

EFEITO SCHLIEREN EM SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO

Fábio R. P. Rocha e Joaquim A. Nóbrega

Departamento de Química - Universidade Federal de São Carlos - Via Washington Luiz, km 235 - CP 676 - 13565-905 - São Carlos - SP

Recebido em 27/9/95; aceito em 5/7/96

SCHLIEREN EFFECT IN FLOW INJECTION ANALYSIS. The formation of interfaces with different refractive index can affect accuracy, precision, detection limit, and system design in flow injection spectrophotometry. The perturbations are named Schlieren effect and the usual alternative to avoid them is the matrix matching between samples and carrier. However, in some situations this is not a practical alternative, such as the analyses of samples with high and variable salinity and the employment of concentrated eluents in ion-exchange resins. In these cases, others procedures need to be explored. A review is presented about several aspects related to Schlieren effect in flow injection analysis, that include strategies to avoid, correct or eliminate these perturbations.

Keywords: flow injection spectrophotometry; Schlieren; refractive index effect.

INTRODUÇÃO

Em sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *flow injection analysis*) a amostra ou solução de referência é inserida em um fluxo transportador, sendo conduzida em direção ao detector. Durante o transporte, a amostra se dispersa, originando um gradiente de concentração e fazendo com que um sinal transiente seja gerado pelo detector. A formação de gradientes de concentração geralmente não dificulta a medida dos sinais analíticos. Além disto, este aspecto foi benéficamente explorado em sistemas para diluição por reamostragem na zona dispersa¹, adição de padrão à zona de amostra², determinações sequenciais³ etc. Entretanto, dependendo do detector utilizado, a medida dos sinais transientes poderá ser perturbada, caso os gradientes na zona de amostra sejam muito intensos. Desta forma, medidas eletroquímicas e por espectrofotometria de absorção molecular podem ser perturbadas em função de serem estabelecidos gradientes de intensidade iônica e de índice de refração, respectivamente. No caso de ser utilizado um espectrofotômetro de absorção molecular, que é um dos detectores mais empregados em acoplamentos com sistemas de análise por injeção em fluxo^{4,5}, a formação de intensos gradientes de índice de refração resulta em um fenômeno denominado efeito Schlieren.

Detectores baseados em medidas de índice de refração são considerados universais em cromatografia líquida, desde que respondem às diferenças de composição entre a fase móvel e o eluente da coluna de separação⁶⁻⁹. Entretanto, a utilização deste tipo de detector torna-se limitada quando existem diferenças de temperatura na fase móvel⁶ ou quando empregam-se técnicas de eluição baseadas na formação de gradientes⁷. A formação de gradientes de índice de refração pode ser induzida por alterações de temperatura provocadas pela absorção de radiação proveniente de um laser. Desta forma, é possível efetuar medidas indiretas de absorbância de soluções com baixas concentrações de analito¹⁰. Este princípio tem sido empregado para detecção em cromatografia líquida⁶. Em sistemas FIA, a utilização de técnicas de detecção com base em medidas de índice de refração têm sido restrita^{4,11}, devido a intrínseca falta de seletividade.

Perturbações devidas ao efeito Schlieren em sistemas FIA foram primeiramente observadas quando um procedimento turbidimétrico para a determinação de sulfato foi proposto¹².

Os altos valores de branco observados em um sistema em linha única, quando a concentração do precipitante foi aumentada, foram atribuídos à presença de gradientes de índice de refração na zona de amostra no instante de medida. Observações similares foram feitas em sistemas em linha única para determinação de cloreto¹³ e amônia¹⁴ devido às diferenças físico-químicas entre as amostras e os reagentes. Uma alternativa para evitar estes inconvenientes surgiu da utilização de sistemas com introdução de reagentes por confluência^{13,15}, permitindo que a amostra fosse inserida em um fluxo transportador inerte com composição semelhante àquela da matriz da amostra.

