

**DESENVOLVIMENTO DE SOFTWARE PARA EFETUAR AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DE DADOS EM ANÁLISE DE ROTINA EMPREGANDO SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO****Mauro Korn**

CETEBÁ - Universidade Estadual da Bahia

**Ana Paula S. Paim, Valdemir A. F. Barros e Boaventura F. Reis\***

Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo - Av. Centenário, 303 - CP 96 - 13 400-970 - Piracicaba - SP

Recebido em 17/7/95; aceito em 30/1/96

**DEVELOPMENT OF SOFTWARE TO PERFORM DATA ACQUISITION AND PROCESSING IN ROUTINE ANALYSIS EMPLOYING FLOW INJECTION SYSTEM.** In this work, a software to perform data acquisition and processing in routine analysis, employing flow injection technique was developed. It was written in Quick BASIC 4.5 and can be run with a 386/486 microcomputer. Employing an analog to digital interface, the microcomputer can follow the signal generated by the spectrophotometer, verify the reproducibility of the replicates and refuse data when its variation was higher than the value previously established. Once the data had been calculated, the analytical report was printed. The feasibility was ascertained by determining chloride in waters by spectrophotometry. By applying paired *t*-test with the obtained data employing the usual flow procedure, no significant difference at level of 95% probability was observed. Other profitable features such as a throughput of 160 determinations per hour and a reagent consumption of 100  $\mu$ l per determination were also achieved.

**Keywords:** flow analysis; automatization; chloride determination.

**INTRODUÇÃO**

O processo de análise química por injeção em fluxo (FIA) foi proposto em 1975<sup>1</sup> e embora tendo completado 20 anos, as opções de automatização para análise de rotina, envolvendo o controle da amostragem e da injeção, a aquisição de dados e o processamento dos resultados, ainda são escassos e pouco acessíveis à maioria dos analistas. Esta técnica é empregada atualmente nos mais diversos ramos da química analítica<sup>2</sup>. Apesar de sua potencialidade como uma poderosa ferramenta para análise de rotina em larga escala, devido ao baixo custo operacional e alta produtividade<sup>3</sup>, a etapa de tratamento dos dados analíticos, ainda é demasiadamente morosa. Em outras palavras, o operador só obtém os resultados, após o processamento do lote de amostras e a medição dos respectivos registros, o que retarda a produção dos relatórios de análise.

Em geral, nas análises químicas com sistema FIA, o processamento químico da amostra e o registro do sinal gerado pelo detector, ocorre em menos de 1 minuto. Porém a concentração do analito é calculada, após a medição manual das alturas máximas dos registros obtidos.

Tendo como objetivo melhorar o desempenho na etapa de tratamento dos dados analíticos, foi desenvolvido um programa que possibilita efetuar a aquisição de dados, processar os resultados, armazená-los e emitir o relatório de análise. O programa foi escrito em linguagem Quick BASIC 4.5, e roda em microcomputadores 386/486, equipados com uma interface de controle<sup>4</sup>. O interfaceamento permite efetuar a introdução da amostra no percurso analítico, empregando um injetor automático e acompanhar o sinal transiente gerado pelo espectrofotômetro por de um conversor analógico/digital.

**DESCRIÇÃO DO PROCESSO DE ANÁLISE QUÍMICA POR INJEÇÃO EM FLUXO**

Tendo como objetivo facilitar a compreensão da estratégia adotada para o desenvolvimento do programa, será feita uma descrição do processo de análise química por injeção em fluxo (FIA).

Na figura 1 é mostrado o diagrama de fluxo de um módulo de análise, para efetuar a determinação de uma espécie química de interesse por espectrofotometria de absorção molecular. O injetor está na posição de amostragem, assim a alíquota da amostra a ser injetada, está sendo coletada pela alça de amostragem (L). Deslocando-se a parte móvel do injetor para a posição de injeção, a solução carregadora (Ca), transporta a alíquota da amostra para o detector através da bobina de reação (Br) e no ponto de confluência (X), o reagente cromogênico é adicionado à amostra. Enquanto a mistura é transportada para o detector, a reação química ocorre no interior da bobina de reação (Br). As dimensões do módulo de análise compreendendo o comprimento do percurso analítico e as vazões das soluções do reagente e do carregador, são definidas em função da natureza físico-química destas soluções e da reação química que deve ocorrer.

