

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL

**INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS DE TRANSIÇÃO NAS
REAÇÕES QUIMILUMINESCENTES
DE OXIDAÇÃO DE LUMINOL OU PERÓXI-OXALATOS
POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

Margareth Mie Nakamura

Dissertação de mestrado

Profa. Dra. Nina Coichev

Orientadora

São Paulo

1998

"Influência de Íons Metálicos de Transição nas Reações Quimiluminescentes de Oxidação de Luminol ou Peróxi-Oxalatos por Peróxido de Hidrogênio".

MARGARETH MIE NAKAMURA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área: Química Analítica.

Aprovado por:

**Profa. Dra. NINA COICHEV
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)**

**Prof. Dr. PAULO CELSO ISOLANI
IQ - USP**

**Prof. Dr. JAIRO JOSÉ PEDROTTI
UM**

**SÃO PAULO
02 DE JUNHO DE 1998**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, tios e irmãos pela dedicação e carinho,

À professora Nina Coichev pela orientação com objetividade, leveza e compreensão,

Às professoras Silvia Serrano e Maria Encarnación, pelo carinho,

Ao Hylton por toda dedicação e amor, incondicionalmente,

A Gisa, Solange, Horácio, Hilda e Mauro Aquiles pela energia positiva e amizade, Rodrigo e Ana Cristina pelos momentos de descontração,

Ao Prof. Wilhelm por sugestões tão significativas no nosso trabalho e utilização do seu laboratório para síntese do 2-NPO,

Ao Cassius, Sandra e Sacha pelo apoio e sugestões na síntese do 2-NPO,

Ao Sérgio pela síntese do 2-NPO e complementação de alguns dados experimentais,

Ao Paulo César e Márcia, pela análise do aço inox padrão por absorção atômica,

A Cris, Renato, Carol, Cristiane, Silvio, Jorge, Patrícia, Laerte, Luciana pelo dia-a-dia com muita amizade,

Aos funcionários da biblioteca, em especial a Moema, pela revisão bibliográfica, e de todo Instituto de Química pelo suporte técnico,

À FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações	iii
I - INTRODUÇÃO	
I.1 - Apresentação.....	2
I.2 - Quimiluminescência.....	3
I.2.1 - Definição.....	3
I.2.2 - Classificação dos fenômenos luminescentes.....	3
I.2.3. - Requisitos para uma reação ser quimiluminescente.....	4
I.2.4. - Rendimento quântico quimiluminescente.....	4
I.2.5. - Classificação das reações quimiluminescentes.....	7
I.2.6 - Aplicações de reações quimiluminescentes em química analítica.....	9
I.2.7 - Reações quimiluminescentes mais estudadas para finalidades analíticas.....	10
II - REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DE LUMINOL POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	
II.1. Introdução.....	14
II.2. Objetivos do presente estudo.....	30
II.3. Parte experimental.....	30
II.3.1. Reagentes.....	32
II.3.1.1. Soluções estoque para sistema em fluxo.....	33
II.3.1.2. Soluções de trabalho.....	33
II.3.1.3. Padronização da solução estoque de peróxido de hidrogênio.....	33
II.3.1.4. Padronização da solução de Cr(III)....	34

II.4. Resultados e discussão.....	35
II.4.1. Modo estático.....	35
II.4.2. Medições em sistema em fluxo.....	36
II.4.2.1. Influência do comprimento do misturador.....	36
II.4.2.2. Influência do volume de injeção de amostra.....	36
II.4.2.3. Influência da concentração de luminol.....	39
II.4.2.4. Influência da concentração de peróxido de hidrogênio.....	39
II.4.2.5. Influência da concentração de EDTA na solução de peróxido de hidrogênio.....	41
II.4.2.6. Efeito da concentração de ácido fosfórico adicionado à amostra.....	44
II.4.2.7. Influência do pH das soluções de luminol e peróxido de hidrogênio... 	44
II.4.2.8. Influência de Fe(II) e Fe(III) em meio com e sem adição de EDTA.....	47
II.4.2.9. Aplicação analítica-Determinação de cromo em aço inox certificado..	48
II.4.2.9.1. Tratamento de amostra de aço inox certificado.....	48
II.4.2.9.2. Determinação da concentração de cromo por absorção atômica... 	49
II.4.2.9.3. Determinação da concentração de Cr(III) por quimiluminescência.	49
II.4.2.9.4. Obtenção da curva analítica para Cr(III).....	51
II.4.2.9.5. Análise de amostra de aço inox.....	52
III - REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DE TCPO OU 2-NPO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.	
III.1. Introdução.....	54
III.2. Objetivos do presente estudo.....	63
III.3. Parte experimental	
III.3.1. Preparação de oxalato de bis-(2-nitrofenil) (2-NPO).....	63
III.3.2. Soluções estoque.....	64

III.3.3. Soluções de trabalho.....	65
III.4. Resultados e discussão.....	66
III.4.1. Estudos em meio não tamponado	
III.4.1.1. Influência do teor de água.....	67
III.4.1.2. Efeito da concentração de imidazol.....	68
III.4.1.3. Efeito da presença de Cr(III).....	68
III.4.1.4. Efeito da concentração de 3-aminofluoranteno.....	68
III.4.2. Estudos em meio tamponado.....	72
III.4.2.1. Meio tamponado com tris(hidroximetil)aminometano ou H_2PO_4/HPO_4^{2-}	73
III.4.2.2. Meio tamponado com imidazol.....	74
III.4.2.3. Meio tamponado com imidazol e na presença de íons metálicos.....	80
III.5. Conclusões gerais.....	84
IV - PERSPECTIVAS FUTURAS.....	88
V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
<i>CURRICULUM VITAE</i>	

RESUMO

Na primeira etapa deste trabalho desenvolveu-se um método para a determinação de íons Cr(III), na presença de EDTA, através de um sistema de injeção em fluxo com detecção da emissão resultante da reação quimiluminescente do luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) e peróxido de hidrogênio, em meio tamponado por $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$.

Na curva analítica para Cr(III) correspondeu o intervalo de $(0,32-3,2) \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹, o erro relativo foi de 3,0% e o limite de detecção $1,3 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹. O método foi aplicado para a determinação de Cr(III) em amostra de aço inox IPT22AISI440A.

Na segunda etapa deste trabalho foram realizados estudos detalhados para melhor compreender a influência de íons metálicos, como Cr(III), Pb(II) e Zn(II), na intensidade de emissão resultante da reação quimiluminescente de TCPO (oxalato de bis-(2,4,6-triclorofenil)) ou 2-NPO (oxalato de bis-(2-nitrofenil)) e peróxido de hidrogênio, na presença de imidazol (IMI) e 3-aminofluoranteno em meio de acetonitrila / água.

A reação é fortemente dependente do pH. Em meio tamponado HIMI^+/IMI ($1,0 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹), pH 8 e 9, a presença de íons Cr(III) e Pb(II) ($1,0-10,0$) $\times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, aumentou a intensidade de emissão. Quando foi utilizado 2-NPO, a reação foi mais eficiente. Entretanto, em meio não tamponado e contendo baixa concentração de IMI, a intensidade de emissão foi parcialmente suprimida na presença de íons metálicos $(0,5-2,4) \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹.

ABSTRACT

In the first step of this work a flow injection analysis method was developed for the determination of Cr(III), in the presence of EDTA, with chemiluminescence detection resulting from the reaction of luminol (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione) and hydrogen peroxide, in a buffer medium $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$.

The calibration curve for the for Cr(III) was in the range of $(0.32-3.2) \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹, the relative deviation was 3.0% and the detection limit was 1.3×10^{-8} mol.L⁻¹. The method was applied to the determination of Cr(III) in a stainless steel sample IPT22AISI440A.

In the second step of this work, detailed studies were carried out to better understand the influence of some metal ions, such as Cr(III), Pb(II) and Zn(II) on the chemiluminescence intensity resulting from the reaction of TCPO (bis-(2,4,6-trichlorophenil)oxalate) or 2-NPO (bis-(2-nitrophenil)oxalate) and hydrogen peroxide in the presence of imidazole (IMI) and 3-aminofluoranthene in acetonitrile / water medium.

The reaction is strongly pH dependent. In a buffer HIMI⁺/IMI (1.0×10^{-2} mol.L⁻¹), pH 8 and 9, the Cr(III) and Pb(II) ions $(1.0-10.0) \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ increased the chemiluminescence intensity. When 2-NPO was used, the reaction was more effective. However, in no buffering medium and containing low IMI concentration, the chemiluminescence intensity was partially suppressed in the presence of metal ions $(0.5-2.4) \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

Φ	rendimento quântico
2-NPO	oxalato de bis-(2-nitrofenil)
3-AFA	3-aminofluoranteno
A	área integrada sob a curva de intensidade relativa de emissão quimiluminescente vs tempo na presença de íons metálicos
A_0	área integrada sob a curva de intensidade relativa de emissão quimiluminescente vs tempo na ausência de íons metálicos
AA	absorção atômica
ACN	acetonitrila
DMF	dimetil formamida
DMSO	dimetil sulfóxido
DNPO	oxalato de bis-(2,4-dinitrofenil)
DPA	9,10-difenilantraceno
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
F	fluoróforo
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HIMI ⁺	imidazol protonado
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho
I máx	altura máxima alcançada no gráfico de intensidade relativa de emissão quimiluminescente vs tempo
I pico	altura relativa de pico obtida nas medições em sistema em fluxo
I	intensidade de emissão quimiluminescente

IMI	imidazol
IV	infravermelho
M ⁿ⁺	íon metálico
ppb	partes por bilhão
ppm	partes por milhão
QL	quimiluminescência
t máx	tempo referente ao I máx
t	tempo total de emissão quimiluminescente
TCPO	oxalato de bis-(2,4,6-triclorofenil)
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
UV	ultravioleta
vs	em relação a
W _{1/2}	largura a meia altura de I _{max}

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

I.1 - APRESENTAÇÃO

O presente trabalho iniciou a implementação de uma nova técnica dentro da linha de pesquisa de estudos cinéticos para elucidação de mecanismos de reações combinados com o desenvolvimento de métodos analíticos alternativos.

Assim, optou-se inicialmente por estudar a aplicação da reação quimiluminescente de oxidação do luminol por peróxido de hidrogênio, em meio aquoso, ativada por íons metálicos. A aplicação analítica deste sistema já se encontra bem documentada na literatura, desde 1962 por Babko et al.¹, existindo publicações recentes com o objetivo de otimização das condições experimentais e ampliação dos campos de aplicação. Do estudo dessa literatura iniciamos os nossos experimentos conforme descrito no capítulo II, o que permitiu adquirir certa experiência nos estudos desse tipo de reação.

No capítulo III estão descritas investigações da reação quimiluminescente de oxidação de ésteres-oxalatos por peróxido de hidrogênio, catalisada por imidazol, cujas aplicações analíticas ainda são restritas.

Recentemente, foi apresentado como tese de doutoramento neste Instituto de Química, os estudos realizados por Cassius V. Stevani, sob orientação do Prof. Dr. Wilhelm J. Baader². Estes estudos tiveram como objetivo a elucidação do mecanismo dessa reação e em muito auxiliou os nossos estudos. Ao leitor que queira aprofundar mais conhecimentos sobre o assunto, recomendamos a leitura dessa tese.

A apresentação desta dissertação consta de uma introdução geral (capítulo I). Os capítulos II e III apresentam inicialmente uma introdução ao sistema químico estudado seguida dos nossos estudos.

I.2 - QUIMILUMINESCÊNCIA

I.2.1 - Definição

Uma reação quimiluminescente pode ser formulada como o inverso de uma reação fotoquímica. Em uma reação fotoquímica ocorre absorção de fótons por uma substância, esta vai para o estado eletronicamente excitado e através de uma reação química, forma-se o produto no estado fundamental².

Em uma reação quimiluminescente, ocorre uma reação química, que leva à produção de uma substância no estado eletronicamente excitado, que pelo decaimento para o estado fundamental emite radiação eletromagnética (UV, visível ou IV)². Para que a emissão ocorra na região do visível, a energia mínima necessária é de $180 \text{ kJ.mol.L}^{-1}$.⁽³⁾

I.2.2 - Classificação dos fenômenos luminescentes

A quimiluminescência é um dos fenômenos luminescentes. Convencionalmente, a fonte de energia responsável por iniciar o processo de emissão de radiação tem sido utilizada como um prefixo ao termo luminescência. Entretanto, em alguns casos a fonte de energia responsável pela geração do

estado eletronicamente excitado tem sido identificada incorretamente. Por exemplo, fenômenos classificados como sono- ou termoluminescência podem ser, na realidade, casos especiais de quimiluminescência (tabela I.1)³.

I.2.3. - Requisitos para uma reação ser quimiluminescente

Para a reação química ser quimiluminescente, três critérios devem ser obedecidos:

- 1) a reação química deve ser exotérmica para gerar energia suficiente para a produção de espécies no estado eletronicamente excitado;
- 2) deve existir um caminho de reação favorável e eficiente para a formação de espécies no estado excitado e;
- 3) deve existir um caminho para que as espécies químicas excitadas formadas ou percam sua energia como fóton ou sejam capazes de transferir a energia eficientemente para um fluoróforo, através de processos que apresentem rendimento quântico luminescente relativamente grande⁴.

Em competição com o caminho quimiluminescente ocorrem vários processos não quimiluminescentes. Esses processos estão representados no esquema I.1 através das equações I.1 a I.3⁽⁴⁾.

I.2.4. - Rendimento quântico quimiluminescente

A intensidade da quimiluminescência (I) gerada por um sistema é uma

Tabela I.1 - Classificação dos fenômenos luminescentes³

Nome	Características
Luminescência	Emissão de radiação UV, visível, IV de uma molécula ou um átomo, resultante da transição de um estado eletronicamente excitado a um estado de energia menor (geralmente o estado fundamental)
Fotoluminescência	Luminescência na qual o modo de excitação é a absorção de radiação UV, visível ou IV
Fluorescência	Fotoluminescência de curta duração, a partir de um estado eletronicamente excitado singlete.
Fosforescência	Fotoluminescência de longa duração, a partir de um estado eletronicamente excitado triplete.
Quimiluminescência	Luminescência na qual a molécula no estado eletronicamente excitado é produzida por uma reação química
Bioluminescência	Quimiluminescência na qual a radiação é emitida por organismos vivos ou sistemas derivados
Eletroquimiluminescência	Quimiluminescência em solução, na qual o estado eletronicamente excitado é produzido por reações de transferência de elétrons de alta energia
Quimiluminescência gerada no eletrodo	Quimiluminescência produzida na superfície do eletrodo
Eletroluminescência	Luminescência a partir de descargas elétricas
Termoluminescência	Luminescência de sólidos em aquecimento moderado
Sonoluminescência	Luminescência a partir da exposição a ondas de ultrassom.
Candoluminescência	Luminescência a partir de sólidos incandescentes
Piroluminescência	Luminescência a partir de metais em chamas

função do tempo, dependente do rendimento quântico quimiluminescente, Φ , (número de fótons emitidos por moléculas de A ou B) e do número de moléculas que reagem por unidade de tempo, como mostrado pela equação 1.4, onde $k_1[C]$ refere-se a taxa de decomposição do intermediário ⁴.

$$I = k_1[C] \Phi \quad (1.4)$$

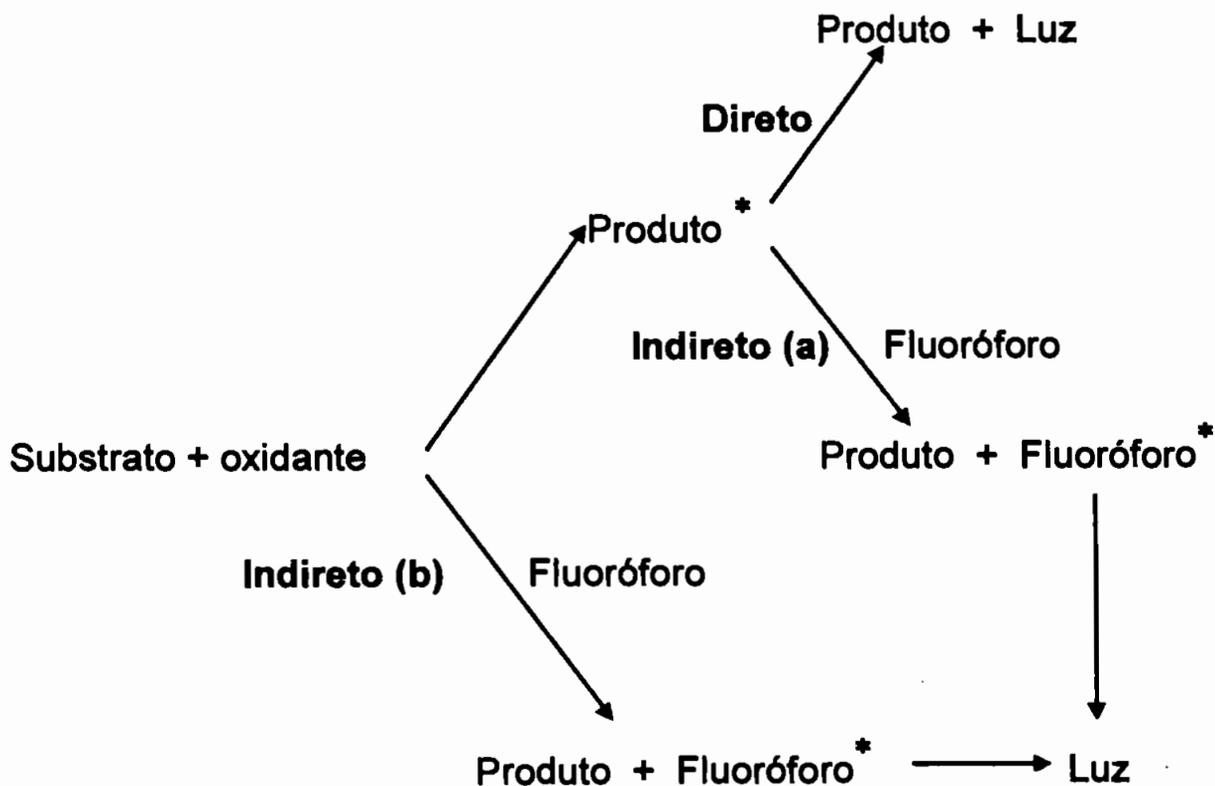
O rendimento quântico quimiluminescente, Φ é igual ao produto das eficiências dos processos químicos e físicos envolvidos. Φ_R refere-se ao rendimento quântico químico (ou a fração de moléculas reagentes que percorrem o caminho quimiluminescente "correto" resultando na produção do intermediário necessário), Φ_E representa a eficiência na produção de espécies no estado excitado (isto é, a probabilidade de que a decomposição do intermediário leve a formação de uma molécula no estado eletronicamente excitado (1.5). Em sistemas envolvendo uma etapa de transferência de energia, é adicionado um termo extra Φ_{TE} na equação 1.5, que se refere a eficiência da etapa de transferência de energia ⁴.

$$\Phi = \Phi_R \Phi_E \Phi_L (\Phi_{TE}) \quad (1.5)$$

1.2.5. - Classificação das reações quimiluminescentes

Uma reação quimiluminescente pode ser classificada como direta ou indireta, dependendo da espécie química responsável pela emissão de radiação

(esquema I.2). No modo direto, a reação gera a espécie química no estado excitado, que é responsável pela emissão de radiação. No modo indireto (a), a espécie química no estado excitado, cujo decaimento de energia levaria a emissão de radiação como no caso direto, transfere a energia a fluoróforos também chamados de ativadores, que então emitem radiação. Ou ainda, no modo indireto (b), a espécie química no estado excitado, extremamente reativa, transfere a energia a fluoróforos, levando-os ao estado eletronicamente excitado e estes, ao retornarem ao estado fundamental, emitem radiação. No modo indireto (a) e (b) o espectro de emissão não é determinado pelo reagente quimiluminescente consumido, mas pelo fluoróforo³.



Esquema I.2 - Classificação das reações quimiluminescentes

I.2.6 - Aplicações de reações quimiluminescentes em química analítica

Reações quimiluminescentes ocorrem na fase sólida, líquida ou gasosa. Há vários artigos de revisão⁵⁻¹⁶ enfocando o potencial das reações quimiluminescentes, particularmente na química analítica, para determinação de íons metálicos, ânions inorgânicos e produtos cancerígenos em uma variedade de matrizes ambientais e clínicas.

