvulas da amostra e do carregador, ou reagente, foram alternadamente abertas por um período de 0,1s, sendo o período de amostragem composto por um total de dez pulsos de injeção (MC10), cada qual com um volume aproximado de 8,5 μL .

Inicialmente tanto a amostra quanto o fluido carregador eram empurrados pela bomba peristáltica, em canais diferentes, no sistema de fluxo. Todavia, com esta configuração as curvas referentes ao sinal analítico não se mostravam reprodutíveis. Durante o processo de injeção ocorria uma queda de pressão quando a válvula responsável pela injeção da amostra se abria devido à solução carregadora apresentar viscosidade maior que a da amostra. Visualmente poderia ser identificada a invasão do carregador no canal da amostra antes que o sistema de propulsão tivesse pressão suficiente para devolver a fração invasora do carregador ao percurso analítico e injetasse a amostra.

Foi escolhido então um fluxo aspirado motivado pelo fato de apenas um canal da bomba ser necessário à propulsão dos elementos de fluido no circuito, evitando o inconveniente de ter vazões diferenciadas para amostra e carregador e conseqüentemente queda de pressão durante a injeção da amostra.

Como foi discutido neste mesmo capítulo, o deslizamento dos roletes no cabeçote da bomba sobre os tubos peristálticos provoca uma variação de pressão durante a propulsão do fluido, em conseqüência disto a falta de sincronia entre a bomba e o sistema de injeção provoca também uma variação no volume injetado de amostra. Esta variação é crítica quando volumes muito pequenos são injetados, isto é, quando o tempo de chaveamento é pequeno. Para minimizar a variância do sinal analítico provocada por possíveis desvios no tempo de abertura das válvulas em relação à posição relativa dos roletes sobre o tubo peristáltico foi acoplado ao cabeçote da bomba um sincronizador

descrito neste mesmo capítulo. Além disto os dados apresentados neste trabalho foram adquiridos com uma taxa de fluxo relativamente alta ($5,12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), de forma que um volume maior de amostra pudesse ser injetado, minimizando a variância do sinal.

O percurso analítico foi inicialmente montado utilizando tubos de PTFE[®], entretanto, com a implementação do fluxo aspirado o material se mostrou permeável ao ar produzindo uma quantidade de bolhas que tornavam inviável a medida do sinal. Foram então substituídos por tubos de PEBD.

Um outro fator importante na escolha dos tubos utilizados no percurso analítico e na cela de detecção foi a tensão interfacial relativa entre estes e o fluido líquido, determinadas através dos seus ângulos de contato e discutidas no capítulo 5 (Resultados e Discussão)

Para avaliar a influência do comprimento do percurso analítico na dispersão da amostra foram utilizados tubos de 30 e 50 cm. Os resultados mostraram, como esperado, que o comprimento do percurso analítico intensifica o processo de dispersão em função do aumento do tempo de interação entre amostra, carregador e superfície sólida dos tubos. O comprimento de 30 cm foi escolhido por permitir a observação do processo de dispersão de forma satisfatória com uma frequência analítica maior em relação ao de 50cm.

Para proceder às medidas de fluorescência foi construída uma cela de detecção apropriada visando reproduzir o comportamento da amostra em reatores retos abertos (figura 4.5). A cela é composta por um tubo de vidro de 7,6 cm de comprimento e 1,0 mm de diâmetro interno. Foi fixado numa moldura de polietileno de alta densidade (PEAD) com conexões na parte inferior adequadas ao fixador de amostra acoplado ao posicionador automático. Nas extremidades do tubo de vidro foram fixadas camisas de Tygon[®] para ajustar os tubos de conexão à cela.

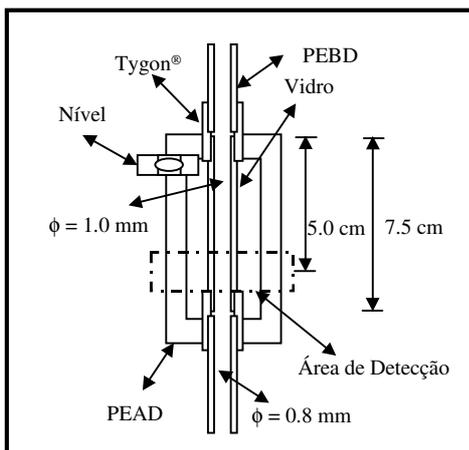


Figura 4.5: Cela de fluxo.
PEAD-Polietileno de alta densidade;
PEBD-Polietileno de baixa densidade.

O comprimento do tubo foi definido em 7,6 cm em função do tempo necessário ao restabelecimento do regime de fluxo, após este passar por uma região turbulenta na emenda entre o tubo de PEBD e o vidro. Tubos mais curtos não permitiam que o regime de fluxo fosse estabelecido, de forma que os mapas de distribuição de concentração se apresentavam demasiadamente distorcidos e difíceis de serem interpretados.

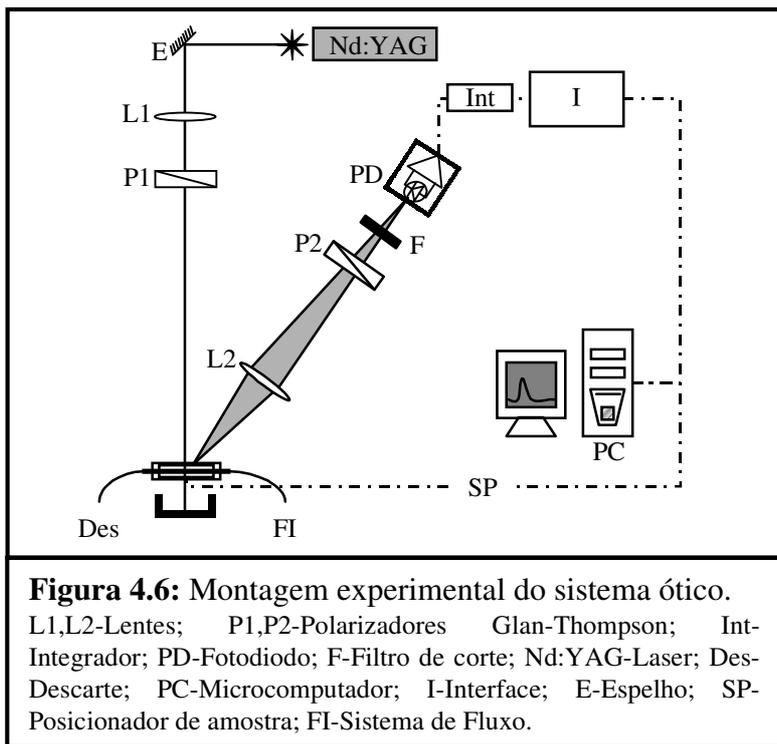
Durante estudos preliminares foi constatada a influência

da gravidade na dispersão da amostra (vide capítulo 5-Resultados e Discussão), de forma que qualquer inclinação lateral da cela de detecção poderia também distorcer os mapas LIF. Como o fixador de amostra tem pelo menos três graus de liberdade um nível mecânico foi acoplado à lateral da moldura para garantir o máximo de verticalidade da cela de fluxo.

O sistema químico é composto por uma solução de Rodamina B (RB) (sonda fluorescente) em monoetilenoglicol (MEG) Merck numa concentração de $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O fluido carregador inerte é o próprio solvente sendo que, na segunda fase do trabalho o carregador foi substituído por uma solução de Ca(II) em MEG na concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

4.3-SISTEMA ÓTICO

A figura 4.6 ilustra a montagem experimental da ótica utilizada neste estudo. Como fonte de excitação foi utilizado um laser pulsado do estado sólido, Nd:YAG, emitindo radiação em 532 nm, com pulso de 10 ns, frequência de 10 Hz e 0,55 mJ de potência.



A luz laser emitida é desviada por um espelho com 98% de refletividade para 532nm Newport. A linha de 532nm foi escolhida por ser o comprimento de onda emitido pelo laser Nd:YAG onde a RB tem mais alta absorção (80% de sua absorção a 550 nm) mais próximo de 550nm, referente ao pico de absorção da RB como mostra o anexo 4.4. A radiação é então focada por uma lente convergente, L₁, na amostra posicionada

a 50cm. Entre a lente L₁ e a amostra é posicionado um polarizador P₁ do tipo Glan-Thompson da Newport para garantir 100% de polarização vertical dos fótons.

Após incidir sobre a amostra a radiação laser é absorvida pelas moléculas de RB que sofrem decaimento radiativo emitindo fluorescência. Esta é coletada pela lente L₂, posicionada numa distância de 7,5 cm sendo focalizada no fotodiodo do detector depois de passar por um filtro de corte de 550nm. A faixa de corte do filtro, abaixo de 550nm, foi determinada com base no espectro de fluorescência da RB (anexo 4.4) com o objetivo de cortar a radiação de fundo, proveniente do laser, preservando o sinal fluorescente. Antes de alcançar o detector a fluorescência passa por um outro polarizador P₂, idêntico a P₁, que resolve o sinal nas suas componentes vertical e horizontal, a depender de sua posição. O sinal é adquirido e armazenado pelo sistema de aquisição de dados em tempo real.

Apesar do filtro de corte posicionado em frente ao fotodetector, a alta intensidade do feixe de excitação diminuía consideravelmente a sensibilidade do sistema de detecção quando este estava posicionado em linha, pois o sinal adquirido era composto principalmente da radiação de fundo que

alcançava o fotodiodo. Para melhorar a sensibilidade aumentando a relação sinal ruído foi adotado o sistema de detecção frontal como pode ser observado na figura 4.6.

Como discutido no capítulo 2 (Dispersão em Sistema FI), este sistema de detecção pode apresentar desvios em relação às medidas de polarização. Para avaliar a influência do posicionamento do detetor nas medidas de polarização, foi medida a polarização intrínseca do sistema com o fluido aprisionado na cela de detecção com velocidade de escoamento igual a zero. A medida da polarização da solução de RB em MEG nestas condições inclui intrinsecamente, além da distribuição de orientações moleculares do fluoróforo, a birrefringência dos componentes óticos e a distribuição anisotrópica da polarização gerada pelo posicionamento em ângulo do detetor.

4.4-SISTEMA QUÍMICO FLUORESCENTE

Como discutido no tópico 4.3 (Sistema de Fluxo) o sistema químico foi inicialmente definido utilizando o MEG como carregador, sendo a amostra uma solução de RB em MEG. Na segunda fase do trabalho o carregador inerte foi substituído por uma solução de Ca(II) em MEG.

A escolha do MEG como solvente e fluido carregador é devida à relação entre o tempo de vida do estado excitado da RB e o seu período de rotação. Para que a polarização seja calculada em função da depolarização da fluorescência induzida por laser polarizado, estas duas grandezas têm que ser da mesma ordem [Quintella 01], como acontece no sistema utilizado.

Um outro fator importante é que, considerando a viscosidade do solvente (MEG), a malha de forças intermoleculares no “*bulk*” é muito mais intensa do que em água, de forma que o processo de dispersão pode ser observado numa escala de tempo maior.

Além da correlação entre tempo de vida do estado excitado e período rotacional da RB, uma outra fonte de erros nas medidas de polarização é a distância entre as moléculas da sonda fluorescente dissolvidas em MEG. Quando muito próximas, dentro do raio crítico de Förster, as moléculas do

fluoróforo excitadas pela fonte de radiação podem transferir energia para outras moléculas mais próximas, estas podem voltar ao estado fundamental de forma não radiativa, auto-supressão, ou podem emitir fluorescência com um desvio na orientação do campo elétrico em relação à molécula que originalmente foi excitada. Para a concentração de $1,25 \text{ mmolL}^{-1}$ utilizada neste trabalho a distância entre duas moléculas de RB foi calculada em 68Å , aproximadamente, de sorte que os resultados não são influenciados pelo raio de Förster considerando que o valor deste para a RB é de 50Å .

A utilização do Ca(II) como reagente foi motivada pela conhecida aplicação da RB na determinação espectrofotométrica deste metal [Gao 02].

Os dados mostram valores de polarização intrínseca de $(0,5 \pm 2,3 \times 10^{-4}\%)$. Este valor valida os resultados discutidos no capítulo 5 (Resultados e Discussão), uma vez que a polarização intrínseca do sistema representa menos de 1% dos valores encontrados quando a amostra é injetada no circuito.

Ainda com objetivo de validar os dados adquiridos no sistema experimental diversas medidas de fluorescência total (LIF) foram efetuadas em função da concentração de RB em MEG e da potência do laser de excitação.

A figura 4.7 mostra que os dados obtidos em nossas condições experimentais, evidenciadas por um círculo branco, se encontram numa área de linearidade. Isto evidencia o fato de que, nas condições de aquisição de

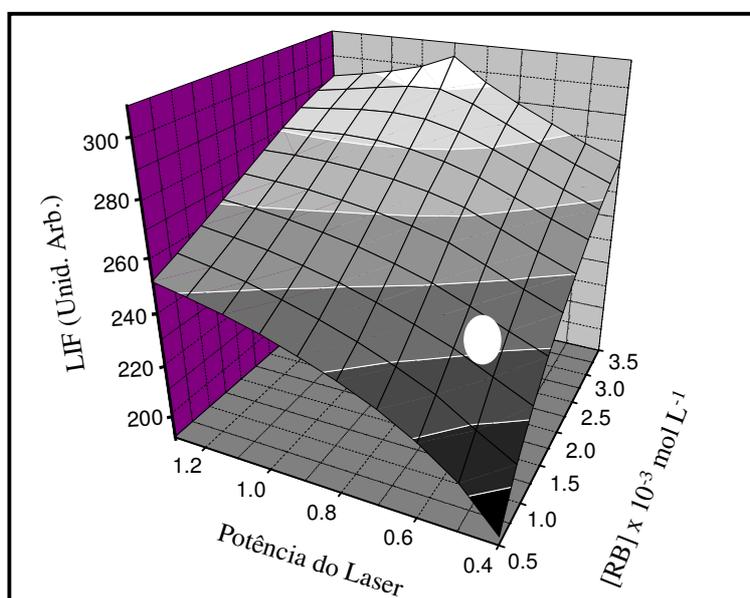


Figura 4.7: Fluorescência total induzida por laser (LIF) em função da concentração de rodamin B e da potência do laser. As condições de trabalho estão selecionadas com um círculo branco.

dados, erros provenientes de processos relacionados com desvios da lei de Lambert-Beer e fotofragmentação da amostra são mínimos.

Foi calculada também a espessura da camada vicinal, que corresponde às moléculas de RB que poderiam permanecer aderidas à superfície sólida do tubo mesmo com o fluido em movimento. Considerando o raio médio da molécula de RB esta camada é da ordem de 12 \AA , no máximo, o que representa uma polarização de $1 \times 10^{-7}\%$, considerando que todas as moléculas presas na superfície interna do tubo estejam alinhadas verticalmente. Assim, podemos concluir que o sinal medido independe da posição radial da cela em que ocorre a excitação do fluoróforo e não sofre influência significativa de possíveis RB da camada vicinal.

Como visto no capítulo 3 (Sistema Fluorescente), a técnica PLF se baseia na excitação das moléculas do corante alinhadas com o campo elétrico do laser, princípio da fotoseleção. Após o decaimento radiativo a fluorescência total é resolvida nas componentes vertical, moléculas que não rotacionaram, e horizontal, moléculas que rotacionaram antes de emitir. A equação 3.1 (capítulo 3– Sistema Fluorescente) permite calcular a polarização do sistema em função da intensidade de fluorescência com campo elétrico nestas direções.

Para a técnica PLF a fonte de radiação deve ser coerente, ou seja, todos os fótons se propagam no espaço em fase, e polarizada, todos os fótons apresentam seus campos elétricos paralelamente alinhados na vertical, é possível excitar apenas as moléculas orientadas com dipolo paralelo ao campo elétrico dos fótons. Combinando esta propriedade com a alta quantidade de energia característica dos lasers o sinal gerado pela amostra (fluoróforos) pode ser em muito incrementado.

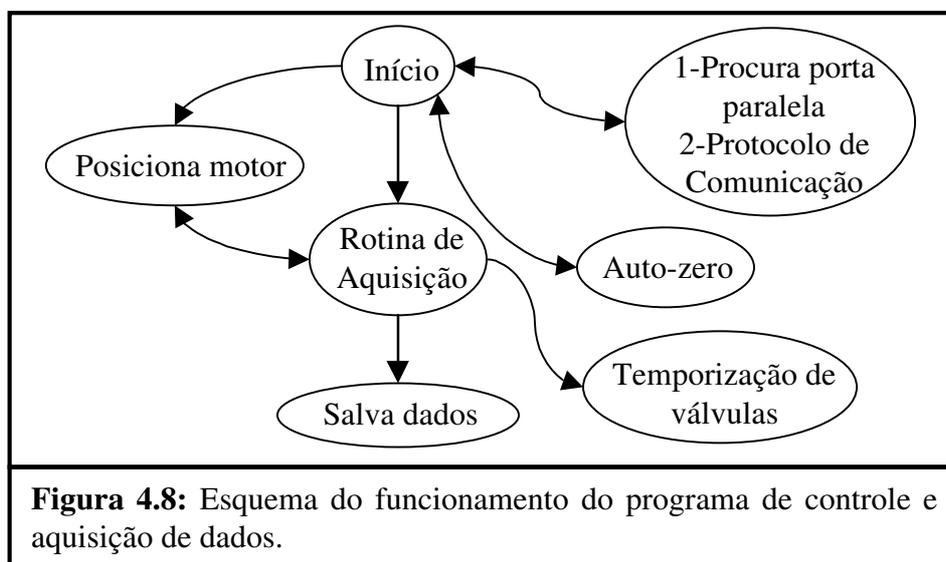
Como a luz laser possui uma quantidade apreciável de energia, a exposição contínua da amostra devida a lasers de emissão contínua (cw) provoca aquecimento local, fenômeno que pode gerar lente térmica. Este consiste na absorção de radiação pela molécula, que passa ao estado excitado e decai de forma não radiativa formando um gradiente de temperatura o qual, por sua vez, gera um gradiente no índice de refração da amostra que difrata o feixe laser. Adicionalmente, a mudança de temperatura pode alterar as condições hidrodinâmicas do sistema, modificando também o padrão de dispersão.

Uma outra característica desfavorável ao uso de um laser cw é a relação entre tempo de excitação e o decaimento radiativo da molécula. Como o tempo de vida do estado excitado da RB é da ordem de 10 ns, a espécie continua absorvendo fótons enquanto emite fluorescência. O uso de um laser de pulso rápido, portanto se justifica pelo fato de que este não apenas evita desvios na medida provocados por aquecimento local do fluido como também evita a absorção de radiação repetidas vezes por uma mesma molécula, uma vez que a duração do pulso laser é da mesma ordem de grandeza do tempo de vida do estado excitado do fluoróforo utilizado neste trabalho, 10ns. Além disto os pulsos ocorrem numa frequência de 10Hz, proporcionando um espaço de tempo em que o fluxo não só substitui os fluoróforos como também resfria a célula de forma a evitar o aquecimento da amostra. Em conseqüência podemos garantir que o sinal fluorescente adquirido corresponde de fato ao comportamento da amostra no sistema de fluxo.

Um inconveniente associado à utilização de um laser de pulso rápido pode ser a relação entre a geração do sinal e o tempo de resposta do sistema de detecção, principalmente quando é necessário converter o sinal analógico em digital utilizando um ADC. Os fotodiodos responsáveis pela detecção propriamente dita do sinal geralmente respondem ao estímulo luminoso na ordem de nanosegundos, sem representar, portanto problema para a aquisição de dados. Entretanto a resposta dos ADC's só ocorre na ordem de microsegundos, isto é, o tempo de resposta do sistema de detecção é três ordens de grandeza mais lento que o sinal. A solução encontrada foi a adaptação de um filtro passa-baixa, um circuito passivo RC (anexo 4.5), na entrada analógica da interface. Este dispositivo integra o sinal de fluorescência durante o tempo de 1 segundo (definido pelos valores nominais do resistor, 10K Ω , e do capacitor, 100 μ F). Este tempo corresponde a dez pulsos do laser, encaminhando a média deste sinal ao processador do PC.

4.5-SOFTWARE

A figura 4.8 mostra o esquema de funcionamento do programa de controle e aquisição de dados desenvolvido para a interface construída neste trabalho.



O programa, em QuickBasic, gerencia toda a rotina de aquisição de dados, posicionamento da amostra e sistema de fluxo.

Ao ser iniciado o programa busca automaticamente a porta paralela do PC e estabelece comunicação com a interface. Em seguida uma tela de diálogo oferece um menu de opções: controle do posicionador de amostra, rotina de aquisição de dados ou auto zero do sistema de posicionamento.

Na primeira opção o usuário tem acesso ao controle dos motores que movimentam o posicionador de amostra, nesta função a posição da amostra em relação ao feixe laser é estabelecida com precisão. Pode-se escolher qual o sentido de rotação do motor e quantos passos serão dados.

Na rotina de aquisição de dados o software aciona as válvulas solenóides numa seqüência e tempo determinados, enquanto simultaneamente adquire o sinal de fluorescência na entrada analógica. Ao fim de cada período de aquisição os dados podem ser salvos para posterior tratamento e análise.

A opção auto zero do motor é útil quando se quer definir com segurança a posição da amostra em relação a um referencial qualquer.