O efeito Schlieren pode influenciar de duas formas os resultados obtidos em sistemas FIA. Nos casos em que um reagente com composição muito distinta daquela do transportador é introduzido por confluência, problemas de oscilação de linha de base surgem quando as condições de mistura são inadequadas¹⁶⁻¹⁹. A mistura irregular entre reagente e transportador constitui uma das principais fontes de ruído em sistemas FIA, sendo criticamente afetada pela pulsação da bomba peristáltica¹⁸. Quando as soluções das amostras apresentam características físico-químicas distintas daquelas da solução transportadora, tanto a forma quanto a altura dos sinais transientes podem ser modificadas²⁰. Como consequência, perturbações devidas às diferenças de índice de refração podem comprometer a precisão e a exatidão⁵, bem como piorar o limite de detecção^{5,18} de uma metodologia. Adicionalmente, curvas analíticas obtidas a partir de sinais perturbados por efeito Schlieren podem apresentar desvios da lei de Beer⁵, uma vez que os valores de absorbância não refletem somente a absorção de radiação pelo analito.

A ORIGEM DO FENÔMENO

Um melhor entendimento da origem das perturbações causadas por efeito Schlieren foi possível quando Betteridge et al.²¹ propuseram um método para determinações refratométricas, baseado na formação de gradientes de índice de refração. Posteriormente, Evans et al.²² propuseram um modelo para prever a magnitude e a forma dos sinais devidos aos gradientes de índice de refração em cromatografia líquida e em sistemas de injeção em fluxo.

O índice de refração de um meio é uma função de fatores como temperatura e comprimento de onda do feixe de radiação

incidente^{10,23}. No caso de uma solução, o índice de refração depende também da concentração das espécies presentes^{22,24}. Desta forma, a formação de intensos gradientes de concentração em sistemas FIA provoca a formação de gradientes de índice de refração na zona de amostra. Estes gradientes resultam na formação de interfaces com diferentes índices de refração, que podem provocar refração e reflexão²² do feixe de radiação incidente, focalizando-o em direção ao detector ou provocando espalhamento de radiação²¹. Devido às alterações na quantidade de radiação que atinge o detector, a presença de efeito Schlieren pode levar a formação de picos distorcidos ou invertidos^{15,21,25}.

Devido a dependência entre índice de refração e temperatura, perturbações devidas ao efeito Schlieren podem ser observadas em sistemas que empregam aquecimento^{21,26}, ou naqueles em que reações altamente exotérmicas estão envolvidas. Tais perturbações são menos críticas em sistemas FIA, visto que os gradientes de temperatura na zona de amostra, em geral, são eliminados previamente à detecção²⁶.

FATORES QUE INFLUENCIAM A MAGNITUDE DO EFEITO SCHLIEREN

A magnitude do efeito Schlieren é dependente de parâmetros que afetam a formação dos gradientes de concentração e a mistura entre o transportador e reagentes adicionados por confluência. Adicionalmente, fatores como as características do feixe de radiação incidente; a geometria e a forma da cela de fluxo e dos pontos de confluência e o índice de refração das soluções envolvidas são determinantes da forma e da magnitude da perturbação que será observada. Estes parâmetros podem ser explorados no sentido de reduzir, ou mesmo eliminar o efeito Schlieren.

O efeito de parâmetros que afetam a dispersão em sistemas FIA (volume injetado, comprimento de reatores, vazões e adição de reagentes por confluência) foi criticamente discutido²⁵ em termos da magnitude da perturbação e da razão sinal/ruído. Propriedades físico-químicas que afetam a mistura entre amostra, transportador e reagentes, tais como densidade¹⁸ e viscosidade²⁷⁻²⁹, influenciam a magnitude do efeito Schlieren. Assim, soluções de diferentes espécies químicas que apresentem mesmo índice de refração, podem afetar de forma distinta os sinais transientes, em função de sua habilidade de mistura com o transportador²⁵. A dependência da espécie química envolvida torna-se mais crítica quando baixas vazões são utilizadas, devido ao aumento do tempo disponível para interação entre amostra e a solução transportadora e às diferenças nos coeficientes de difusão das diversas espécies químicas²¹.