Dentre as vantagens da detecção quimiluminescente, incluem a alta sensibilidade e uma faixa linear de concentração do analito ampla, através de uma instrumentação relativamente simples. A alta sensibilidade dos procedimentos é obtida principalmente pela ausência da necessidade de uma fonte de radiação, eliminando o espalhamento Raman, Rayleigh e ruídos relacionados com a fonte, permitindo à fotomultiplicadora ser operada em potencial relativamente alto comparado ao aplicado na fluorescência convencional³.

A emissão quimiluminescente pode ser caracterizada por parâmetros como comprimento de onda, intensidade e taxa de aumento ou de decaimento da emissão. O comprimento de onda de emissão e o rendimento quântico são afetados pela natureza do fluoróforo, polaridade do solvente, temperatura e por processos físicos secundários os quais podem suprimir o estado excitado. A intensidade de emissão é dependente da velocidade da reação quimiluminescente, da eficiência em gerar moléculas no estado excitado e em reações quimiluminescentes indiretas, da natureza e concentração do fluoróforo³.

Do ponto de vista analítico, a intensidade de emissão quimiluminescente é o parâmetro mais significativo e pode ser usada para quantificar a espécie que

determina a velocidade de reação. A intensidade pode ser medida como uma resposta transiente ou por integração com relação ao tempo de emissão³.

A versatilidade analítica da detecção quimiluminescente depende ainda do ajuste das condições de reação, de maneira que somente um dos componentes da reação atue como reagente limitante, enquanto outros reagentes estejam presentes em excesso³.

A baixa seletividade é uma das principais limitações analíticas da detecção quimiluminescente. A utilização de sistemas de análise com soluções em fluxo tem a vantagem de acomodar um tratamento químico *on line* para fornecer um certo grau de seletividade à análise. A combinação da detecção quimiluminescente com a seletividade da cromatografia líquida vem aumentando as potencialidades das reações quimiluminescentes. Na prática, a sensibilidade da detecção quimiluminescente e a seletividade da cromatografia líquida devem ser balanceadas contra a incompatibilidade da melhor fase móvel para separação e das melhores condições para a reação³.

I.2.7 - Reações quimiluminescentes mais estudadas para finalidades analíticas

Muitas reações quimiluminescentes na fase líquida envolvem a oxidação de substâncias aromáticas, cujas estruturas estão representadas na figura I.1.

A seguir estão descritas as principais características das condições de reação para alguns dos substratos quimiluminescentes.

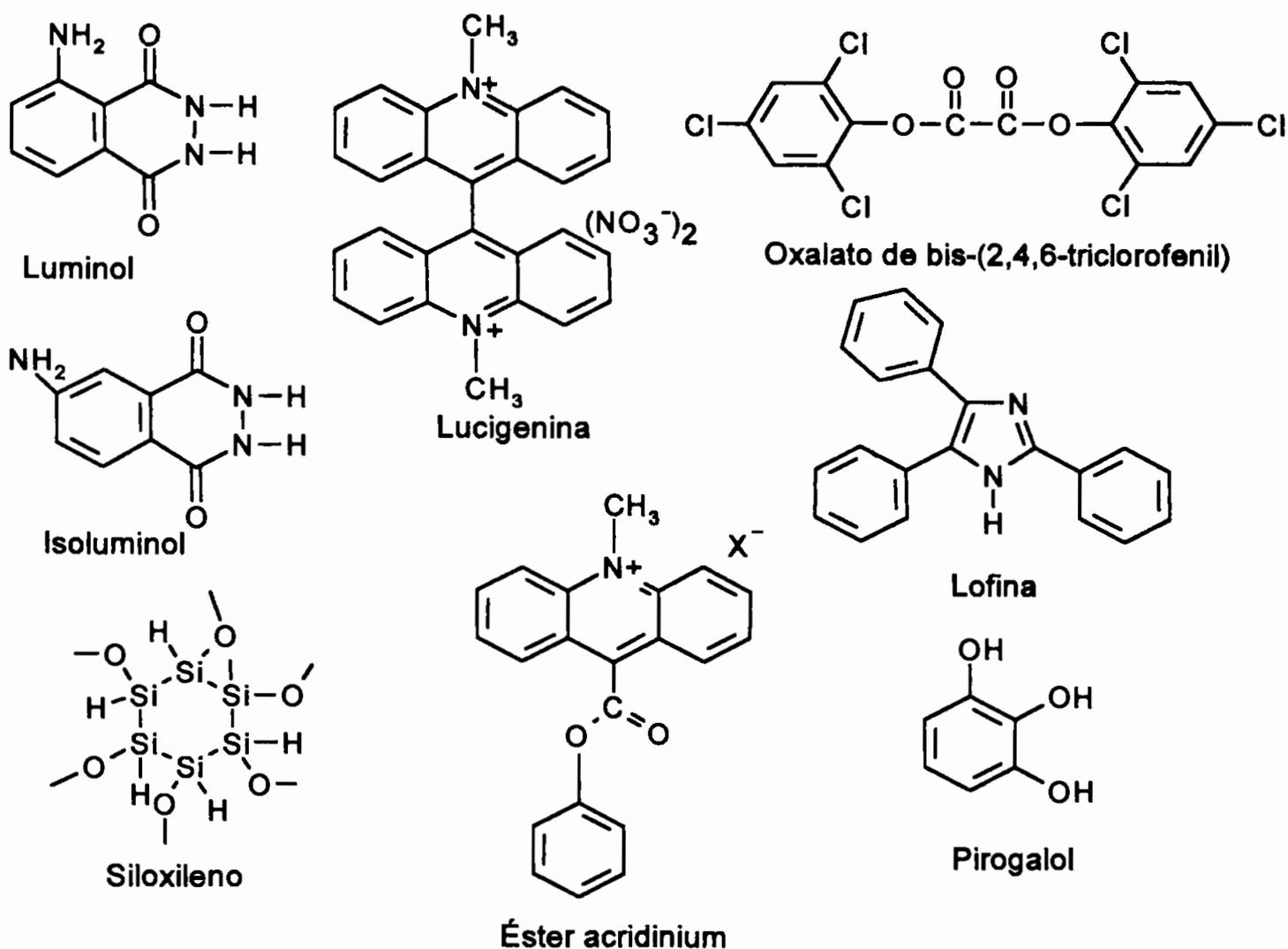


Figura I.1 - Substratos quimiluminescentes mais comumente estudados

Luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) foi descoberto por W. Lommel e a primeira publicação foi feita por Albrecht, em 1928. O mecanismo da oxidação do luminol, na presença de peróxido de hidrogênio e íons metálicos de transição e em solução alcalina (pH 10-11), não está totalmente elucidado. Sabe-se que com a oxidação do luminol, forma-se 3-aminofalato no estado excitado, que então emite radiação. A quantidade de energia liberada na oxidação é de cerca de 90 kcal.mol^{-1} , (baseada no balanço das energia de ligação) muito maior que a quantidade de energia necessária para emissão de radiação em 425 nm (67 kcal.mol^{-1})¹⁷.

A reação de oxidação da lucigenina (dinitrato de 10,10'-dimetil-9,9'-biacridinium) por peróxido de hidrogênio ocorre em meio básico, formando N-metil acridona no estado excitado. A emissão de radiação é ativada por vários íons metálicos, incluindo Bi(III), que não apresenta ação ativadora para a reação do luminol. O produto excitado, N-metil acridona, é insolúvel em água, dificultando uma trabalho quantitativo. A adição de surfactantes evita a precipitação⁴.

A quimiluminescência de peróxi-oxalatos envolve a oxidação de vários ésteres oxalatos por peróxido de hidrogênio, na presença de fluoróforos. Os ésteres oxalatos mais conhecidos são TCPO (oxalato de bis-(2,4,6-triclorofenil)), DNPO (oxalato de bis-(2,4-dinitrofenil)) e 2-NPO (oxalato de bis-(2-nitrofenil)). A intensidade de emissão é dependente do éster, da acidez do meio e da adição de ácidos ou bases fracas, enquanto o comprimento de onda é característico do fluoróforo. Devido a insolubilidade do TCPO e DNPO em água e a susceptibilidade à hidrólise, principalmente do segundo reagente, solventes orgânicos como acetato de etila ou acetonitrila têm sido utilizados para obter maior solubilidade e estabilidade, aumentando as possibilidades de aplicação analítica. Algumas tentativas para aumentar a estabilidade do sistema incluem o uso de micelas no meio de reação ou utilização de reatores sólidos contendo TCPO, onde o reagente é lentamente dissolvido em um sistema em fluxo. A reação quimiluminescente de peróxi-oxalatos com detecção em *post-column* tem sido utilizada para detecção de compostos fluorescentes ou que se tornam fluorescentes após derivatização, devido a sua compatibilidade com eluição por gradiente e operações de fase normal ou reversa³.

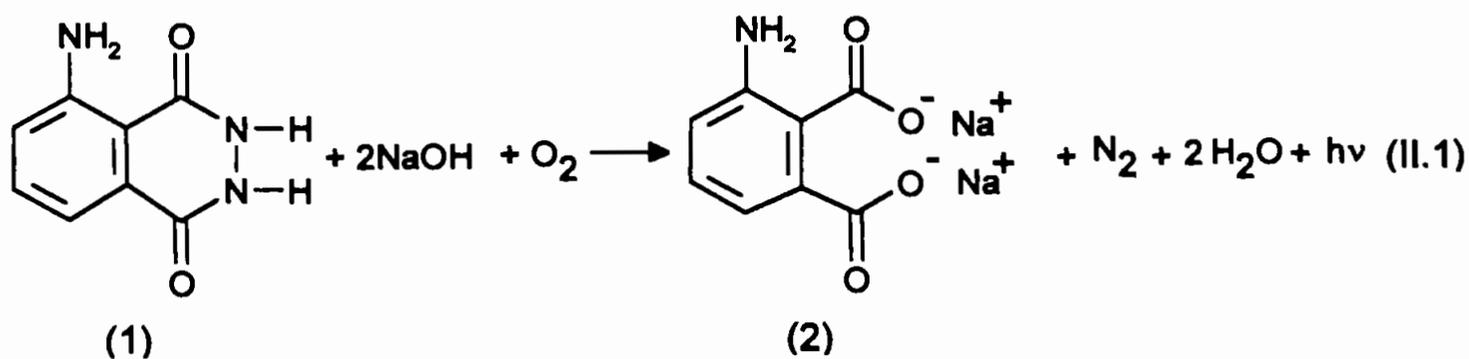
CAPÍTULO II

REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DO LUMINOL POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

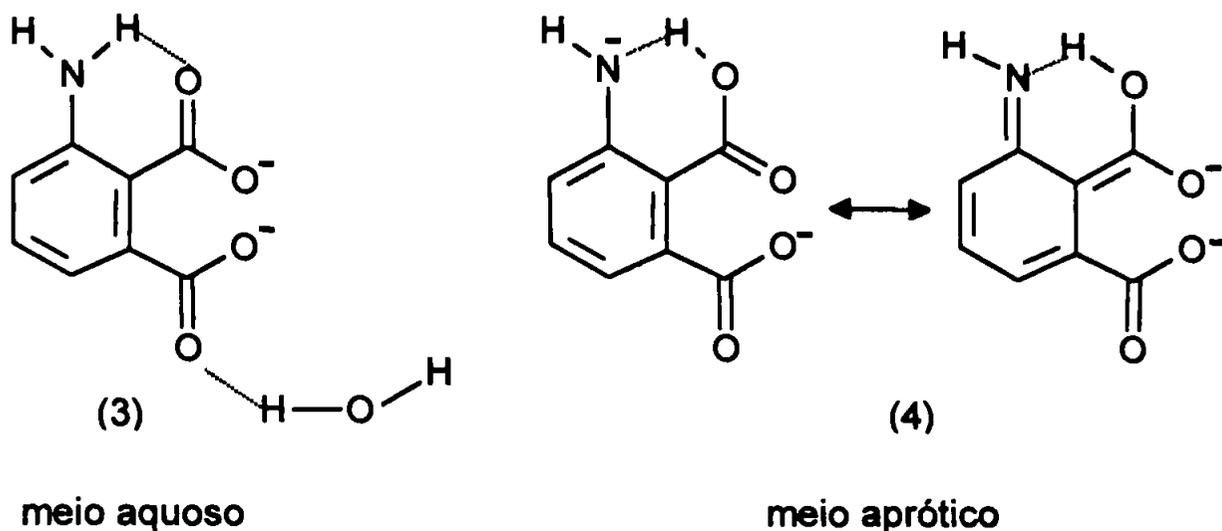
CAPÍTULO II - REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DO LUMINOL POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

II.1 - INTRODUÇÃO

A reação de oxidação de luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) (1) por oxigênio ou peróxido de hidrogênio, em meio básico, com geração de quimiluminescência, pode ser representada pela equação geral II.1. O luminol é convertido em um ânion duplamente carregado e subseqüentemente é oxidado ao estado singlete excitado, que emite radiação ao decompor-se formando o íon aminoftalato (2)¹⁸.

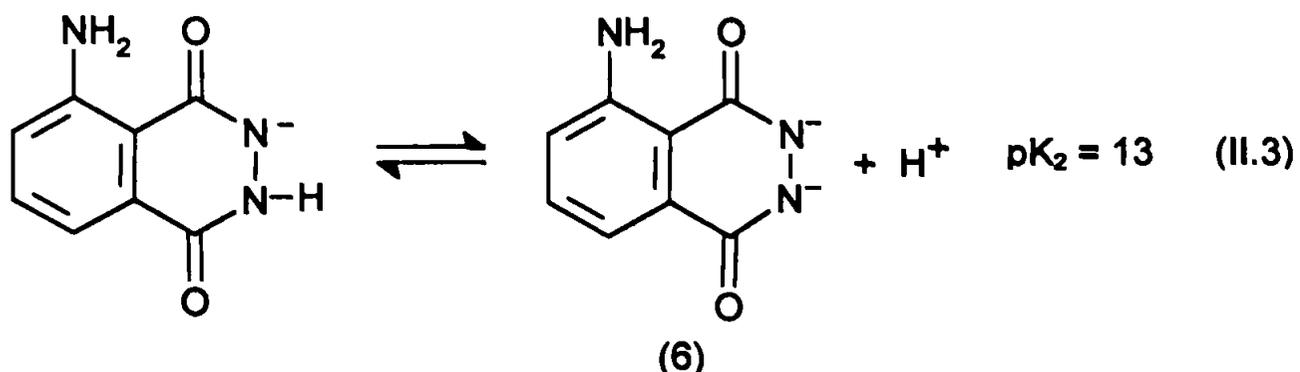
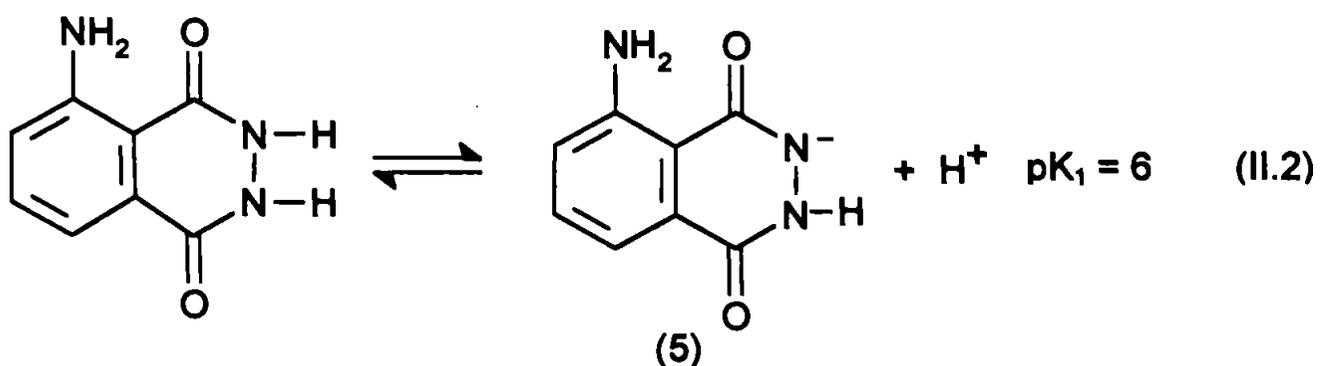


O máximo de quimiluminescência do luminol ocorre em 425 e 480 nm, em meio aquoso e aprótico (DMF, DMSO), respectivamente. Estes máximos são atribuídos às diferentes espécies (3) e (4), respectivamente¹⁹.



A presença de uma base é essencial, pois a reação de oxidação do luminol inicia com a formação de um ânion. O luminol monoânion (5) é a espécie predominante em solução aquosa alcalina, enquanto o luminol diânion (6) é formado em solução aprótica, se for utilizado t-butóxido como base. Em uma mistura de água/DMSO são observadas as formas aniônicas (5) e (6)¹⁹.

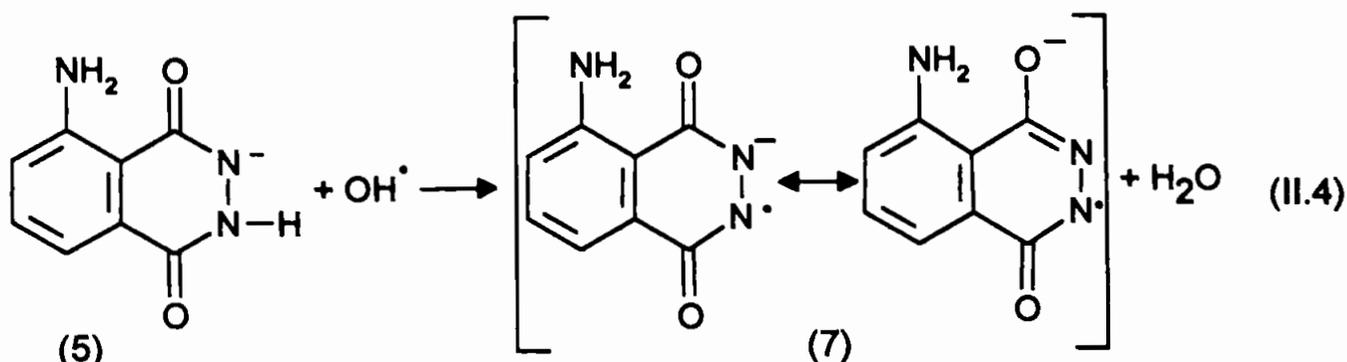
O equilíbrio ácido-base do luminol pode ser escrito como:²⁰



Em sistemas apróticos como DMSO e DMF, é observado um alto rendimento quântico. A eficiência de excitação não é influenciada, em extensão considerável, pela temperatura, polaridade do solvente ou presença de supressores. A reação quimiluminescente ocorre tendo o oxigênio molecular como oxidante. Não é necessário um ativador para formar o luminol diânion (6), somente uma base forte¹⁹.

Em sistemas próticos, somente o oxigênio não é suficiente para a oxidação do luminol, sendo necessário a presença de ativadores tais como íons metálicos de transição complexados ou não, além do peróxido de hidrogênio. A hipótese mais razoável é que, em solução aquosa, é necessário a formação do luminol ânion radical (7), que então reage rapidamente com um oxidante (equação II.4)¹⁹.