4.6- ROTINA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DE DADOS

Após a montagem experimental o sistema foi submetido a avaliações preliminares com o objetivo de testar a sua confiabilidade e de definir a melhor metodologia de aquisição de dados. Foram avaliados a reprodutibilidade das curvas e o melhor posicionamento da célula de fluxo em relação à fonte de radiação e ao detetor. Para calcular o grau de reprodutibilidade dos perfis de dispersão, o feixe laser foi posicionado na região central da célula de fluxo, onde se tem maior intensidade de sinal de fluorescência e menor luz espúria proveniente do laser espalhado, e repetidas injeções de amostra foram feitas para cada sistema de amostragem por multicomutação, MC1 e MC10. As curvas foram plotadas e os desvios relativos calculados foram 2% para ambos.

O posicionamento ideal da cela de amostragem foi definido fazendo-se mapas de distribuição de concentração em função do tempo, tanto posicionando o tubo capilar na direção horizontal como na vertical. O resultados (discutidos no capítulo 5 – Resultados e Discussão) determinaram o posicionamento vertical do tubo com fluxo descendente como ideal para garantir não só a simetria dos mapas e aumentar a dispersão.

Após ter sido comprovada a eficiência da montagem experimental e definidas as melhores condições de aquisição, os dados de dispersão foram obtidos focalizando-se o feixe laser num ponto fixo da cela de detecção, sendo o sinal de fluorescência adquirido após injeção da amostra. Foi estabelecido como rotina fixar a extremidade do tubo mais afastada do detetor como ponto inicial movendo-se em seguida a cela de fluxo, por meio dos motores de passo do posicionador de amostra, até que o feixe de excitação alcançasse a extremidade contrária. Para cada ponto de amostragem foram realizadas duas injeções idênticas, sendo medido numa a componente paralela e noutra a componente vertical da fluorescência emitida, através da rotação do segundo polarizador (P2, Figura 4.6). Cada perfil foi medido três vezes e a sua média utilizada.

Ao fim de cada período de amostragem os perfis de dispersão eram individualmente armazenados no disco rígido do micro computador antes de serem convertidos numa matriz de dados, originando um mapa bidimensional.

Em função da geometria cilíndrica da cela de fluxo a fluorescência emitida na extremidade próxima à linha ótica de detecção vem invariavelmente acompanhada da luz laser espalhada pelas superfícies do tubo, sendo coletada pela lente 2 e focalizada, juntamente com o sinal de fluorescência, no detetor. Isto gera um “*off-set*” diferenciado para cada perfil de dispersão. Em função disto tornou-se imprescindível um pré-tratamento nos dados para correção da linha de base.

Como os perfis apresentavam uma simetria regular em relação ao centro do fluxo os mapas foram divididos e uma das metades rebatida, não apenas para facilitar a visualização de padrões mas também para evitar pequenas flutuações na simetria provocadas por mínimas inclinações da cela de detecção. Assim, os mapas apresentados no capítulo 5 (Resultados e Discussão) são duplicações de perfis adquiridos em relação a um eixo longitudinal de simetria. Testes mostram que a margem de erro associada ao rebatimento é da ordem de 15%, não comprometendo a interpretação qualitativa dos resultados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1-INFLUÊNCIA DA TENSÃO INTERFACIAL ESTÁTICA NO PROCESSO DE DISPERSÃO.

Atualmente tubos de diversas constituições químicas podem ser encontrados no mercado para aplicações em FI. Cada um destes pode apresentar interações químicas diferentes com os fluidos do sistema, determinando tensões interfaciais líquido/sólido também diferenciadas. Estas tensões são diretamente proporcionais à interação química entre sólido e líquido e podem estar relacionadas com diferentes padrões de dispersão e polarização [Quintella 02c], constituindo-se num importante parâmetro a ser investigado.

As tensões interfaciais estáticas (Γ_{SL}) entre o fluido carregador e os materiais utilizados no percurso analítico e na cela de detecção foram avaliadas medindo-se os ângulos de contato (θ_c) cujo cosseno é proporcional a Γ_{SL} entre o MEG e algumas superfícies sólidas (figura 5.1).

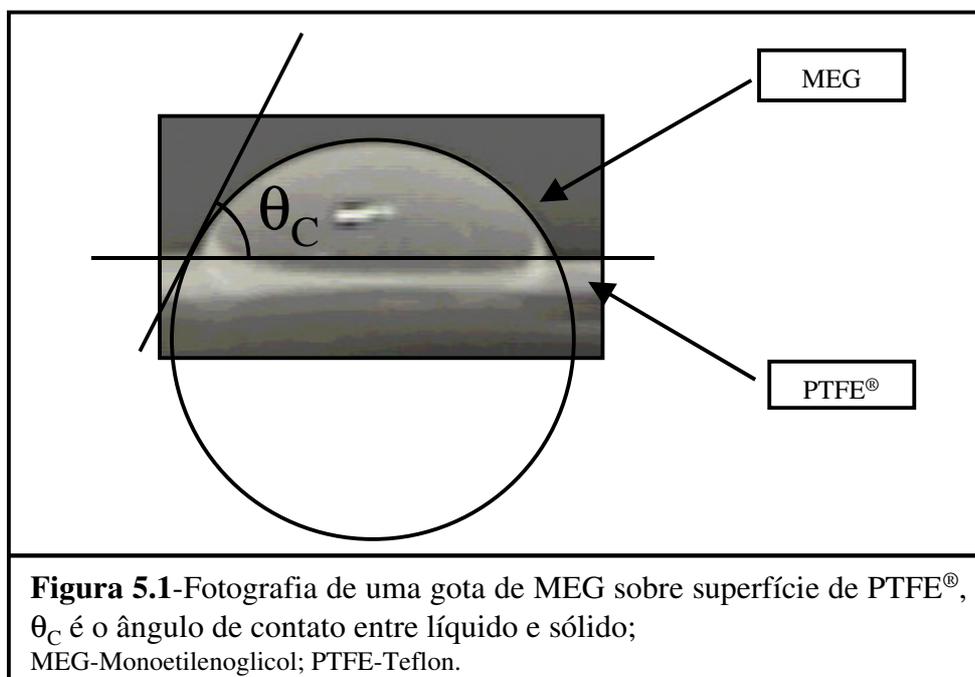


Tabela 5.1: Ângulos de contato (θ_c) para o MEG sobre várias superfícies sólidas.

Superfície	MEG	
	θ_c (°)	$\text{Cos}\theta_c$
Bsi	18,2	0,950
PEBD	67,5	0,383
PTFE[®]	76,1	0,240

Bsi – Borossilicato; PEBD – Polietileno de baixa densidade; PTFE – Teflon.

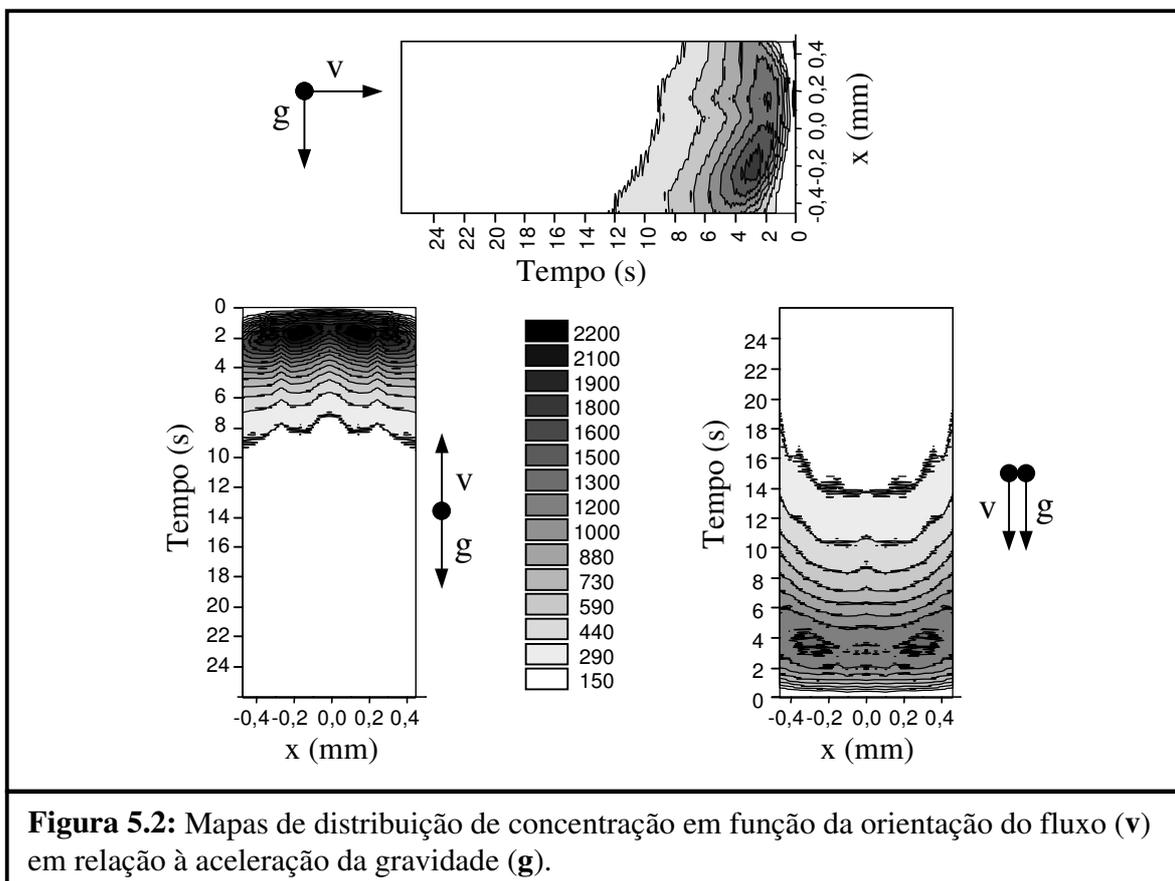
A tabela 5.1 mostra os resultados obtidos para o MEG sobre superfícies de borossilicato (Bsi), polietileno de baixa densidade (PEBD) e PTFE[®]. O valor do $\text{cos}\theta$ para a interface MEG/PEBD é 0,383 enquanto que para o PTFE[®] é 0,240 nos permitindo concluir que a interação entre o fluido usado no sistema FI é maior para o PEBD. Em consequência o processo de dispersão pode ser intensificado utilizando tubos de PEBD no percurso analítico. Para a interface MEG/Bsi, no entanto, o valor do $\text{cos}\theta$ é 0,95, o que nos leva a inferir que a interação do fluido com a superfície sólida aumenta cerca de 2,5 vezes quando este chega à cela de detecção. Quanto maior a tensão interfacial estática maior a turbulência molecular no fluxo junto às paredes da célula, uma vez que uma maior interação entre a fase sólida e as moléculas do líquido favorece o ancoramento temporário destas na superfície sólida.

Em consequência ao chegar à cela de detecção o processo de dispersão torna-se ainda mais intenso favorecendo a observação deste fenômeno.

5.2- INFLUÊNCIA DA GRAVIDADE NA DISPERSÃO EM SISTEMA FI

Para determinar a influência da gravidade no padrão de dispersão em sistemas FI foram adquiridos mapas de fluorescência total em função da inclinação da cela de detecção. As medidas foram feitas com a cela posicionada na horizontal e na vertical. Neste segundo caso o sentido do fluxo também foi variado, ora a favor da aceleração da gravidade (fluxo descendente) ora contra (fluxo ascendente).

A figura 5.2 mostra os mapas de fluorescência total obtidos neste primeiro teste. Pode-se observar que com a cela posicionada na vertical a distribuição de concentração é simétrica em relação ao sentido do fluxo. Com o posicionamento horizontal da cela, no entanto, a amostra está mais concentrada na região inferior do tubo.



O resultado é coerente com a diferença nas propriedades físicas dos fluidos presentes no circuito. A solução de RB em MEG é mais densa ($d_{RB} = 1,15 \text{ g/cm}^3$; $d_{R6G} = 1,10 \text{ g/cm}^3$) e menos viscosa que o MEG puro [Gonçalves 00] devido a presença das moléculas do corante modificar a malha de forças intermoleculares intrínsecas do solvente, alterando as suas propriedades coligativas. Sendo menos viscosa, a amostra tem maior difusividade molecular, isto é, se desloca no percurso analítico com maior velocidade relativa por não interagir tão fortemente com as moléculas vizinhas, sofrendo maior influência do regime de fluxo, e tornando-se mais susceptíveis à influência da força gravitacional. Sua

maior densidade e mobilidade faz com que haja uma maior concentração da amostra preferencialmente na região inferior da cela de detecção.

Em função disto podemos inferir que, em sistemas FI baseados em métodos óticos, uma pequena variação no alinhamento entre a unidade de detecção e a fonte horizontal de sinal pode gerar desvios significativos na resposta do detetor.

O mapa adquirido com a cela de fluxo posicionada na vertical, como já foi dito, apresenta simetria longitudinal, no entanto pode-se observar uma diferença na extensão da zona de amostra em função do sentido do fluxo. Nitidamente, com o fluxo ascendente, o plugue de amostra ocupa uma região muito menor, cerca de 54%, o que indica menor dispersão considerando que o mesmo volume de amostra foi injetado no sistema. Considerando que a dispersão axial em sistemas que apresentam fluxo laminar ocorre exclusivamente pela existência de um gradiente de velocidades [Ruzicka 78] é razoável imaginar que o fato da solução de RB em MEG ser mais denso e menos viscoso que o MEG puro determina uma velocidade média maior quando o fluxo se propaga a favor a gravidade.

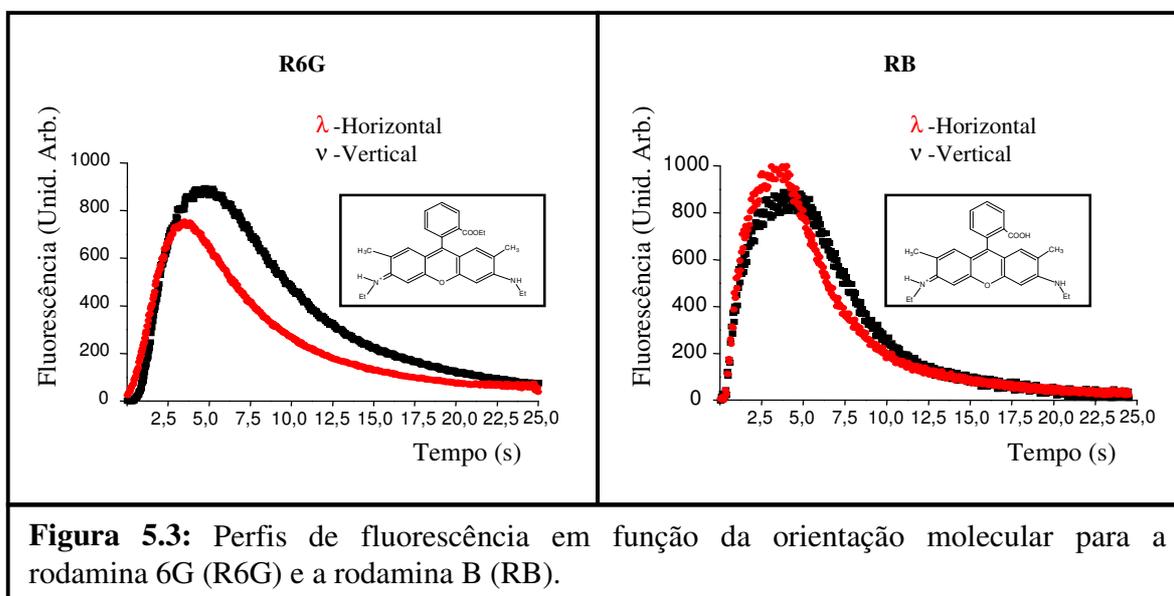
Podemos concluir que a diferença na difusividade entre carregador e amostra, associada a uma maior densidade da solução RB/MEG, influencia diretamente na forma como a concentração se distribui ao longo do percurso analítico não só em função do tempo mas também da direção e do sentido do fluxo.

5.3-INFLUÊNCIA DE DIFERENÇAS ESTRUTURAIS ENTRE A RB E A R6G NO PADRÃO DE DISPERSÃO DA AMOSTRA EM SISTEMAS FI.

Com o objetivo de definir qual sonda fluorescente seria empregada nos estudos de dispersão foram testados dois corantes xantênicos, a Rodamina B (RB) e a Rodamina 6G (R6G). Ambos os corantes possuem um anel benzênico disposto perpendicularmente ao grupo xantênico. A R6G é o

produto da esterificação da RB, ou seja, a carboxila (-COOH) que compõe o grupo benzóico na RB é substituída por um grupamento éster (-COOCH₂CH₃) na R6G [Baraka 91].

Os perfis mostrados na figura 5.3 mostram um comportamento diferente para a R6G em relação ao observado para a RB.



No primeiro caso tanto as moléculas orientadas de forma perpendicular como as de forma paralela ao sentido do fluxo apresentam um comportamento similar. Existe uma diferença na altura do pico, cerca de 16% em favor do perfil vertical, que pode ser atribuída às diferentes concentrações entre as moléculas orientadas na vertical e na horizontal, como sugere a relação altura máxima/largura à meia altura da tabela 5.2. Nos perfis de dispersão da RB (figura 5.3) pode-se constatar que as moléculas orientadas na vertical mostram um comportamento diferenciado em relação às moléculas orientadas de forma horizontal.

Considerando que tanto a RB como a R6G apresentam praticamente o mesmo volume molecular, igual a 1.261,54 Å³ para a R6G e 1.161,67 Å³ para a RB (calculados com o software HiperChem 6.0 à partir de suas fórmulas moleculares), e também a mesma assimetria, o que elimina a influência da secção de choque, as diferenças observadas podem ser relacionadas com a presença da carboxila na RB em substituição ao grupo éster na R6G.

Tabela 5.2: Dispersão em função da orientação molecular para a Rodamina B e a Rodamina 6G.

		RB	R6G
A	V	0,51	0,58
	H	0,49	0,42
H_{máx}	V	0,47	0,54
	H	0,53	0,46
L_{1/2}	V	0,56	0,57
	H	0,44	0,43
H_{máx}/L_{1/2}	V	0,84	0,95
	H	1,20	1,07

A = Área do pico normalizada pela fluorescência total;

H_{máx} = Altura máxima do pico normalizada pela fluorescência total;

L_{1/2} = Largura à meia altura do pico normalizada pela fluorescência total;

V = Componente vertical da fluorescência;

H = Componente horizontal da fluorescência.

Podemos supor que no caso da RB o deslocamento da molécula do corante com o grupo xantênico orientado verticalmente favorece a interação da carboxila com as paredes do tubo e com as moléculas do solvente, aumentando a intensidade da malha de forças intermoleculares presentes no fluido como pode ser visto na figura 5.4. Este mesmo fato não pode ser estendido às moléculas que se deslocam com orientação horizontal, pois desta forma a carboxila assume um posicionamento que dificulta a sua interação com a vizinhança.

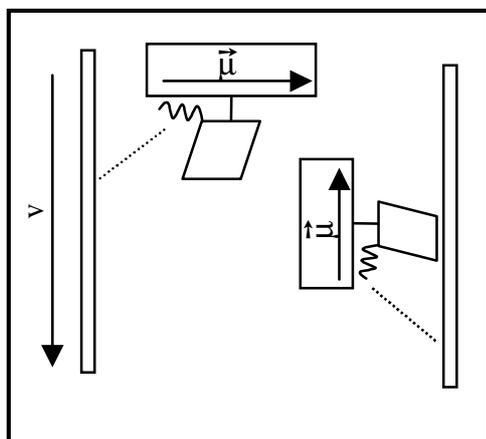


Figura 5.4: Representação da interação entre rodamina B e as paredes do tubo.

difusividade química e por conseguinte um maior coeficiente de dispersão.

Em função da maior interação entre as moléculas que se deslocam verticalmente com as paredes do tubo e as moléculas do solvente, estas apresentam uma maior dificuldade de permear o fluido carregador, em relação às moléculas orientadas na vertical. A tabela 5.3 mostra a diferença na relação entre a altura do pico e a largura a meia altura dos respectivos perfis de dispersão, evidenciando que as moléculas de RB orientadas verticalmente apresentam uma menor

Tabela 5.3: Dispersão da RB em função da orientação molecular.