Como o efeito Schlieren é causado por refração e/ou reflexão de radiação, feixes convergentes, divergentes ou colimados podem afetar diferentemente a magnitude e a forma da perturbação^{22,30}. A sensibilidade de um detector espectrofotométrico às alterações de índice de refração pode ser reduzida utilizando um arranjo óptico que permita a focalização do feixe de radiação após a passagem pela cela de fluxo^{31,32}. Os efeitos causados pela geometria dos pontos de confluência¹⁶ e da cela de fluxo^{20,32} têm sido examinados, na tentativa de reduzir as oscilações de linha de base e a magnitude da perturbação dos sinais transientes.

Betteridge et al.²¹ verificaram que em determinadas condições a magnitude dos gradientes de índice de refração foi diretamente dependente do índice de refração da amostra. Esta observação foi explorada para o desenvolvimento de um método para determinações refratométricas utilizando sistemas de injeção em fluxo. A forma diferencial dos sinais obtidos foi correlacionada com os desvios sofridos por um feixe de radiação divergente, proveniente de um diodo emissor de luz. Evans et al.²² verificaram que a forma do sinal transiente obtido para solventes com diferentes índices de refração em cromatografia líquida depende do gradiente de índice de refração

formado, não podendo ser diretamente prevista considerando apenas o índice de refração dos solventes isoladamente.

PROCEDIMENTOS PARA EVITAR, ELIMINAR OU CORRIGIR EFEITO SCHLIEREN

Diversos procedimentos têm sido explorados no sentido de evitar, eliminar ou corrigir perturbações causadas por efeito Schlieren na medida dos sinais transientes. O artifício mais simples consiste na compatibilização entre as características físico-químicas do transportador àquelas das soluções a serem processadas. Nos casos em que esta alternativa não é viável, três estratégias devem ser consideradas: (i) a minimização da interação entre a zona de amostra e o fluxo transportador; (ii) o uso de sistemas com melhores condições de mistura ou (iii) o emprego de procedimentos instrumentais que permitam distinguir entre os sinais devidos ao analito e aqueles relacionados à absorção não específica.

COMPATIBILIZAÇÃO ENTRE AMOSTRA E SOLUÇÃO TRANSPORTADORA

Uma maneira adequada para minimizar, ou mesmo eliminar, problemas com efeito Schlieren consiste em ajustar as características da solução transportadora (acidez, concentração salina, viscosidade etc.) àquelas das amostras e soluções de referência. Este procedimento, apesar de ser simples em alguns casos, não é de uso geral. Limitações surgem, por exemplo, quando são analisadas amostras com acidez ou salinidade elevadas e variáveis ou quando se utilizam eluentes concentrados em resinas de troca iônica³³.

A adição de um soluto inerte, de forma a compatibilizar o índice de refração do reagente àquele das amostras, foi sugerida como uma forma de evitar as perturbações causadas por gradientes de índice de refração²¹. Este artifício foi posteriormente utilizado para reduzir o efeito Schlieren verificado em sistemas em linha única^{34,35}. Entretanto, gradientes de concentração podem ser formados pela interação entre soluções com índice de refração similar, mas com composição química distinta, fazendo com que esta alternativa nem sempre seja eficiente para eliminar efeito Schlieren. Tal como mencionado anteriormente, a utilização de soluções transportadoras com características semelhantes à matriz da amostra e a introdução de reagentes por confluência¹⁵, constitui-se na alternativa mais eficaz para evitar a formação de gradientes de índice de refração.