Outros oxidantes como hipoclorito de sódio, ferricianeto de potássio ou persulfato de potássio apresentam rendimentos quânticos menores comparados com H₂O₂-hemina¹⁹.



meio aquoso

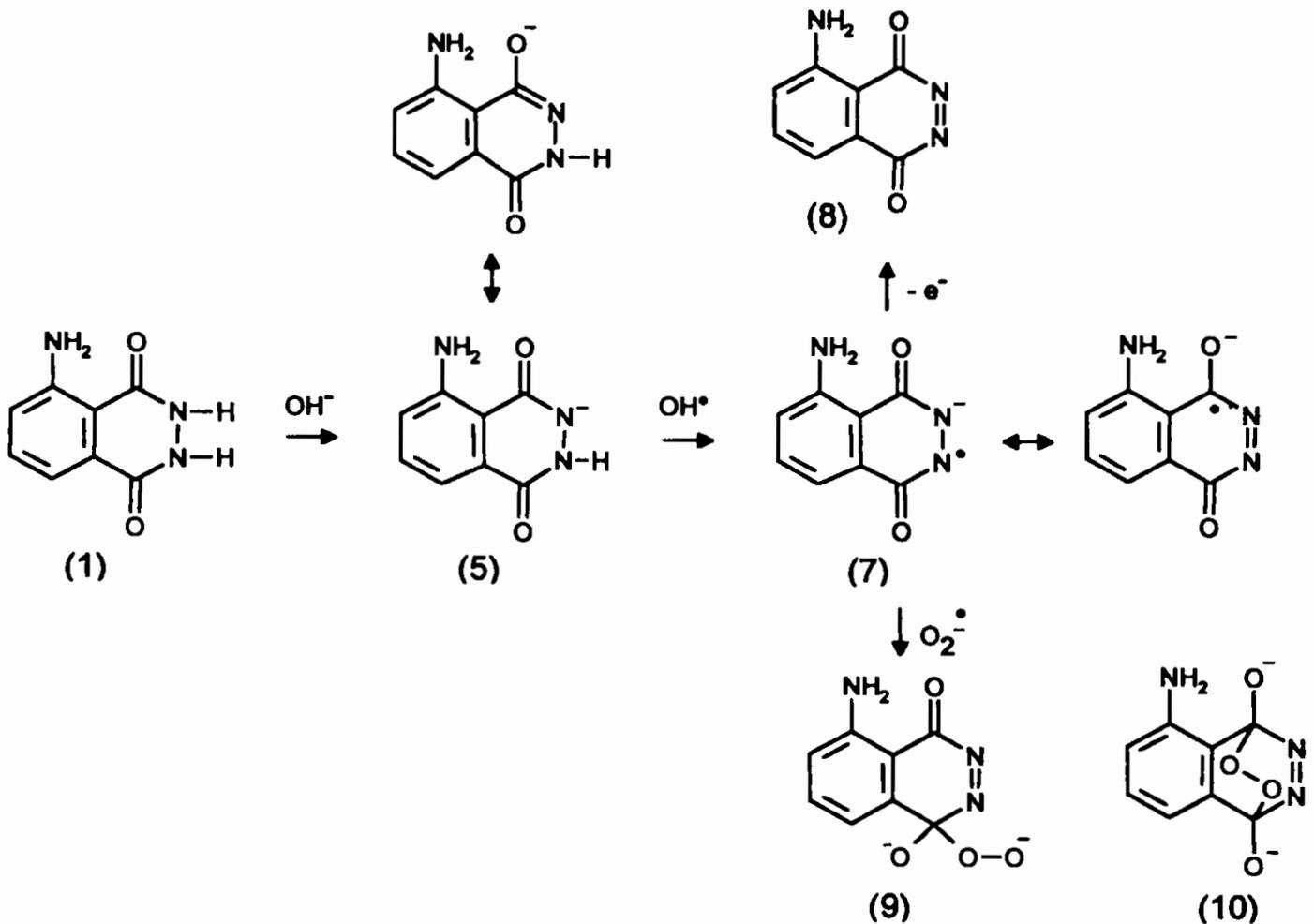
O esquema II.1 representa a sinopse de um provável mecanismo para a reação quimiluminescente, em solventes próticos¹⁹.

Interpretação de experimentos cinéticos mostraram um produto de oxidação de dois elétrons, diazoquinona desidroluminol (8), como intermediário. Não há certeza se a diazoquinona é o intermediário em condições variadas de reação. Dependendo da espécie que reage com o ânion radical (7), O_2 ou $O_2^{\bullet -}$, forma-se o peróxido (9) que pode ser um radical ou um ânion. O peróxido (9) também pode ser formado a partir da diazoquinona (8). O peróxido (9) sofre ciclização, formando o endoperóxido (10), muito reativo¹⁹.

Embora o completo conhecimento dos mecanismos das reações e dos fatores essenciais para as etapas de produção de radiação sejam necessários para a otimização de métodos analíticos, tem sido possível na maioria dos casos, utilizar a detecção quimiluminescente empiricamente, como uma ferramenta na química analítica¹⁹.

Desde que foi primeiramente publicada por Albrecht em 1928, a reação quimiluminescente do luminol tem sido a mais utilizada para determinação de espécies orgânicas e inorgânicas. Em meio aquoso contendo excesso de luminol e peróxido de hidrogênio, ao menos 20 íons metálicos, tais como Co(II), Cr(III), Fe(III), Fe(II) e Mn(II), ativam ou inibem a reação, apresentando limites de detecção na faixa de 10^{-11} a 10^{-8} mol.L⁻¹. Estes baixos limites de detecção tornam o sistema interessante para determinação de íons metálicos em amostras do meio ambiente e também na análise de materiais biológicos²¹.

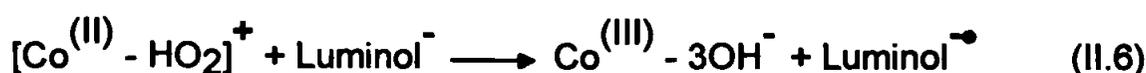
Medições de intensidade da radiação emitida podem ser utilizadas para quantificar a concentração do íon metálico que determina a velocidade da reação. A duração da emissão quimiluminescente é função da natureza e da concentração do íon metálico¹⁸.



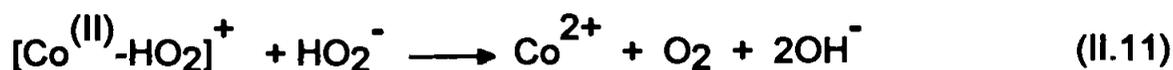
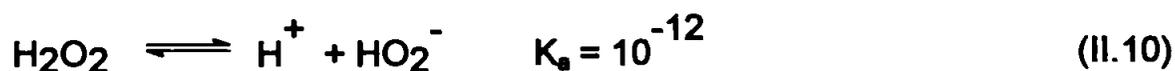
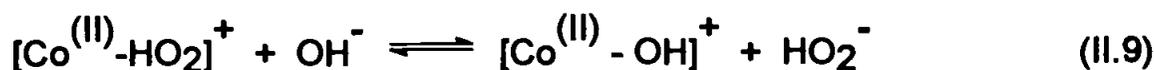
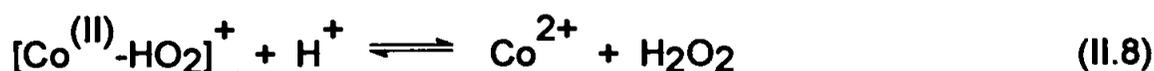
Esquema II.1 - Esquema dos possíveis intermediários envolvidos no mecanismo da reação quimiluminescente do luminol, em meio aquoso¹⁹.

T. G. Burdo e W. R. Seitz²² realizaram estudos comparando luminol e hidrazida do antraceno, para determinar a importância do complexo Co(II) -luminol na luminescência. A intensidade da emissão quimiluminescente foi aproximadamente a mesma para o ambos, apesar da hidrazida do antraceno ser incapaz de formar complexo bidentado estável com íon metálico, por não apresentar grupo amino em sua estrutura. Assim, descartou-se a hipótese de que o complexo Co(II) -luminol seja um intermediário importante. Os resultados indicaram

que um intermediário essencial para a quimiluminescência é o complexo $[\text{Co}^{(\text{II})}-\text{HO}_2]^+$ (equação II.5). Este intermediário reage com o luminol, em meio aquoso básico, para produzir o radical na etapa determinante da velocidade (equação II.6). Então, o luminol ânion radical reage com peróxido de hidrogênio, emitindo radiação quimiluminescente (equação II.7).



Os equilíbrios II-8 a II-11 estão apresentados de maneira simplificada para ilustrar qualitativamente que mudanças nas concentrações dos vários reagentes afetam a intensidade de emissão quimiluminescente²², conforme será abordado no estudo da verificação da influência da acidez e concentração de peróxido de hidrogênio, discutido nos itens II.4.2.4 e II.4.2.7.



O aumento da velocidade de reação na presença de íons metálicos tem sido denominado de efeito catalítico. Mas esta designação é questionável, pois os ciclos catalíticos dificilmente são identificados e na maioria dos casos, as espécies que afetam a velocidade de reação são consumidas. Assim, os íons metálicos devem ser considerados como ativadores^{21, 23}.

A instrumentação para realizar medições de intensidade de radiação quimiluminescente consiste na forma mais simples, de uma célula de amostra, um equipamento para adição de reagentes e outro para detecção da radiação emitida. Geralmente, o comprimento de onda não é discriminado. Dependendo da configuração do sistema e do método de adição de reagente, os sistemas podem ser classificados como estático, de fluxo contínuo ou cromatográfico. Alguns sistemas em fluxo são operados no modo de parada súbita (*stopped flow*). Em muitos casos, é introduzida uma coluna cromatográfica em sistemas em fluxo. A escolha do método para mistura dos reagentes depende, em parte, da velocidade de reação pois o sinal de emissão é transitório e rápido. Para o método de análise com soluções em fluxo, o máximo de emissão depende da velocidade da mistura da amostra e reagentes³.

A conjugação da quimiluminescência e análise por injeção em fluxo (FIA) é extremamente atrativa obtendo-se elevada sensibilidade, rapidez, mistura reprodutível de reagentes e detecção quase imediata do sinal^{24,25}.

Utilizam-se junções em "T" ou em "Y" para obter mistura rápida e reprodutível da amostra e dos reagentes em sistemas em fluxo. Ambos são misturados imediatamente antes de passarem pela bobina de mistura posicionada em frente à fotomultiplicadora. A bobina ou a célula, é escolhida de maneira a obter máxima emissão de radiação da solução. Parâmetros como vazão dos reagentes,

comprimento e diâmetro dos tubos, ordem de adição dos reagentes afetam a forma e altura do pico, dispersão e tempo de residência médio^{3,24}.

O principal problema para aplicação analítica na determinação de íons metálicos de transição é a seletividade, pois muitos íons metálicos ativam a reação quimiluminescente. Assim, tem sido necessário realizar tratamentos na amostra, envolvendo separações ou eliminação de espécies interferentes. Os métodos de separação propostos envolvem uso de colunas de troca iônica, separação cromatográfica, otimização da concentração dos reagentes para reduzir interferentes ou o uso de agentes complexantes mascarantes³.

A tabela II.1 apresenta alguns exemplos de determinação de íons metálicos baseada na reação quimiluminescente de oxidação do luminol por peróxido de hidrogênio.

Íon Co(II) é o que tem sido determinado com maior sensibilidade, seguido de Cu(II), Cr(III) e Fe(II).

✗ A análise para íons Fe(II) exemplifica um tipo de seletividade. Se oxigênio está presente, Fe(II) é o único íon metálico que ativa a luminescência do luminol na ausência de peróxido de hidrogênio. Outros oxidantes são eliminados e todo Fe(III) convertido a Fe(II) por tratamento com sulfito. O método foi utilizado para análise de águas naturais, sem tratamento prévio de amostras²⁶.

A especificidade da reação para íons Cr(III) pode ser obtida na presença de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), pois a formação do complexo Cr(III)-EDTA é cineticamente lenta, enquanto outros íons metálicos tornam-se inativos quando complexados com EDTA. Íons Cr(VI) não ativam a reação^{27,28}.

J.L. Bowling et al.²⁹ observaram uma diminuição de 10% na quimiluminescência, quando soluções de Cr(III) e de EDTA foram misturadas 15

minutos antes da adição à solução de luminol e peróxido de hidrogênio, evidenciando que Cr(III) já se encontrava parcialmente complexado em solução.

A taxa de complexação de Cr(III)-EDTA é acelerada pela adição de íons bicarbonato, sal de manganês, aquecimento da solução por 30 minutos ou exposição da mistura ao ultra-som³⁰.

A tabela II.2 apresenta alguns trabalhos com o objetivo de desenvolvimento de método analítico para determinação de Cr(III), Cr(VI) e cromo total.

Geralmente, íons Cr(VI) são reduzidos a Cr(III), empregando sulfito em meio de ácido nítrico. Dessa maneira, é possível a especiação de Cr(III) e Cr(VI).

Os estudos de interferentes realizados por Seitz et al.²⁷ na determinação de Cr(III), empregando-se EDTA para mascarar demais íons metálicos, estão representados na tabela II.3.

Co(II) interfere mesmo em concentrações de 10^{-7} mol.L⁻¹ e Sn(IV) reduz a luminescência, provavelmente por oxidação de Cr(III) a Cr(VI).

Escobar et al.²⁸ observaram que na determinação de 1ppb de Cr(III), Fe(III) pode ser mascarado ajustando o pH da solução da amostra em 3,7 pois ocorre a formação de um complexo estável $[\text{Fe}(\text{OH})_2]^+$ eliminando o efeito interferente.

Não foi observado efeito de interferência na intensidade de luminescência quando os ânions Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , PO_4^{3-} foram adicionados nas concentrações indicadas na tabela II.3⁽²⁷⁾.

Bause et al.⁴⁶ testaram o efeito interferente de alguns ânions ($0,56 \text{ mol.L}^{-1}$) na quimiluminescência ativada por íons Cr(III). Como íons brometo aumentaram em oito vezes a luminescência, sugeriram a adição desse haleto na determinação de íons Cr(III) para aumentar a sensibilidade da análise.

Tabela II.1 - Alguns exemplos para determinações de íons metálicos baseadas na sua ação ativadora na reação quimiluminescente de oxidação do luminol por peróxido de hidrogênio.

Íons	Observações	Concentração	Referência
Co(II), Fe	Modo estático; uso de ácido hidróxi-etililenodiamina triacético para mascarar efeito de íons Fe; análise de sais de amônio e alcalinos de pureza especial	Curva de calibração: linear até 5×10^{-5} mol.L ⁻¹ ; limite de detecção 3×10^{-9} g.mL ⁻¹ para Fe e 1×10^{-10} g.mL ⁻¹ para Co(II)	31
Co(II)	Construção de cela de fluxo com membrana; adição de EDTA para reduzir emissão de fundo	Limite de detecção 10^{-10} mol.L ⁻¹	32
Co	Utilização de análise por injeção em fluxo	Faixa linear: 10^{-5} - 10^{-1} ppm e limite de detecção: 10^{-6} ppm	33
Co(II), Cu(II) e Fe(II)	Utilização de <i>stopped flow</i> , na ausência de H ₂ O ₂ , Fe(II) produz a maior intensidade, na presença de H ₂ O ₂ , Co(II), Cu(II) e Mn(II) aumentam mais que 50.000 vezes.	Estudo do efeito da mistura desses íons metálicos	34
Co(II)	Utilização de cromatografia líquida; análise direta de amostra de água filtrada e de água do mar, extração de Co(II) com tetracloreto de carbono e APDC	Limite de detecção: 5×10^{-12} mol.kg ⁻¹	35

Tabela II.1 - Alguns exemplos para determinações de íons metálicos baseadas na sua ação ativadora na reação quimiluminescente de oxidação de luminol por peróxido de hidrogênio (continuação)

Íons	Observações	Concentração	Referência
Co(II)	Análise por injeção em fluxo acoplado a cromatografia de íons; cloreto de bário para separar Co(II) de interferentes. Determinação direta de água de refrigeração sintética e de soluções padrões de Cu(II) contendo traços de Co(II)	Faixa linear acima de $1 \times 10^{-11} \text{ g.mL}^{-1}$ e limite de detecção: $1 \times 10^{-12} \text{ g.mL}^{-1}$	36
Co(II)	HPLC com coluna de troca catiônica para separar Co(II) de outros íons metálicos. Análise de farinha de arroz	Faixa linear: $5 \times 10^{-9} \text{ g.L}^{-1}$ a $1 \times 10^{-5} \text{ g.L}^{-1}$ e limite de detecção: $5 \times 10^{-10} \text{ g.L}^{-1}$	37
Co(II), Cu(II) e Fe(II)	Análise por injeção em fluxo com cromatografia de íons; utilização de ácido oxálico como fase móvel para separar Co(II), Cu(II) e Fe(II) em uma coluna de troca catiônica. Análise de mistura sintética	Limite de detecção: $6 \times 10^{-12} \text{ g.mL}^{-1}$ de Co(II), $8 \times 10^{-11} \text{ g.mL}^{-1}$ de Cu(II), $3 \times 10^{-10} \text{ g.mL}^{-1}$ de Fe(II) e $1 \times 10^{-10} \text{ g.mL}^{-1}$ de Cr(III)	38
Cu(II), H ₂ O ₂	Deteção da luminescência em placas fotográficas	Sensibilidade: $3 \times 10^{-8} \text{ g.mL}^{-1}$ de Cu(II) e $2 \times 10^{-7} \text{ g.mL}^{-1}$ de H ₂ O ₂	1
Fe(II) e Fe total, Mn(II) e Mn total	Análise por injeção em fluxo reverso, periodato de potássio como agente oxidante, controle de qualidade do tratamento de água para consumo	Faixa linear: até $1 \times 10^{-10} \text{ g.mL}^{-1}$ para Fe(II) e Mn(II), limite de detecção: $3 \times 10^{-12} \text{ g.mL}^{-1}$ para Fe(II) e $5 \times 10^{-12} \text{ g.mL}^{-1}$ para Mn(II)	39

Tabela II.1 - Alguns exemplos para determinações de íons metálicos baseadas na sua ação ativadora na reação quimiluminescente de oxidação de luminol por peróxido de hidrogênio (continuação)

Íons	Observações	Concentração	Referência
Fe(II)/Fe(III) e Fe total	Análise sequencial; luminol imobilizado em coluna de troca aniônica; ausência de H ₂ O ₂ ; redução de Fe(III) em uma coluna contendo Cu/Zn. Análise de águas naturais	Faixa linear: 1x10 ⁻⁹ a 1x10 ⁻⁸ g.mL ⁻¹ e limite de detecção: 4x10 ⁻¹⁰ g.mL ⁻¹	40
Hg(II)	Análise por injeção em fluxo automatizada; efeito inibidor de Hg(II) na atividade enzimática da álcool oxidase, com diminuição da produção de H ₂ O ₂	Faixa de determinação: 10-100 ppm	41
Mn(II)	Dois picos de emissão, onde o tempo para ocorrência do segundo pico aumenta com a diminuição de pH; uso de cianeto para mascarar o efeito de Ni(II), Fe(II), Co(II) e Cu(II)	Faixa linear: 0,01-10x10 ⁻⁸ g.mL ⁻¹	42
Mn(II)	<i>Stopped flow</i> ; ausência de H ₂ O ₂ e adição de cloreto de sódio; proposta de mecanismo para o efeito de cloreto de sódio. Análise de amostras biológicas certificadas	Limite de detecção: 1,8x10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹	43
Zn(II) e Cd(II)	Análise por injeção em fluxo; efeito de inibição devido Zn(II) e Cd(II) na quimiluminescência ativada por Co(II)	Faixa linear: 1-10x10 ⁻⁸ g.mL ⁻¹ de Zn(II) e 2-20 x10 ⁻⁸ g.mL ⁻¹ de Cd(II); limite de detecção: 5x10 ⁻¹⁰ g de Zn(II) e 3x10 ⁻¹⁰ g de Cd(II)	44

Tabela II.2 - Alguns exemplos para determinações de Cr(III)/Cr(VI), baseadas na sua ação ativadora na reação quimiluminescente de oxidação de luminol por peróxido de hidrogênio.