Sist. Amostragem	C ₀		C _{máx}		D		Pol Intr (%)
	V	H	V	H	V	H	
MC10	932	927	848	985	1,10	0,94	0,52 ± 3x10 ⁻⁴
MC1	932	927	850	931	1,10	1,00	

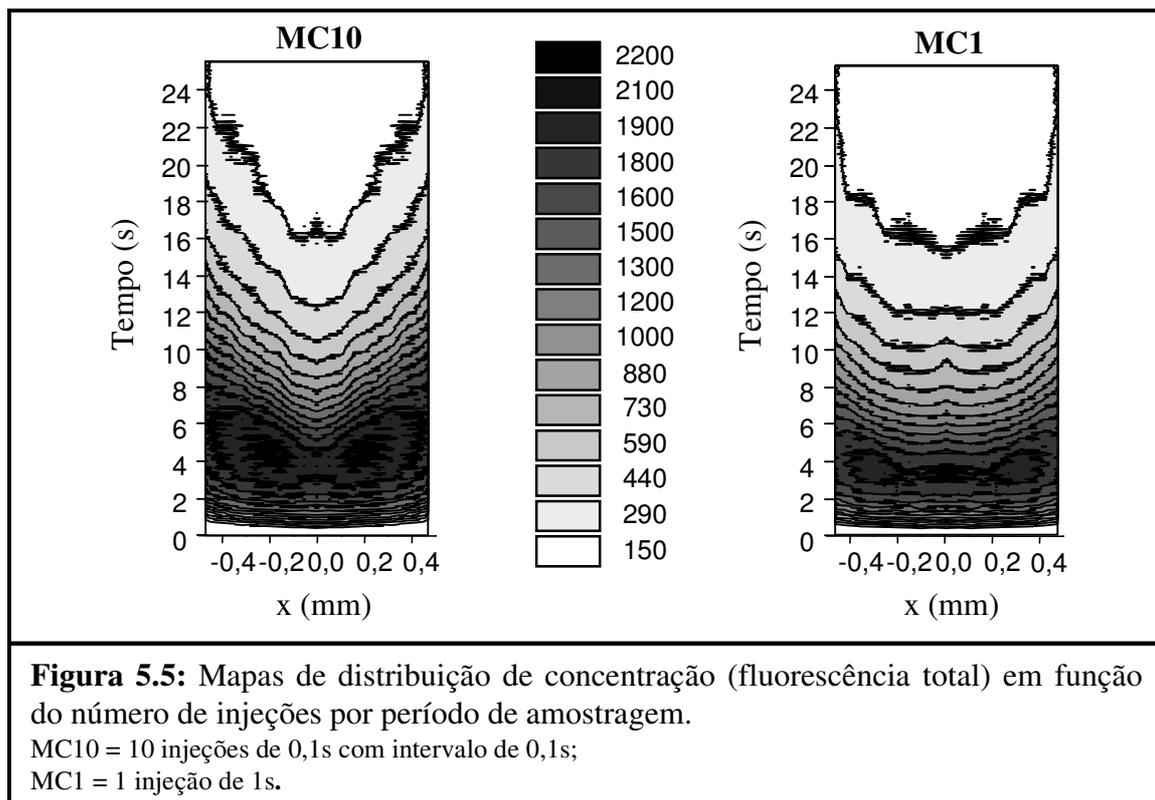
C₀=Concentração Inicial (Intensidade de Fluorescência sem dispersão); C_{máx}=Concentração Máxima da Amostra (Intensidade de Fluorescência após dispersão); D (Coeficiente de Dispersão) = C₀/C_{máx}; Pol Intr = Polarização Intrínseca (sem fluxo); V = Componente vertical da fluorescência; H = Componente horizontal da fluorescência

5.4- INFLUÊNCIA DA ÁREA INTERFACIAL LÍQUIDO-LÍQUIDO NA DISPERSÃO EM SISTEMAS FI

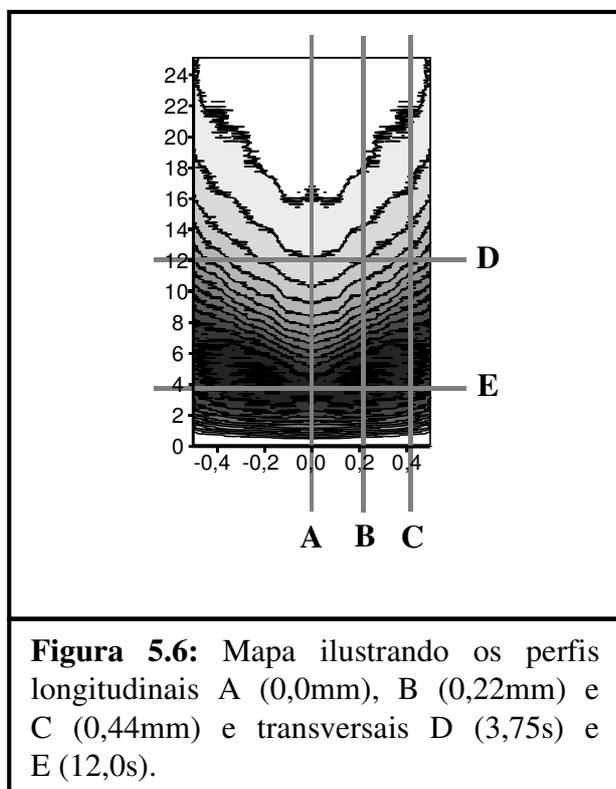
Para determinar a influência da área interfacial líquido-líquido no processo de dispersão da amostra foram adotados dois sistemas de injeção por multicomutação baseados em tempo. Estes sistemas, como já foi discutido nos capítulos 2 (Dispersão em Sistemas FI) e 4 (Sistema Experimental), diferem no número de pulsos de injeção por ciclo de amostragem. Enquanto na primeira apenas um plugue de amostra é introduzido no circuito (MC1), na segunda este mesmo plugue é subdividido em 10 volumes menores (MC10), aumentando em 10 vezes a interface de contato entre amostra e carregador ou reagente.

5.4.1-Dispersão Total da Amostra (LIF)

Observando os mapas LIF de distribuição de concentração em função do tempo (figura 5.5), pode-se observar que a dispersão longitudinal da amostra aumenta do centro em direção às paredes da cela de detecção, sendo que a região frontal da zona de amostra adquire um perfil parabólico em decorrência da existência do gradiente de velocidades imposto pelo regime de fluxo laminar.



Como discutido no capítulo 3 (Sistema Fluorescente) o regime de fluxo depende de constantes



físicas relacionadas entre si pelo número de Reynolds (Re). O sistema FI deste trabalho tem Re 7, o que implica num regime de fluxo altamente laminar, uma vez que somente em valores acima do Re crítico, neste caso cerca de 1000, o fluxo é considerado turbulento. Isto concorda com o que prevê a literatura [van der Linden 82], segundo a qual a dispersão em sistemas FI de tubo aberto em linha simples ocorre pelo gradiente de velocidades gerados pelo fluxo laminar e pela difusão molecular.

Os mapas LIF mostram que o método de

injeção da amostra no circuito pode aumentar o processo de dispersão, de forma que a magnitude da

dispersão aumenta quando a área interfacial entre carregador e amostra é incrementada, ou seja, fragmentando um mesmo volume de amostra em plugues menores pode-se conseguir uma maior eficiência de mistura entre esta e o fluido carregador. A extensão da zona de amostra no sistema MC10 de injeção é cerca de 18% maior que na MC1 (tabela 5.4A) a 0,44 mm de distância do centro do tubo (figura 5.6). É possível observar também que a diferença diminui na região central do tubo ($x = 0,00$ mm), sendo cerca de 9%, ainda em favor do sistema MC10 de injeção.

Tabela 5.4A: Dispersão longitudinal da rodamina B, sem a adição de Ca(II), em função da posição lateral (x) e do número de injeções por período de amostragem.

Sist. Am. x (mm)	MC1			MC10			R(%)		
	LIF (cm)	V (cm)	H (cm)	LIF (cm)	V (cm)	H (cm)	LIF	V	H
0,44	27,7	23,7	19,5	33,0	26,3	24,0	18	10	19
0,22	25,5	19,5	17,7	27,7	22,5	20,4	8	13	13
0,00	22,5	20,25	17,4	24,7	19,2	17,7	9	-5	2

$R = ((MC10 - MC1) / MC10) \times 100$; Valores determinados acima de 150 contagens;

MC1=1 injeção por período de amostragem;

MC10=10 injeções por período de amostragem;

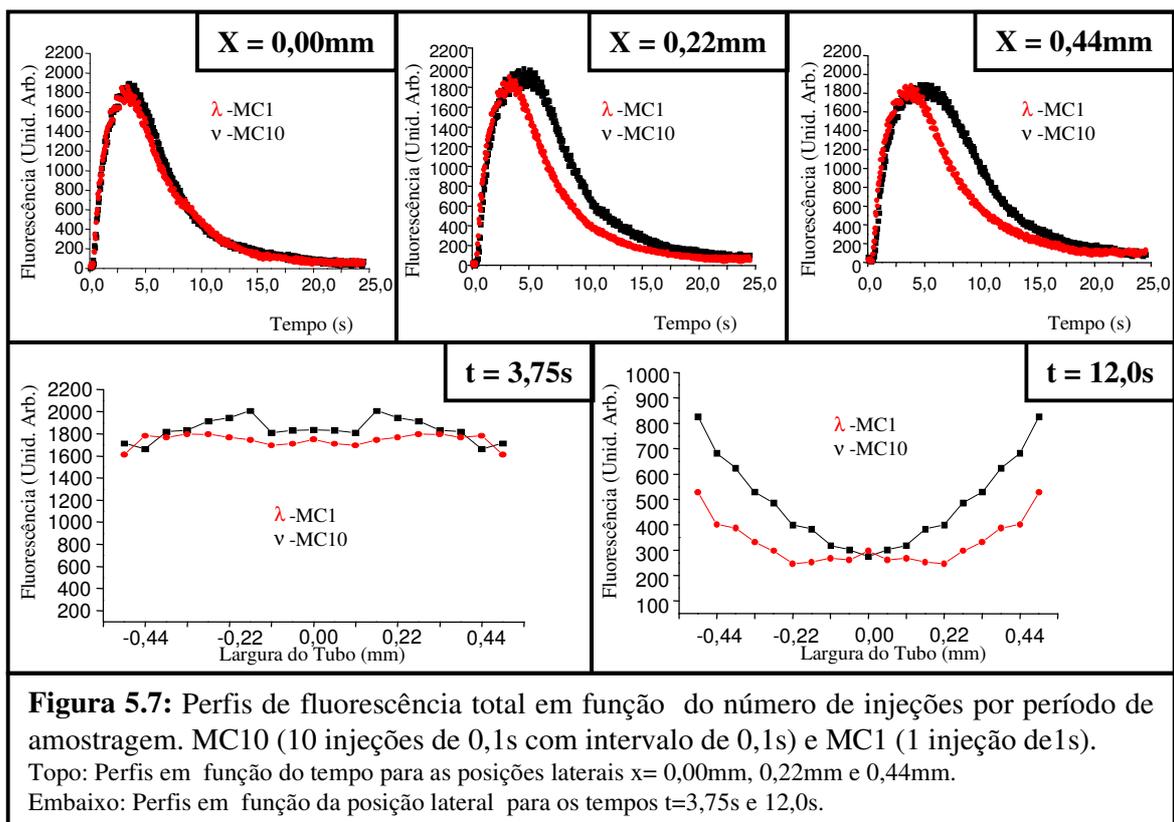
LIF–Fluorescência total;

V–Fluorescência vertical

H–Fluorescência horizontal.

Uma outra característica interessante é o fato de que o máximo de concentração não está localizada no centro do tubo, nitidamente pode-se observar a existência de dois picos laterais que são mais pronunciados para o sistema MC10, fato previsto por Wentzel e col. [Wentzel 93] para tempos pequenos de dispersão. O gradiente de velocidade, dado pela polarização, nos mostrará que o fenômeno está relacionado com perfil de distribuição de velocidades dentro da cela de detecção. No centro da cela a velocidade de escoamento do fluido é ligeiramente menor que na região intermediária, aumentando o tempo de interação da amostra com o carregador e, conseqüentemente, promovendo uma maior dispersão. Pode-se observar nos mapas inclusive que regiões de menor concentração possuem um prolongamento semelhante a uma pequena “cauda” na região final do plugue, certamente em decorrência da menor velocidade do fluido nesta região.

Os perfis LIF de distribuição de concentração dentro da cela de detecção podem ser vistos na figura 5.7. Os cortes longitudinais referem-se às distâncias de 0,44 mm, 0,22 mm e 0,00 mm em relação ao eixo central do tubo. Os cortes transversais correspondem aos instantes 3,75 s e 12,0 s. Neste último os pontos foram unidos por linhas que tem como único objetivo conduzir a visão do leitor numa melhor visualização do comportamento geral da curva. Esta mesma descrição pode ser aplicada, com as devidas adaptações, aos outros perfis descritos neste capítulo.



Podemos observar pelo alargamento dos perfis longitudinais que o processo de dispersão se intensifica com o tempo na medida em que o fluido se aproxima das bordas (figura 5.6), sendo esta característica mais intensa no sistema de injeção MC10. Isto confirma o que foi observado nos mapas LIF e conseqüentemente se ajusta com o proposto na literatura para fluxos laminares que prevê a existência de um gradiente de velocidades que diminui do centro para a periferia do tubo, chegando a zero na camada limite. Apesar da dispersão longitudinal ser proporcional à interface de contato amostra/carregador, os perfis longitudinais mostram que no centro do tubo não existe diferença

significativa entre MC1 e MC10 (figura 5.6). Se considerarmos que na região próxima ao centro do tubo a velocidade de escoamento do fluido é muito maior que nas extremidades próximas às paredes da cela podemos inferir que quanto maior a velocidade de escoamento do fluido menor será a dispersão da amostra. Isto confirma a relação existente entre dispersão e taxa de fluxo.

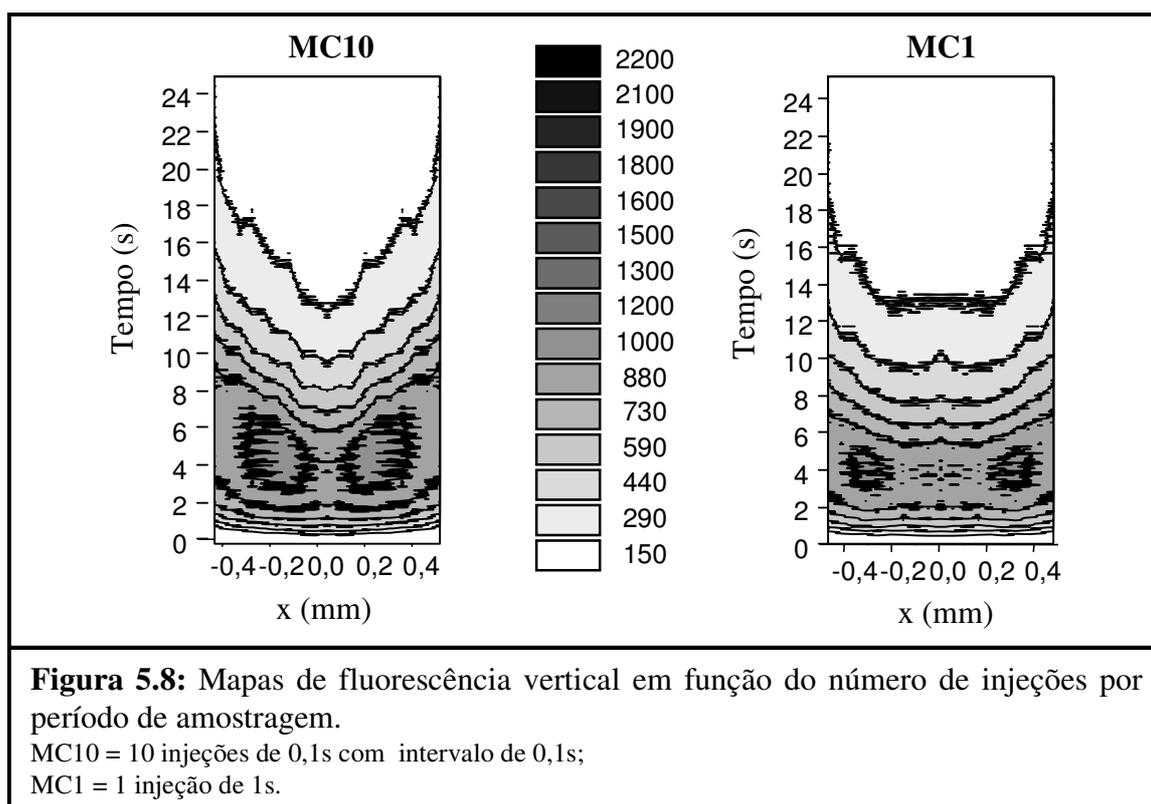
É importante observar que a velocidade do fluido, bem como o comprimento do percurso analítico, define o tempo de interação entre líquido e sólido e entre “camadas” moleculares dentro do próprio líquido. Esta interação é diretamente proporcional ao processo de dispersão, de forma que constituições químicas diferentes nos tubos de conexão podem gerar padrões diferentes de dispersão sem que haja a necessidade de utilizar percursos analíticos muito grandes, o que diminui a frequência analítica, pelo simples fato de alterar as interações entre a fase líquida e a superfície sólida, bem como entre carregador e amostra.

Os perfis transversais mostrados na figura 5.6 confirmam a existência de dois máximos laterais e maior concentração para o sistema MC10 de injeção na região inicial da zona de amostra. Na parte final do plugue pode-se observar que no centro as concentrações são aproximadamente iguais, sendo que mais próximo às paredes do tubo a concentração para amostragem MC10 é maior. Uma observação importante é que o sistema MC1 gera na parte final do plugue de amostra ($t=12,00$ s) uma região com concentração aproximadamente constante no centro do tubo, enquanto que no sistema MC10 a concentração cai gradativamente desde a extremidade até o centro. Isto pode ser interpretado como uma consequência do alargamento do plugue de amostra imposta pelo sistema MC10. Como os cortes foram feitos no mesmo instante os níveis de concentração nas laterais para o sistema MC10 ainda estavam altos por causa do plugue ser mais longo em função da maior influência de forças dispersivas nas paredes do tubo, maximizadas neste sistema (vide ângulos de contato na seção 5.1).

5.4.2-Dispersão da Amostra em Função da sua Orientação Molecular

No decorrer deste texto nos referiremos a moléculas se deslocando na horizontal como aquelas que, fotoselecionadas pelo laser na vertical, emitem fluorescência na horizontal após rotacionarem. Similarmente as moléculas que não sofrerem difusão rotacional depois de excitadas pelo feixe laser serão referidas como as que se deslocam na vertical.

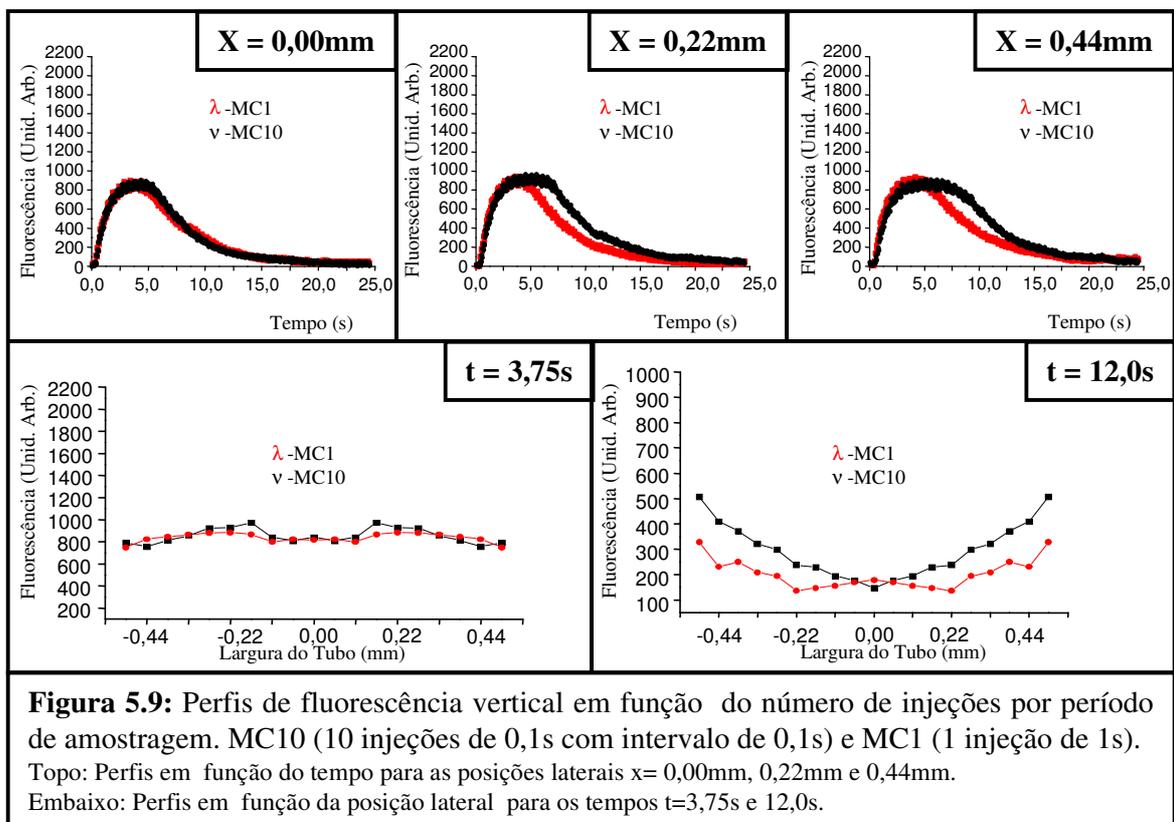
A figura 5.8 mostra a dispersão das moléculas de RB verticalmente polarizadas. De forma geral estes mapas mostram um comportamento similar aos de LIF (figura 5.5), sendo o sistema MC10 de injeção da amostra mais eficiente em promover a dispersão da orientação molecular vertical da amostra principalmente nas extremidades próximas às paredes da cela de detecção (21% na tabela 5.4).



Pode-se observar que as moléculas verticais contribuem para a existência de dois máximos laterais como foi observado no mapa LIF (figura 5.5). Uma outra característica interessante é o padrão de distribuição radial no fim da zona de amostra (figura 5.8), sendo em MC1 caracterizada por uma

região plana de concentração no centro do tubo enquanto que em MC10 o alargamento do plugue é gradativo do centro para a periferia. Isto mais uma vez é consequência do gradiente de velocidades gerados em sistemas de fluxo laminar, sendo o processo dispersivo imposto pelo regime de fluxo laminar menos sensível na MC1 em função da reduzida interface de contato.