Durante o transporte da amostra através do percurso analítico, ocorre dispersão da mesma no carregador, em consequência é gerado um gradiente de concentração do analito. A detecção é efetuada com a amostra em movimento em relação ao detector. Devido a dispersão da amostra, o sinal gerado pelo detector, é um transiente em função do tempo e não apresenta um estado estacionário para leitura. Em vista disto, em sistemas FIA usuais emprega-se registrador potenciométrico acoplado à saída analógica dos instrumentos de medidas, para registrar o sinal gerado pelo detector em função do tempo e um destes registros é mostrado na figura 2. A área sob a curva ou altura máxima pode ser tomada como parâmetro de medida, para calcular a concentração do analito. A determinação da área, com boa precisão, é conseguida, empregando-se um integrador eletrônico. É um dispositivo a mais para ser adquirido, onerando o

\*Obs.: Cópia do programa será fornecida mediante o envio de um disquete de 3 1/2.

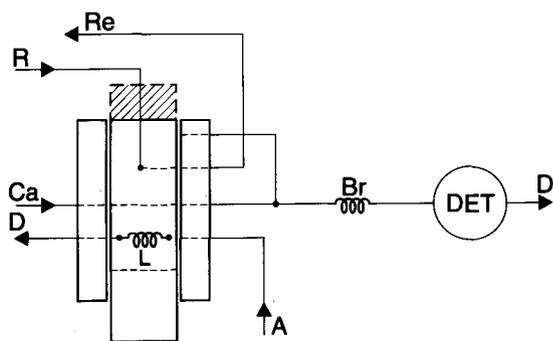


Figura 1. Diagrama de fluxo do módulo de análise. As 3 barras retangulares representam o injetor visto de cima. Ca = carregador da amostra, solução de ácido nítrico 0,014 mol/L, vazão de 3,9 ml/min; A = amostra, vazão de 2,0 ml/min; R = reagente, vazão 2,0 ml/min; Re = recuperação do reagente; L = alça de amostragem, 25 cm; Br = bobina de reação, 100 cm; DET = espectrofotômetro a 480 nm, D = descarte de soluções. A bobina de reação e alça de amostragem foram de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm. A superfície achurada indica a posição ocupada pela parte móvel do injetor na etapa de injeção. O deslocamento da parte móvel do injetor da posição de amostragem para a de injeção, vice-versa, é feita por um par de solenóides (potência = 10W), cujo acoplamento foi omitido para simplificar o diagrama.

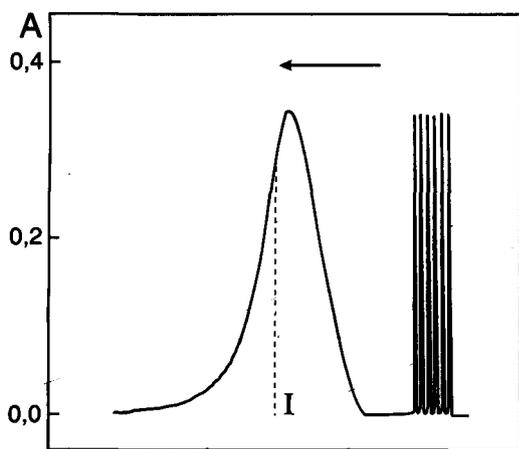


Figura 2. Registros típicos de um sistema FIA. A = absorbância. Foi usado uma solução padrão contendo 10 mg/l Cl. O registro da esquerda foi traçado aumentando-se a velocidade do papel do registrador potenciométrico. I = instante em que a injeção seguinte pode ser efetuada.

sistema de análise. O procedimento mais elementar e menos dispendioso para medir as alturas máximas dos registros obtidos com um registrador potenciométrico, é utilizando uma régua milimetrada.