Íons	Observações	Concentração	Referência
Cr(III)	Sistema em fluxo. Análise de folhas de árvores, fígado bovino, soro humano	$(2-6) \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$	45
Cr(III), Cr(VI) e cromo total	Cr(VI) é reduzido em meio H_2O_2 /ácido clorídrico; sistema em fluxo. Análise de águas naturais.	(50-600) ppb	29
Cr(III) na presença de íons haletos	Sistema em fluxo. Análise de águas naturais	Limite de detecção: $1,3 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$	46
Cr(III)	Aumento da sensibilidade devido íons Br^- , eliminação da interferência de Mg^{2+} por diluição. Análise de água do mar	$3,3 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$	47
Cr(III), Fe(II) e Co(II)	Análise por injeção em fluxo	$10^{-10} - 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ de Cr(III), $10^{-8} - 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de Fe(II) e $10^{-9} - 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de Co(II).	48
Cr(III), Co(II) e H_2O_2	Determinação de Cr(III), Co(II) e H_2O_2	Limite de detecção: $1,3 \times 10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$ de Cr(III), $1,2 \times 10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$ de Co(II) e $17,6 \times 10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$ de H_2O_2	17

Tabela II.2 - Alguns exemplos para determinação de Cr(III)/Cr(VI), baseada na sua ação ativadora na reação

quimiluminescente de oxidação de luminol por peróxido de hidrogénio (continuação)

Íons	Observações	Concentração	Referência
Cr(III) e Cr(VI)	Determinação de Cr(III) e Cr(VI) (redução com sulfito); separação por cromatografia de íons. Análise de amostra de água certificada	Limite de deteção: 1×10^{-10} g	17
Cr(III) e Cr(VI)	Determinação de Cr(III) e Cr(VI) (redução com sulfito); separação por cromatografia de íons. Recuperação de Cr(III) em amostras de pele humana.	Limite de deteção: 5×10^{-7} g.L ⁻¹ de Cr(III) e Cr(VI)	50
Cr(III) e Co(II)	Separação por cromatografia de íons. Análise de vidros	Limite de deteção: $1,5 \times 10^{-8}$ g.mL ⁻¹ de Cr(III) e 5×10^{-11} g.mL ⁻¹ de Co(II)	51
Cr(III)	Análise por injeção em fluxo. Análise de prometazina devido seu efeito inibidor, em tabletes e xaropes contendo prometazina	Limite de deteção: 3×10^{-9} mol.L ⁻¹	52
Cr(III)	Análise por injeção em fluxo; aplicação em amostras de água e alimentos	Limite de deteção: 0,01ppb, faixa linear até 6 ppb	28

Tabela II.2 - Alguns exemplos para determinações de Cr(III)/Cr(VI), baseadas na sua ação ativadora na reação quimiluminescente de oxidação de luminol por peróxido de hidrogênio (continuação)

Íons	Observações	Concentração	Referência
Cr(III) e Cr(VI)	Determinação de Cr(III) e Cr(VI) (redução com sulfito); separação por cromatografia de íons. Análise de amostras de água	Limite de detecção: $5 \times 10^{-8} \text{ g.L}^{-1}$ de Cr(III) e $1 \times 10^{-7} \text{ g.L}^{-1}$ de Cr(VI)	53
Cr(VI)	Determinação de Cr(VI) (redução com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ imobilizado em uma coluna)	Limite de detecção: $2 \times 10^{-7} \text{ g.mL}^{-1}$	54
Cr(III), Cr(VI) e Cr total	Determinação de Cr total após redução prévia de Cr(VI) por tratamento com H_2O_2 em meio ácido. Análise de mistura sintética de ambas espécies e aplicação em águas de esgoto.	Faixa linear: $0,01-6 \times 10^{-9} \text{ g.mL}^{-1}$	55
Cr(III) e Cr(VI)	Determinação simultânea, após separação com coluna de troca iônica Dionex e redução de Cr(VI) com sulfito de potássio. Aplicação na análise de adesivos usados em teste de dermatite e amostra de água certificada	Faixa linear para ambos foi de $1-4 \times 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$ e limite de detecção: $1,2 \times 10^{-7} \text{ g.L}^{-1}$ para Cr(III) e $9 \times 10^{-8} \text{ g.L}^{-1}$ para Cr(VI)	56

Tabela II.3 - Efeito interferente de cátions ou ânions na determinação de Cr(III).

Condições experimentais : [luminol]: 10^{-3} mol.L⁻¹, [H₂O₂]: 10^{-2} mol.L⁻¹, [Cr(III)]: 1×10^{-7} mol.L⁻¹, tampão [KOH-H₃BO₃]: 10^{-1} mol.L⁻¹, [EDTA]: 2×10^{-3} mol.L⁻¹ na amostra e branco, [EDTA]: 10^{-3} mol.L⁻¹ no luminol e tampão, pH ~10,2⁽²⁷⁾.

Cátion ou ânion interferente	Concentração do interferente (mol.L ⁻¹)	Intensidade relativa
nenhum	-	100
Co(II)	10^{-7}	125
Co(II)	5×10^{-7}	219
Fe(III)	5×10^{-6}	124
Fe(III)	10^{-5}	159
Fe(II)	2×10^{-5}	143
Fe(II)	4×10^{-5}	186
Sn(IV)	2×10^{-5}	92
Sn(IV)	6×10^{-5}	65
Mg(II), Ca(II), Zn(II), Ba(II), Sr(II), V(V), Pb(II), Mn(II), Al(III), Ni(II), Ag(I), Cu(II), Hg(I), Cd(II)	10^{-4}	100
Cl ⁻	0,1	100
SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻	0,01	
PO ₄ ³⁻	10^{-4}	

II.2 - OBJETIVOS DO PRESENTE ESTUDO

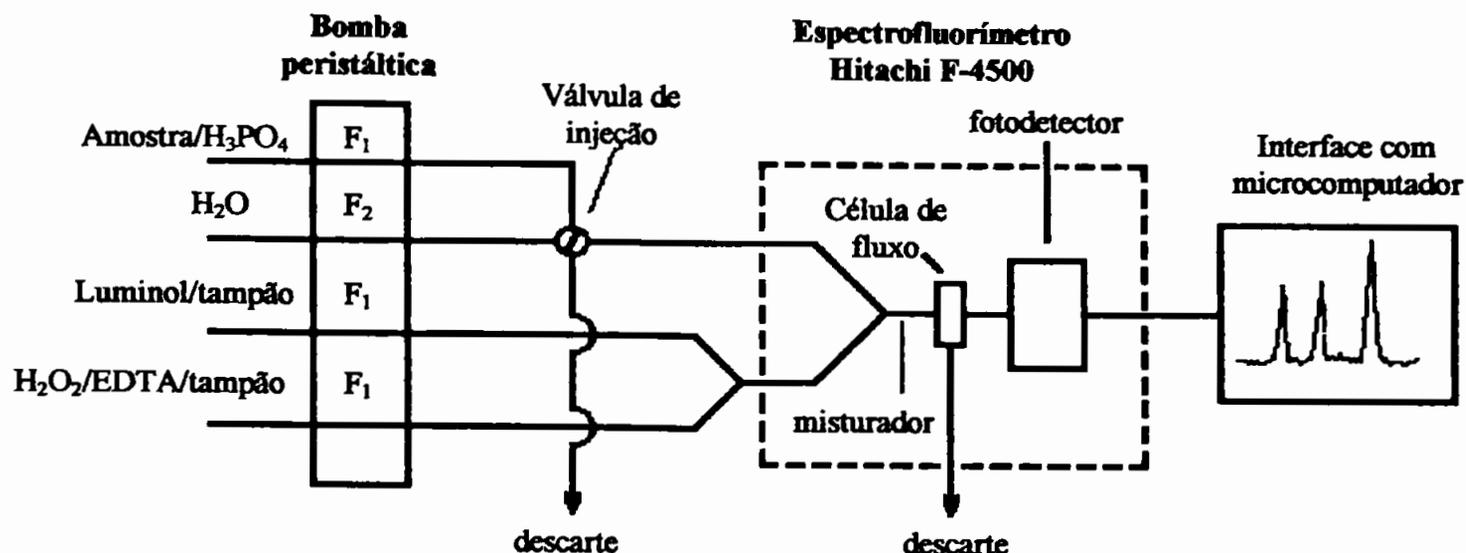
Nesta fase do trabalho foi montado o sistema de injeção em fluxo, com algumas modificações ao descrito por Escobar et al.²⁸, com a finalidade de fazer um estudo dos fatores que influenciam a determinação de íons Cr(III), a partir da reação de oxidação de luminol por peróxido de hidrogênio, em meio tamponado por $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$.

II.3 - PARTE EXPERIMENTAL

A mistura dos reagentes para determinação de Cr(III) através da reação de oxidação do luminol foi feita através de um sistema de injeção em fluxo, conforme o esquema II.2.

Usou-se uma bomba peristáltica Gilson Minipuls 3, contendo 4 canais dispostos horizontalmente, para conduzir os reagentes através de tubos de polietileno (0,8 mm de diâmetro interno), à célula espectrofluorimétrica Hellma cujo volume interno é de 0,3mL. O fluxo diferenciado para o carregador foi obtido através de tubos isoversílicos (3mm de diâmetro interno). Aos canais de luminol, peróxido de hidrogênio e amostra foram conectados tubos de *tygon* (1 mm).

Utilizando água deionizada como fluxo carregador, a amostra foi injetada no fluxo resultante da mistura dos reagentes luminol e peróxido de hidrogênio. A mistura do luminol e peróxido de hidrogênio foi feita através de junções em "T" confeccionadas em acrílico. A amostra foi introduzida no fluxo da água, através de um injetor manual confeccionado também em acrílico.



Esquema II.2 - Diagrama esquemático para determinação de íons Cr(III) através do monitoramento da quimiluminescência produzida pela reação de oxidação do luminol por peróxido de hidrogênio, por injeção em fluxo. $F_1 = 2,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $F_2 = 13,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A intensidade de emissão quimiluminescente foi continuamente monitorada em 425 nm, através de espectrofluorímetro Hitachi F-4500 acoplado a computador.

Todas as análises foram feitas com a fotomultiplicadora ajustada em 950V, sem discriminação de comprimento de onda de excitação, abertura de fenda de excitação ajustada em 1 nm (mínimo) e a de emissão em 20 nm (máximo), lâmpada de excitação apagada e o *shutter* da lâmpada fechado.

A linha base foi aquela resultante da mistura da solução de luminol com peróxido de hidrogênio. O sinal analítico foi obtido pela diferença entre a intensidade com a amostra e a linha de base. A altura de pico, I_{pico} , foi relacionada com a concentração dos diversos reagentes. O ruído na linha base corresponde a

26% da altura de pico obtida para solução contendo ácido fosfórico $3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em água deionizada.

Medidas de pH foram obtidas com potenciômetro Metrohm 654 equipado com eletrodo de vidro combinado Metrohm. Para calibração diária do eletrodo de vidro, utilizou-se pH=7 (tampão fosfato) e pH=9 (tampão borato).

II.3.1) REAGENTES

$\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Merck), H_2O_2 30% (Merck), H_3PO_4 (Merck), EDTA (Merck) e luminol (Aldrich) utilizados na preparação das soluções são de pureza analítica e foram usados sem purificação prévia.

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada pelo sistema Nanopure - Ultrapure Water System da Barnstead.

II.3.1.1) Soluções estoque para sistema em fluxo

Solução de Cr(III) $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$: $4,0 \times 10^{-2} \text{ g}$ de $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em água e diluídos a 100,0 mL em um balão volumétrico.

Solução de H_3PO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$: 2,86 mL de ácido fosfórico concentrado foram diluídos com água a 100,0 mL em balão volumétrico.

Solução de EDTA $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$: 3,72 g de EDTA foram dissolvidos em 20,0 mL de solução KOH 1 mol.L^{-1} e diluídos a 100,0 mL em um balão volumétrico. Solução de EDTA $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ foi preparada a partir desta solução por diluição com água.

Solução de luminol $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$: $17,72 \times 10^{-2} \text{ g}$ de luminol foram dissolvidos

em 3,5mL de solução de KOH 1mol.L^{-1} , diluídos a 100,0 mL em um balão volumétrico e mantido em frasco plástico ao abrigo da luz.

II.3.1.2) Soluções de trabalho

Soluções padrões de Cr(III) 10^{-8} - 10^{-7}mol.L^{-1} em H_3PO_4 $3 \times 10^{-4}\text{mol.L}^{-1}$: foram diariamente preparadas por diluição da solução estoque.

Solução de luminol $1 \times 10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$: 10,0mL da solução estoque 10^{-2}mol.L^{-1} foram diluídos a 100,0 mL em um balão volumétrico, com solução tampão $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ $0,2\text{mol.L}^{-1}$ (pH 10,50).

Solução de peróxido de hidrogênio $5,0 \times 10^{-2}\text{mol.L}^{-1}$ em EDTA $1 \times 10^{-5}\text{mol.L}^{-1}$: 0,48 mL de H_2O_2 30% e 1,0 mL de solução $1 \times 10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$ de EDTA foram diluídos em um balão volumétrico de 100,0 mL com solução tampão $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ $0,2\text{mol.L}^{-1}$ (pH 10,50).

II.3.1.3) Padronização da solução estoque de H_2O_2 ⁵⁷

0,25 mL da solução estoque de H_2O_2 30% foram diluídos com água deionizada em um balão volumétrico de 50,0 mL. 5,0 mL desta solução foram adicionados em um erlenmeyer de 125,0 mL contendo 40,0 mL de água e 5,0 mL de H_2SO_4 20% (v/v). A titulação foi feita com solução padrão de KMnO_4 $2,05 \times 10^{-2}\text{mol.L}^{-1}$ (padronizada com $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$), até viragem para cor de rosa.

A reação de padronização pode ser descrita pela equação II.12



II.3.1.4) Padronização da solução de Cr(III)^{57,58}

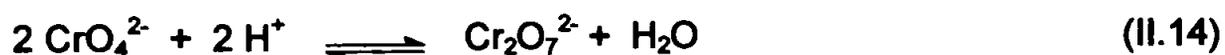
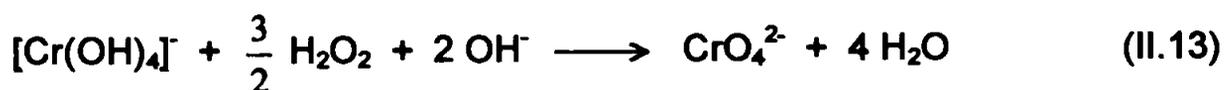
Em um erlenmeyer de 250,0 mL foram adicionados 99,76mL de uma solução de Cr(III) $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 2,0 mL de H_2O_2 30%, 100,0 mL de água e solução KOH 1 mol.L^{-1} até tornar o meio básico.

A solução foi mantida sob aquecimento para oxidação a CrO_4^{2-} e eliminação do peróxido de hidrogênio em excesso. Adição de H_2SO_4 10%(v/v) resultou em solução levemente alaranjada devido conversão a $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$. O volume final da solução foi acertado com água a 50,0 mL em um balão volumétrico.

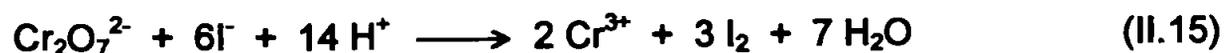
Em um erlenmeyer de 125,0 mL, a uma alíquota de 9,99 mL foram adicionados cristais de KI e 50,0 mL de água. A solução resultante foi titulada com $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \cdot 5,3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (padronizada com KIO_3 utilizando método iodométrico). Próximo a viragem, foram adicionados 2,0 mL de solução indicadora de amido e a titulação prosseguiu até a mudança para incolor. O volume médio foi de 12,3 mL de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ e a concentração obtida para a solução de Cr(III) foi de $1,08 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

As reações de padronização da solução de Cr(III) podem ser descritas pelas equações II.13 a II.17.

•Oxidação de Cr(III) a $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$



•Padronização de $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ com $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$



II.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.4.1 - MODO ESTÁTICO

A uma célula de quartzo contendo luminol e peróxido de hidrogênio sob agitação magnética, a adição de íons Cr(III) através de um capilar de *tygon* acoplado a uma seringa (1,0 mL) produziu aumento na intensidade de luminescência que alcançou o máximo e então decaiu dentro de aproximadamente 4 segundos. A solução final está representada na legenda da figura II.1.

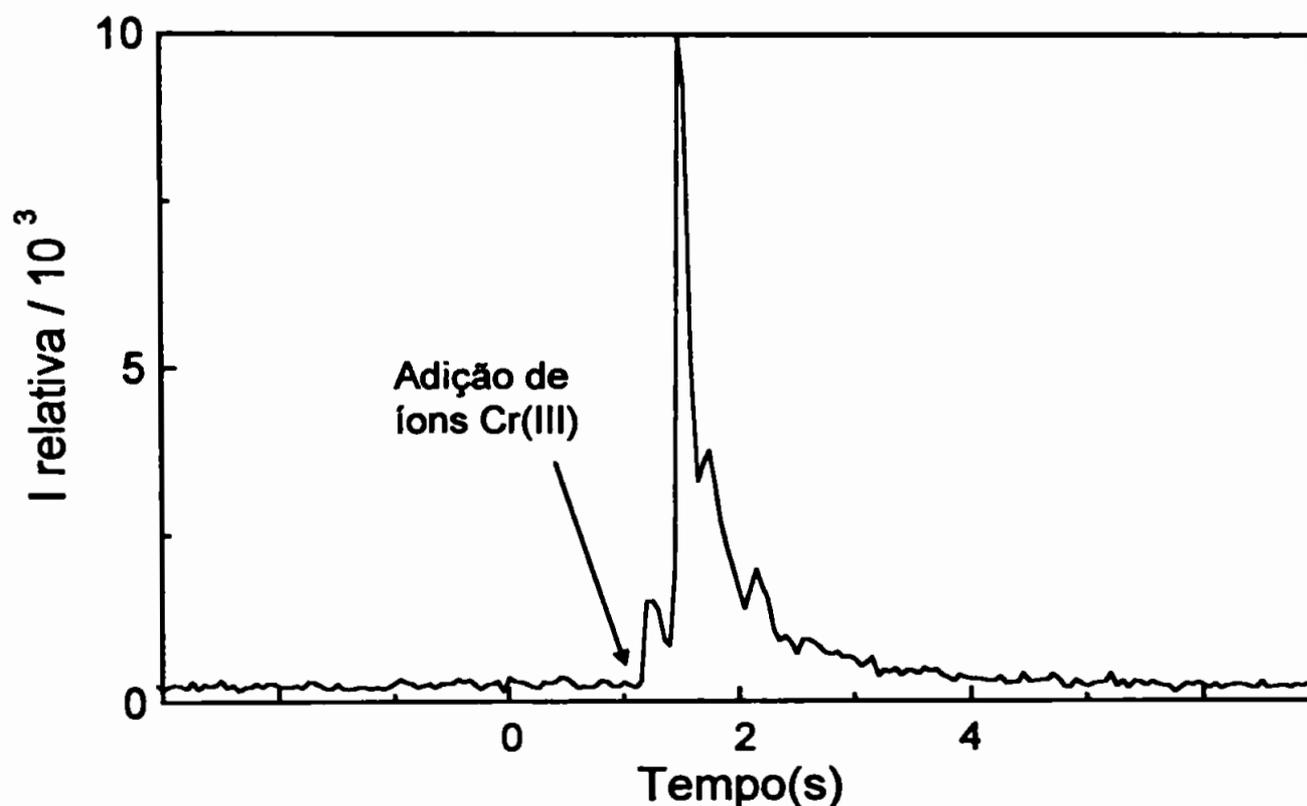


Figura II.1 - Variação da intensidade relativa de emissão quimiluminescente com o tempo. Adição de $[\text{Cr(III)}] \sim 5 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ em solução de $[\text{H}_3\text{PO}_4]: 3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, em célula contendo soluções de $[\text{H}_2\text{O}_2]: 1,4 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[\text{luminol}]: 1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, ambos preparados em solução tampão $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 10,90).

II.4.2 - MEDIÇÕES EM SISTEMA COM SOLUÇÕES EM FLUXO.

Um aspecto importante a considerar na medição da intensidade relativa de radiação é que a espécie emissora deve estar em frente ao detector, enquanto a reação quimiluminescente estiver ocorrendo. A introdução da amostra por injeção em fluxo permite efetuar medições logo após a mistura de reagentes. A vazão dos reagentes deve ser relativamente alta e o comprimento do misturador, reduzido.

Para os estudos em sistema por injeção em fluxo (esquema II.2), a melhor vazão para a água e demais reagentes foi de 13,4 e 2,3 mL.min⁻¹, respectivamente.

Os vários parâmetros estudados para otimizar o sinal analítico estão apresentados a seguir.

II.4.2.1) Influência do comprimento do misturador

Verifica-se na figura II.2 que a diminuição do comprimento do misturador (esquema II.2), posicionado anteriormente à célula de fluxo, produz aumento da intensidade de luminescência. Utilizou-se o menor comprimento para o misturador, uma vez que o tempo de duração da quimiluminescência para concentração de Cr(III)~5x10⁻⁷ mol.L⁻¹ é de aproximadamente 4 segundos (figura II.1).