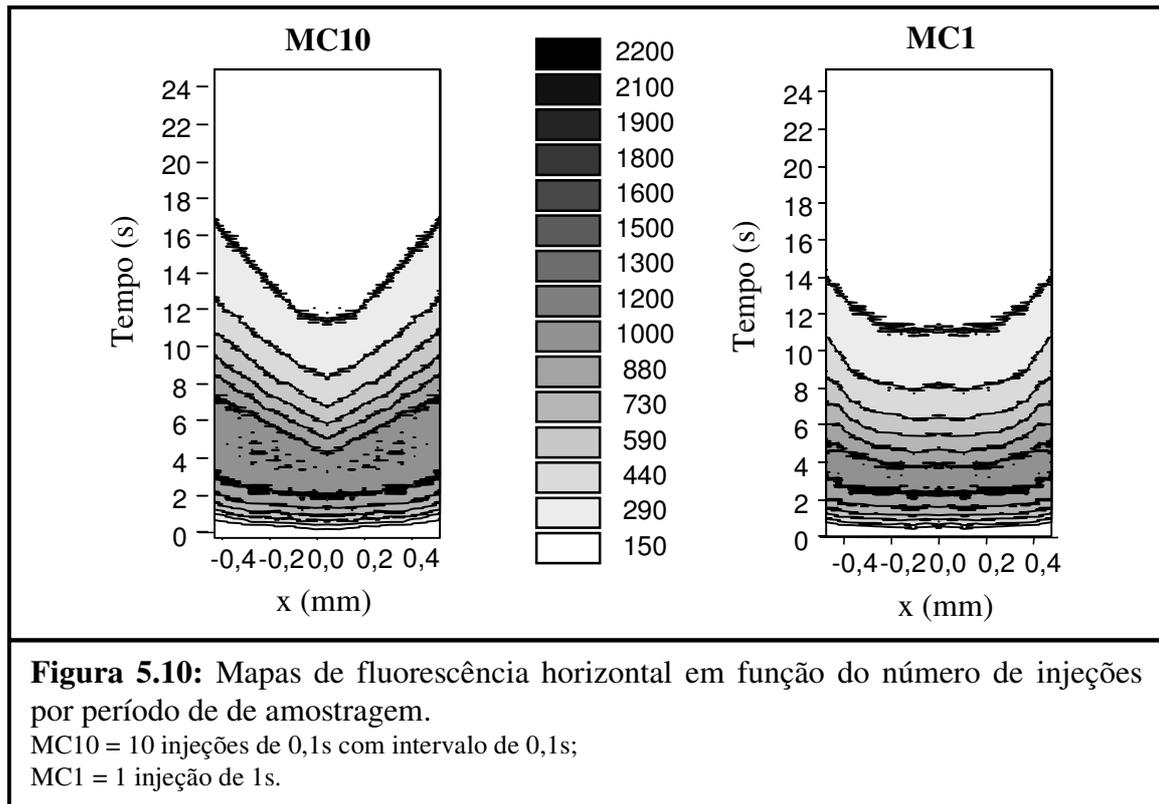
Observando os perfis longitudinais na figura 5.9 podemos perceber um comportamento similar ao encontrado nos perfis LIF (figura 5.7). O sistema MC10 de injeção aumenta a largura do sinal principalmente nas extremidades da cela, no centro as curvas são aproximadamente iguais.



Os perfis radiais de concentração, figura 5.9, confirmam os dois máximos laterais, observados nos mapas, no início da zona de amostra, mais pronunciados em MC10. Na parte final da zona de amostra, nas extremidades próximas às paredes, é observada uma maior concentração no perfil correspondente a MC10.

As moléculas orientadas na direção horizontal apresentam também comportamento semelhante ao observado nos perfis LIF, a exemplo do que foi observado em relação à dispersão das moléculas

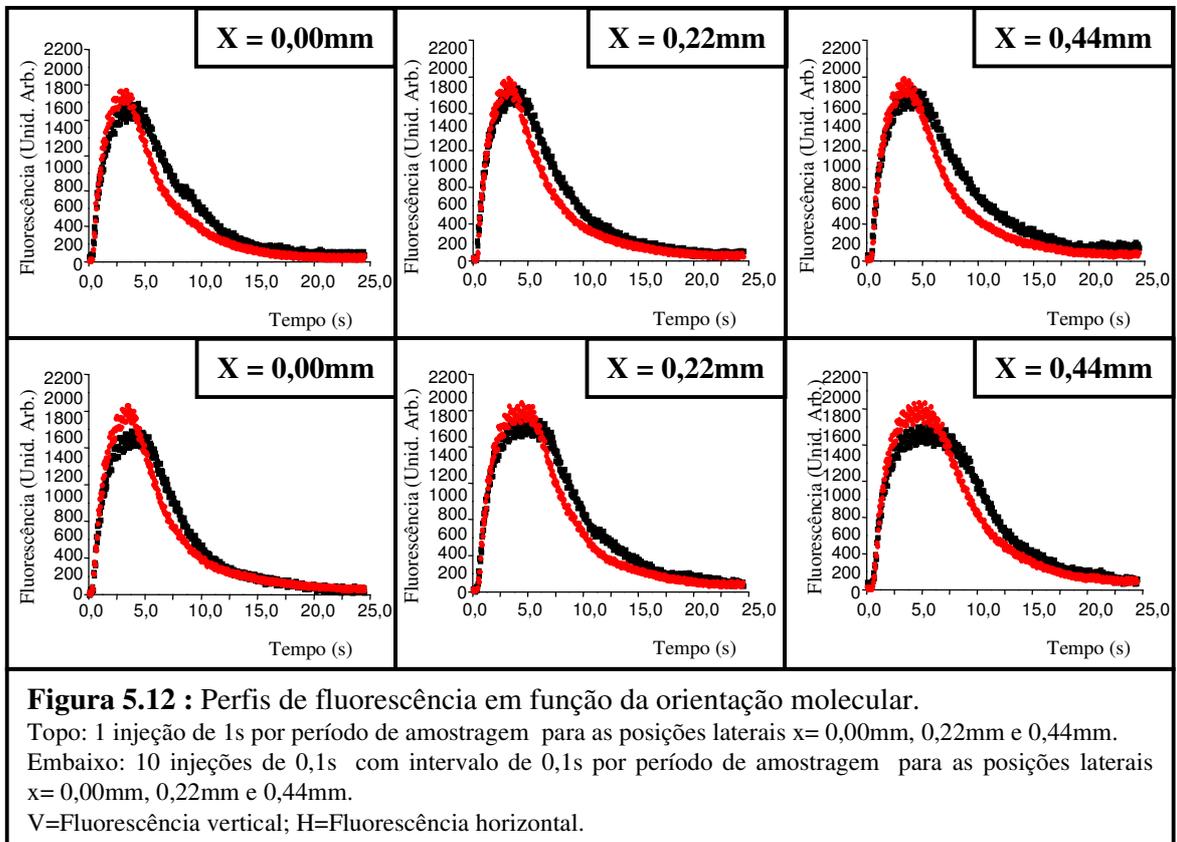
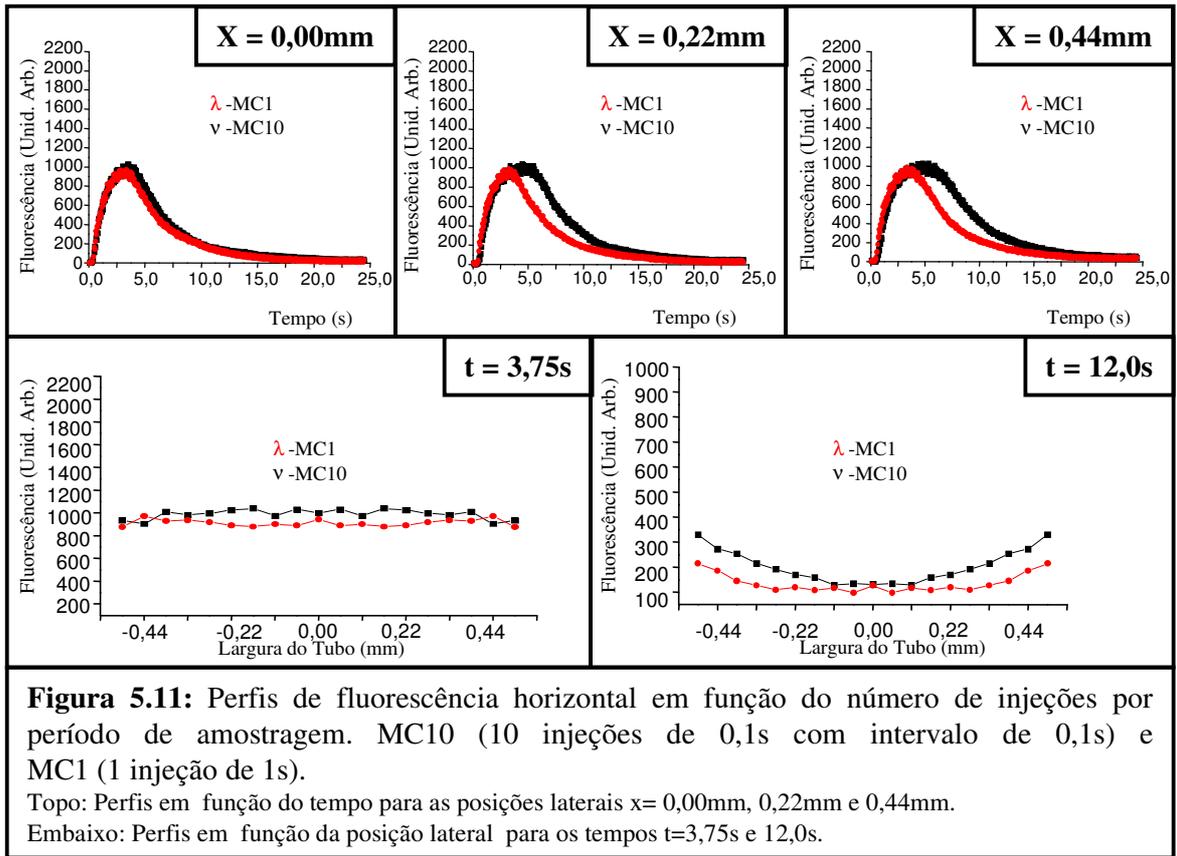
verticalmente polarizadas. A figura 5.10, no entanto mostra uma diferença importante no padrão de distribuição das moléculas orientadas horizontalmente em relação aos mapas LIF: os dois máximos laterais do início do pulso de amostra são substituídos por uma única faixa de máximo que se estende de um lado a outro do tubo.



A concentração da RB horizontal apresenta um pico mais intenso e um decaimento mais rápido quando comparado com o sinal correspondente às moléculas verticalmente polarizadas principalmente na região central e nas extremidades do tubo.

A figura 5.11 mostra, respectivamente, os perfis longitudinais e transversais. Estes apresentam comportamento similar ao encontrado para o LIF e para a fluorescência vertical.

Comparando entre si os perfis longitudinais extraídos dos mapas de fluorescência vertical e horizontal (figura 5.12) pode-se confirmar a diferença no padrão de distribuição de concentração em relação à disposição espacial da molécula de RB.



A primeira observação se refere ao fato de que, sem dispersão, a concentração total de moléculas verticalmente polarizadas é ligeiramente maior (cerca de 0,54%) que as horizontalmente polarizadas, como mostra a tabela 5.3. Era de se esperar este resultado uma vez que, ao longo de todo o período analítico, o princípio da fotoseleção [Lakowicz 83] privilegia as moléculas que estão dispostas paralelamente ao campo elétrico do feixe de excitação. Considerando que o laser utilizado é 100% polarizado na vertical e que a probabilidade de um determinado fluoróforo absorver um fóton é proporcional ao $\cos^2\theta$ (onde θ é o ângulo formado entre o campo elétrico do fóton e o momento de dipolo da molécula), no instante em que a amostra em fluxo é submetida à radiação laser, as espécies com dipolo elétrico posicionado também na vertical vão ser excitadas numa maior proporção. Obviamente durante o período de vida do estado excitado algumas moléculas mudam por difusão rotacional o ângulo de inclinação do seu momento de dipolo e emitem fluorescência numa outra direção, neste caso horizontal.

Há uma maior concentração de moléculas dispostas horizontalmente na porção inicial da zona de amostra em oposição ao fato de que a porção final da amostra é composta predominantemente por moléculas verticalmente polarizadas. Este fato sugere uma possível diferença na mobilidade das moléculas de RB no fluxo em função de sua orientação molecular, ou seja, aparentemente as moléculas orientadas horizontalmente apresentam uma maior difusividade química, ficando menos dispersas no fluido carregador.

Considerando que as medidas de fluorescência polarizada foram feitas com volumes idênticos para ambas as orientações espaciais, e que numa única injeção de amostra a concentração da RB horizontalmente polarizada é menor que a concentração das moléculas polarizadas verticalmente, era de se esperar que o processo de dispersão pudesse ser observado com maior intensidade para as moléculas horizontais, uma vez que uma quantidade menor desta estaria submetida às mesmas condições de fluxo. Considerando a definição do coeficiente de dispersão proposto por Ruzicka [Ruzicka 78] em que D é razão $C_0/C_{m\acute{a}x}$, onde $C_{m\acute{a}x}$ é a concentração máxima da amostra na zona

dispersa (máximo do sinal transiente) e C_0 é a concentração inicial da amostra sem dispersão (volume infinito), pode-se calcular D para a RB de acordo com sua orientação espacial, como mostra a tabela 5.3. As medidas de C_0 foram obtidas medindo as intensidades das componentes vertical e horizontal da fluorescência num ponto central da cela de detecção, fazendo a solução de amostra circular sem a presença do carregador.

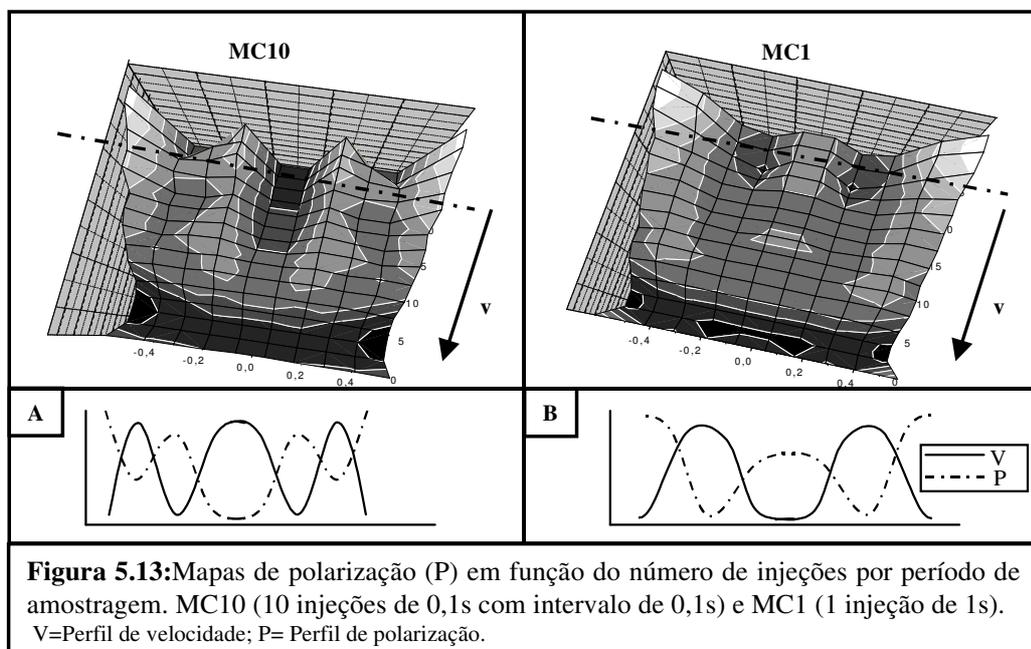
Como o sistema se comporta de forma contrária ao previsto, pode-se supor que a menor dispersão das moléculas orientadas horizontalmente não se deve a uma diferença na concentração presente no sistema, mas sim a uma possível diferença nas difusividades químicas destas espécies. É conhecido na literatura [Li 95] que diferenças na difusividade molecular de componentes do fluido modificam a forma do pico característico, como acontece no sistema em estudo.

Se considerarmos o fato de a RB ser uma molécula grande e de geometria assimétrica podemos explicar a diferença nas difusividades como uma consequência da diferença nas secções de choque, em função da orientação espacial da molécula. Isto é, ao se deslocar com o grupo xantênico perpendicular ao sentido do fluxo, as moléculas dispostas na horizontal deveriam ter uma menor capacidade de difusão, pois este grupamento funcionaria como um fator de impedimento estérico ao deslocamento da molécula no fluxo vertical. Se isto fosse verdade, as moléculas verticalmente orientadas deveriam ter uma maior velocidade relativa (menor tempo médio de residência) pelo fato de que o grupo xantênico estaria posicionado paralelamente ao sentido do fluxo. O que podemos observar nos dados é justamente o contrário, a RB horizontal tem uma maior difusividade química, apesar de ter uma maior secção de choque por estar com o grupamento xantênico disposto de forma perpendicular ao sentido do fluxo. Provavelmente esta diferença na mobilidade da RB horizontal está relacionada com interações menos intensas em função de uma disposição menos favorável de algum grupo funcional, provavelmente a carboxila do anel benzóico.

Este fenômeno foi também observado nos dados preliminares de controle e a influência do grupo funcional foi discutida na seção 5.3 (Influência de Diferenças Estruturais entre a RB e a R6G no Padrão de Dispersão da Amostra em Sistemas FI) deste capítulo.

5.4.3-Polarização

Observando os mapas de polarização na figura 5.13 pode-se constatar que, de forma geral, a polarização é baixa na frente da zona de amostra evidenciando uma maior concentração de moléculas orientadas na horizontal.



Na região terminal do plugue, no entanto, a polarização cai de forma acentuada na região central para MC10, enquanto no sistema de injeção MC1 a queda ocorre em posições radiais intermediárias apresentando uma polarização alta na região central. Curiosamente as regiões de mínimo no trecho final do plugue de amostra, no mapa de polarização referente à MC1 (figura 5.13), coincidem justamente com os máximos do sistema MC10. O comportamento semelhante no início do plugue e antagônico na parte final está relacionado com a maior eficiência de mistura alcançada com o sistema MC10.

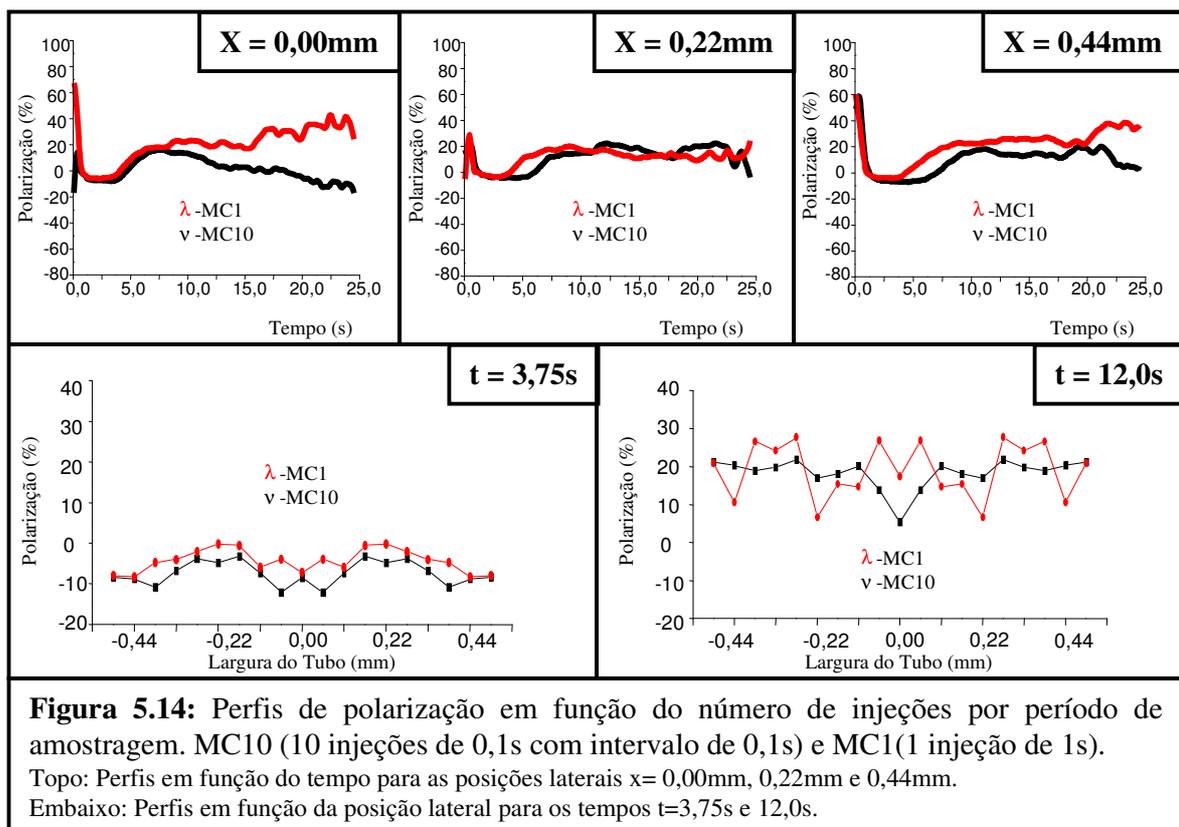
Admitindo que a difusão axial contribui numa ordem de grandeza maior para o processo de dispersão que a difusão radial nas condições em que as medidas foram realizadas, podemos garantir que a “cauda” do plugue de amostra está mais dispersa que a porção inicial [van der Linden 82]. Em consequência as moléculas nesta região estão mais susceptíveis a microturbulências provocadas pelas injeções consecutivas de pequenos volumes de amostra e carregador, evidenciando que a dispersão da amostra está associada não apenas com a laminaridade do regime de fluxo, mas com o aumento da tensão de cisalhamento entre as correntes de fluxo. Esta é aqui provocada pela comutação intermitente de amostra e carregador, gerando uma difusão rotacional mais intensa principalmente na região central.