A experiência tem demonstrado que a precisão das medidas depende da estabilidade geral do módulo de análise, incluindo as reações químicas envolvidas. Esta afirmação é corroborada pela literatura, onde são encontradas muitas propostas de métodos analíticos com erro relativo menor que 1%, embora as medidas das alturas dos registros tenham sido feitas, empregando um instrumento de medida tão singelo como uma régua<sup>4</sup>.

### Descrição do Software

Levando-se em conta a facilidade para localização do máximo do sinal analítico, adotou-se a média de maior valor como parâmetro para estabelecimento do máximo. Inicialmente, são efetuadas 4 leituras sequenciais ( $X_1, X_2, X_3$  e  $X_4$ ), em intervalos de tempo de 0,05 s. Sendo o somatório  $(X_1 + X_2 + X_3) < (X_2 + X_3 +$

$X_4)$ , outra leitura é efetuada. A comparação é repetida, considerando as somas  $(X_2 + X_3 + X_4)$  e  $(X_3 + X_4 + X_5)$ . Este procedimento deve ser repetido, até serem encontradas três somas sucessivas com valores decrescentes, isto é,  $(X_{n-4} + X_{n-3} + X_{n-2}) > (X_{n-3} + X_{n-2} + X_{n-1}) > (X_{n-2} + X_{n-1} + X_n)$ , sendo n o número de leituras efetuadas. A soma anterior a estas corresponde ao valor máximo do sinal transiente, a partir da qual a média deve ser calculada. Este critério proporciona uma boa margem de segurança na detecção do máximo, pois minimiza possíveis variações causadas por ruídos.

Dependendo das características físico-químicas dos reagentes e da configuração do módulo de análise, o branco dos padrões e amostras muito diluídas, podem não gerar sinal superior à leitura da linha de base. Tendo em vista que fato como este pode acontecer, ao retornar de cada etapa de leitura, o microcomputador verifica se o intervalo de tempo decorrido após a injeção da amostra, é maior do que o estabelecido pelo operador. Ocorrendo esta condição, o programa armazena a leitura da linha de base como dado válido e retorna para iniciar novo ciclo de amostragem. O fluxograma do software é mostrado na figura 3, o qual foi desenvolvido para trabalhar com módulo de análise baseado em injetor automático.

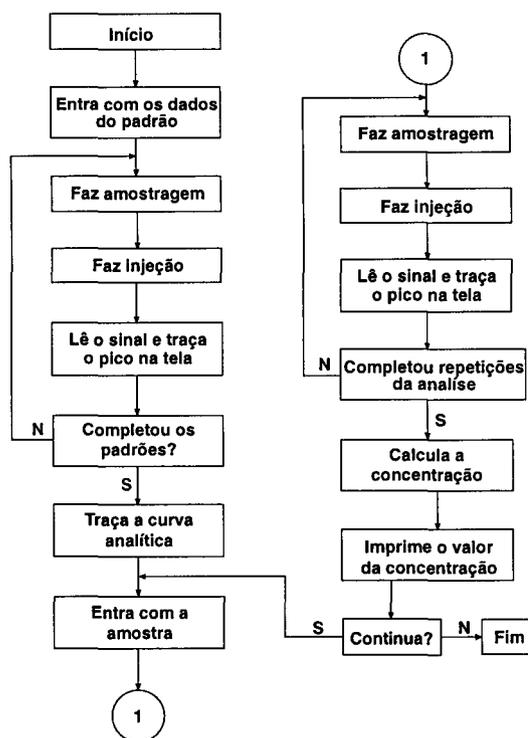


Figura 3. Diagrama de blocos do algoritmo do programa de controle e aquisição de dados