II.4.2.2) Influência do volume de injeção da amostra

A influência do volume de injeção da amostra está representada na figura II.3. O aumento do volume de amostra na alça de amostragem produziu aumento do

sinal de emissão quimiluminescente. Passou-se a utilizar alça de amostragem cujo volume de injeção foi de 0,4 mL.

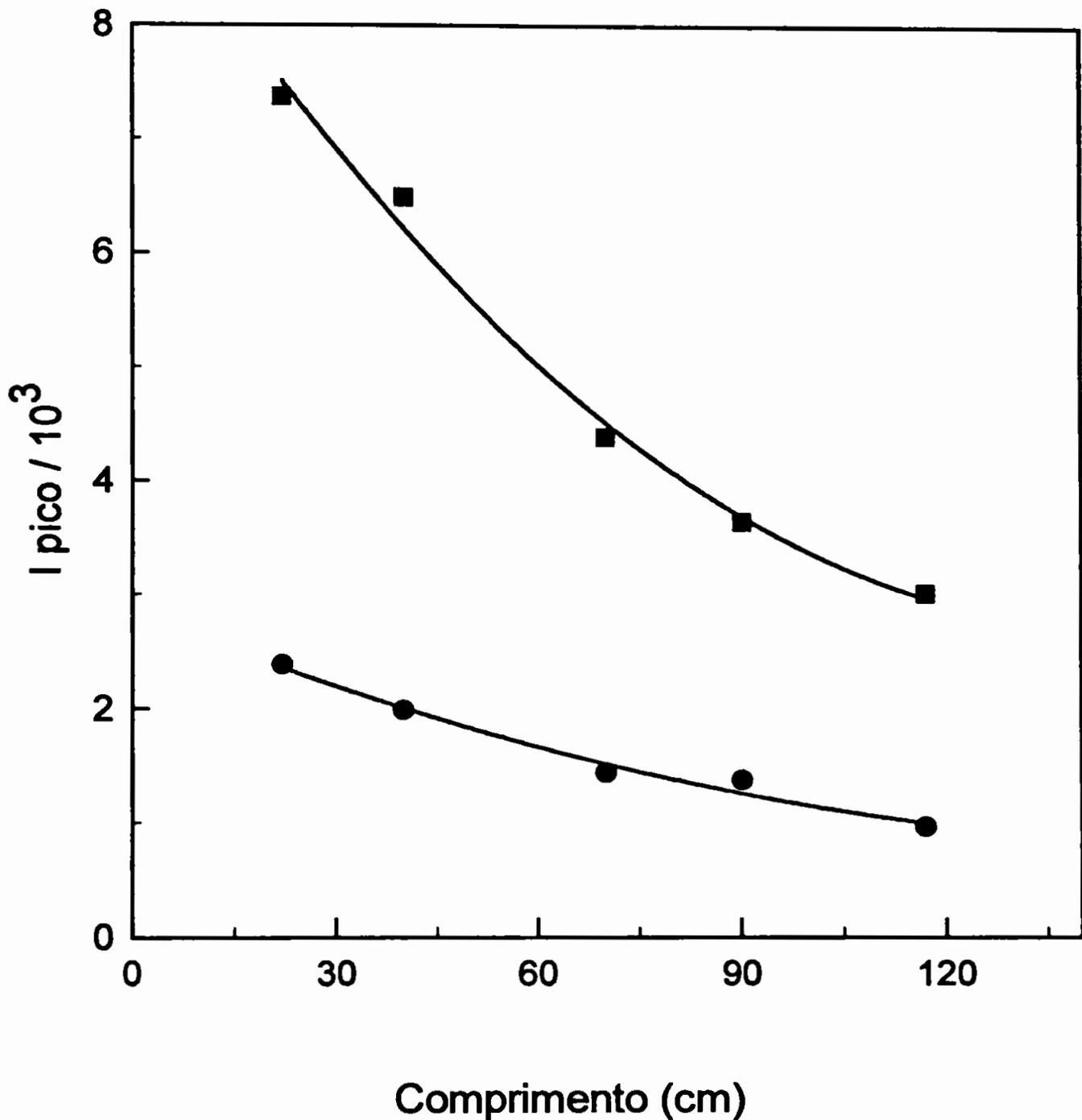


Figura II.2 - Variação da altura de pico com o comprimento do misturador. Condições experimentais: ● [Cr(III)] 1×10^{-7} mol.L⁻¹ e ■ [Cr(III)] $2,5 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹ em [H₃PO₄]: 3×10^{-4} mol.L⁻¹, [H₂O₂]: 0,14 mol.L⁻¹ e [luminol]: 1×10^{-3} mol.L⁻¹ preparados em solução tampão HCO₃⁻ / CO₃²⁻ 0,2 mol.L⁻¹ (pH 10,90).

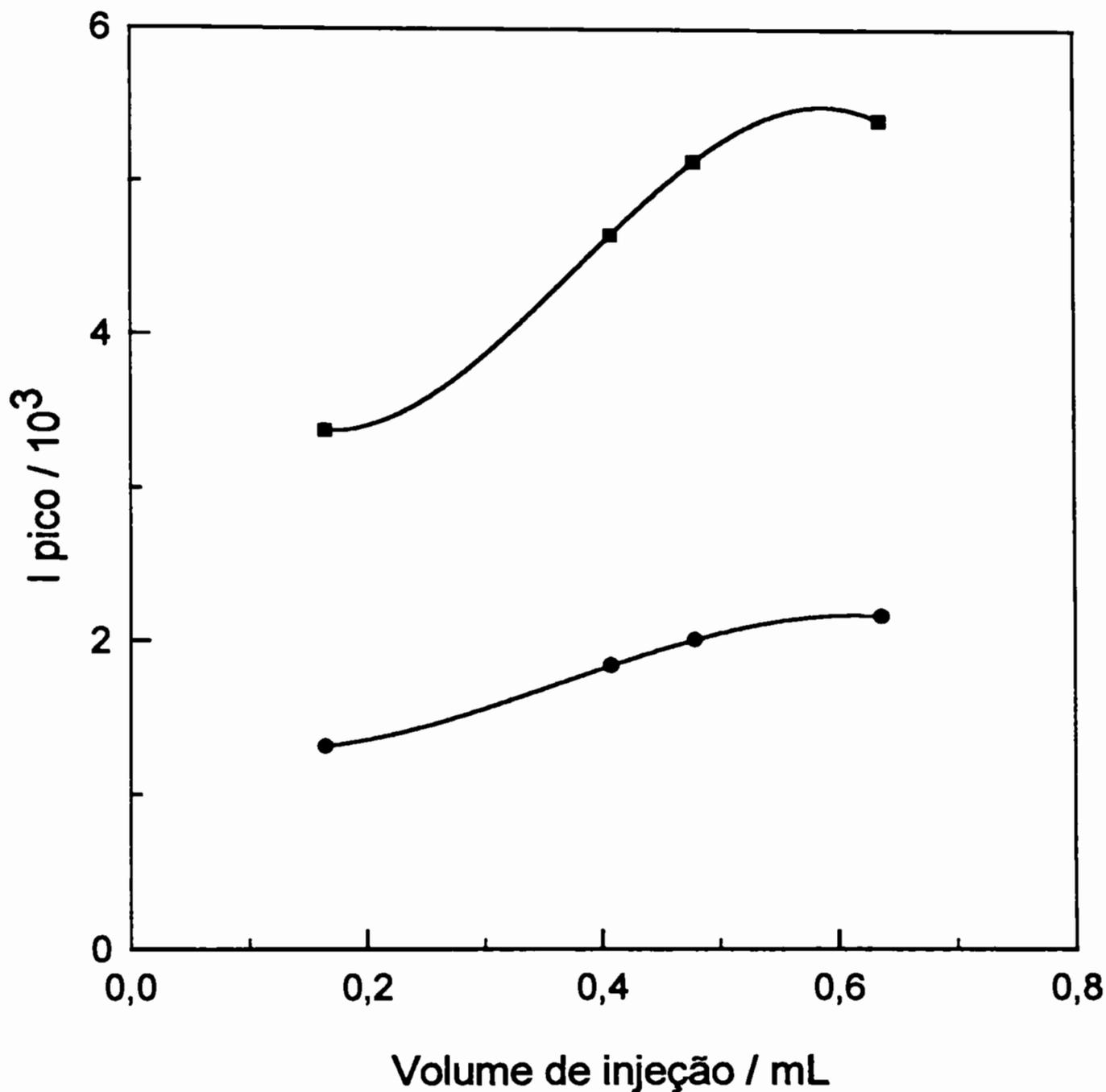


Figura II.3 - Influência do volume de injeção da amostra na altura de pico.

Condições experimentais: ● [Cr(III)] 1×10^{-7} mol.L⁻¹ e ■ [Cr(III)] $2,5 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹ em [H₃PO₄]: 3×10^{-4} mol.L⁻¹, [H₂O₂]: 0,14 mol.L⁻¹ em [EDTA]: 1×10^{-5} mol.L⁻¹ e [luminol]: 1×10^{-3} mol.L⁻¹ preparados em solução tampão HCO₃⁻ / CO₃²⁻ 0,2 mol.L⁻¹ (pH 10,90), m = 5 cm.

II.4.2.3) Influência da concentração de luminol

Observa-se na figura II.4 que para concentrações de luminol maiores que $8 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, a altura de pico se mantém aproximadamente constante. Portanto, foi escolhida a concentração de luminol $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ para estudos posteriores.

Para concentrações menores, observa-se uma correlação linear entre concentração do luminol e a altura de pico; para concentrações maiores, é observada auto-supressão, onde parte da luz emitida é absorvida¹⁹.

Além disso, como o luminol pode agir como um ligante bidentado, altas concentrações deste reagente levariam a complexação com o íon metálico envolvido, reduzindo a formação do complexo $[\text{Co}^{(\text{II})}-\text{HO}_2]^+$ (equação II.5)²².

II.4.2.4) Influência da concentração de peróxido de hidrogênio

Na figura II.5 observa-se que a intensidade de emissão atingiu um máximo quando foi empregado peróxido de hidrogênio em concentração $5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$.

A ocorrência de um máximo de quimiluminescência em uma faixa de concentração de peróxido de hidrogênio foi justificada por T. G. Burdo et al.²² nos estudos realizados considerando o íon $\text{Co}(\text{II})$ como ativador. Em baixas concentrações de peróxido de hidrogênio, a intensidade de emissão é proporcional a sua concentração, havendo formação de concentrações crescentes do complexo $[\text{Co}^{(\text{II})}-\text{HO}_2]^+$, que é o intermediário para a ocorrência da quimiluminescência (equação II.5). Quando a concentração de peróxido de hidrogênio é

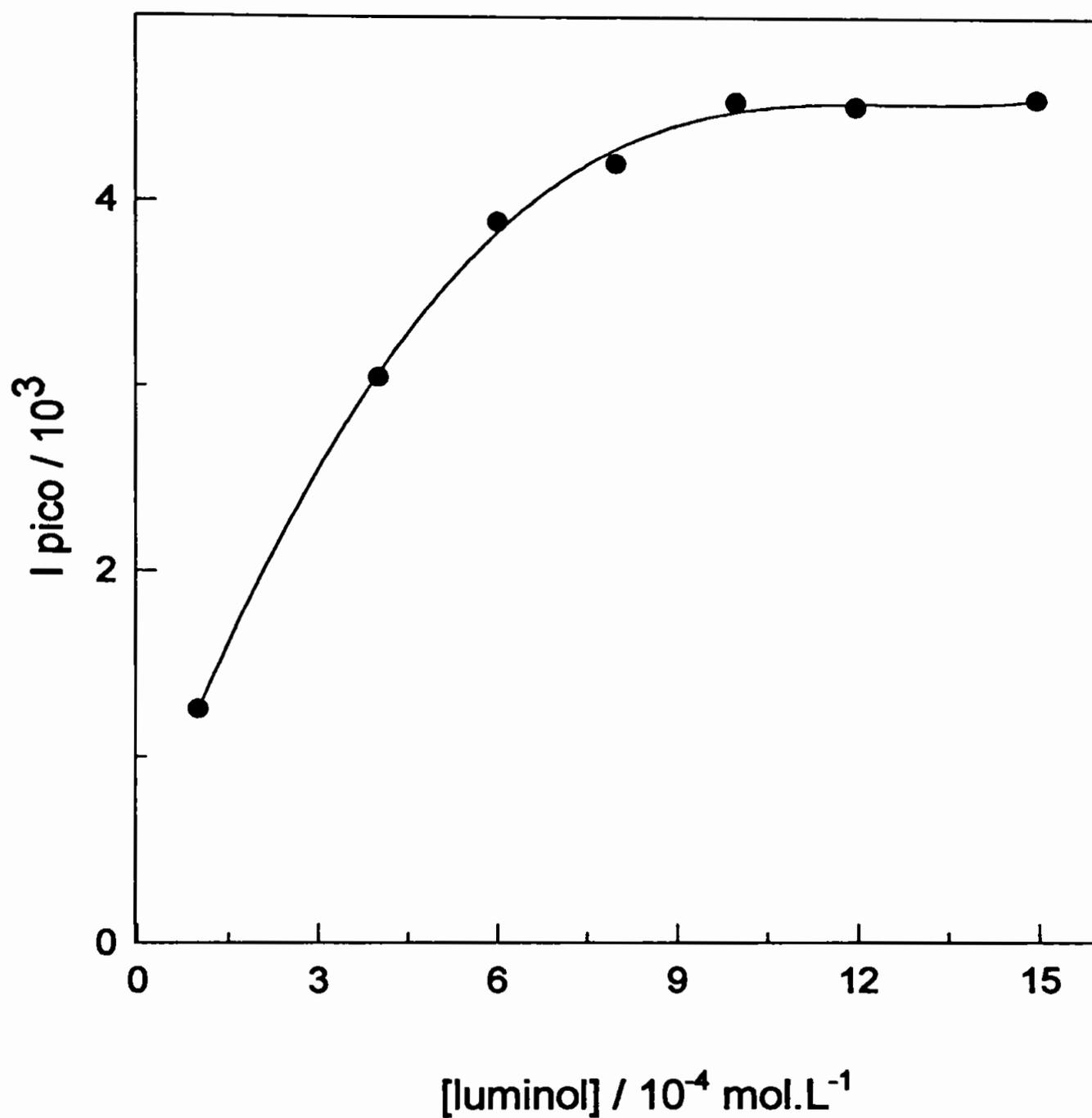


Figura II.4 - Dependência da altura de pico com a concentração de luminol.

Condições experimentais: [Cr(III)]: $2,5 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ em $[\text{H}_3\text{PO}_4]$: $3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]$:

$0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ em solução tampão $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 10,90), $m = 40 \text{ cm}$

suficientemente alta de modo que todo Co(II) está na forma de $[\text{Co}^{(\text{II})}-\text{HO}_2]^+$, a intensidade de emissão atinge um valor máximo. Com o aumento ainda maior da concentração de peróxido de hidrogênio, o complexo $[\text{Co}^{(\text{II})}-\text{HO}_2]^+$ reage com outra molécula de HO_2^- decompondo em H_2O e O_2 (equação II.11) com consequente destruição desse complexo intermediário e diminuição da intensidade de quimiluminescência.

Babko e Lukovskaya¹ observaram a possibilidade de inibição da emissão de luz pelo estabilizador contido no peróxido de hidrogênio. O fornecedor do peróxido de hidrogênio utilizado não discrimina o estabilizador usado.

II.4.2.5) Influência da concentração de EDTA na solução de peróxido de hidrogênio

O efeito da concentração de EDTA pode ser verificado na figura II.6. A adição de EDTA à solução de peróxido de hidrogênio tem como finalidade inativar o efeito de outros íons metálicos na análise específica de íons Cr(III) . Não ocorre variação significativa de intensidade de quimiluminescência na faixa estudada. Adição de EDTA $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ à solução de peróxido de hidrogênio produz um máximo de emissão quimiluminescente.

Como EDTA é utilizado como mascarante para os demais íons metálicos presentes nas soluções e impurezas dos reagentes, a quantidade adicionada deve ser suficiente para complexá-los.

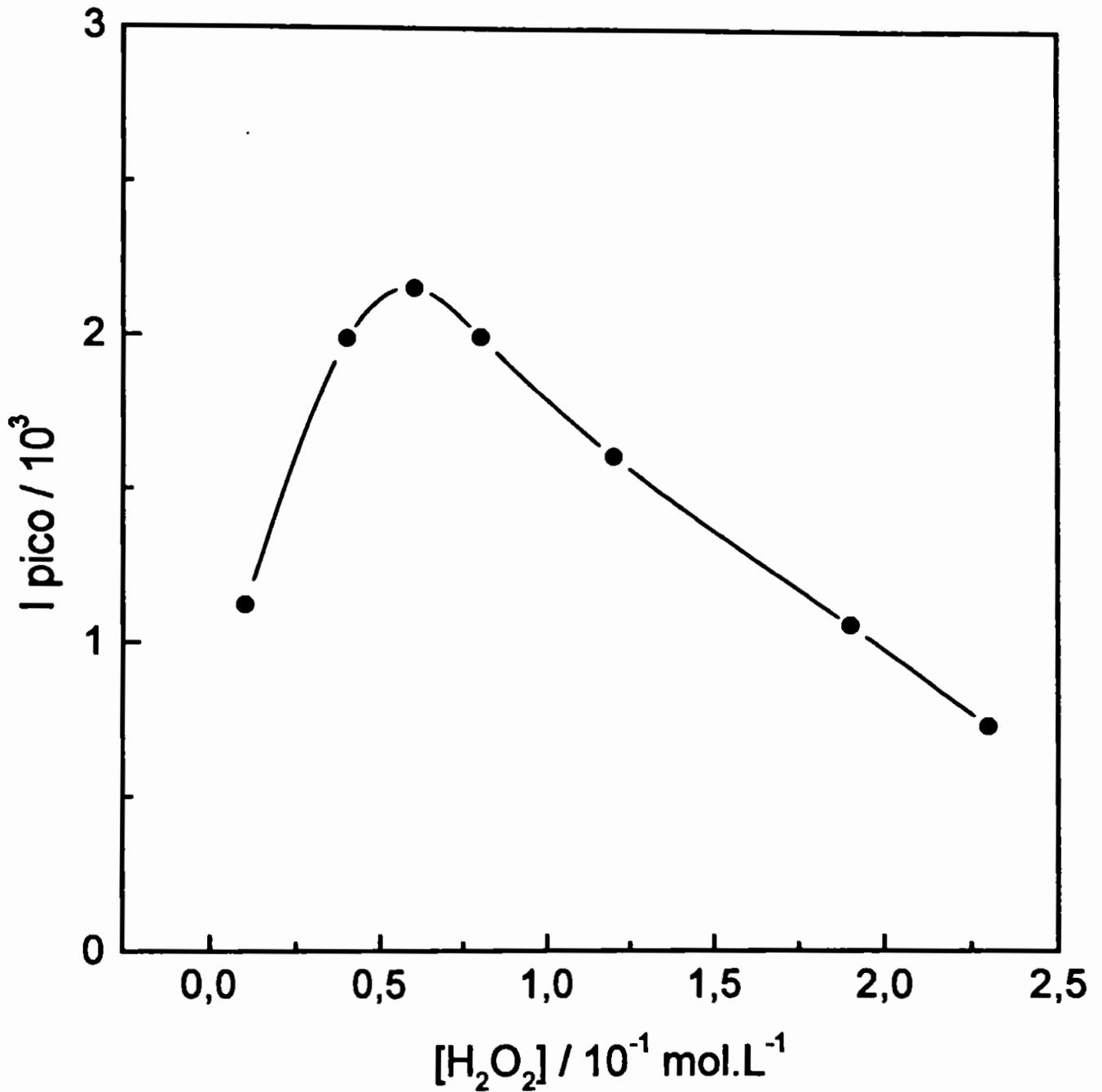


Figura II.5 - Variação da altura de pico com a concentração de peróxido de hidrogênio. Condições experimentais: $[Cr(III)]$ $1 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ em $[H_3PO_4]$: $3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $[luminol]$: $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em solução tampão HCO_3^- / CO_3^{2-} $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 10,90), $m = 40 \text{ cm}$.