Os máximos de polarização próximos às paredes dizem respeito justamente à menor velocidade do fluido nas proximidades da camada limite, o que aumenta o tempo de interação entre líquido e sólido favorecendo uma determinada orientação espacial, neste caso a vertical. Isto concorda com a diferença observada na difusividade molecular entre as espécies vertical e horizontal, confirmando que as moléculas orientadas na vertical interagem mais efetivamente com as paredes do tubo e por isso apresentam menor mobilidade.

A análise dos mapas de polarização mostrados na figura 5.13 revela ainda a existência de um padrão de fluxo ainda não descrito para sistemas FI. O perfil de velocidades pode ser obtido através de tratamento matemático integrando-se os perfis transversais de polarização do fluido líquido, conforme demonstrado experimentalmente por Quintella e col. [Quintella 02a]. Podemos obter uma projeção do perfil radial de velocidade em função do tempo e do sistema de amostragem (A e B na figura 5.13). Tais perfis revelam que para MC1 as moléculas no centro do fluxo se deslocam no percurso analítico com uma velocidade relativa menor que na região intermediária. Isto significa que nas nossas condições experimentais o regime de fluxo descrito pela amostra apresenta um padrão anelar e não parabólico como era de se esperar. Este padrão permanece até um determinado instante, quando as duas correntes de fluxo laterais se encontram restabelecendo o perfil parabólico convencional.

Em MC10 este padrão é também observado, mas com uma diferença. Ao invés de duas regiões de maior velocidade relativa, o perfil encontrado é composto por três regiões de maior velocidade. no centro e nas regiões intermediárias. Este comportamento pode estar relacionado com a maior eficiência de dispersão observada para MC10 neste trabalho e confirmado pela literatura [Kronka 96]

Observando os perfis longitudinais na figura 5.14 podemos confirmar que na região central e na extremidade do tubo há uma maior concentração de moléculas orientadas na vertical para MC1.



Na região intermediária o sistema MC10 se comporta de forma similar ao MC1 apresentando uma concentração ligeiramente maior de moléculas verticalmente polarizadas na porção final do plugue de amostra.

Os perfis transversais, figura 5.14, mostram que na primeira parte do plugue de amostra a polarização é maior (cerca de 20%) na região central para ambos os sistemas de injeção, e que na região onde estariam localizados os máximos de fluorescência a polarização cai também para ambos

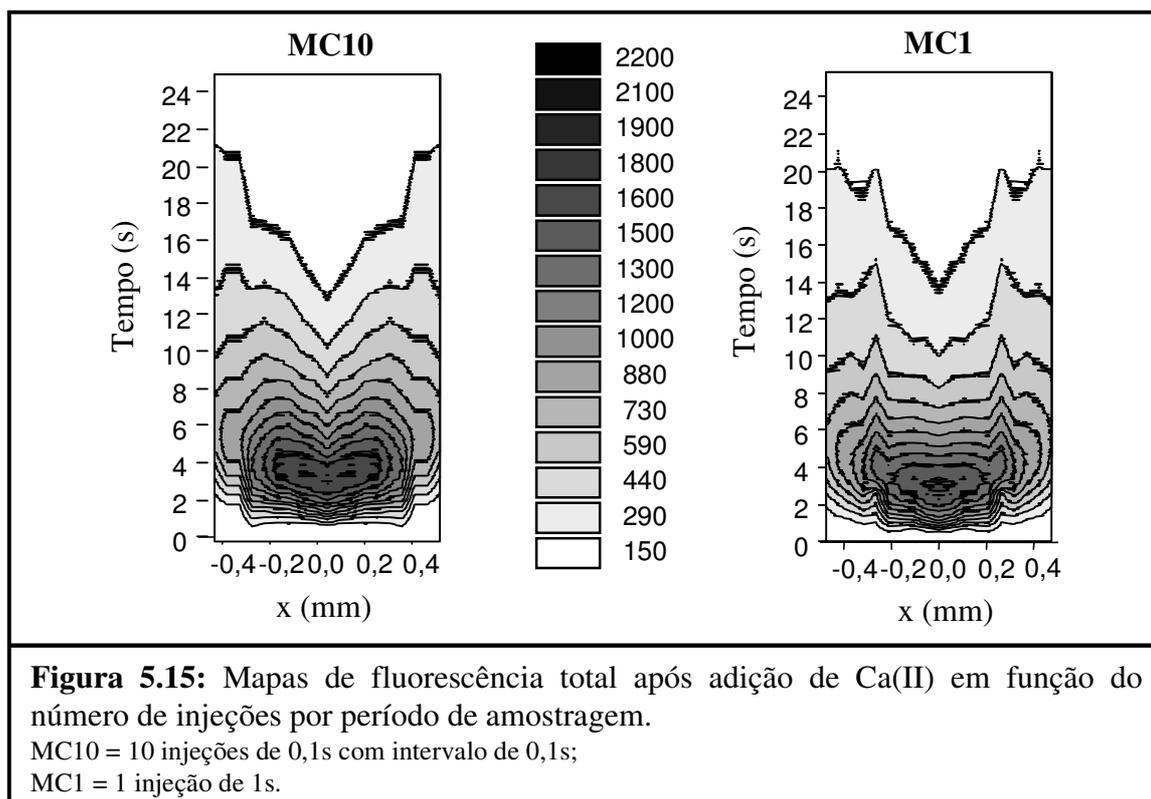
(cerca de 10%), evidenciando a maior concentração de moléculas na horizontal como já foi discutido neste capítulo.

5.5-INFLUÊNCIA DO PADRÃO E DA DINÂMICA DE DISPERSÃO NA REAÇÃO DA RB COM Ca(II)

Para estudar a eficiência de uma reação química em função do grau de dispersão foi utilizada uma solução de Ca(II) em MEG por motivos discutidos no capítulo 4 (Sistema Experimental). O sistema FI não sofreu alteração significativa, à exceção do fato de que o carregador passou a ser a solução do reagente como descrito neste mesmo capítulo. Vale a pena lembrar que tanto a RB quanto o Ca(II) foram dissolvidos em MEG partindo de seus respectivos cloretos, de forma que qualquer alteração no sinal analítico deve ser creditado a uma possível interação entre o Ca(II) e a RB.

5.5.1-Dispersão Total Através de LIF

Os mapas LIF mostrados na figura 5.15, quando comparados com os sem Ca(II) (figura 5.5) mostram que a adição deste cátion ao carregador provoca acentuada diminuição (cerca de 40%) da concentração da espécie fluorescente do corante. Pode-se perceber ainda que atenuação da fluorescência se dá de forma mais intensa próximo às paredes do tubo, sendo os dois máximos laterais substituídos por uma única região de máximo no centro do plugue de amostra.



Este fato está relacionado com os mecanismos de supressão da fluorescência, descritos resumidamente no capítulo 3 (Sistema Fluorescente). Duas opções são viáveis, desativação do estado excitado através de choques entre o fluoróforo e a espécie supressora ou interação química entre as duas espécies, Ca(II) e RB, gerando um produto não fluorescente. Considerando que a primeira opção é pouco provável e que não existem referências, ao que o autor saiba, da utilização do Ca(II) em supressão colisional, apenas a interação química será considerada aqui.

A RB, em solução, pode apresentar pelo menos quatro formas moleculares diferentes a depender do pH, da concentração, e do próprio solvente [Ramette 56]. Uma das formas pode ser o zwitterion (figura 3.3C), que se caracteriza pela protonação do grupo benzóico perpendicular ao grupo xantênico. O surgimento de uma carga negativa pode justificar a interação eletrostática entre a RB e o íon Ca(II). Sendo este íon divalente, provavelmente são necessárias duas moléculas de RB para neutralizá-lo, sendo possível imaginar a formação de uma espécie de “pseudodímero” no sistema, que na verdade seriam duas moléculas de RB unidas eletrostaticamente a um íon Ca(II).

Testes preliminares de simulação utilizando o software HyperChem foram realizados e determinaram a possibilidade de existir uma espécie nestas condições, com uma energia de 488,39 kcalmol⁻¹, com momento de dipolo, μ , igual a 32,23 D e volume de 2.250,09 Å³. É claro que os resultados precisam ser aprimorados e níveis de confiança mais relevantes precisam ser alcançados na seqüência deste estudo, todavia não é objetivo deste trabalho realizar cálculos teóricos de estrutura molecular de espécies químicas geradas em fluxo.

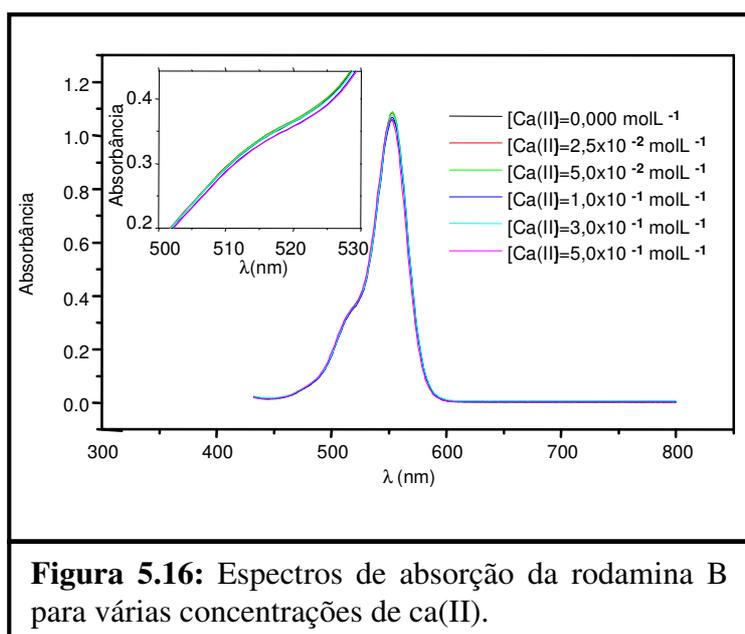


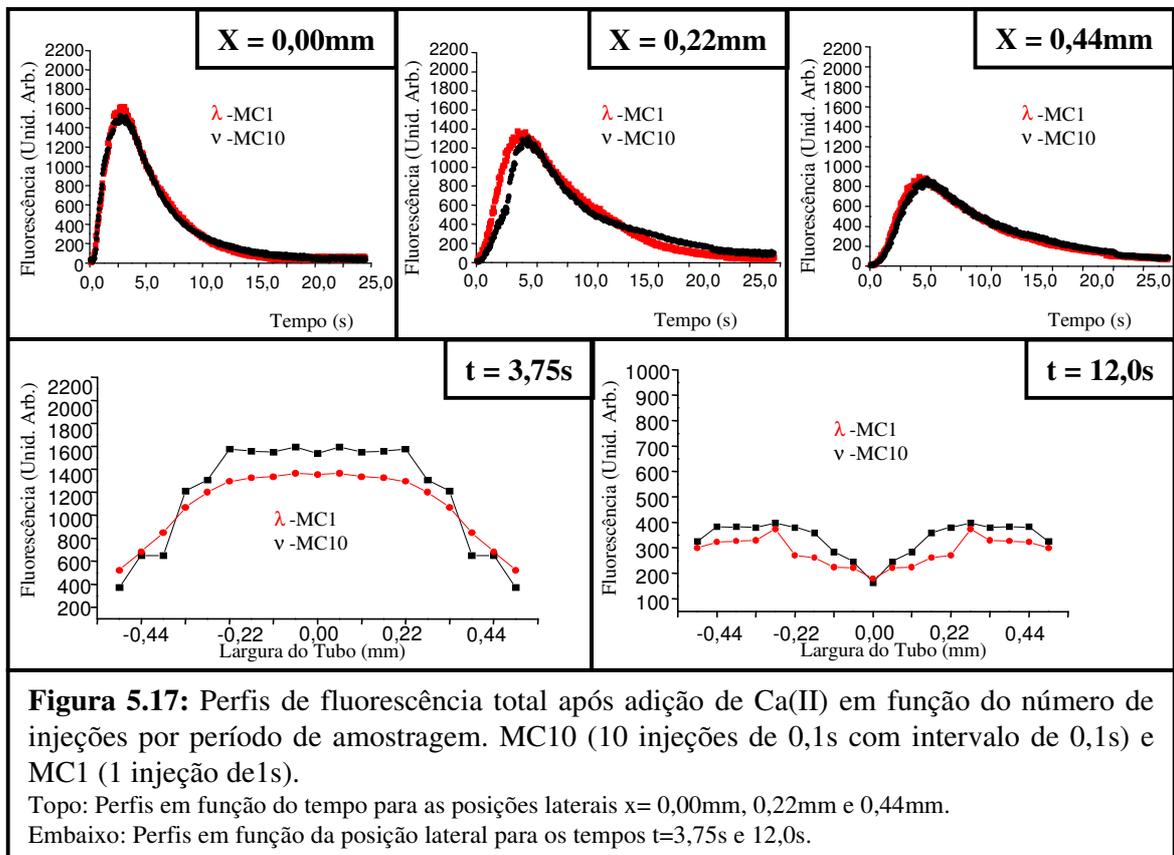
Figura 5.16: Espectros de absorção da rodamina B para várias concentrações de ca(II).

Além dos testes de simulação teórica foram obtidos espectros de absorção molecular (figura 5.16) com o objetivo de detectar uma possível variação na concentração do dímero, associado com um pico em 520 nm [Arbeloa 82] em consequência da presença do Ca(II). No entanto não só nenhuma modificação significativa foi observada, como o ponto

isobéstico está ausente.

Observando os perfis longitudinais na figura 5.17 fica evidente que não existe diferença significativa entre os dois sistemas de amostragem após a adição de Ca(II) para o centro e a lateral da célula. Para $x = 0,20$ mm a diferença é similar ao perfil sem Ca(II), sendo possível observar o aumento da concentração de ambos no centro do fluxo no início do plugue. Já os perfis transversais (figura 5.17) mostram comportamento oposto ao sem Ca(II) mostrados na figura 5.9. A concentração é menor próximo às bordas do tubo em MC10 (início da zona de amostragem) com um incremento mais acentuado da concentração em direção ao centro. Na parte final do plugue de amostra a concentração cai de forma mais acentuada para o sistema de injeção MC10 à partir de 0,15mm, em relação ao centro

do fluxo, enquanto para MC1 a concentração diminui de forma mais lenta à partir de 0,25mm até o centro.



É importante mais uma vez relacionar a dispersão da amostra com o tempo de interação entre as moléculas do fluido. Próximo às paredes a velocidade das correntes de fluxo é menor, tendendo a zero na camada limite, em função da interação entre o fluido líquido e as paredes sólidas do tubo. Nitidamente as moléculas que se deslocam com uma menor velocidade relativa reagem numa maior proporção pois têm mais tempo para estabelecer uma interação.

5.5.2-Dispersão em função da orientação molecular na presença de Ca(II)

Os mapas de fluorescência vertical (figura 5.18) mostram comportamento semelhante ao observado nos mapas LIF com Ca(II), inclusive praticamente a mesma extensão da zona de amostra, como pode ser visto na tabela 5.4B.

Tabela 5.4B: Dispersão longitudinal da rodamina B, após adição de Ca(II), em função da posição lateral (x) e do número de injeções por período de amostragem.

Sist. Am.	MC1			MC10			R(%)		
	LIF (cm)	V (cm)	H (cm)	LIF (cm)	V (cm)	H (cm)	LIF	V	H
0,44	29,8	22,2	18,0	30,7	20,7	20,7	3	-7	13
0,22	24,7	19,5	15,0	25,5	19,5	19,5	3	0	23
0,00	20,3	16,5	13,5	19,5	15,7	15,7	-4	-5	17

$R = ((MC10 - MC1) / MC10) \times 100$; Valores determinados acima de 150 contagens;

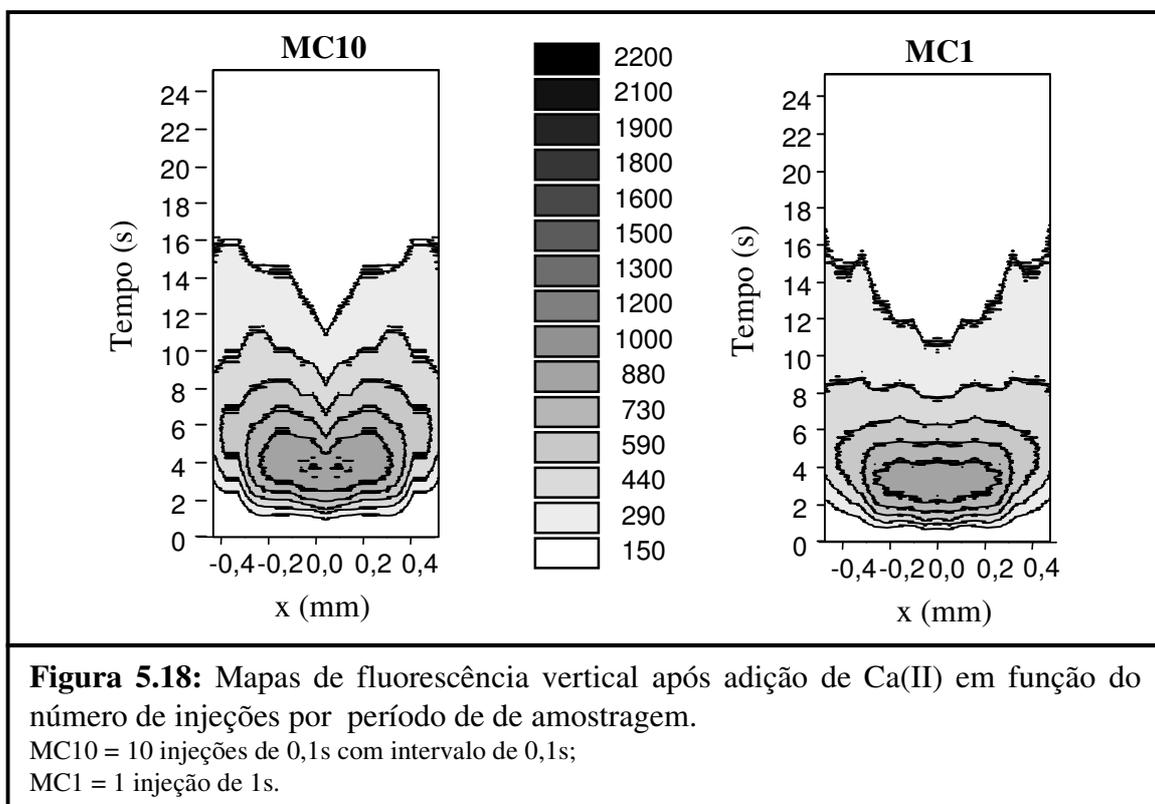
MC1=1 injeção por período de amostragem;

MC10=10 injeções por período de amostragem;

LIF-Fluorescência total;

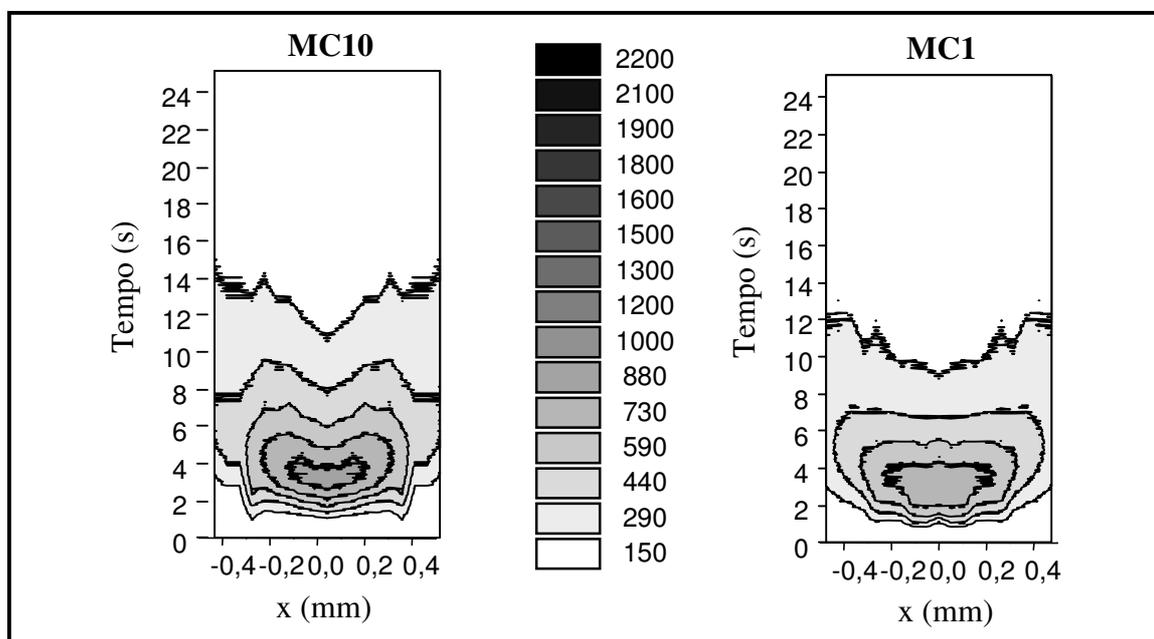
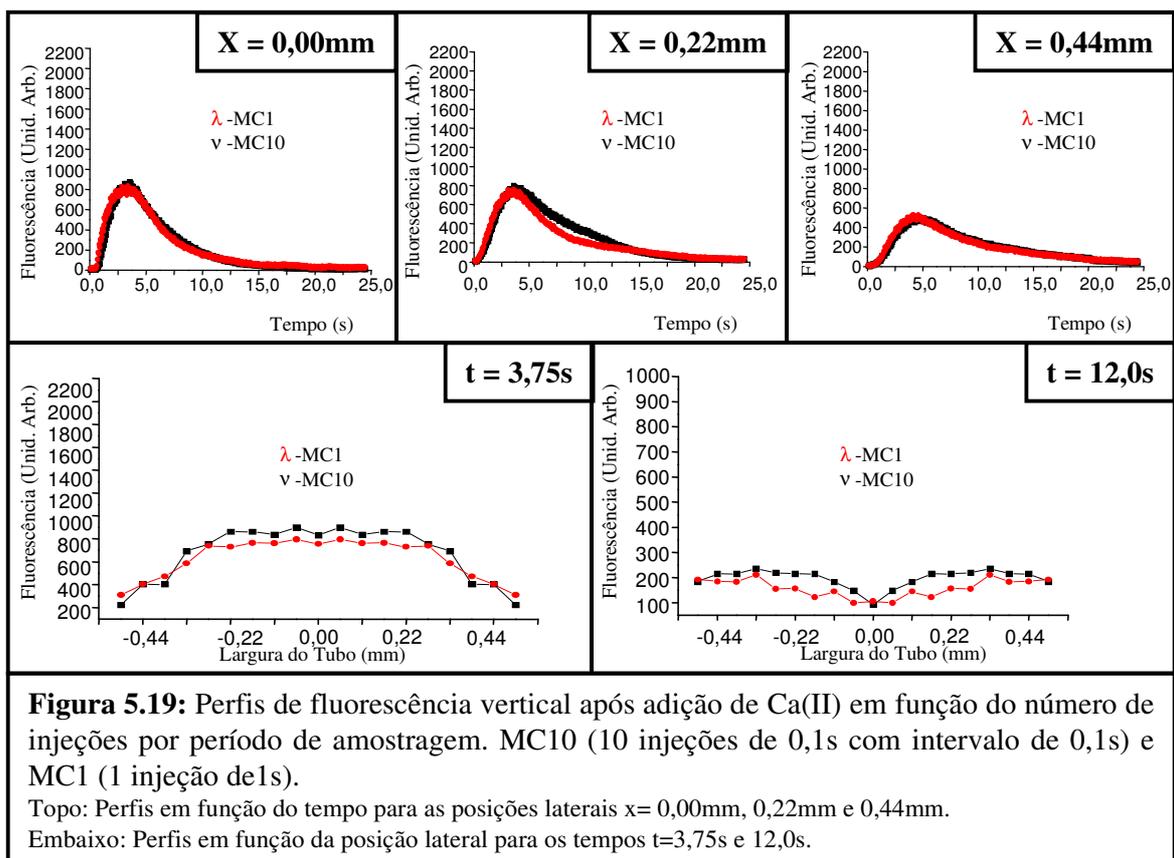
V-Fluorescência vertical

H-Fluorescência horizontal.