Quando o software é inicializado os parâmetros operacionais: tempo de amostragem; tempo de injeção; tempo de espera para encerrar as leituras; número de padrões e respectivas concentrações; número de repetições por amostra; e erro relativo aceito entre leitura do mesmo padrão ou amostra são requisitados. Após estes dados serem fornecidos pelo operador, o microcomputador executa as etapas de amostragem e de injeção, monitora o sinal gerado pelo espectrofotômetro através da interface analógica/digital, detecta o máximo e armazena na memória a leitura correspondente. Uma vez tendo completado o número de repetições programadas, é então calculada a média e o desvio padrão relativo. Sendo o erro calculado maior do que o estabelecido pelo operador (parâmetro de entrada), o microcomputador executa uma nova leitura, despreza a leitura

discordante, calcula novamente a média e repete o teste de precisão. Esta tentativa é repetida duas vezes, mas se o erro encontrado continuar sendo maior do que o programado, o microcomputador interrompe o processo e escreve uma mensagem de erro. Então, o operador deve decidir se aceita aquele dado, se altera o valor do erro permissível ou procura se há alguma falha no módulo de análise. Este mesmo critério foi estabelecido para os padrões e para as amostras, tal como se procede em sistemas FIA manuais, onde o operador através de uma inspeção visual dos registros, decide se repete as medidas ou passa para o padrão ou para a amostra seguinte.

Tendo completado as leituras dos padrões, os resultados são processados para estabelecer a melhor função de transferência, que expresse a variação de concentração em função da absorbância. A função de transferência pode ser traduzida como um polinômio de grau menor ou igual a  $n-1$ . Assim, é aplicado o teste do  $\chi^2$  para os polinômios de grau 1 até  $n-1$ . A função de transferência é assumida como sendo aquela cujo valor do  $\chi^2$  é a mais próxima de zero.

Para a simplificação do software, o valor do ajuste proposto pelo método do  $\chi^2$  (valor medido - valor calculado) deve ser em módulo tão pequeno quanto possível. Desta forma o valor em módulo de  $\chi^2$  deve tender a zero. Naturalmente, partindo dos valores de  $\chi^2$  a depender do número de graus de liberdade, a somatória deveria atingir um valor correspondente ao número de pontos estabelecidos para a curva analítica, porém isto implicaria no processo de informação conhecido como *look-at-table* que retardaria na execução da rotina. Assim, utilizou-se a lógica do *goodness fit* estabelecida através de equação similar a do  $\chi^2$ . Esta função será empregada para determinar as concentrações do analito nas amostras, a partir dos valores de absorbância.

O cálculo da concentração do analito é realizado em duas fases distintas. Primeiramente, uma das subrotinas contidas no programa, seleciona os dois padrões que apresentam leituras mais próximas a da amostra, satisfazendo a seguinte condição,  $L_p < L_a < L_{p+1}$ , sendo  $L_p$  e  $L_{p+1}$  as leituras dos padrões e  $L_a$  a da amostra. A finalidade desta operação é delimitar a faixa de concentração do analito. Em seguida a concentração é calculada, aplicando a função de transferência, previamente estabelecida a partir das leituras dos padrões.

À medida que os dados são calculados, são organizados para serem armazenados e/ou impressos nos relatórios, obedecendo o código de identificação estabelecido pelo operador ao inicializar o programa.

Do ponto de vista da análise química, o parâmetro de maior interesse é a concentração do analito, entretanto, a análise do perfil do registro em função do tempo (*peak shape*), pode dar informações úteis sobre a estabilidade do módulo de análise e também sobre a homogeneização das soluções. Considerando-se a importância deste fato, incluiu-se no programa subrotinas para apresentar no monitor, as leituras do sinal gerado pelo detector em função do tempo. Isto é feito, à medida que o microcomputador converte para digital, o sinal gerado pelo espectrofotômetro. Assim, pode ser visualizada no monitor, a imagem relativa aos sinais transientes gerados no detector, praticamente em tempo real.

O desempenho do software foi avaliado, procedendo a determinação de cloreto em amostras de águas naturais por espectrofotometria, usando como meio reacional uma solução de  $Hg(SCN)_2$  na presença de íons  $Fe^{3+}$ .