Um procedimento alternativo para a compatibilização entre o transportador e a solução a ser processada foi proposto por Thomsen et al.³⁶ para a determinação de silicato em água de mar. O diagrama de fluxos foi projetado para permitir a divisão do fluxo de amostra em duas partes. Uma das frações recebeu por confluência uma solução redutora e a mistura foi injetada em um transportador constituído pelos demais reagentes misturados com a fração remanescente de amostra. As vazões foram definidas de forma a conciliar a salinidade da solução injetada àquela da solução transportadora. Essa estratégia poderia ser utilizada nos casos em que as amostras apresentassem acidez ou concentração salina variável. Entretanto, existem algumas limitações práticas: a mistura entre a amostra e os reagentes depende unicamente do processo de dispersão; a frequência de amostragem é diminuída devido às dificuldades na substituição da amostra a ser processada e o volume de amostra utilizado é superior ao comumente empregado em sistemas FIA.

Perturbações causadas por efeito Schlieren foram observadas em FIA, quando técnicas de separação/pré-concentração em sistemas sólido-líquido, foram utilizadas^{33,37,38}. Nestes sistemas, a compatibilização entre as soluções utilizadas no processamento das amostras é dificultada pela necessidade de se utilizar soluções ou solventes com características distintas daquelas do carregador para a eluição do analito. Este inconveniente dificulta

a utilização destas técnicas de separação em sistemas FIA que utilizam medidas espectrofotométricas³⁷. A formação de gradientes de índice de refração foi também verificada em sistemas envolvendo realocização da cela de fluxo³⁹.

MINIMIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A ZONA DE AMOSTRA E O TRANSPORTADOR

As perturbações devidas ao efeito Schlieren na quantificação do analito podem ser evitadas, efetuando-se as medidas em uma região da zona de amostra não afetada por intensos gradientes de concentração. Para tanto, a interação entre a solução injetada e o transportador deve ser minimizada, de forma a proteger uma fração da zona de amostra do processo de dispersão. Isto pode ser alcançado, por exemplo, utilizando sistemas com fluxo monossegmentado⁴⁰. Em tais sistemas, a amostra é inserida no transportador entre duas bolhas de ar, permitindo reduzir a dispersão axial (longitudinal). Como alternativa, a fração central da zona de amostra pode ser preservada de interações com a solução transportadora, aumentando-se o volume de solução injetada¹⁸. A validade da utilização deste artifício foi demonstrada⁵ para a determinação de ferro na presença de 0,20 mol/L de cloreto de sódio e de cobalto em soluções contendo 0,10 mol/L de glicose. Posteriormente, esta estratégia foi utilizada para a determinação de brometo⁴¹ e de ferro⁴² em soluções concentradas de cloreto de sódio. Este procedimento é simples e eficiente, podendo ser utilizado para evitar perturbações devidas aos gradientes de índice de refração na medida dos sinais transientes, especialmente nos casos em que o volume de amostra e a frequência de amostragem não são aspectos críticos. Além disto, um aumento de sensibilidade pode ser observado, visto que as medidas são efetuadas em condições de dispersão limitada.