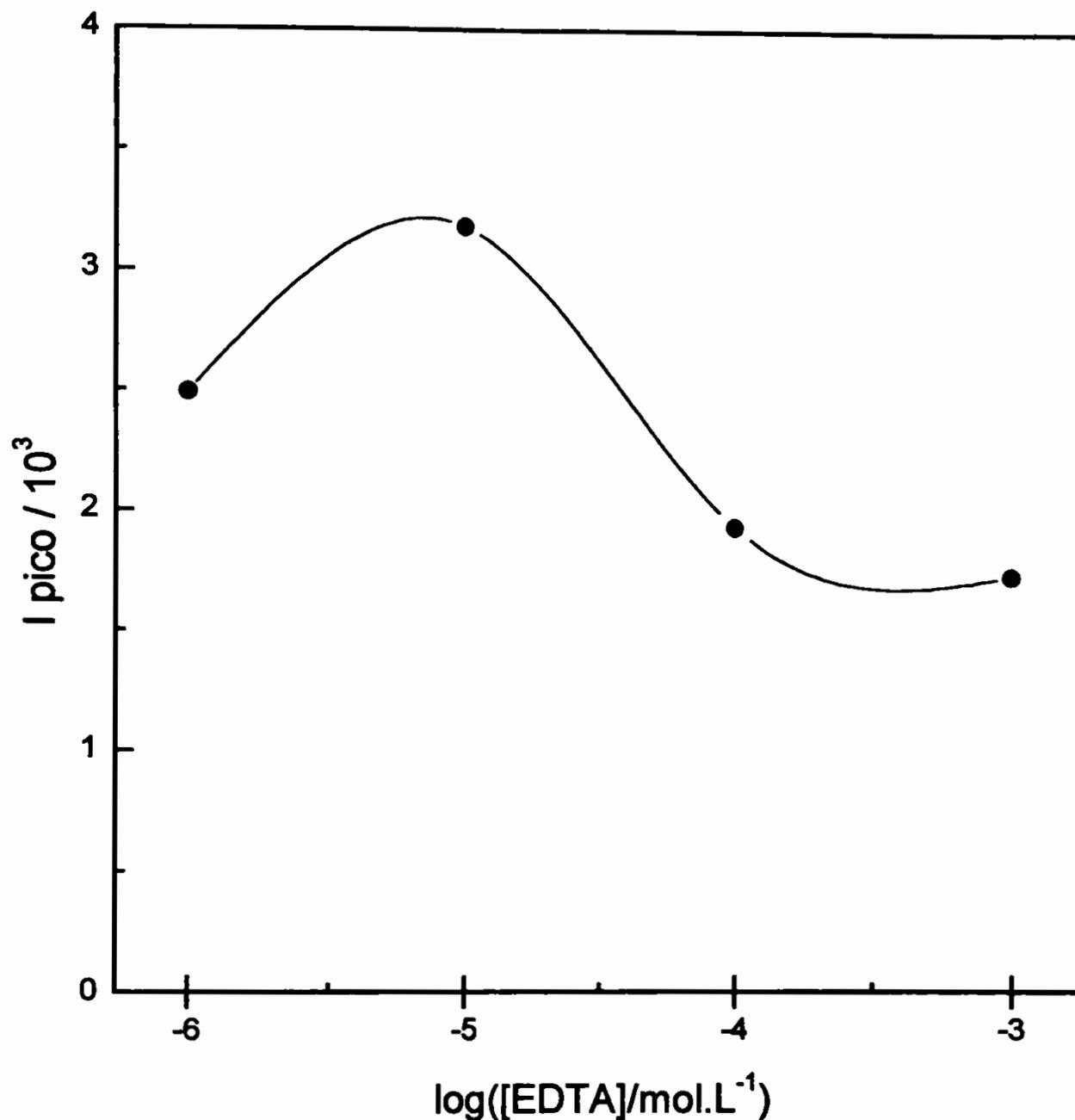


Figura II.6 - Efeito da adição de EDTA à solução de H₂O₂ na altura de pico.

Condições: [Cr(III)]: 1x10⁻⁷ mol.L⁻¹ em [H₃PO₄]: 3x10⁻⁴ mol.L⁻¹, [H₂O₂]: 0,14 mol.L⁻¹ e [luminol]: 1x10⁻³ mol.L⁻¹ em solução tampão HCO₃⁻ / CO₃²⁻ 0,2 mol.L⁻¹ (pH 10,90), m=5cm.

II.4.2.6) Efeito da concentração de ácido fosfórico adicionado à amostra

O efeito da concentração de ácido fosfórico na intensidade de emissão pode ser observado na figura II.7. Adição de ácido fosfórico em concentrações maiores que $2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ não resultaram em variação significativa da intensidade de emissão na faixa estudada. Utilizou-se $3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em estudos posteriores.

Quando EDTA é adicionado à solução de peróxido de hidrogênio e também à solução da amostra, observa-se o mesmo perfil da figura II.7 com um aumento de sensibilidade.

II.4.2.7) Influência do pH das soluções de luminol e peróxido de hidrogênio

Um fator de extrema importância na obtenção de maior intensidade de emissão é a acidez do meio, pois a reação entre luminol- H_2O_2 na presença de Cr(III) ocorre em meio fortemente básico. Em meio carbonato há um aumento na intensidade de emissão²¹. Para estudos do efeito da acidez do meio, foram utilizadas soluções tampão $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) em diversas proporções para a preparação das soluções de luminol e peróxido de hidrogênio.

Conforme figura II.8, ocorre um aumento de intensidade de emissão a partir de 10,2 e em pH 10,5 obtém-se um máximo. A ocorrência de um máximo de intensidade de quimiluminescência em um determinado pH foi justificado por T. G. Burdo et al.²² nos estudos realizados considerando o íon Co(II) como ativador, pois a acidez do meio afeta a concentração do complexo intermediário $[\text{Co}^{(\text{II})}\text{-HO}_2]^+$.

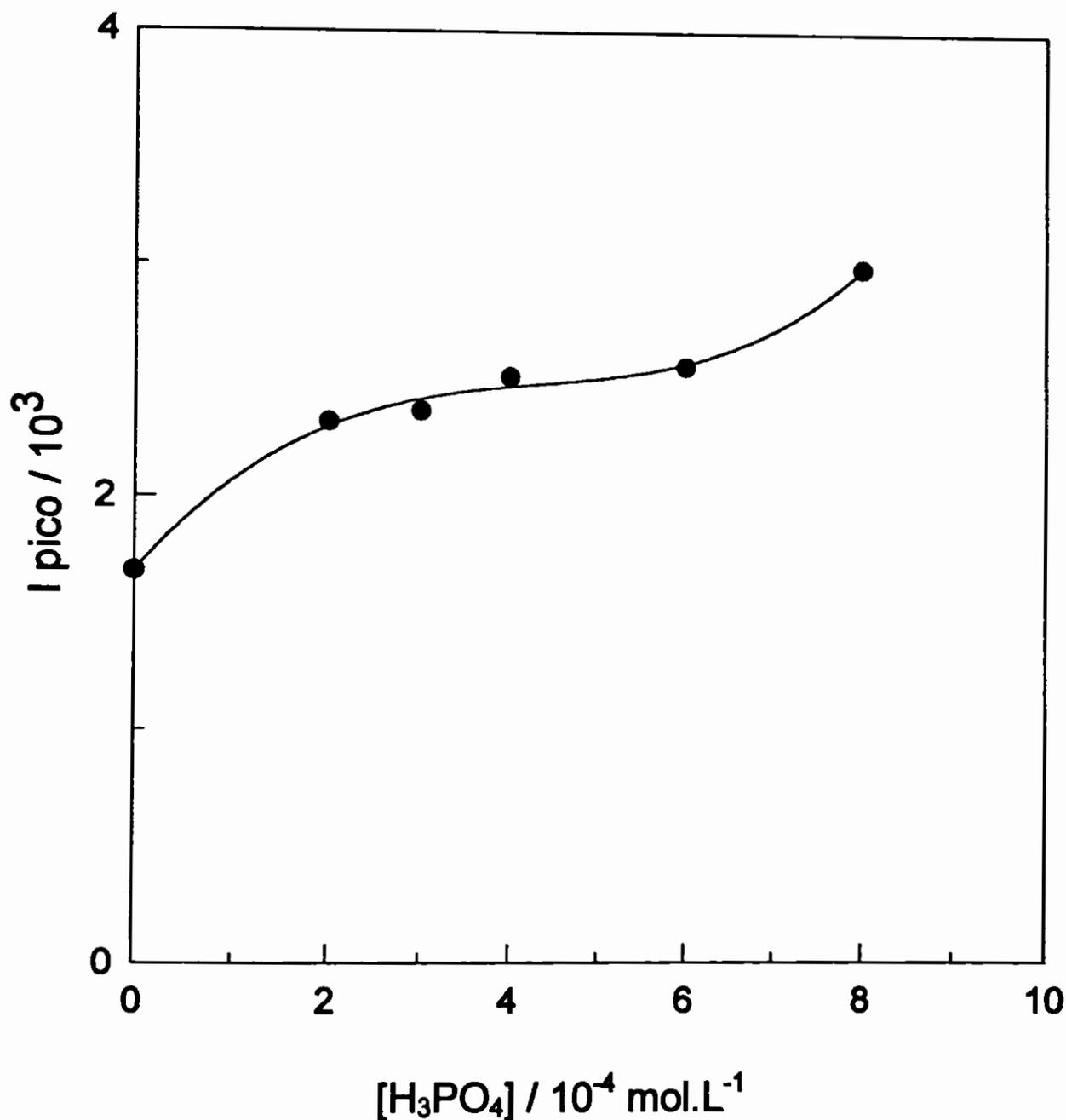


Figura II.7 - Efeito da concentração de H_3PO_4 adicionado à solução da amostra, na altura de pico. Condições: $[Cr(III)]: 1 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$, $[H_2O_2]: 0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ em $[EDTA]: 1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $[luminol]: 1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, ambos em solução tampão HCO_3^-/CO_3^{2-} $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 10,90), $m = 5 \text{ cm}$.

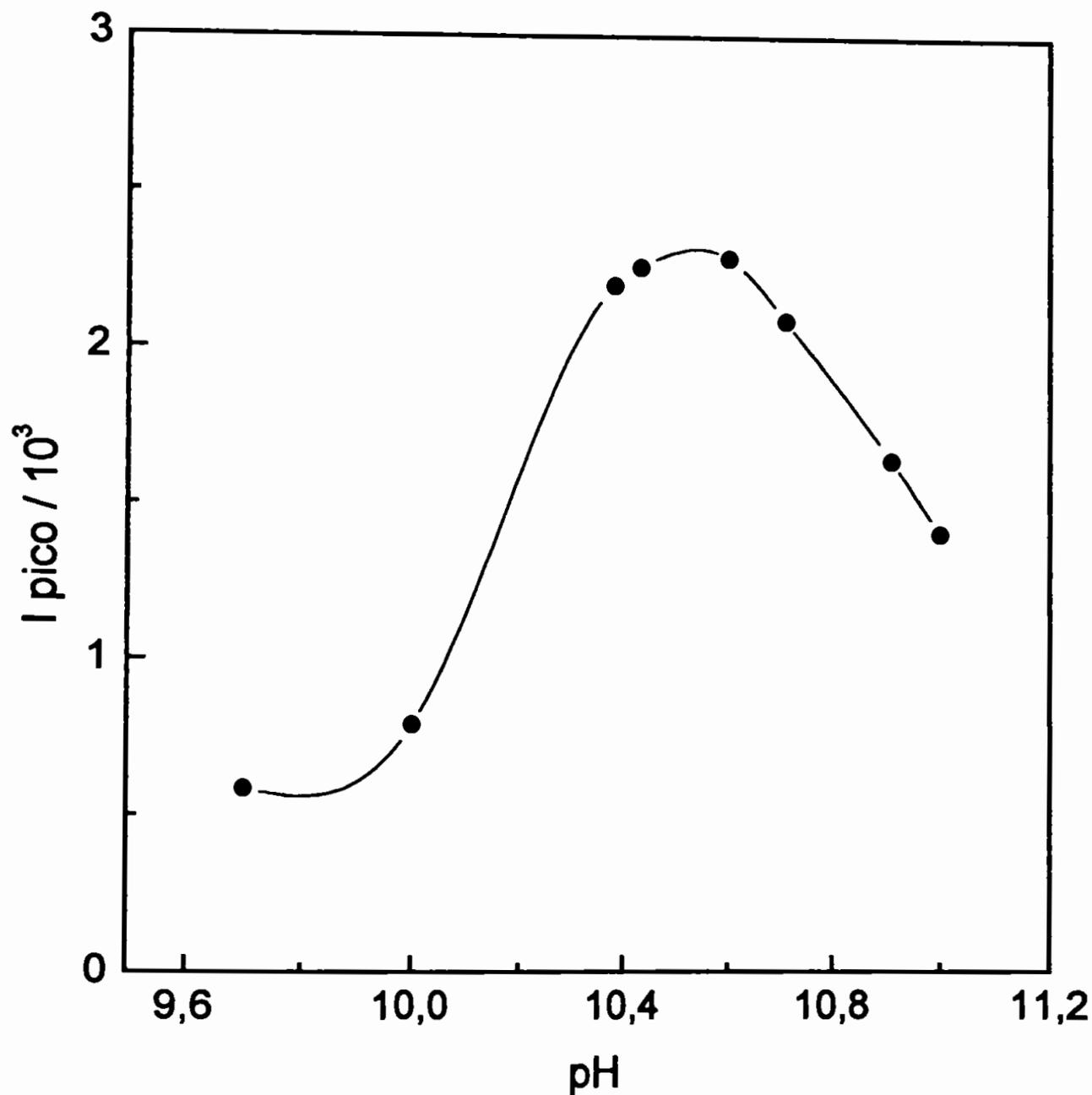


Figura II.8 - Efeito do pH na altura de pico. Condições: [Cr(III)]: $1 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ em $[\text{H}_3\text{PO}_4]$: $3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]$: $0,12 \text{ mol.L}^{-1}$ em [EDTA]: $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e [luminol]: $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em solução tampão $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, $m = 5 \text{ cm}$.

Conforme a equação II.8, com o aumento da concentração de H^+ ocorre dissociação do complexo e a quimiluminescência diminui. Em meio de pH alto, íons OH^- reagem com o complexo $[Co^{(II)}-HO_2]^+$ formando $Co(OH)_2$, uma espécie que não emite radiação (equação II.9). Combinando ambos efeitos, é esperado um máximo de intensidade de emissão em um determinado pH.

Resumindo, as condições experimentais ótimas são: [luminol]: $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[H_2O_2]$: $5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ contendo [EDTA]: $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ preparados em solução tampão HCO_3^-/CO_3^{2-} $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 10,50), amostra de Cr(III) em $[H_3PO_4]$: $3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, volume de injeção da amostra: 0,40 mL e comprimento do misturador: 5cm.

II.4.2.8 - Influência de íons Fe(II) e Fe(III) na ausência e na presença de EDTA

Íons Fe(II) e Fe(III) apresentam ação ativadora na reação de oxidação de luminol por peróxido de hidrogênio (tabela II.2).

Seitz et al.²⁷ observaram que na presença de Cr(III) $1 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$, íons Fe(II) $2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ aumentam em 43% enquanto íons Fe(III) em concentração $5 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ aumentam em 24% a intensidade de emissão, mesmo quando EDTA é adicionado às soluções de peróxido de hidrogênio e amostra (tabela II.1).

Nossos estudos revelaram que adicionando EDTA somente na solução de peróxido de hidrogênio, em concentração 100 vezes superior a dos íons Fe(II) ou Fe(III), a interferência desses íons é parcialmente suprimida devido o tempo de reação (figura II.1) e de mistura (figura II.2) serem relativamente pequenos. Quando EDTA é adicionado à solução da amostra, a interferência desses íons é totalmente suprimida.

II.4.2.9 - APLICAÇÃO ANALÍTICA - DETERMINAÇÃO DE CROMO EM AÇO INOX CERTIFICADO

Uma aplicação dentro das melhores condições experimentais do presente trabalho foi a determinação de Cr(III) em aço inox IPT no.22AISI440A cuja composição está descrita na tabela II.4. Após o ferro, cromo é o elemento mais abundante, representando 16,21% do peso.

Tabela II.4 - Composição do aço inox IPT nº 22AISI440A

Composição	Concentração (%) em peso
Fe	81,67
Cr	16,21
Mn	0,804
C	0,628
Si	0,449
Ni	0,143
Cu	0,050
P	0,029
S	0,009
N	0,008

II.4.2.9.1 - Tratamento da amostra de aço inox certificado

$203,4 \times 10^{-3}$ g do aço inox foram adicionados a 15,0 mL de HCl concentrado e 5,0 mL de H₂O₂ 30%. A amostra foi submetida a aquecimento até quase a secura

resultando em dissolução incompleta. O resíduo ficou retido na filtragem da solução em papel Whatman 42. Foi feita a lavagem do precipitado com água deionizada.

O filtrado foi transferido e diluído com água deionizada em balão volumétrico a 100,0 mL (solução AA).

II.4.2.9.2 - Determinação da concentração de cromo por absorção atômica

Utilizou-se o aparelho de absorção atômica Thermo Jarrel Ash AAS-Can 4 acoplado a microcomputador. As condições do equipamento para a análise foram: comprimento de onda: 357,9 nm, abertura de fenda: 0,5 nm, corrente da lâmpada: 6 mA, corrente de fundo: 2,5 mA.

A curva analítica foi obtida fazendo-se diluição adequada de solução padrão de $K_2Cr_2O_7$ 1000,0 ppm (previamente seco em estufa) a 1,0, 3,0, 4,0 e 5,0 ppm.

1,0 mL da solução AA foram diluídos a 100,0 mL (solução AD) e a concentração de cromo total nesta solução (média de 10 leituras) foi de 2,51 ppm ($4,82 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$).

II.4.2.9.3 - Determinação da concentração de Cr(III) por quimiluminescência

Foram utilizadas as soluções de trabalho descritas no item II.3.1.2 (p. 33)

O "branco" foi obtido pela diluição de $1,5 \times 10^{-2}$ mL de H_3PO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ em um balão de 25,0 mL, resultando em solução de H_3PO_4 $3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. A intensidade de emissão produzida pelo "branco" foi subtraída da intensidade das soluções padrões e amostra. O "branco" representou 21% do sinal obtido para a menor concentração padrão de Cr(III) $0,5 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$.

A solução para análise da amostra foi preparada pela diluição de 0,1 mL da solução AA com água deionizada em balão de 50,0 mL. Em seguida, 0,22 mL desta solução, $1,5 \times 10^{-2}$ mL de H_3PO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e 0,25 mL de EDTA $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ foram diluídos com água deionizada em um balão de 25,0 mL. A adição de EDTA foi feita imediatamente antes à análise, para mascarar a interferência de outros íons metálicos, principalmente íons Fe(III).

II.4.2.9.4 - Obtenção da curva analítica para Cr(III)

Para obtenção das soluções padrões de Cr(III), foram adicionados (0,32-3,2) mL de uma solução de Cr(III) $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (preparada pela diluição de 0,46 mL da solução de Cr(III) $1,08 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em balão de 100,0 mL) e $1,5 \times 10^{-2}$ mL de H_3PO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ foram diluídos com água deionizada em balões de 25,0 mL. As concentrações finais das soluções padrões de Cr(III) foram de $(0,32-3,2) \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$.

Um exemplo está representado na figura II.9.

Para a faixa de concentração de íons Cr(III) estudada a equação de reta é descrita por:

$$I_{\text{pico}} = 73,2 + 1681,8 [\text{Cr(III)}], \text{ onde } r^2 = 0,9994$$

O desvio relativo para 8 determinações realizadas com amostra contendo $1,1 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ foi de 3,0% e o limite de detecção de $1,3 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ (considerando como 3 vezes o desvio padrão)

II.4.2.9.5 - Análise de amostra de aço inox

O tratamento da amostra de aço com ácido clorídrico/peróxido de hidrogênio não resultou em dissolução total da amostra. Comparação entre o teor de cromo total obtido por absorção atômica e o valor certificado diferiram em 25%, indicando que ocorreram perdas no procedimento de abertura de amostra.