## PARTE EXPERIMENTAL

### Equipamentos

Bomba peristáltica Ismatec modelo IPN-2, equipada com tubos de Tygon com diâmetros internos para vazões nominais de 3,9 e 2,0 ml/min.

Espectrofotômetro Femto modelo 432, equipado com cubeta de fluxo de 180  $\mu$ l.

Microcomputador 386 equipado com interface PCL-711S da American Advantech Co, o qual possibilita acionar o injetor e efetuar a conversão do sinal analógico para digital.

O módulo de análise foi constituído por injetor automático<sup>5</sup>, reator de geometria helicoidal feito com tubo de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm e conectores do tipo T feitos de acrílico.

A interface PCL-711S possui duas portas digitais de entrada e duas de saída, conversores analógico/digital e digital/analogico com 12 bits de resolução e tempo de conversão de 25  $\mu$ s, 8 entradas analógicas com ganhos de 1, 2, 4, 8 e 16 vezes. As entradas analógicas e os respectivos ganhos, são selecionados por software. Esta interface apresenta classificação ISO para dispositivos eletrônicos e foi desenvolvida para acoplamento na placa principal do microcomputador, em qualquer conector (slot) disponível. A aquisição desta interface (USA U\$ 290,00) não onera a implementação de um procedimento automático como o que estamos propondo. Os sinais digitais são fornecidos no padrão TTL, portanto sendo necessário o emprego de uma interface intermediária (Fig.4) para acionar os solenóides do injetor.

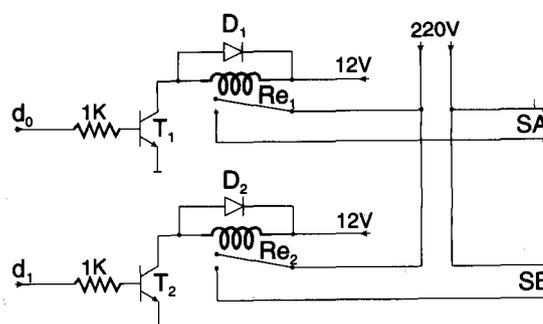


Figura 4. Esquema da interface para acionar o injetor.  $T_1$  e  $T_2$  = transistores BC547,  $D_1$  e  $D_2$  = diodos 1N4002,  $Re_1$  e  $Re_2$  = relés com contatos elétricos para 10 A, SA e SB = solenóides tendo curso de tração de 20 mm e potência de 10 W.

### Reagentes

Em todos experimentos foram usados reagentes de grau analítico e água destilada e deionizada. A solução do reagente cromogênico, 37,1 mmol/L em sulfato férrico e 1,9 mmol/L em tiocianato de mercúrio, foi preparada dissolvendo-se 0,6260g de  $Hg(SCN)_2$  em 150 ml de álcool etílico, adicionou-se à mesma 140 ml de uma solução de ácido nítrico 1,4 mol/L. Dissolveu-se 14,850 g de  $Fe_2(SO_4)_3$  em 600 ml de água sob aquecimento após esfriar esta solução à temperatura ambiente, as duas foram misturadas e o volume foi completado para 1000 ml. Soluções padrão 0,0; 2,50; 5,00; 10,00; 15,00; e 20,00 mg/l de cloreto em ácido nítrico 0,014 mol/L, foram preparadas por diluição a partir de uma solução estoque de 1000 mg/l. Como fluido carregador foi preparada uma solução de ácido nítrico 0,014 mol/L.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desempenho do programa foi avaliado, determinando íons cloreto em amostras de águas por espectrofotometria de absorção molecular, usando como reagentes  $Hg(SCN)_2$  na presença de  $Fe^{3+}$ . Este método de determinação foi selecionado, considerando-se que o mesmo é empregado em sistemas de análise química por injeção em fluxo no CENA há mais de 16 anos<sup>6</sup>. O conhecimento acumulado sobre o desempenho do método,

facilitaria a identificação das falhas que poderiam ocorrer durante a fase de testes do software.