SISTEMAS COM MELHORES CONDIÇÕES DE MISTURA

Como uma regra geral, as perturbações causadas por efeito Schlieren tornam-se menos intensas, à medida em que as condições de mistura são melhoradas, sendo dificilmente observadas em sistemas com dispersão elevada¹⁵. Assim, as diferenças de índice de refração podem ser reduzidas alterando-se os componentes utilizados para efetuar a mistura entre a solução transportadora, amostra e reagentes. Entretanto, essas alterações podem afetar o processo de dispersão da amostra. Quando se utilizam reatores tubulares dispostos em linha reta, o perfil parabólico formado devido às condições de fluxo laminar é pouco alterado durante o percurso analítico. Em consequência do processo de dispersão, os sinais transientes obtidos são menores e mais largos, o que pode comprometer a sensibilidade das medidas e diminuir a frequência de amostragem. Diversas alternativas têm sido propostas visando favorecer a difusão no sentido radial, permitindo que uma mistura adequada seja obtida, com reduzida dispersão longitudinal. Isto pode ser conseguido, utilizando-se reatores que permitam a contínua mudança da direção do fluxo, promovendo situações de turbulência local. Como exemplo de componentes deste tipo, podem ser citados os reatores preenchidos com materiais inertes, tais como polímeros¹⁶ ou esferas de vidro^{43,44} e os reatores tubulares helicoidais com diâmetro reduzido^{45,46}. O desempenho de alguns destes componentes foi avaliado^{16,18}, visando reduzir oscilações de linha de base observadas na análise de soluções aquosas utilizando reagentes preparados em meio alcóolico. Condições ótimas para a mistura entre fluxo transportador e reagentes introduzidos por confluência foram previamente avaliadas^{28,29}.

Em certas situações, os reatores anteriormente mencionados não são efetivos para garantir condições adequadas de mistura.

Como exemplo, pode ser citada a utilização de sistemas FIA para o monitoramento de processos industriais, nos quais as amostras frequentemente são muito concentradas e apresentam características indesejáveis (altas densidade e viscosidade, por exemplo) para serem diretamente analisadas. Neste caso, o uso de câmaras de mistura pode ser eficiente para eliminar efeitos matriciais⁴⁷ que poderiam causar diferenças de índice de refração. Tais dispositivos mostram-se também eficientes nos casos em que os reagentes adicionados por confluência apresentam características extremamente diferentes daquelas do transportador¹⁹. Apesar de bastante eficazes no sentido de promover a mistura entre as várias porções da zona de amostra, o uso de câmaras de mistura representa uma forma de diluição em sistemas FIA^{4,45}.

Problemas devidos a absorção não específica, em geral, não são observados em sistemas que envolvem parada de fluxo²⁵. Entretanto, resultados satisfatórios são obtidos somente se a parada de fluxo ocorrer quando a região da zona de amostra utilizada para quantificação atingir a cela de fluxo, visto que as interfaces podem ser novamente observadas quando o fluxo é restabelecido. Desta forma, a retenção de uma fração da zona de amostra²⁶ em um reator distante do ponto de medida não é eficaz para eliminar os efeitos dos gradientes de índice de refração.

PROCEDIMENTOS INSTRUMENTAIS PARA A CORREÇÃO DE EFEITO SCHLIEREN

Em situações práticas, os sinais analíticos e as perturbações devidas ao efeito Schlieren aparecem conjuntamente e apresentam formas distintas. Desta forma, os sinais máximos não são coincidentes, tornando inviáveis correções baseadas na subtração do sinal devido a uma solução branco. Além disto, este artifício é limitado pela falta de repetibilidade que pode ser observada em sinais transientes afetados por intensas diferenças de índice de refração. Entretanto, alguns procedimentos instrumentais podem ser utilizados para eliminar a contribuição devida ao efeito Schlieren sobre os sinais de absorbância medidos. Com este propósito, métodos baseados em medidas de absorbância em dois comprimentos de onda²⁵ e em espectrofotometria diferencial foram propostos⁴⁸.

Medidas espectrofotométricas em dois comprimentos de onda^{49,50} são usualmente exploradas para permitir medidas de absorbância em soluções turvas⁴⁹⁻⁵¹, determinações simultâneas⁵¹ e para o estudo cinético de reações paralelas através do monitoramento de duas espécies absorventes⁴⁹. Em cromatografia líquida, este artifício permite a eliminação de picos devidos aos solventes⁸, bem como a redução de desvios de linha de base provocados por alterações de temperatura³¹. Além disto, medidas de absorbância em diferentes comprimentos de onda são exploradas para a correção de sinais de fundo em espectrofotometria de absorção atômica⁵².