A solução resultante apresentou coloração esverdeada, evidenciando predominância de íons Cr(III). J.L. Bowling et al.²⁹ e R. Escobar et al.⁵⁵ utilizaram esse tratamento para redução *off line* de íons Cr(VI) a Cr(III). Para estudos comparativos foi considerado que todo cromo da amostra se encontrava no estado de oxidação menor.

Na tabela II.5 estão indicados os resultados obtidos para a determinação da concentração de Cr total por absorção atômica e Cr(III) por QL.

Tabela II.5 - Comparação das concentrações (% cromo) na amostra de aço inox, obtidas por absorção atômica (AA) e por quimiluminescência (QL):

Método	AA	QL
%Cr	12,3	12,6

A concentração (%) de cromo obtida por absorção atômica e por quimiluminescência foram concordantes.

O método apresentado pode ser estendido para determinação de concentrações menores que 10^{-8} mol.L⁻¹ de íons Cr(III) em amostras biológicas e águas naturais, empregando-se o mesmo equipamento, com uma maior abertura da fenda de emissão.

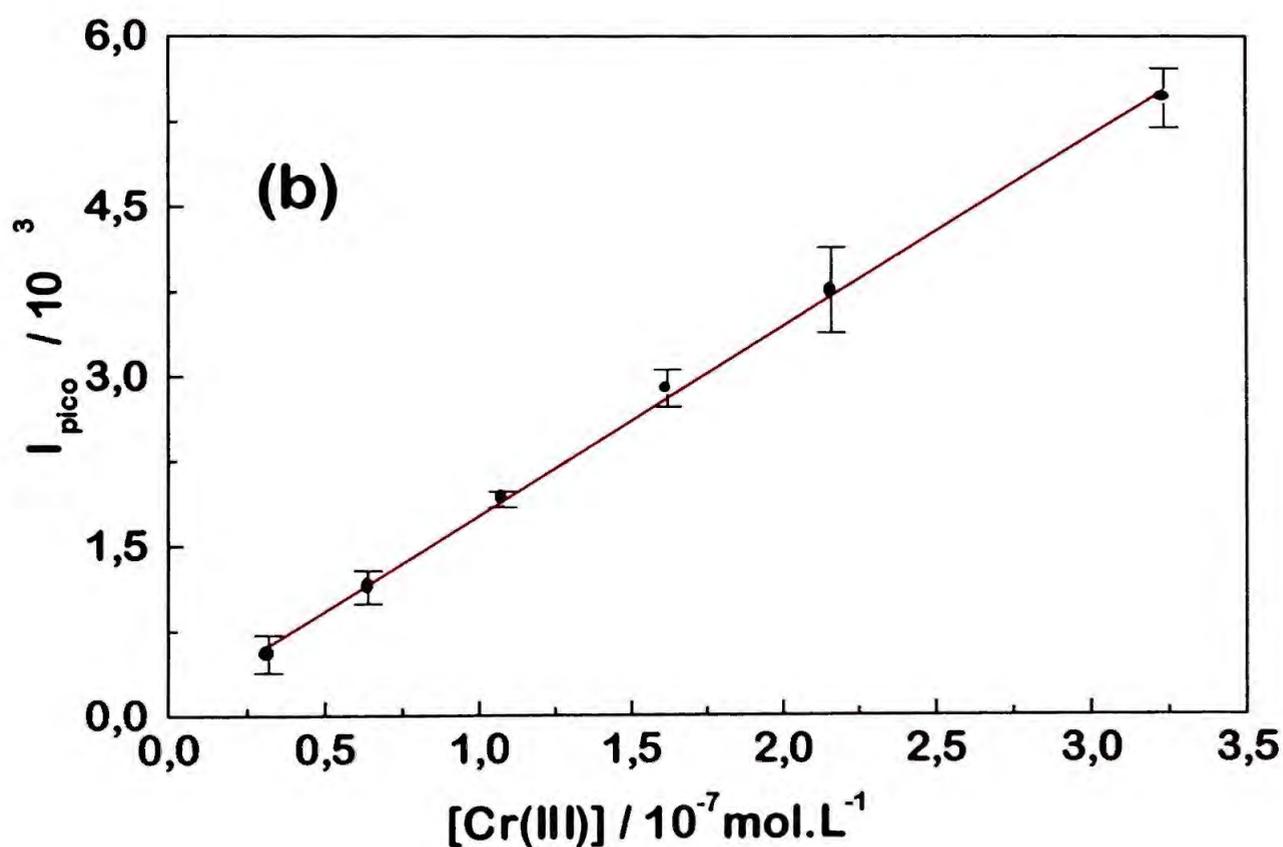
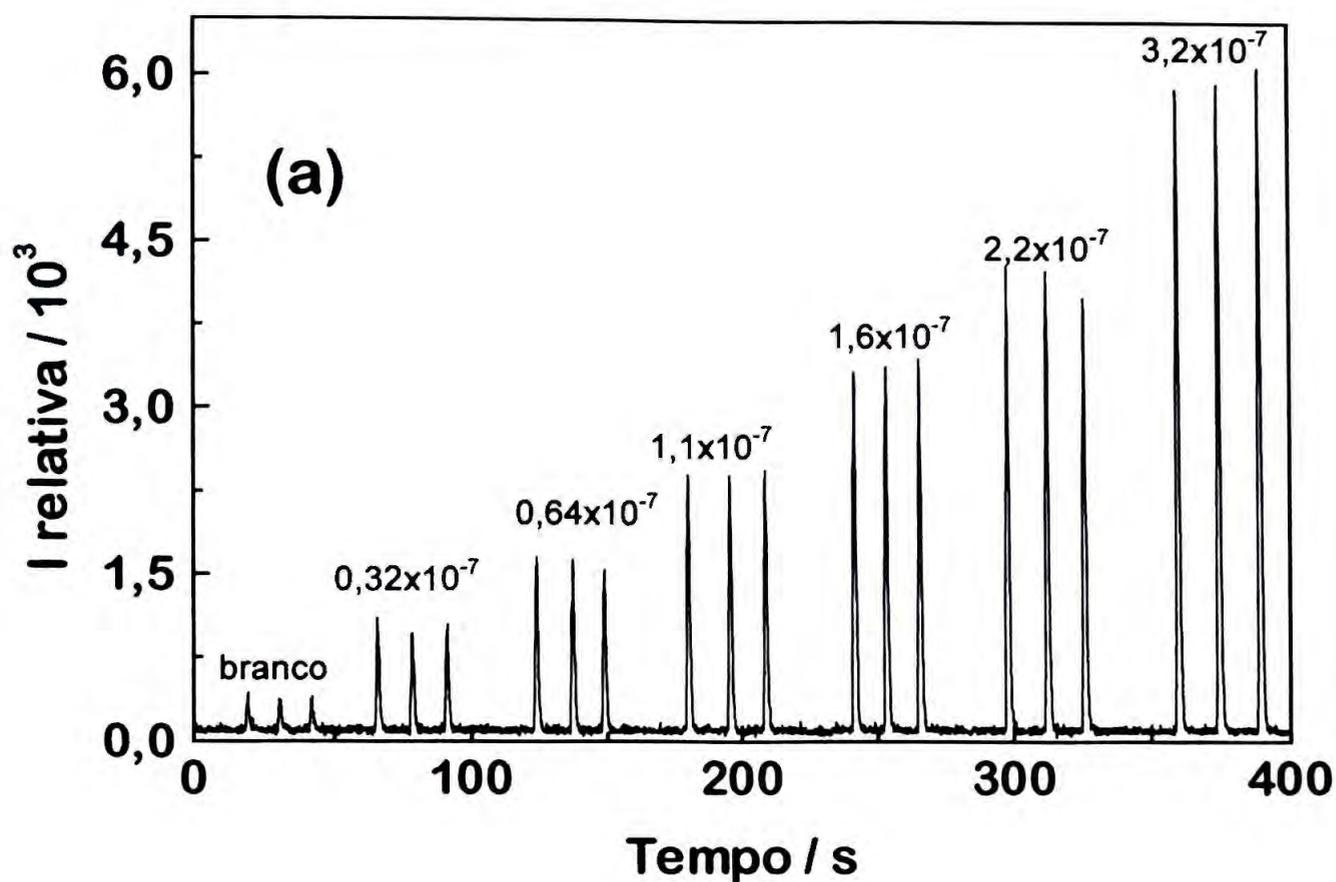


Figura II.9 - Representação de a) conjunto de picos, onde estão indicadas as concentrações padrões de Cr(III) (em mol.L^{-1}) e b) curva analítica para determinação de Cr(III) em amostra de aço inox.

CAPÍTULO III

REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DE TCPO OU 2-NPO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

CAPÍTULO III - REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DE TCPO OU 2-NPO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

III.1 - INTRODUÇÃO

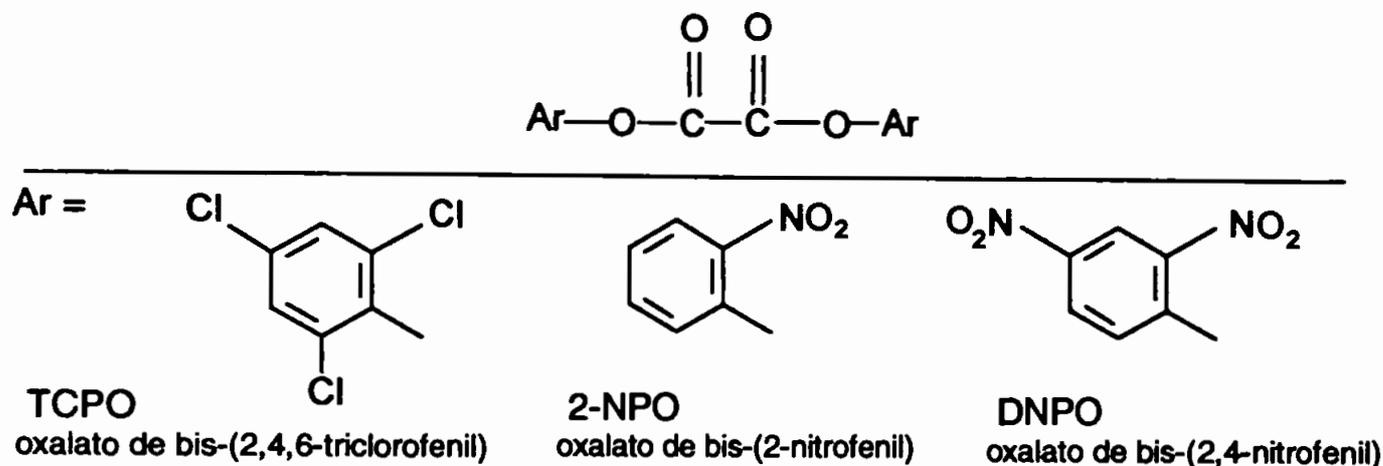
Em geral, as reações quimiluminescentes convertem energia química em luz de maneira ineficiente. Entretanto, o sistema peróxi-oxalato apresenta rendimentos quânticos da ordem de 30%⁽²⁾, sendo utilizado na fabricação de Cialume, base para bastões de sinalização e de fontes de iluminação em exames médicos⁶⁰.

A quimiluminescência de peróxi-oxalatos ocorre quando ésteres fenólicos do ácido oxálico reagem com peróxido de hidrogênio, na presença de catalisador e de hidrocarbonetos aromáticos altamente fluorescentes de baixo potencial de oxidação, chamados de ativadores ou fluoróforos⁶⁰.

Rauhut et al.⁶¹ propuseram a existência de um intermediário de alta energia, 1,2-dioxetanodiona, como a espécie capaz de produzir o estado excitado na molécula fluorescente. Segundo McCapra, em um processo denominado por CIEEL (luminescência quimicamente iniciada por transferência de elétron) ocorre a formação de um complexo entre o intermediário meta-estável e o ativador, para transferência de elétron⁶². No entanto, o intermediário 1,2-dioxetanodiona ainda não foi isolado e identificado⁶³.

As reações com ésteres-feniloxalatos cujos substituintes são eletronegativos apresentam as maiores eficiências quimiluminescentes, com rendimentos quânticos acima de 23%⁶⁰.

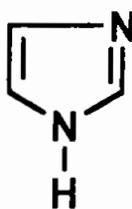
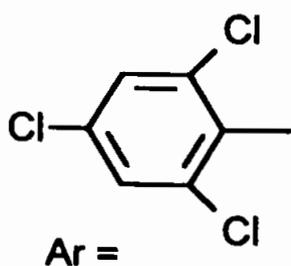
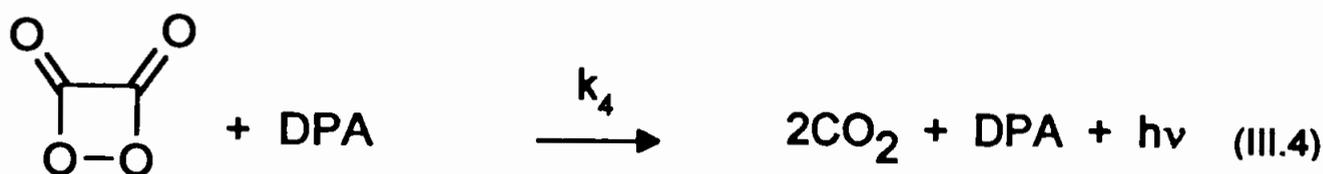
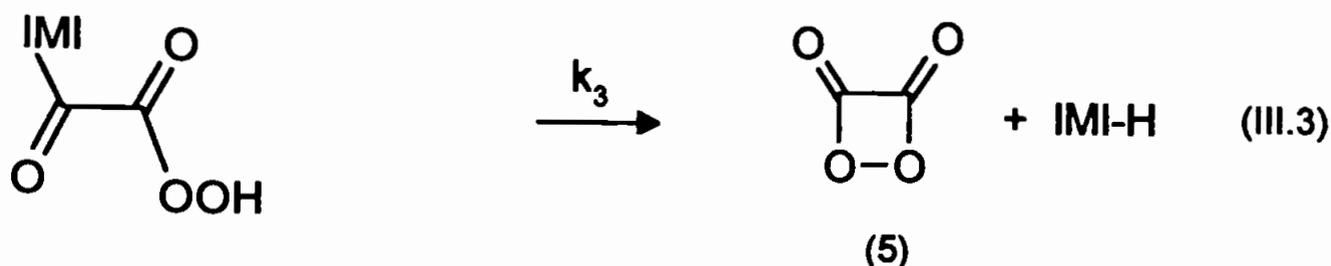
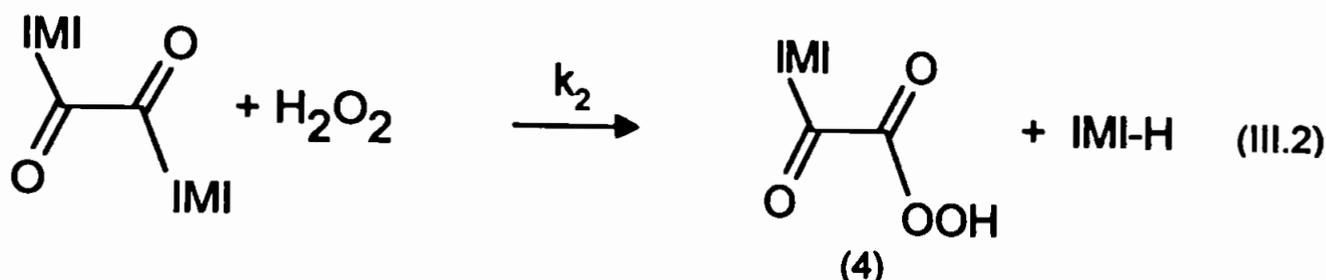
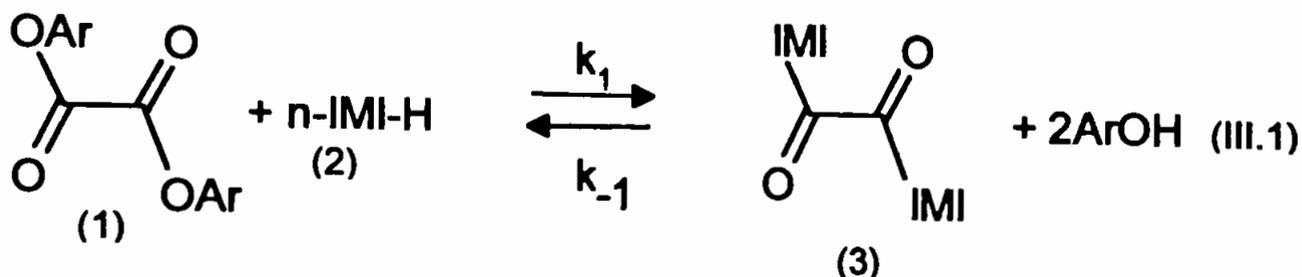
As estruturas dos ésteres-oxalatos mais estudados, TCPO, 2-NPO e DNPO estão representadas no esquema III.1.



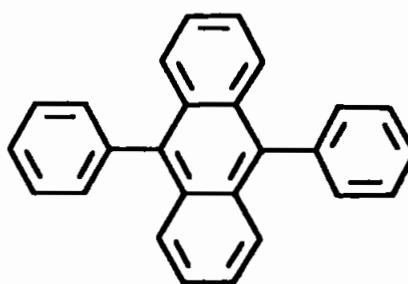
Esquema III.1 - Estruturas dos ésteres-oxalatos mais utilizados na quimiluminescência dos peróxi-oxalatos.

A natureza nucleofílica da hidrólise de ésteres faz com que a reação seja catalisada por bases oxigenadas ou nitrogenadas, como imidazol⁶⁴⁻⁶⁶, piridina⁶⁷ e trietilenodiamina⁶⁸. Alvarez et al.⁶⁸ sugeriram que a natureza e a concentração de catalisadores afetam a formação de diferentes intermediários na reação.

No esquema III.2 está representado um mecanismo simplificado proposto por Stevani et al.⁶⁵ para a reação quimiluminescente de oxidação de TCPO catalisada por imidazol, utilizando DPA (9,10-difenilantraceno) como ativador. Através de uma reação de substituição entre TCPO (1) e imidazol (2) ocorre a formação de 1,1'-oxalildi-imidazol (3) (equação III.1). Ataque nucleofílico do peróxido de hidrogênio à carbonila do 1,1'-oxalildi-imidazol dá origem ao perácido (4) (equação III.2). Com a ciclização do perácido ocorre a formação do intermediário 1,2-dioxetanodiona (5) (equação III.3). Interação deste intermediário reativo com o ativador, leva a emissão de luz e a formação de CO₂ (equação III.4).



IMI-H



DPA

Esquema III.2 - Mecanismo simplificado proposto por C.V.Stevani et al.⁶⁵ para a reação quimiluminescente de oxidação de TCPO por peróxido de hidrogênio, catalisada por imidazol e na presença de DPA como ativador, em meio de acetato de etila anidro.

A quimiluminescência observada em sistemas peróxi-oxalatos corresponde a emissão de radiação devido a transferência de carga do intermediário de alta energia, 1,2-dioxetanodiona, para o fluoróforo, levando-o ao estado eletronicamente excitado. Os melhores fluoróforos são aqueles com baixo potencial de oxidação e energia de excitação acima de 430 kJ.mol^{-1} . Como nem todos fluoróforos são eficientemente excitados, o sistema peróxi-oxalato tem sido utilizado na determinação de hidrocarbonetos aromáticos^{60,69}, particularmente hidrocarbonetos amino-poliaromáticos^{70,71} e também como método de análise de peróxido de hidrogênio em águas de chuva⁷²⁻⁷⁶.

O maior problema para o uso de reações quimiluminescentes em química analítica é a perda de seletividade e o fato de que a intensidade de emissão depende de uma variedade de fatores experimentais como: pH, conteúdo de água, natureza dos solventes orgânicos, ânions de sais presentes, temperatura, natureza e concentração do éster-oxalato, peróxido de hidrogênio, fluoróforo e catalisador⁷⁷.

Compostos facilmente oxidáveis como sulfito, nitrito, anilinas e compostos organo-sulfúricos suprimem a quimiluminescência de peróxi-oxalatos⁷⁸⁻⁸⁰.

Estudos de Honda et al.⁸¹ revelaram que íons haleto (cloreto, brometo e iodeto) também podem ser quantificados com base no seu efeito de supressão da intensidade de quimiluminescência; nitrato e fosfato não apresentaram o efeito. Os autores concluíram que a constante de supressão causada por haleto é independente da natureza e da concentração do fluoróforo e peróxido de hidrogênio, mas dependente da natureza do oxalato.