Foi empregado o módulo de análise cujo diagrama de fluxo é mostrado na figura 1, e parte dos resultados obtidos para avaliar o desempenho do programa proposto é mostrado na tabela 1. A comparação entre os resultados obtidos pelo proposto e empregando a medição manual dos registros, não apresentou diferença significativa, quando aplicado o teste-*t* ao nível de 95% de confiabilidade, para um lote de 8 amostras com concentrações entre 4 e 20 mg/l Cl<sup>-1</sup>.

**Tabela 1.** Resultados obtidos com um sistema FIA convencional e com o sistema proposto.

Amostra	FIA Convencional Concentração: mg/l	Método proposto Concentração: mg/l
1	9,21 ± 0,08	9,29 ± 0,10
2	15,63 ± 0,18	15,31 ± 0,13
3	18,72 ± 0,25	18,55 ± 0,22
4	5,67 ± 0,08	5,52 ± 0,09
5	7,39 ± 0,06	7,42 ± 0,08
6	11,50 ± 0,13	11,52 ± 0,13
7	3,80 ± 0,05	3,85 ± 0,07
8	19,41 ± 0,14	19,41 ± 0,14

Obs.: As médias foram calculadas a partir de 3 leituras consecutivas.

O módulo de análise apresentado na figura 1, tem configuração com o fluxo do reagente intermitente, visando diminuir o consumo do reagente cromogênico. Em vista desta configuração, o branco sempre apresenta uma leitura maior que a da linha de base. Para a composição que usamos e com um tempo de injeção de 3 s, o qual é suficiente para descarregar uma alça de amostragem de 25 cm (125 µl), esta leitura do branco situa-se em torno de 0,1 absorbância. Portanto não compromete a faixa operacional do espectrofotômetro empregado. A vazão do reagente cromogênico foi mantida em 33,3 µl/s, o que resulta em um consumo de 100 µl por determinação, entretanto, se fosse empregado bombeamento contínuo no percurso analítico, o consumo seria de 800 µl por determinação.

O software foi desenvolvido considerando-se que a partir das concentrações dos padrões e das respectivas leituras, deveria encontrar a função que apresentasse melhor ajuste, independente da resposta ser ou não linear. Então, para testar o desempenho do software, foi selecionado um método espectrofotométrico que não apresenta resposta linear. Nenhuma modificação é necessária, se o método empregado apresentar resposta linear, pois o software identificará que a função de transferência, neste caso, é representada por um polinômio de grau um.

O "calcanhar de Aquiles" nos sistemas FIA é a presença de bolhas de ar no percurso analítico, em geral, aspiradas durante a troca de uma amostra para outra. Mesmo para operadores experientes isto pode ocorrer, e além de perder a leitura correspondente, é preciso removê-las da cela de fluxo, interrompendo a injeção da amostra. No software em apreço, foi estabelecido como parâmetro para validar cada leitura, que o valor da absorbância não ultrapasse uma unidade. Sempre que uma bolha de ar penetra na cela de fluxo, produz um espalhamento de luz, tendo como resultado uma leitura muito alta. Quando este valor limiar é superado, o microcomputador interrompe o processo e avisa o operador. Outro critério também considerado pelo software, é a mudança brusca da leitura da linha de base, que pode ocorrer quando uma pequena bolha de ar permanece no caminho óptico da cela de fluxo. Também neste caso, o microcomputador interrompe o processo, emite um aviso sonoro e escreve uma mensagem no vídeo.

O programa foi desenvolvido para tomar como parâmetro de medida a altura máxima do sinal analítico, além da simplicidade do algoritmo empregado para isso, proporcionou como vantagem adicional, um aumento na velocidade analítica. Uma vez encontrado o valor máximo da leitura, a próxima amostra pode ser injetada, tomando-se o cuidado de controlar o instante de comutação do injetor, para evitar que a nova amostra chegue à cela de fluxo antes que a amostra anterior tenha sido completamente descartada. Tarefa facilmente implementada, sendo que com este recurso, obteve-se uma velocidade analítica de 160 determinações por hora, representado um aumento em torno de 30 % em relação ao procedimento manual. Este aumento foi considerado em relação a operação do instrumento, não foi computado o tempo necessário para efetuar a medição manual dos registros.