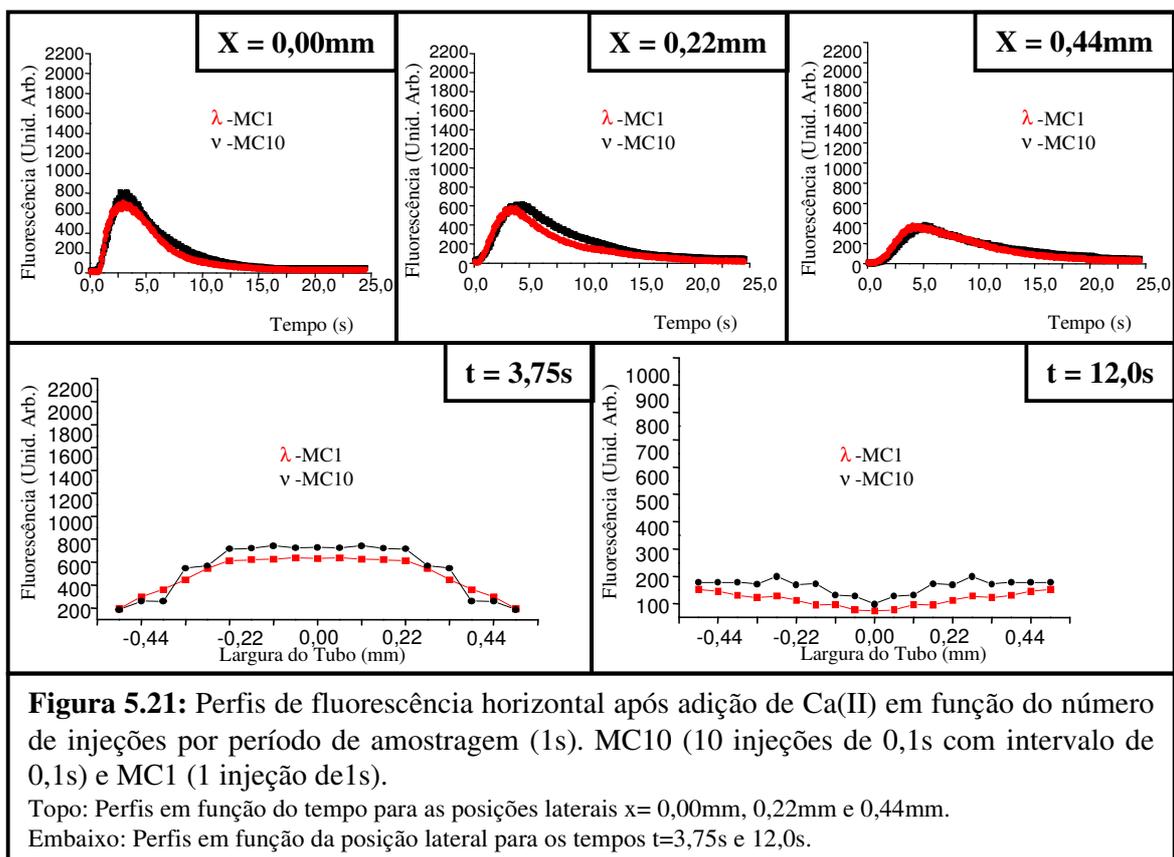
Os perfis longitudinais referentes às moléculas orientadas verticalmente (figura 5.19), também não mostram diferença significativa entre si.

Já os perfis transversais (figura 5.19) revelam que a concentração da amostra no centro do fluxo varia ligeiramente (cerca de 10%) no início do plugue de acordo com o sistema de amostragem. A diferença na concentração se mostra mais evidente na região entre o centro e a borda do fluido na parte final da zona de amostragem (t=12,00s).



Na figura 5.20 podemos observar os mapas de fluorescência horizontal. A exemplo dos mapas verticais os sistemas de amostragem não diferem significativamente entre si, a não ser na extensão do plugue de amostra, sendo o sistema MC10 responsável por uma dispersão mais intensa da amostra como pode ser observado na tabela 5.4B.

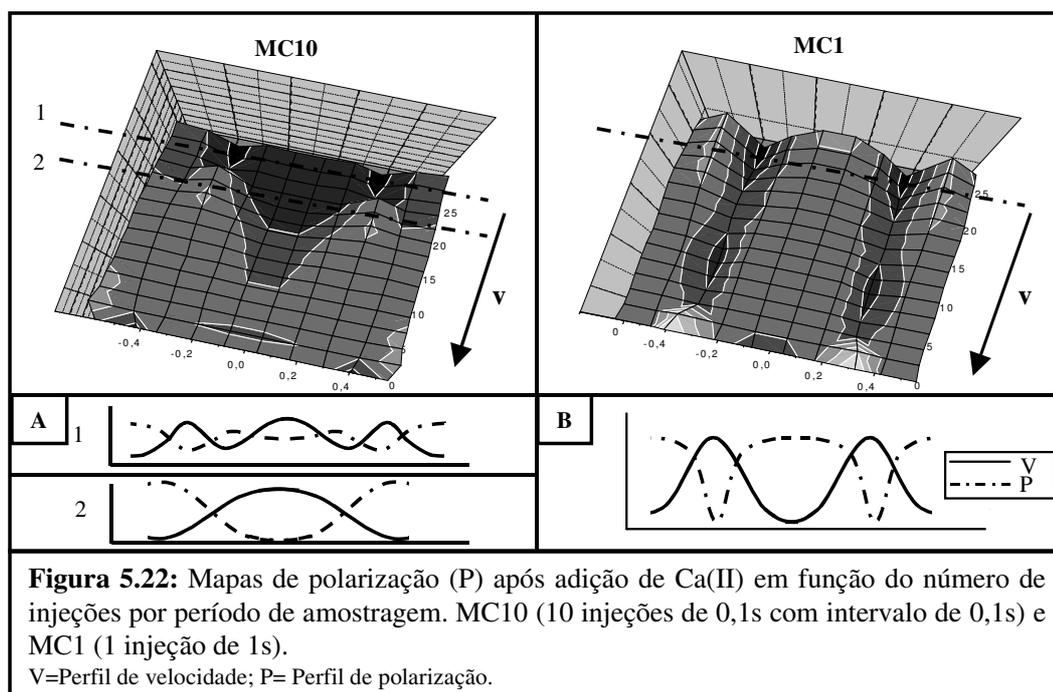
Os perfis longitudinais e transversais referentes a estes mapas horizontais (figura 5.21) também demonstram o mesmo comportamento observado para o LIF e a fluorescência vertical após a adição de Ca(II) (figuras 5.17 e 5.19). No entanto o perfil transversal apresenta algumas diferenças na parte final da zona de amostra quando a concentração em MC10 aumenta até 0,15mm e cai até o centro, enquanto que em MC1 a concentração cai gradativamente até o centro.



Tanto para MC10 como para MC1 pode-se observar que a influência da interação sólido-líquido é mais intensa desde a extremidade do fluxo até cerca de 0,27mm de distância da parede do tubo.

5.5.3-Polarização

Os mapas de polarização da RB após a adição de Ca(II) podem ser observados na figura 5.22. É clara a diferença na distribuição da polarização ao longo do fluxo. No caso da amostragem MC10 existe uma região de mínimos acentuada na parte final do plugue de amostra, o que revela uma maior concentração de moléculas orientadas na horizontal, em oposição ao sistema de injeção MC1, em que os mínimos se estendem como dois vales em praticamente todo o fluxo.



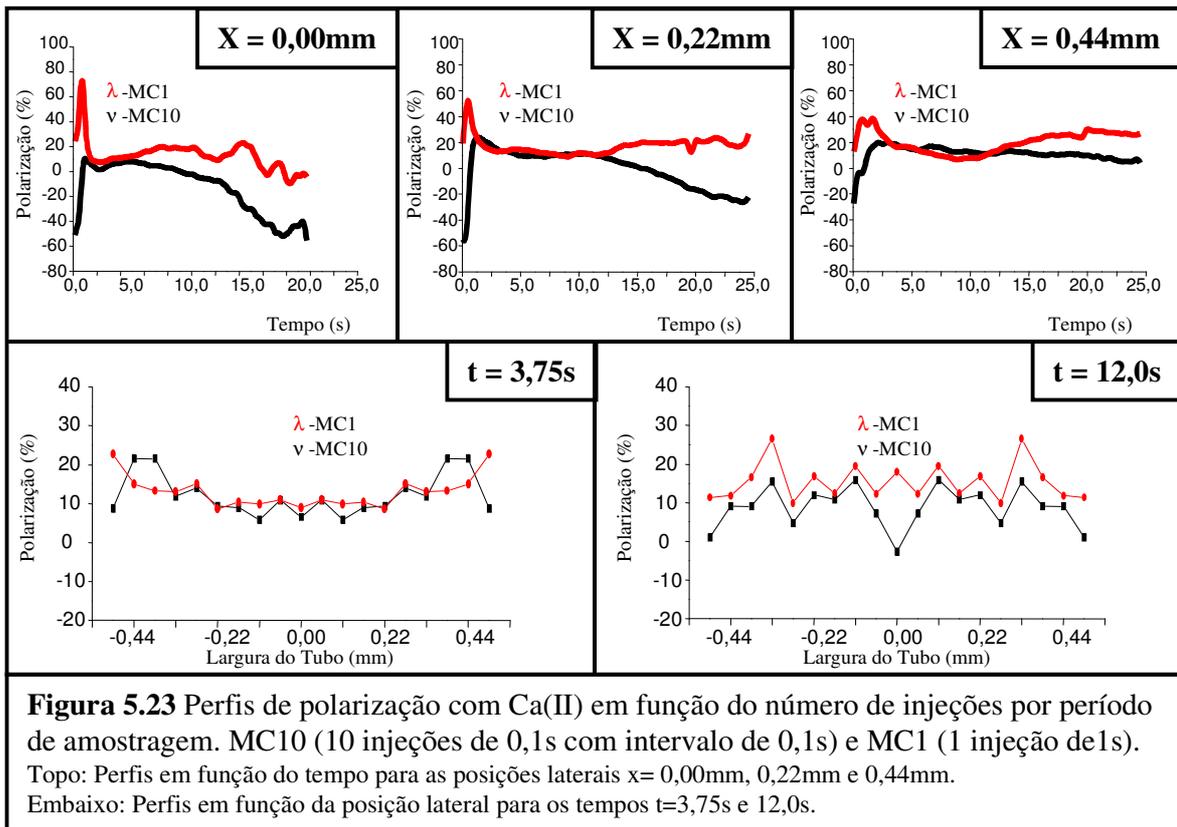
Uma conclusão que se pode tirar desta informação é que, pelo fato de em MC1 um único pulso de injeção ser responsável pela introdução da amostra no circuito, a interação entre amostra e reagente acontece mais intensamente na região no centro do fluxo, de forma que a mistura parece mais efetiva quando se observa apenas o perfil longitudinal.

No caso da amostragem MC10 a reação se processa com maior intensidade na parte final do plugue de amostra e mais próximo às paredes do tubo. Esta é provavelmente a região mais turbulenta e onde ocorre maior difusão rotacional em função do chaveamento alternado das válvulas solenóides durante a introdução da amostra. Em outras palavras, a introdução de pequenos plugues consecutivos

de amostra e reagente alteram de forma significativa não apenas o padrão de dispersão mas principalmente a dinâmica molecular envolvida neste processo, de forma que aumentando a difusão rotacional das moléculas aumenta a probabilidade de ocorrerem choques efetivos incrementando o rendimento da reação. Estudos posteriores podem inclusive definir parâmetros experimentais de controle de reações em linha que dependam fortemente do alinhamento intermolecular.

A presença de um padrão de fluxo anelar também pode ser observada após a adição de Ca(II) como mostra a figura 5.22. Em MC1 pode-se constatar um comportamento semelhante ao encontrado sem a adição de Ca(II) com as moléculas posicionadas nas laterais se deslocando com maior velocidade relativa até um instante determinado.

A amostragem MC10 apresenta dois padrões diferenciados, a depender da posição longitudinal do fluido. Na porção inicial da zona de amostra o padrão obedece a um perfil parabólico convencional. Na parte final do plugue de amostra mais uma vez podemos perceber uma menor velocidade relativa para as moléculas no centro do tubo, como observado para MC1 sem adição de Ca(II). Aparentemente ocorre entre MC1 e MC10 o mesmo fenômeno: a diferença está no tempo em que estas correntes laterais levam para confluir. Em MC10 elas se encontram num tempo menor que em MC1. Certamente que a confluência destas correntes de fluxo gera uma maior turbulência molecular. Como no sistema de injeção MC10 este processo ocorre de forma brusca, num tempo menor, este sistema MC1 permite uma mistura mais eficiente entre amostra e reagente justificando assim o seu maior rendimento nesta reação química.



A figura 5.23 compara os perfis longitudinais e transversais de polarização para os dois sistemas de amostragem utilizados. Pode-se observar que longitudinalmente as polarizações são similares no início do plugue de amostragem, com exceção da região mais próxima das paredes, quando o sistema MC10 apresenta uma polarização menor. Na parte final da zona de amostra, no entanto, a polarização para MC1 permanece aproximadamente constante enquanto que a polarização na Amostragem MC10 cai rapidamente, revelando que neste último caso a presença de moléculas orientadas na horizontal é maior, ao contrário de MC10.

Nos perfis transversais não existem grandes diferenças entre os sistemas de amostragem, a não ser o fato de que na porção final do plugue de amostra a polarização é 20% menor no centro para MC10 ao contrário do que acontece com MC1.

De forma geral pode-se concluir que a presença de Ca(II) gera maior concentração de moléculas horizontais no final da zona de amostra para MC10, enquanto em MC1 há uma maior abundância de moléculas verticais em todo o percurso.

5.5.4-Influência da área Interfacial no Rendimento da Reação

Comparando os perfis LIF longitudinais antes e após a adição de Ca(II) (figura 5.24), podemos constatar que o Ca(II) diminui gradativamente a concentração, à partir centro, e conseqüentemente ocorre o alargamento à meia altura das curvas. O comportamento é similar para ambos os sistemas de amostragem como já foi observado neste capítulo. Todavia, calculando a proporção em que cada perfil foi atenuado (Tabelas 5.5 A, B e C) observa-se que o sistema de amostragem MC10 apresenta maior fator de atenuação, em média 10% maior que em MC1, apesar destes não apresentarem diferença significativa após a adição do reagente (figura 5.24).

Tabela 5.5A: Rendimento da supressão da fluorescência total na presença de Ca(II) em função do número de injeções por período de amostragem.

x (mm)	Área s/ Ca(II)		Área c/ Ca(II)		Rendimento(%)		Δ LIF
	MC10 LIF	MC1 LIF	MC10 LIF	MC1 LIF	MC10 LIF	MC1 LIF	
0,44	373.305	299.104	168.397	167.534	55	44	11
0,22	346.127	268.761	222.933	211.1412	36	21	14
0,00	274.618	260.886	193.859	191.859	29	26	3

MC1=1 injeção por período de amostragem; MC10=10 injeções por período de amostragem.

Tabela 5.5B: Rendimento da supressão da fluorescência vertical na presença de Ca(II) em função do número de injeções por período de amostragem.

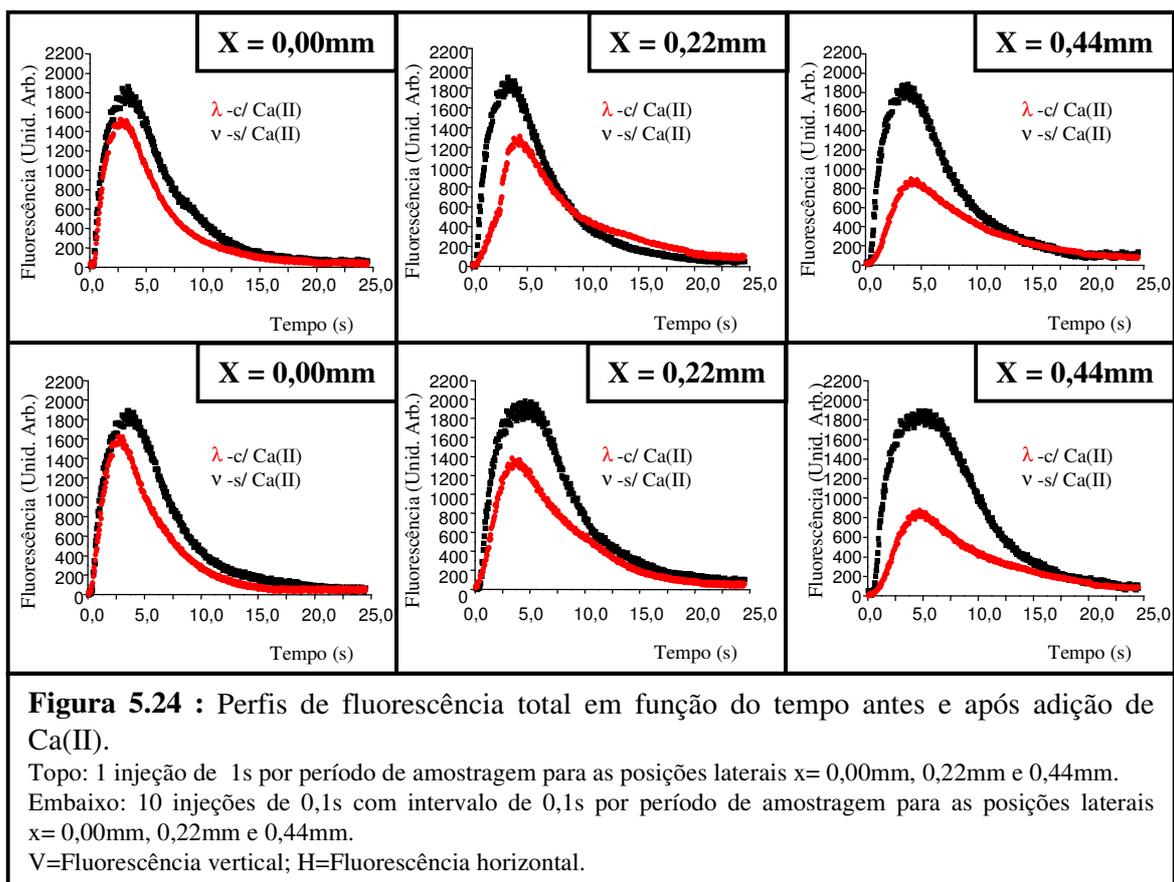
x (mm)	Área s/ Ca(II)		Área c/ Ca(II)		Rendimento(%)		Δ V
	MC10 V	MC1 V	MC10 V	MC1V	MC10 V	MC1 V	
0,44	192.938	166.435	98.874	97.293	49	42	7
0,22	183.280	146.011	127.238	111.153	31	24	7
0,00	140.883	143.299	104.828	107.484	26	25	1

MC1=1 injeção por período de amostragem; MC10=10 injeções por período de amostragem.