Zagatto et al.²⁵ propuseram um procedimento para a compensação das perturbações devidas ao efeito Schlieren através de medidas em dois comprimentos de onda, utilizando um espectrofotômetro com arranjo linear de diodos. O primeiro valor de absorbância medido corresponde ao sinal analítico mais absorção não específica. No segundo comprimento de onda, onde a absorção devida ao analito é desprezível, a magnitude do efeito Schlieren é determinada. A diferença entre os dois sinais é proporcional à concentração do analito, sendo utilizada para sua quantificação. Esse procedimento permite que a perturbação seja medida simultaneamente ao sinal analítico, de forma que a repetibilidade do efeito Schlieren não é um fator crítico. Entretanto, para que a correção seja efetiva é necessário que a magnitude das perturbações causadas por diferenças de índice de refração seja semelhante nos dois comprimentos de onda onde as medidas são efetuadas. Nos casos em que os gradientes de índice de refração são muito intensos, a subtração dos sinais

pode comprometer a precisão das medidas, o que enfatiza a necessidade de procedimentos para minimizar a perturbação. Adicionalmente, pode ocorrer a perda de linearidade da curva analítica, uma vez que a absorção de radiação ocorre a partir de um feixe policromático¹⁰.

Medidas em dois comprimentos de onda foram empregadas³⁷ para eliminar perturbações devidas ao efeito Schlieren observadas em um procedimento para a determinação de zinco em plantas, utilizando separação em resina de troca iônica. Posteriormente, Liu e Dasgupta⁵³ empregaram medidas dos sinais transientes em dois comprimentos de onda, para a correção dos efeitos de turbidez e de gradientes de índice de refração em sistemas FIA. Foram utilizadas duas celas de fluxo e, em cada uma delas, medidas nos comprimentos de onda de 950 e 605 nm foram feitas utilizando-se dois pares de diodos emissores de luz. A viabilidade da utilização do procedimento foi demonstrada empregando-se soluções de azul de bromotimol contendo 1,5% (v/v) de leite ou 60% (v/v) de etanol, sendo possível a quantificação do corante com um erro inferior a 3,7%, através de medidas de área de pico e tratamento matemático dos sinais obtidos. Daniel et al.⁵⁴ investigaram a utilização conjunta dos procedimentos propostos por Thomsen et al.³⁶ e por Zagatto et al.²⁵ para eliminar perturbações devidas ao efeito Schlieren, melhorando a precisão e a sensibilidade do procedimento para a determinação de nitrato em água de mar.

A diferenciação de espectros de absorvância é um artifício útil para melhorar a resolução de bandas sobrepostas e para a eliminação de sinais de fundo^{10,49}. Este artifício foi explorado por Leach et al.⁴⁸ para compensar perturbações causadas por gradientes de índice de refração na análise de baixas concentrações de metais utilizando sistemas de injeção em fluxo. O diagrama de fluxos foi projetado para permitir que a zona de amostra atravessasse seqüencialmente duas celas de fluxo separadas por um reator tubular helicoidal. A diferença de absorvância foi registrada em função do tempo, permitindo a obtenção de um sinal diferencial. Foi verificado que o sinal devido aos gradientes de índice de refração tornou-se nulo quando a resposta à absorvância do analito foi máxima, tal como anteriormente proposto por Betteridge et al.²¹. Desta forma, medidas em intervalos de tempo precisamente definidos poderiam ser utilizadas para permitir a medida de sinais analíticos sem perturbações devidas ao efeito Schlieren. Apesar de ser uma estratégia engenhosa, sua utilização em situações práticas deveria ser investigada para demonstrar a aplicabilidade do procedimento para a compensação de efeito Schlieren.