O software em apreço foi desenvolvido, considerando-se que o módulo de análise era baseado em um injetor automático, portanto em termos de automatização o mesmo está em posição intermediária, pois depende do operador para trocar amostras. Entretanto, além de executar as etapas de amostragem, injeção, aquisição de dados e impressão, o mesmo é capaz de tomar decisões, pois é capaz de rejeitar resultados a partir de critérios previamente estabelecidos. Havendo a disponibilidade de um amostrador automático, acreditamos que poucas modificações serão necessárias para incluir subrotinas para controlar o mesmo, transformando-o em sistema completamente automático.

Embora pudessemos implementar este programa empregando um módulo de análise baseado em injetor manual, o injetor automático proporciona vantagens adicionais as quais julgamos que devem ser comentadas. O módulo de análise empregado (Fig.1), apresenta uma configuração com o fluxo do reagente cromogênico intermitente, cuja finalidade é a economia do mesmo. Este reagente apresenta coloração, portanto a magnitude da leitura do branco, é função do volume do reagente introduzido no percurso analítico durante a etapa de injeção. Empregando-se um injetor automático, o volume deste reagente, será sempre o mesmo, enquanto o intervalo de tempo estabelecido para a injeção não for alterado.

Outra facilidade proporcionada pelo injetor automático, é a possibilidade de se efetuar injeção por tempo. Este recurso tem grande utilidade quando trabalhamos com amostras muito concentradas. Neste caso, o injetor permanece na posição de injeção um pequeno intervalo de tempo  $\Delta t$ , inserindo no percurso analítico uma alíquota da amostra com volume  $V = v_z \cdot \Delta t$  ( $v_z$  = vazão do carregador). Isto pode ser executado sem modificar o módulo de análise, diminuindo-se a duração do intervalo de tempo estabelecido para a injeção da amostra.

## CONCLUSÕES

O processo de análise química por injeção em fluxo tem sido apresentado como um meio de baixo custo, que possibilita estabelecer procedimentos de análise química semi-automatizados. Entretanto, estamos propondo neste artigo, o emprego de microcomputador, visando melhorar o nível de automatização em análise de rotina. Neste caso não implica em aumento de despesas, pois o custo de um registrador potenciométrico monocal canal supera o de uma impressora e um microcomputador com os recursos necessários a nível de "hardware", para se implementar um sistema automático como o proposto. Deve-se acrescentar também como vantagem adicional, o ganho em produtividade, pois enquanto empregando um procedimento FIA usual, o operador ainda precisa medir as alturas dos registros para calcular as concentrações do analito, com sistema proposto os resultados podem ser impressos à medida que são obtidos, ou no final do período de trabalho. Como vantagem adicional, tem-se diminuição no consumo de reagentes e aumento da velocidade analítica.

## AGRADECIMENTOS

CNPq, CAPES, FAPESP e FINEP.

## REFERÊNCIAS

1. Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; *Anal. Chim. Acta* **1975**, 78, 145.
2. Reis, B. F.; *Quim. Nova.*, **1996**, 19, 51.
3. Ruzicka, J.; Stewart, J. W. B.; Zagatto, E. A. G.; *Anal. Chim. Acta* **1976**, 81, 387.
4. Cosano, J. S.; Luque de Castro, M. D.; Valcárcel, M.; *J. Automatic Chemistry* **1993**, 15, 141.
5. Reis, B. F.; Zagatto, E. A. G.; Martelli, P. B.; Brienza, S. M. B.; *Analyst* **1993**, 118, 719.
6. Bergamin F<sup>al</sup>, H.; Reis, B. F.; Zagatto, E. A. G.; *Anal. Chim. Acta* **1978**, 97, 423.

Publicação financiada pela FAPESP