Tabela 5.5C: Rendimento da supressão da fluorescência horizontal na presença de Ca(II) em função do número de injeções por período de amostragem.

x (mm)	Área s/ Ca(II)		Área c/ Ca(II)		Rendimento(%)		Δ H
	MC10 H	MC1 H	MC10 H	MC1 H	MC10 H	MC1 H	
0,44	181.876	136.588	75.177	70.355	59	48	10
0,22	165.354	125.714	106.492	83.181	23	34	2
0,00	135.727	121.496	100.224	83.336	26	31	-5

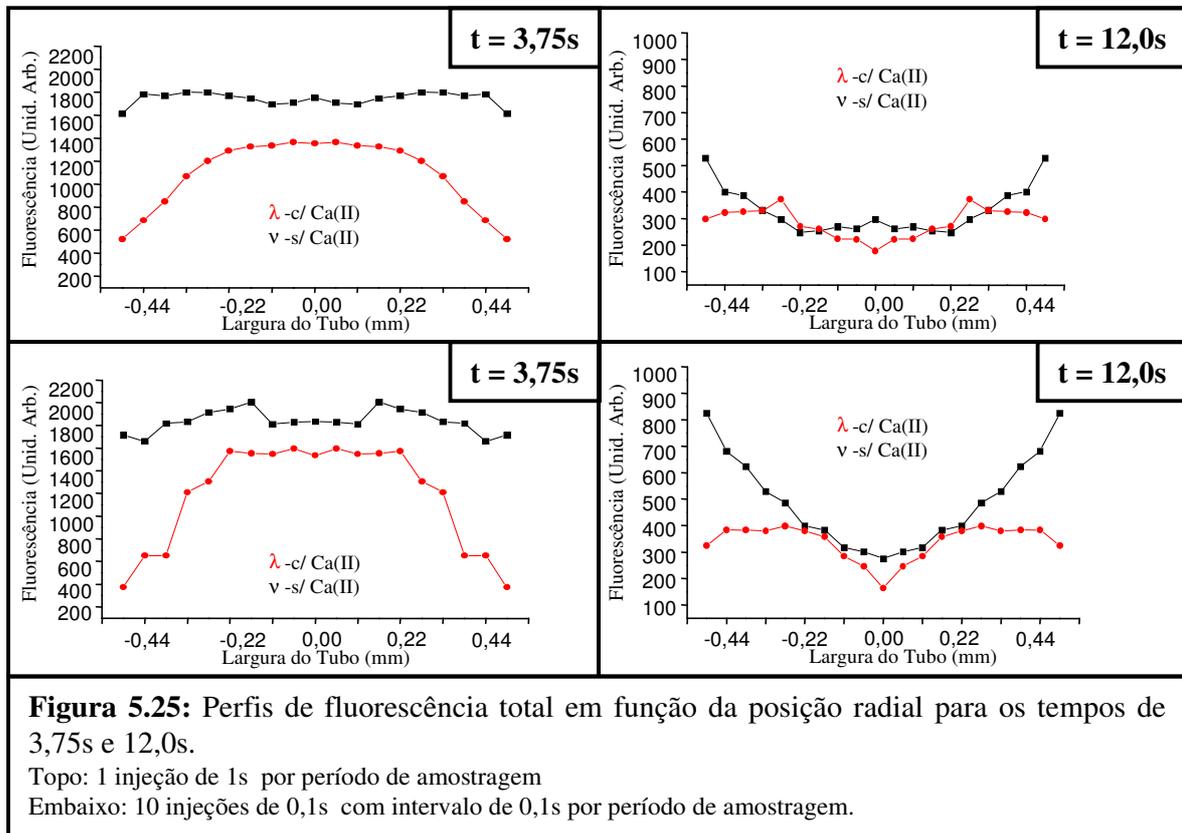
MC1=1 injeção por período de amostragem; MC10=10 injeções por período de amostragem.



Este resultado é esperado e confirma os resultados experimentais obtidos por metodologia semelhante descrita na literatura [Kronka 96]. Basicamente a maior interface de contato entre amostra e reagente associada com microturbulências geradas pelo chaveamento alternado das válvulas solenóides otimiza o processo de mistura, facilitando a interação entre as espécies reactantes.

Ainda observando estes perfis longitudinais, podemos ver que a presença do Ca(II) diminui o máximo de sinal mais intensamente nas bordas. No centro do fluxo a atenuação do máximo é menor, sendo mais perceptível a diminuição na largura do sinal. Isto pode estar relacionado com o fato de que no centro do tubo o fluido apresenta uma maior velocidade relativa em relação às moléculas nas extremidades do tubo, de forma que o tempo de interação entre amostra e reagente não é suficiente para que estes possam interagir na parte central da zona da amostra. Assim a “cauda” do pluge, mais susceptível ao processo de dispersão, é “atacada” pelo Ca(II), provocando a extinção mais intensa da fluorescência nesta região.

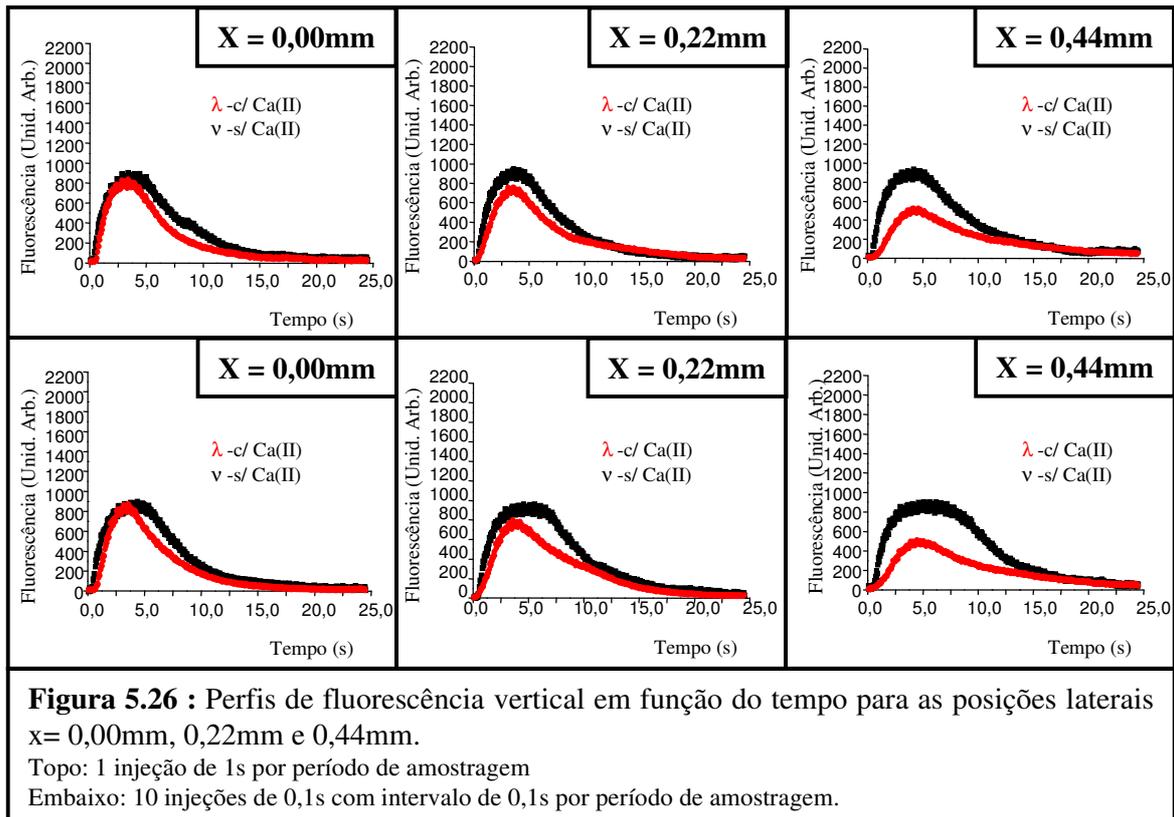
O comportamento observado longitudinalmente é similar aos perfis transversais (figura 5.25). Nestes se pode perceber a diminuição acentuada da concentração da amostra nas bordas enquanto que no centro do fluxo a atenuação do sinal é muito menor, tanto no início quanto no final da zona de amostra. A maior eficiência de MC10 também pode ser observada nestas figuras.



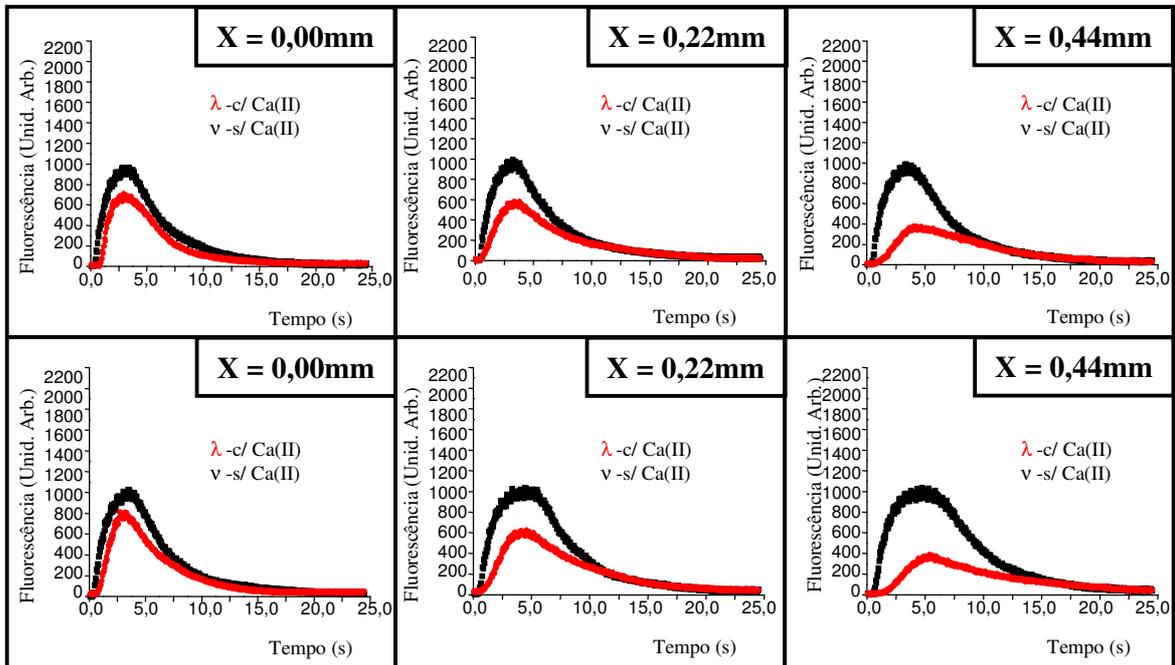
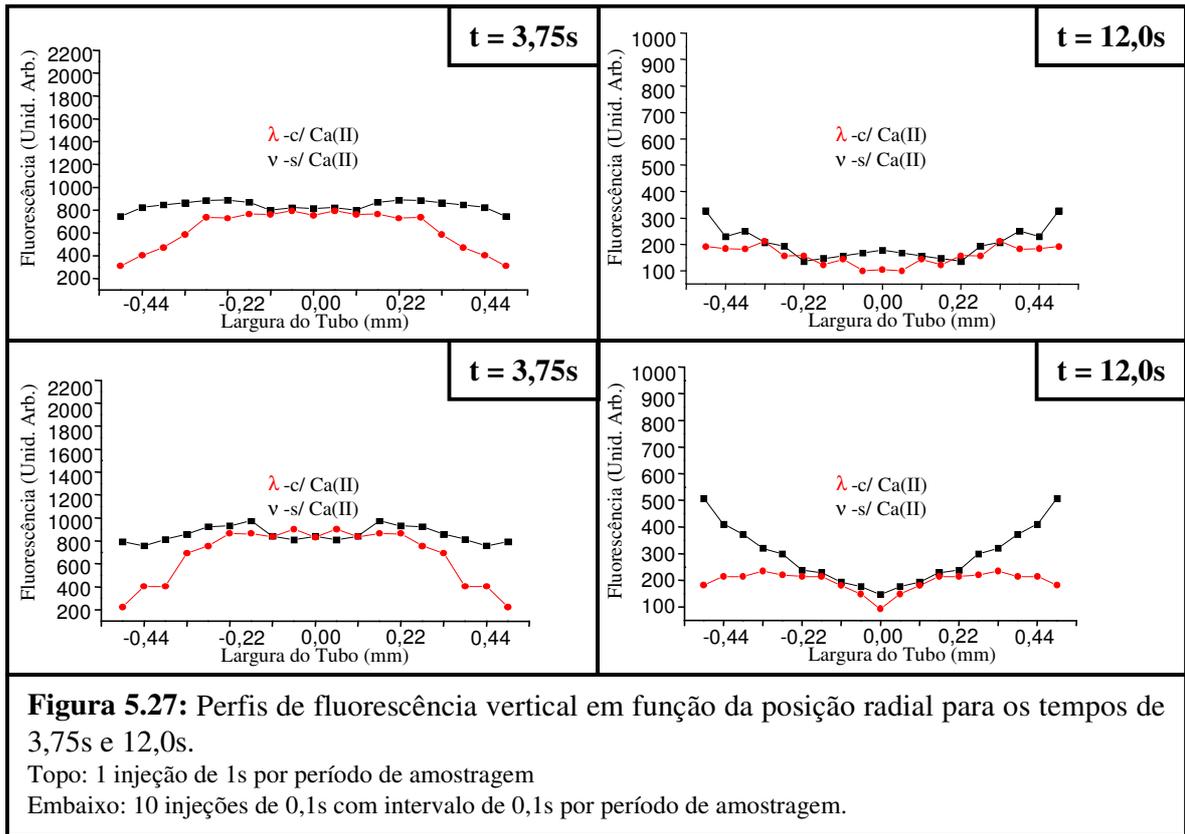
Comparando os mapas de fluorescência vertical (figuras 5.8 e 5.18), o comportamento é similar ao observado nos mapas de fluorescência total. No entanto, nos mapas de fluorescência horizontal (figuras 5.10 e 5.20), observa-se que depois da adição de Ca(II) claramente ocorre uma modificação na área de maior concentração. Ao invés de faixas que se estendem de um extremo ao outro do tubo, o máximo se concentra agora na parte central do fluxo. Isto também é atribuído à influência do tempo de interação próximo às extremidades do tubo no rendimento da reação.

Comparando os perfis longitudinais verticais (figura 5.26), podemos mais uma vez observar o mesmo comportamento dos perfis LIF. Como os perfis de fluorescência total são a soma das características pertencentes a cada uma das orientações moleculares da RB é razoável observar que a

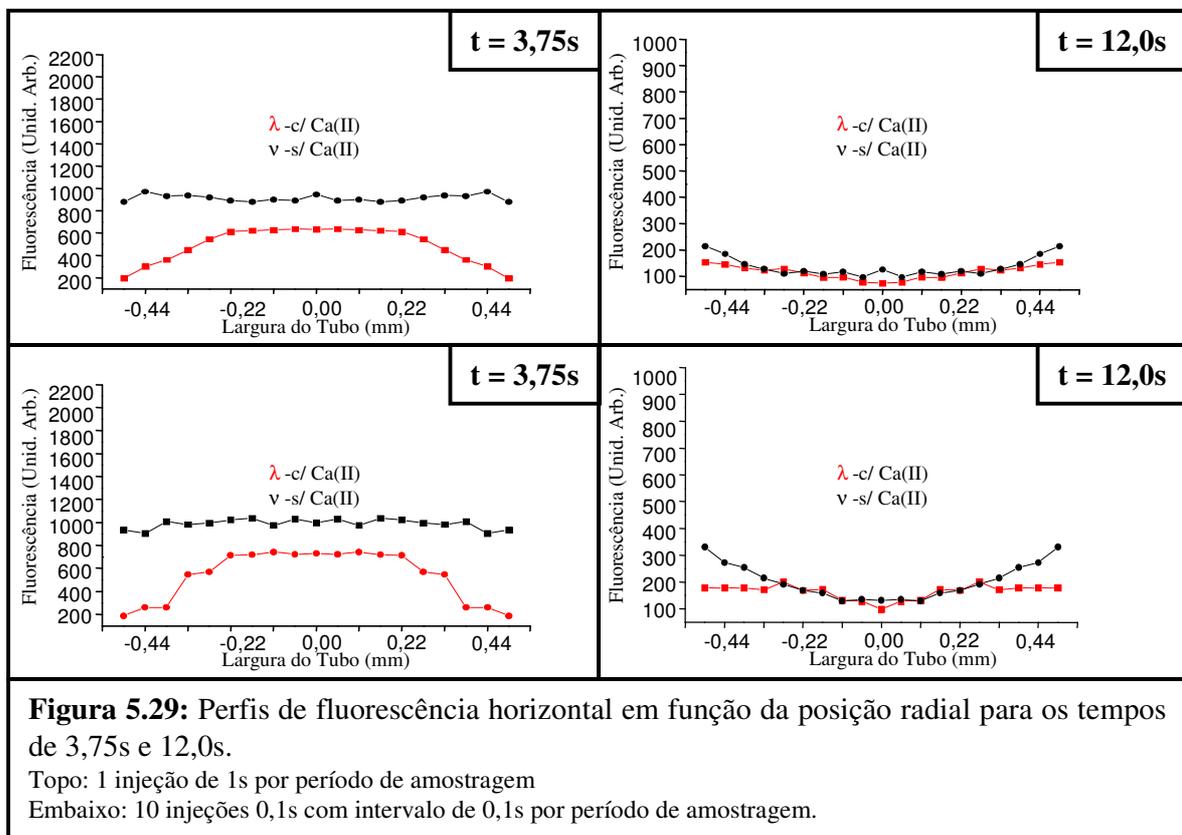
fluorescência vertical deva contribuir mais intensamente nas características dos mapas LIF. Isto pode ser atribuído à maior concentração das moléculas orientadas verticalmente no sistema, pelo princípio da fotoseleção. Virtualmente não existe diferença entre os sistemas de amostragem, a não ser pelo rendimento da reação. Também neste caso MC10 é mais eficiente como pode ser observado na tabela 5.5.



Nos perfis transversais mostrados na figura 5.27, também não se percebe diferença entre os métodos de injeção empregados, fora o fato de que para MC10 a interação com o Ca(II) se prolonga até uma distância maior das paredes, cerca 0,15 mm em relação ao meio do tubo, como consequência da maior eficiência de mistura. Para MC1 este alcance é reduzido, percebendo-se um maior rendimento da reação até uma distância de 0,30mm em relação ao centro do fluxo.



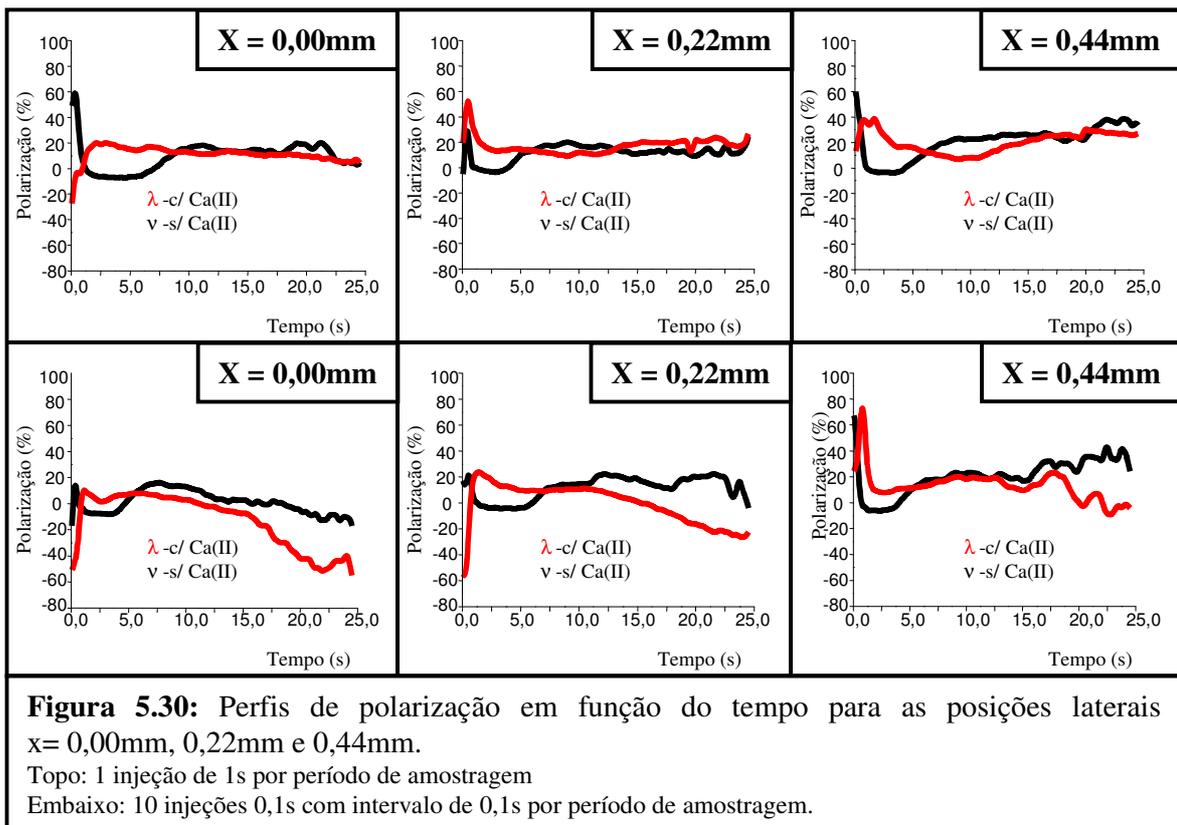
Nos perfis horizontais longitudinais (figura 5.28) pode-se observar o mesmo comportamento dos perfis longitudinais verticais na figura 5.26. Já os perfis transversais (figura 5.29) apresentam pequenas diferenças quando se compara os dois sistemas de amostragem. No início do plugue ($t=3,75s$) a diminuição da concentração ocorre mais bruscamente para MC10, enquanto uma queda gradual caracteriza o comportamento do sistema MC1. No final da zona de amostra ($t=12,00s$) a diferença entre as concentrações nas bordas, antes e após adição de Ca(II), é pequena para MC1 quando comparado com MC10. Mais uma vez podemos constatar a maior eficiência deste último sistema de comutação em promover a mistura entre amostra e reagente.