CONCLUSÃO

Considerando a revisão crítica da literatura pode-se afirmar que a formação de interfaces com diferentes índices de refração pode perturbar de diversas formas a medida dos sinais transientes em sistemas FIA. Tais perturbações devem ser consideradas no projeto dos sistemas quando medidas turbidimétricas ou de absorção molecular são efetuadas. Entretanto, atualmente existem alternativas práticas e eficazes que possibilitam evitar, minimizar ou corrigir os efeitos causados por efeito Schlieren. A alternativa metodológica recomendável é extremamente dependente do problema analítico em foco e a opção pelo procedimento mais indicado somente poderá ser feita considerando-se a instrumentação necessária, o volume de amostra disponível e as características analíticas desejadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro e a André Fernando de Oliveira (DQ-UFSCar) e ao Prof. Boaventura F. Reis (CENA-USP) pela leitura do manuscrito e pelas sugestões apresentadas.

REFERÊNCIAS

1. Reis, B. F.; Jacintho, A. O.; Mortatti, J.; Krug, F. J.; Zagatto, E. A. G.; Bergamin F², H.; Pessenda, L. C. R.; *Anal. Chim. Acta* **1981**, *123*, 221.
2. Giné, M. F.; Reis, B. F.; Zagatto, E. A. G.; Krug, F. J.; Jacintho, A. O.; *Anal. Chim. Acta* **1983**, *155*, 131.
3. Fernandez, A.; Luque de Castro, M. D.; Valcárcel, M.; *Anal. Chim. Acta* **1987**, *193*, 107.
4. Ruzicka, J.; Hansen, E.H.; *Flow Injection Analysis*; 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, 1988.
5. Yamane, T.; Saito, M.; *Talanta* **1992**, *39*, 215.
6. Yeung, E. S.; *Detectors for Liquid Chromatography*; John Wiley & Sons: New York, 1986.
7. Lindsay, S.; *High Performance Liquid Chromatography*; 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, 1992.
8. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; *Introduction to Modern Liquid Chromatography*; 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, 1979.
9. Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 3207.
10. Ingle, J. D.; Crouch, S. R.; *Spectrochemical Analysis*; Prentice Hall: New Jersey, 1988.
11. Valcarcel, M.; Luque de Castro, M. D.; *Análisis por Inyección en Flujo*; San Pablo, Cordoba, 1984.
12. Krug, F.J.; Bergamin F², H.; Zagatto, E. A. G.; Jørgensen, S. S.; *Analyst* **1977**, *102*, 503.
13. Bergamin F², H.; Reis, B. F.; Zagatto, E. A. G.; *Anal. Chim. Acta* **1978**, *97*, 427.
14. Krug, F. J.; Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; *Analyst* **1979**, *104*, 47.
15. Zagatto, E. A. G.; Reis, B. F.; Martinelli, M.; Krug, F. J.; Bergamin F², H.; Giné, M. F.; *Anal. Chim. Acta* **1987**, *198*, 153.
16. Silfwerbrand-Lindh, C.; Nord, L.; Danielsson, L. G.; Ingman, F.; *Anal. Chim. Acta* **1984**, *160*, 11.
17. Patton, C. J.; Crouch, S. R.; *Anal. Chim. Acta* **1986**, *179*, 189.
18. Tyson, J. F.; Marsden, A. B.; *Anal. Chim. Acta* **1988**, *214*, 447.
19. Jacintho, A.O.; Rufini, I.A.; Antonio, R.F.; *Quím. Nova* **1989**, *12*, 5.
20. Ham, G.; *Anal. Proc.* **1981**, *18*, 69.
21. Betteridge, D.; Dagless, E. L.; Fields, B.; Graves, N. F.; *Analyst* **1978**, *103*, 897.
22. Evans, C. E.; Shabushnig, J. G.; McGuffin, V. L.; *J. Chromatogr.* **1988**, *459*, 119.
23. Halliday, D.; Resnick, R.; Walker, J.; *Fundamentals of Physics*; 4th ed., John Wiley & Sons: New York, 1993.
24. Heller, W.; *J. Phys. Chem.* **1965**, *69*, 1123.
25. Zagatto, E. A. G.; Arruda, M. A. Z.; Jacintho, A. O.; Mattos, I. L.; *Anal. Chim. Acta* **1990**, *234*, 153.
26. Krug, F. J.; Reis, B. F.; Giné, M.F.; Zagatto, E. A. G.; Ferreira, J. R.; Jacintho, A. O.; *Anal. Chim. Acta* **1983**, *151*, 39.
27. Betteridge, D.; Ruzicka, J.; *Talanta* **1976**, *23*, 409.
28. Clark, G. D.; Hungerford, J. M.; Christian, G.D.; *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 973.
29. Spinks, T. L.; Pacey, G. E.; Fábian, I.; *Anal. Chim. Acta* **1991**, *254*, 209.
30. Stewart, J. E.; *Appl. Opt.* **1981**, *20*, 654.
31. Renn, C. N.; Synovec, R. E.; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 568.
32. Dasgupta, P. K.; Bellamy, H. S.; Liu, H.; *Talanta* **1993**, *40*, 341.
33. Bergamin F², H.; Reis, B. F.; Jacintho, A.O.; Zagatto, E. A. G.; *Anal. Chim. Acta* **1980**, *117*, 81.
34. Haj-Hussein, A. T.; Christian, G. D.; *Analyst* **1986**, *111*, 65.
35. Fogg, A.G.; Cipko, E.; Farabella, L.; Tyson, J.F.; *Analyst* **1990**, *115*, 593.

36. Thomsen, J.; Johnson, K. S.; Petty, R. L.; *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 2378.
37. Ferreira, J. R.; Zagatto, E. A. G.; Arruda, M. A. Z.; Brienza, S. M. B.; *Analyst* **1990**, *115*, 779.
38. Blain, S.; Tréguer, P.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *308*, 425.
39. Zagatto, E. A. G.; Bergamin F^o, H.; Brienza, S.M.B.; Arruda, M. A. Z.; Nogueira, A. R. A.; Lima, J. L. F. C.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, *261*, 59.
40. Pasquini, C.; Oliveira, W. A.; *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2575.
41. Emaus, W. J. M.; Henning, H. J.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, *272*, 245.
42. Yamane, T.; Yamada, H.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *308*, 433.
43. Van Den Berg, J. H. M.; Deelder, R. S.; Egberink, H. G. M.; *Anal. Chim. Acta* **1980**, *114*, 91.
44. Reijn, J. M., Van der Linden, W. E.; Poppe, H.; *Anal. Chim. Acta* **1981**, *123*, 229.
45. Kalberg, B.; Pacey, G. E.; *Flow Injection Analysis. A practical guide*; Elsevier: Amsterdam,; 1989.
46. Tijssen, R.; *Anal. Chim. Acta* **1980**, *114*, 71.
47. Garn, M. B.; Gisin, M.; Gross, H.; King, P.; Schmidt, W.; Thommen, C.; *Anal. Chim. Acta* **1988**, *207*, 225.
48. Leach, R. A.; Ruzicka, J.; Harris, J. M.; *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 1669.
49. Sommer, L.; *Analytical Absorption Spectrophotometry in the Visible and Ultraviolet. The Principles*; Elsevier: Amsterdam, 1989.
50. Ewing, G. W.; *Métodos Instrumentais de Análise Química*; Trad. de Albanese, A. G.; Campos, J. T. S.; Edgard Brucher: São Paulo, 1972.
51. Huang, J.; Liu, H.; Tan, A.; Xu, J.; Zhao, X.; *Talanta* **1992**, *39*, 589.
52. Welz, B.; *Atomic Absorption Spectrometry*; 2nd ed., Verlag Chemie, Weinheim, 1985.
53. Liu, H.; Dasgupta, P. K.; *Anal. Chim. Acta* **1994**, *289*, 347.
54. Daniel, A.; Birot, D.; Lehaitre, M.; Poncin, J.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *308*, 413.