5.5.5-Polarização

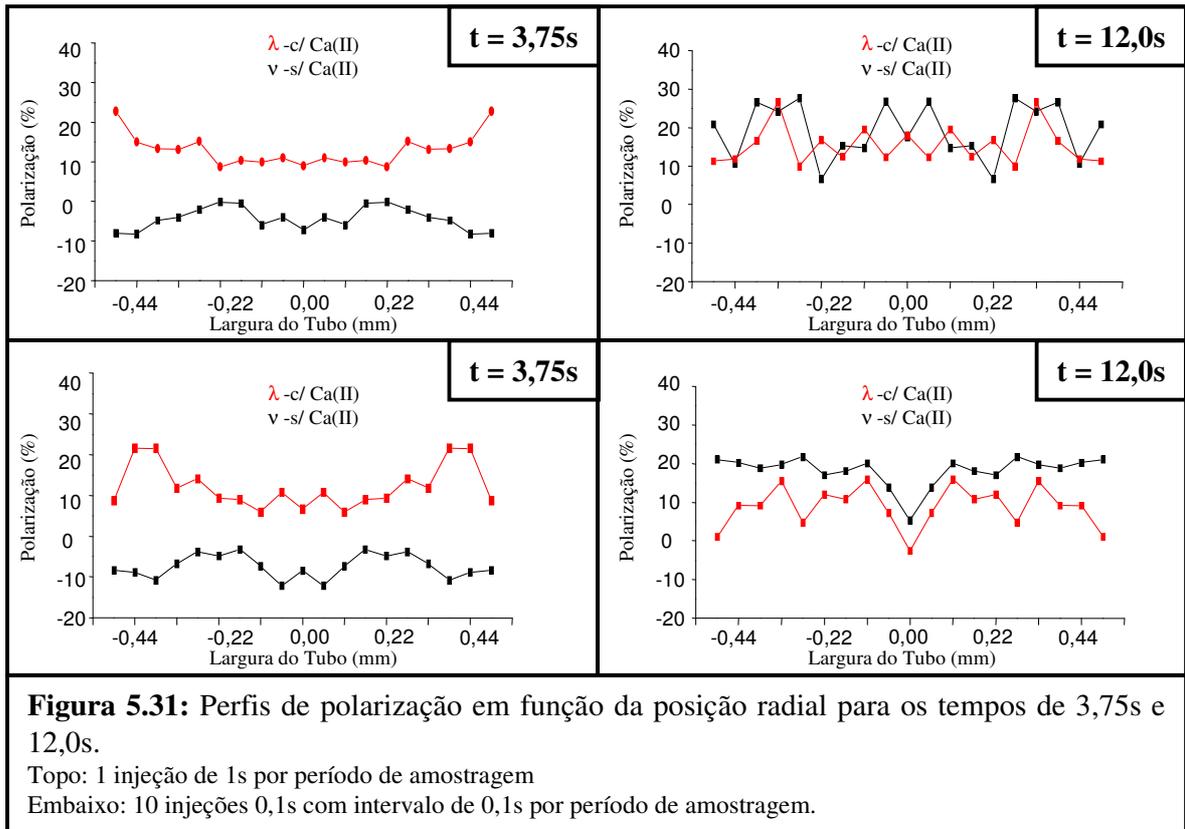
Os mapas de polarização (figuras 5.13 e 5.22), de forma geral, mostram que a adição de Ca(II) aumenta a polarização no início do plugue e diminui no final. Isto indica que na primeira parte da zona de amostra há um consumo maior de moléculas na horizontal, enquanto na extremidade final mais

moléculas orientadas na vertical são consumidas. Comparando os perfis longitudinais (figura 5.30) pode-se melhor observar este padrão em MC10, em MC1 a diminuição da polarização na parte final do plugue é mais intensa próximo às paredes na região entre o centro do fluxo e a borda. Provavelmente isto é consequência da dinâmica molecular imposta pelo sistema MC10, isto é, o maior número de pulsos de injeção deve alterar de forma mais significativa a difusão rotacional das moléculas de RB como proposto anteriormente neste capítulo.



Nas regiões mais internas do tubo o que se observa é uma diminuição da polarização, mais intensa no sistema MC10, com o aumento do tempo, demonstrando a diminuição de moléculas orientadas verticalmente no final do plugue de amostra para este sistema de amostragem, como foi observado nos mapas de polarização.

Nos perfis transversais, figura 5.31, observamos que para ambos os sistemas de amostragem, a polarização média aumenta no início e cai no final do plugue, evidenciando mais uma vez o consumo diferenciado de moléculas orientadas na vertical e horizontal.



6-CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um sistema experimental para o estudo de dispersão em sistemas FI proposto neste trabalho. Ele mostrou ser capaz de efetuar tanto medidas de fluorescência total quanto de fluorescência polarizada. Por ser controlado remotamente via PC apresenta boa reprodutividade (erro de aproximadamente 2% para 10 curvas consecutivas). Por ser um sistema modular além de ser versátil é fácil de operar. Sua implementação pode ser considerada de baixo custo, cerca de R\$ 2.000,00 não contabilizando a bomba peristáltica, o sistema laser e o micro computador.

Pode ser usado tanto para medidas de fluorescência total (LIF), quanto para medidas de fluorescência polarizada (PLF), permitindo a aquisição de mapas de distribuição de concentração em função do tempo e de polarização com alta resolução espacial (400 pontos/mm²).

Os dados experimentais bidimensionais confirmam de modo geral o previsto teoricamente por Wentzel e col. [Wentzel 93] e Vanderslice e col. [Vanderslice 86].

O sistema se mostrou sensível a alterações no ambiente químico evidenciadas pela substituição da sonda fluorescente e pela adição de um reagente.

Os perfis de dispersão obtidos para a RB e a R6G evidenciaram que moléculas assimétricas com grupos funcionais quimicamente ativos podem apresentar diferentes difusividades químicas a depender da orientação espacial com que se deslocam no fluido. Isto causa diferentes reatividades afetando o rendimento final da reação.

Os mapas LIF mostraram que a gravidade exerce importante papel no processo de dispersão da amostra, sendo a densidade dos constituintes do fluido uma variável a ser considerada, além da viscosidade.

Os mapas LIF também confirmam a influência do gradiente de velocidades, presentes em sistemas FI, no processo de dispersão da amostra no fluido carregador. Os resultados evidenciam que a

dispersão é uma função da velocidade de escoamento, uma vez que quanto menor a velocidade relativa entre as moléculas do fluido maior o tempo de interação entre estas espécies.

A amostragem MC10 se mostrou o método de comutação mais eficiente no processo de dispersão em relação a MC1, justificando conseqüentemente o aumento da sensibilidade de sistemas FI referidos na literatura.

Na reação do Ca(II) com a molécula de RB foi observada uma redução na concentração da espécie fluorescente do corante especialmente junto às bordas do tubo. Isto evidencia a relação entre o rendimento da reação química e o tempo de interação, definido pela velocidade relativa entre as moléculas do fluido, isto é, a dispersão da amostra.

Os mapas PLF-FI também mostram que a metodologia empregada na injeção da amostra gera padrões de dispersão molecular distintos para diferentes orientações da mesma molécula e que esta dinâmica molecular de dispersão está relacionada com a eficiência do sistema de amostragem na ‘macro dispersão’ observada nos mapas LIF e confirmada pela literatura.

Os mapas PLF-FI, ao representarem o gradiente de velocidade, revelam a existência de uma espécie de fluxo anelar, com a zona central da amostra se deslocando com menor velocidade que a intermediária até um instante determinado (para MC10 15s, para MC1 10s) quando volta a apresentar apenas uma corrente com distribuição parabólica de velocidade. Em conseqüência, pode-se concluir que a difusão rotacional gerada pelo aumento da tensão de cisalhamento entre as correntes de fluxo contribui de forma significativa para o processo de dispersão, e não apenas a laminaridade do regime de fluxo como propõe a literatura.

Os mapas obtidos em função da orientação espacial das moléculas do corante revelam padrões de dispersão diferentes para as moléculas orientadas verticalmente e horizontalmente. Foi observado que em função da presença de uma carboxila no anel benzênico perpendicular ao grupo xantênico, quando a molécula se desloca verticalmente este grupamento interage mais intensamente com as paredes do

tubo e também com as moléculas do solvente diminuindo a difusividade química da molécula orientada desta forma.

Quando se comparam os dois sistemas de amostragem nos mapas LIF após a adição do reagente não se pode constatar qualquer diferença significativa entre eles. Todavia, comparados com seus correspondentes originais (sem adição de Ca(II)) pode-se comprovar a maior eficiência da amostragem MC10 como método de comutação.

Podemos perceber também a substituição de dois máximos laterais nos mapas adquiridos sem a injeção de Ca(II) por um único máximo central após a adição do reagente. Isto foi relacionado com alterações no perfil de distribuição de velocidades. Os mapas referentes às orientações vertical e horizontal apresentam um comportamento similar ao observado nos mapas LIF.

O sistema proposto possibilita o estudo da influência do alinhamento intermolecular no processo de dispersão e conseqüentemente no rendimento de determinada reação química em linha, de forma que reações de cinética fortemente dependente da secção de choque das espécies reactantes possam ser melhor compreendidos. Possibilita o desenvolvimento de reatores que manipulem não apenas o tempo de interação entre as espécies e otimizem o grau de mistura, mas que sejam capazes de orientar espacialmente as moléculas envolvidas na reação.

É evidente que os estudos sobre dispersão em sistemas FI não são recentes, muito menos estão esgotadas as possibilidades de pesquisa nesta direção. O que se observa, no entanto, é que até hoje o que se propôs foi tão somente considerar aspectos teóricos, normalmente baseados na mecânica de fluidos, associados a alguns parâmetros medidos experimentalmente com o intuito de entender a dispersão da amostra de um ponto de vista físico e macroscópico. O sistema experimental proposto e os resultados descritos neste trabalho abrem a possibilidade de não apenas estudar o fenômeno da dispersão sob o ponto de vista teórico e macroscópico, mas de entender a dinâmica deste evento em escala molecular, incluindo os aspectos químicos envolvidos, assim, ampliando o universo das coisas a serem estudadas neste ramo da química analítica.

A presença de Ca(II) gera maior concentração de moléculas horizontais no final da zona de amostra para o sistema MC10, enquanto para MC1 há uma maior abundância de moléculas verticais em todo o percurso.

PROPOSTAS PARA O FUTURO

1. Foram observados indícios de que tempos irregulares de chaveamento das válvulas solenóides podem gerar diferentes padrões de dispersão e polarização. Tais dados não foram aqui discutidos por não terem sido investigados sistematicamente. Será interessante não só variar a frequência e a duração do pulso, mas também utilizar outros dispositivos de injeção, como injetores proporcionais ou seringas.

2. Foi observado que a interação do Ca(II) com a RB apresenta uma forte dependência da orientação molecular, no entanto os resultados preliminares não foram conclusivos de sorte que pretendemos numa próxima etapa determinar com maior precisão o mecanismo desta possível reação, bem como propor um estrutura para o produto;

3. Tendo sido comprovada a eficiência do sistema experimental para o estudo da dispersão em sistemas FI seria interessante aplica-lo no estudo de outros processos dependentes deste fenômeno, como:

3.1 Pré-concentração em fase sólida e extração líquido-líquido;

3.2 Investigação de outros parâmetros de fluxo, como sistema de propulsão a pressão constante (gravidade), diferentes geometrias e comprimentos para o percurso analítico, e reatores de diferentes constituições químicas;

3.3 Definição de parâmetros experimentais de controle de reações em linha fortemente dependentes do alinhamento intermolecular;

3.4 Determinação experimental da dispersão simulada teoricamente para sistemas FI com o objetivo de aprimorar ou validar cálculos teóricos.

Referências Bibliográficas

- [Amador-Hernández 01] – Amador-Hernández, J.; Fernández-Romero, J.M.; Luque de Castro, M.D.; *Anal Chim. Acta*, **2001**, 448(1-3), 61.
- [Arbeloa 82] – Arbeloa, I.L.; Ojeda, P. R.; *Chem. Phys. Lett.* **1982**, 87, 556.
- [Baraka 91] – Baraka, M.E.; Deumié, M.; Viallet, P.; *J. Photochem. Photobiol., Part A* **1999**, 62, 195.
- [Bergamin 78] – Bergamin F°, H.; Medeiros, J.X.; Reis, B.F.; Zagatto, E.A.G.; *Anal. Chim. Acta* **1978**, 101, 9.
- [Bur 00] – Bur, A.; Roth, S.C.; Thomas, C.L.; *Rev. Sci. Instrum.* **2000**, 71, 1516.
- [Calixto 01] – Calixto, R.C.; Grinberg, P.; *Spectrochim. Acta, Part B* **2001**, 56(10), 1831.
- [Dasgupta 85] – Dasgupta, P.K.; Hwang, H.; *Anal. Chem.* **1985**, 57, 1009.
- [Ensafi 98] – Ensafi, A.A.; Rezai, B.; *Talanta* **1998**, 47(3), 645.
- [Ferreira 99] – Ferreira, S.L.C.; Brito, C.F.; Dantas, A.F.; Neyla, L.A.M.; Costa, A.C.S.; *Talanta* **1999**, 48(5), 1173.
- [Gao 02] – Gao, H.W.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, 13, 78.
- [Giné 83] – Giné, M.F.; Reis, B.F.; Zagatto, E.A.G.; Krug, F.J.; Jacintho, A.O.; *Anal. Chim. Acta* **1983**, 123, 221.
- [Gonçalves 00] – Gonçalves, C.C.; *Desenvolvimento da Técnica PLF e sua Aplicação para Estudos do Alinhamento Intermolecular de Sistemas Líquidos Dinâmicos*; Dissertação de Mestrado, Salvador, **2000**.
- [Hansen 88] – Hansen, E.H.; *Frezenius Z. Anal. Chem.* **1988**, 329, 656.
- [Johnson 93] – Johnson, L.D.; *Handbook of Fluorescence Probes and Research Chemicals* **1993**, 6ª Ed., 52, 2323.
- [Kawski 90] – Kawski, A.; Kojro, Z.; Bojarski, P.; *Z Naturforsch., A* **1990**, 45(11-12), 1357.
- [Kawski 94] – Kawski, A.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z.; *Z Naturforsch A* **1994**, 49(11), 1091.

- [Kenyon 91] Kenyon, A.J.; McCaffery, A.J.; Quintella, C.M.; Winkel, J.F.; *Mol. Phys.* **1991**, 74, 871.
- [Kolev 86] – Kolev, S.D.; Pungor, E.; *Anal. Chim. Acta* **1986**, 185, 315.
- [Kolev 95] – Kolev, S.D.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, 308, 36.
- [Korenaga 92] – Korenaga, T.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, 261, 539.
- [Kronka 96] – Kronka, E.A.M.; Reis, B.F.; Korn, M.; Bergamin F^o, H.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, 334, 287.
- [Lakovicz 83] – Lakovicz, J.R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, NY, 1983, p.111.
- [Legnevorá 02] – Legnevorá, Z.; Solich, P.; Sklenávorá, H.; Satínský, D.; Karlíček, R.; *Water Res.* **2002**, 36(11), 2777.
- [Li 95] – Li, J.; Liu, G.; Ma, H.; Korenaga, T.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, 310; 329.
- [Lima 98] – Lima, J.L.F.C.; Lopes, T.I.M.S.; Rangel, A.O.S.S.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, 366(1-3), 187.
- [Luque de castro 97] – Luque de Castro, M.D.; Silva, M.P.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **1997**, 16(1), 16.
- [Murugaiah, 92] – Murugaiah, V.; Synovec, R.E.; *Anal. Chem.* **1992**, 64, 2130.
- [Nord 84] – Nord, L.; Karlberg, B.; *Anal. Chim. Acta* **1984**, 164, 233.
- [Paim 98] – Paim, A.P.S.; Kronka, E.A.M.; Reis, B.F.; *Quím. Nova* **1998**, 21, 47.
- [Pasco 99] – Pasco, N.; Jeffries, C.; Davies, Q.; Downard, A.J.; Roddick-Lanzilotta, A.D.; Gorton, L.; *Biosens. Biotechnol.* **1999**, 14, 171.
- [Pasquini 02] – Pasquini, C.; Aquino, E. V.; Rohwedder, J. J. R.; Facchin, I.; *Talanta* **2002**; 56(4), 643.
- [Quintella 01] – Quintella, C.M.; Gonçalves, C.C.; Pepe, I.; Lima, Â.M.V.; Musse, A.P.S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, 12, 780.
- [Quintella 02a] – Quintella, C.M.; McCaffery, A.J.; Musse, A.P.S.; Submitted.

- [Quintella 02b] - Quintella, C.M.;Gonçalves, C.C.; Pepe, I.; Lima, Â.M.V.; Musse, A.P.S.; *J. Autom. Methods Manage. Chem* **2002**, 24, 31.
- [Quintella 02c] – Quintella, C.M.; Lima, A.M.V.; Gonçalves, C.C.; Pizzo, A.M.; Schreiner, M.A.; Mammana, A.; Pepe, I.M.; Watanabe, Y.N.; *Submitted*.
- [Ramette 56] – Ramette, R. E.; Sandell, E. B.; *J. Amer. Chem. Soc.* **1956**, 78, 4872.
- [Ranger 90] – Ranger, C.B.; Stone, M.E.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1990**, 8, 289.
- [Reijn 80] – Reijn, J. M.; van der Linden, W. E.; Poppe, H.; *Anal. Chim. Acta* **1980**, 114, 105.
- [Reis 81] Reis, B.F.; Jacintho, A.O.; Mortatti, J.; Krug, F.J.; Zagatto, E.A.G.; Bergamin Fº, H.; Pessenda, L.C.R. *Anal. Chim. Acta* **1981**, 123, 221.
- [Reis 96] – Reis, B.F.; *Quím. Nova* **1996**, 19, 51.
- [Riley 86] – Riley, C.; Rocks, B.F.; Sherwood, R.A.; *Anal. Chim. Acta* **1986**, 179, 69.
- [Ruzicka 75] - Ruzicka, J.; Stewart, J.W.B.; *Anal. Chim. Acta* **1975**, 79, 79.
- [Ruzicka 77] – Ruzicka, J.; Hansen, E.H.; Zagatto, E.A.G.; *Anal. Chim. Acta* **1977**, 88, 1.
- [Ruzicka 78] – Ruzicka, J.; Hansen, E.H.; *Anal Chim. Acta* **1978**, 99, 37.
- [Ruzicka 83] Ruzicka, J.; Hansen, E.H.; *Anal. Chim. Acta* **1983**, 145, 1.
- [Scully 91] – Scully, A.D.; Matsumoto, A.; Hirayma, S.; *Chem.Phys.* **1991**, 157, 253.
- [Sosniza 98] - Sosniza, P.; Irtel, F.; Ulber, R.; Busse, M.; Faurie, R.; Fischer, L.; Scheper, T.; *Biossens. Bioelectron.* **1998**, 13(12), 1251.
- [Stewart 81] – Stewart, K.K.; *Talanta* **1981**, 28, 789.
- [Stults 87] – Stults, C.L.; Wade, A.P.; Crouch, S.R.; *Anal. Chem.* **1987**, 59(18), 2245.
- [Valcarcel 87] – Valcarcel, M.; Luque de Castro, M.D.; *J. Chromatogr., A* **1987**, 393(1), 3.
- [van Akker 98] – van Akker, E.B.; Bos, M.; van der Linden, W.E.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, 373, 221.
- [van der Linden 82] – van der Linden, W.E.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **1982**, 1 (8), 188.
- [Vanderslice 81] – Vanderslice, J.T.; Stewart, K.K.; Rosenfeld, A.G.; *Talanta* **1981**, 28, 11.

[Vanderslice 86] – Vanderslice, J.T.; Rosenfeld, A.; Gregory, B.; Gary, R.; *Anal. Chim. Acta* **1986**, 179, 119.

[Wentzell, 93] – Peter, D.; Bowdridge, M.R.; Taylor, E.L.; Macdonald, C.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, 278, 293.

[Zagatto 99] – Zagatto, E.A.G.; Oliveira, C.C.; *Quím. Nova* **1999**, 22, 143.

[Zou 97] – Zou, G.; Liu, Z.; Wang, C.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, 350, 359.