A importância deste fato está em avaliar o papel de possíveis interferentes em procedimentos analíticos que usam a reação quimiluminescente. Além do que, sob condições de concentração de peróxido de hidrogênio relativamente alta e

fluoróforo imobilizado, o potencial analítico dessas reações pode ser estendido à análise de supressores.

Steijger et al.⁸² apresentaram um estudo da influência de vários íons metálicos na reação quimiluminescente de oxidação de 2-NPO por peróxido de hidrogênio, catalisada por imidazol e na presença de 3-aminofluoranteno (3-AFA) como fluoróforo. Verificaram que na presença de alguns íons metálicos em concentração $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ocorria um aumento do tempo para alcançar a intensidade máxima (I_{max}), t_{max} , e da área sob a curva de intensidade relativa de emissão quimiluminescente vs tempo, definida como $I_{\text{max}} \times W_{1/2}$, onde $W_{1/2}$ corresponde a largura a meia altura de I_{max} . Um exemplo está representado na figura III.1a, b. Não foi observado o efeito para concentrações de Cr(III) inferiores a $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e para concentrações superiores a $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, a emissão de radiação foi totalmente suprimida.

No mecanismo da reação quimiluminescente de peróxi-oxalatos (figura III.2a), propuseram o ataque do íon metálico ao átomo de oxigênio do éster, negativamente carregado (esquema III.2b) para explicar a mudança da cinética da reação. O aumento na intensidade de emissão seria resultado da interação do íon metálico com o éster-imidazol, que estabilizaria o complexo, resultando em uma reação mais eficiente⁸².

A figura III.2 resume os resultados obtidos por Steijger et al.⁸² referente ao efeito do íon metálico na área da curva de intensidade relativa vs tempo. Nessa figura é possível comparar o aumento da área devido a presença de diferentes íons metálicos ($1,5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) na reação de oxidação de 2-NPO, na presença de

imidazol e 3-AFA. Os íons metálicos que causaram os maiores aumentos de área foram Cu(II), Cr(III) e Pb(II) enquanto o menor aumento foi devido a íons Co(II).

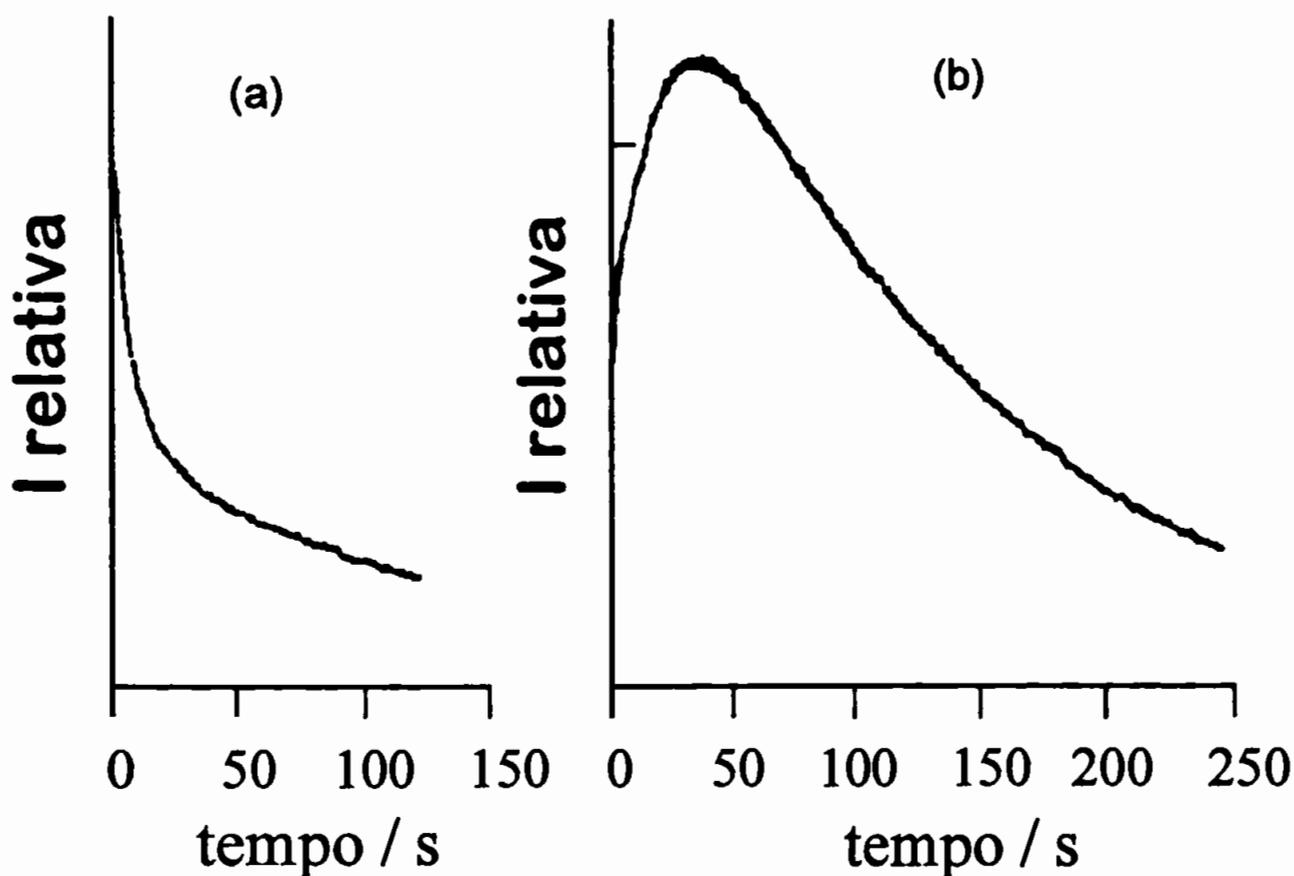
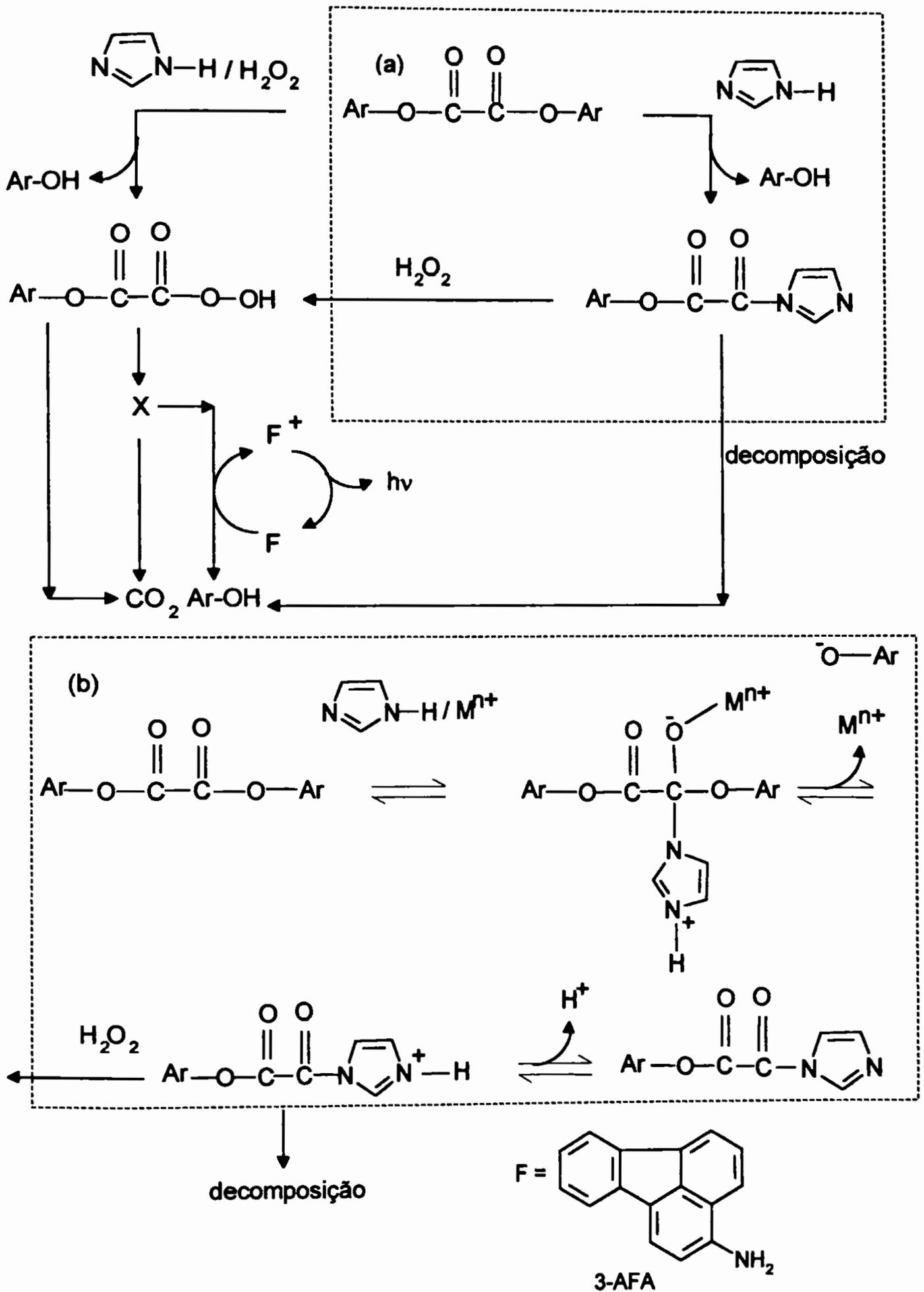


Figura III.1 - Influência de íons Cr(III) na reação quimiluminescente de oxidação de 2-NPO. Condições experimentais: [2-NPO]: $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]$: $2,9 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, [imidazol]: $2,9 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, [3-AFA]: $7,4 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$, ACN/ H_2O (v/v): 90/10, a) ausência de íons metálicos e b) $[\text{Cr(III)}] = 1,5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1(82)}$

Os mesmos autores propuseram um método para estudo do aumento de intensidade de emissão devido íons Cu(II) utilizando um sistema com injeção em fluxo. Utilizando as concentrações ótimas dos reagentes e dos parâmetros do sistema em fluxo obtidas através de análise fatorial, íons Cu(II) $4 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ aumentaram em 70% a intensidade de emissão quimiluminescente⁸³.



Esquema III.2- Mecanismo proposto para a reação quimiluminescente de peróxi-oxalatos na a) ausência e b) presença do íon metálico⁸².

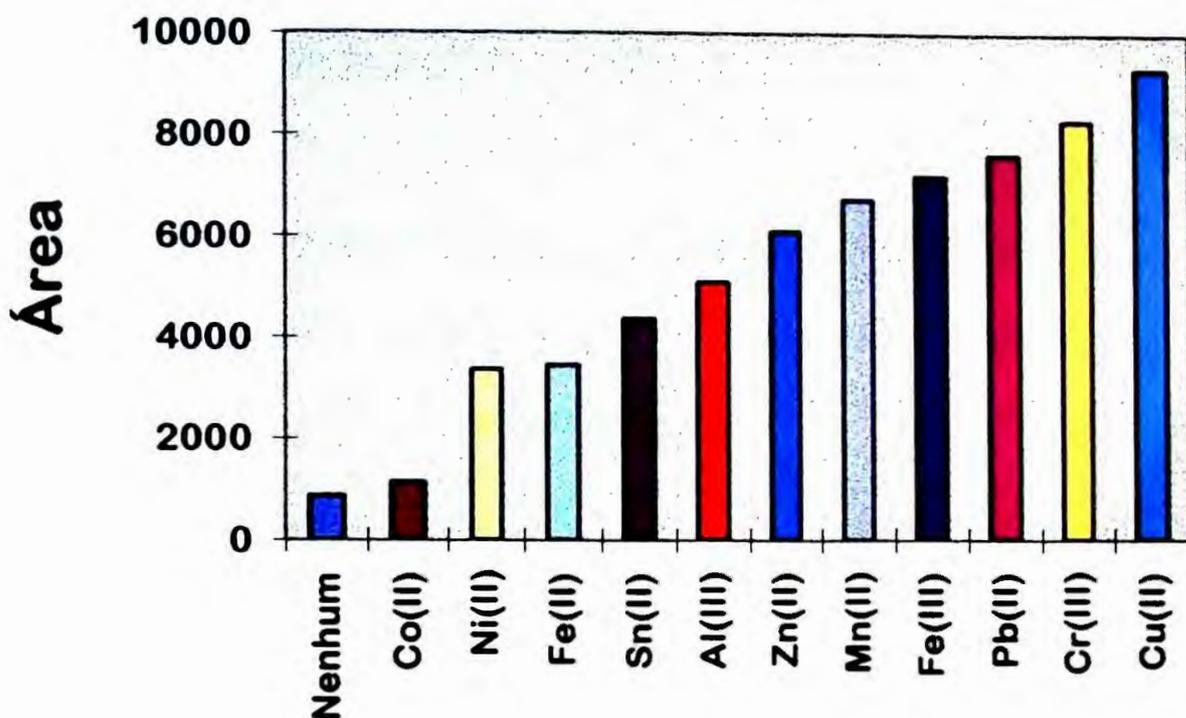


Figura III.2 - Efeito de íons metálicos na reação de oxidação de 2-NPO por peróxido de hidrogênio, na presença de imidazol e 3-AFA. Área = intensidade máxima vs largura à meia altura (figura III.1.b). Condições experimentais: [2-NPO]: $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]$: $2,9 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, [imidazol]: $2,9 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, [3-AFA]: $7,4 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$, ACN/ H_2O (v/v): 90/10 e $[\text{M}^{n+}] = 1,5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1(82)}$

Outros estudos comparativos realizados por Steijger et al.⁸² consideraram os ésteres-oxalatos 2-NPO, TCPO e DNPO em concentrações variadas de imidazol, na ausência e presença de íons Fe(III). Analisando a tabela III.1, observa-se que com a adição do íon metálico as alturas dos picos, I_{max} , obtidas utilizando 2-NPO e TCPO foram similares e ocorre aumento de área quando são utilizados 2-NPO ou TCPO, na presença de imidazol em concentração maior. A utilização de DNPO produz a maior altura de pico, I_{max} , e o menor tempo para alcançar o máximo, t_{max} . Ambos, 2-NPO e TCPO, apresentaram I_{max} menores e t_{max} maiores, porém similares,

resultando em valores de área sob a curva de intensidade relativa vs tempo, A, maiores que com DNPO.

Tabela III.1 - Efeito de vários ésteres-oxalatos. Condições experimentais: [Éster-oxalato]: $1,5 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, [H₂O₂]: $2,9 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, [3-AFA]: $7,4 \times 10^{-9}$ mol.L⁻¹, ACN/H₂O (v/v): 90/10, a) [imidazol]: $7,5 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, b) $2,9 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹(⁸²)

Éster-oxalato ^a	[Fe(III)] 10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹	I _{max} (mm)	t _{max} (s)	W _{1/2} (s)	Área (mm.s)
2-NPO	-	79	<2	21	1659
2-NPO	15	71	40	114	8094
TCPO	-	77	20	138	106626
TCPO	15	71	38	114	8094
TCPO ^b	-	160	6	16	2560
TCPO ^b	15	200	5	15	3000
TCPO ^b	150	370	6	15	5550
TCPO ^b	1500	152	20	62	9424
DNPO	-	224	<2	12	2688
DNPO	15	226	<2	12	2712
DNPO	150	146	<2	13	1898

Embora Steijger et al.⁸² tenham justificado a mudança de cinética da reação devido a estabilização do complexo éster-imidazol pelo íon metálico, conforme representado no esquema III.2b, Sato e Tanaka⁸⁴ sugeriram que a formação do complexo entre o íon metálico (Al(III), Zn(II), Cd(II) ou In(III)) e o fluoróforo (8-hidroxiquinolina) foi o responsável pelo aumento da intensidade de

quimiluminescência. O limite de detecção para os íons metálicos situou-se na faixa de 20-700 ppb.

III.2 - OBJETIVOS DO PRESENTE ESTUDO

Em função dos trabalhos realizados por Steijger et al.⁸², cujos resultados foram resumidos nas figuras III.2, tabela III.1 e esquema III.2 do item anterior, optou-se por realizar estudos mais detalhados e quantitativos para explorar a possibilidade do uso da medição da intensidade de quimiluminescência gerada na reação de oxidação de ésteres-oxalatos por peróxido de hidrogênio na presença de imidazol e 3-AFA.

Os trabalhos apresentados por estes autores foram qualitativos, assim, nessa fase do presente trabalho foram feitos estudos da influência de íons Cr(III), Pb(II) e Zn(II) na oxidação de TCPO ou 2-NPO. Em meio acetonitrila (ACN) / água, foram verificadas as influências do teor de água, concentração de imidazol e de 3-AFA, acidez do meio e natureza do tampão.

III.3 - PARTE EXPERIMENTAL

III.3.1. – Preparação de oxalato de bis-(2-nitrofenil) (2-NPO)

2-NPO foi preparado conforme procedimento descrito por M.M.Rauhut et al.⁸⁵ e A. G. Mohan e N. J. Turro⁸⁶.

Em um balão de três bocas foram adicionados a 310,0 mL de tolueno seco, 17,0 g de o-nitrofenol (recristalizado em etanol).

Após retirada da água residual por destilação azeotrópica, foram adicionados 12,0 g de trietilamina previamente destilada e 8,5 g de cloreto de oxalila, muito lentamente. Durante 3 horas, o balão contendo a mistura reacional foi mantido em banho de gelo para controle da temperatura a 10°C, sob constante agitação e atmosfera de argônio.

O solvente foi retirado através de rotoevaporação a 40°C.

Para dissolução do excesso de trietilamina foram adicionados 60,0 mL de clorofórmio seco. Após agitação, a mistura reacional foi filtrada à vácuo, o produto 2-NPO, levemente amarelado, foi recristalizado em diclorometano seco e caracterizado por espectrometria de massa e infra-vermelho.

3.1.2 - Soluções estoque

Solução de TCPO (Flucka) ou 2-NPO ($4,5 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹): 2,0 mg de TCPO (ou 1,5 mg de 2-NPO) foram dissolvidos em de 10,0 mL de acetonitrila.

Solução de imidazol ($4,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹) (Aldrich): 3,3 mg de imidazol foram dissolvidos em 10,0 mL de acetonitrila.

Solução de 3-AFA (5×10^{-4} mol.L⁻¹) (Aldrich): Preparação da solução estoque foi feita pela dissolução de 2,7 mg em balão de 25,0 mL. (o manuseio do reagente deve ser feito com cuidado, pois é tóxico)

Solução de H₂O₂ ($4,5 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹) (Merck) foram diluídos 43×10^{-6} mol.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio com acetonitrila, em balão de 10,0 mL.

Os reagentes foram utilizados sem purificação prévia. As soluções de TCPO, 2-NPO, imidazol, 3-AFA e H_2O_2 foram preparadas em acetonitrila (ACN) (grau HPLC EM Science), sendo conservadas sob refrigeração a 5°C . A solução de imidazol foi mantida ao abrigo da luz.

As soluções tampões de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ foram preparadas com água deionizada.

As soluções estoque dos íons metálicos em concentração $1,1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ foram preparadas pela dissolução dos respectivos sais: $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (pH=3), $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (pH=2), em solução de HNO_3 nas concentrações indicadas.

III.3.3 - Soluções de trabalho

As medições de intensidade de emissão vs tempo foram realizadas empregando-se as seguintes soluções de trabalho:

Em uma célula de quartzo, sob agitação magnética e termostatização ($25 \pm 0,1$) $^\circ\text{C}$, foram inicialmente adicionados ACN/água, de maneira a manter a proporção (v/v) de 60%. Em seguida, 0,05 mL de imidazol ($4,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), 0,05 mL de peróxido de hidrogênio ($4,5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$), 0,45 mL de 3-AFA ($5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) e água ou solução do íon metálico. A célula de reação foi fechada com um cepto de teflon. O início da reação ocorreu com a injeção de 0,05 mL de TCPO ($4,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) através de uma seringa Hamilton de capacidade 0,10 mL conectada ao tubo isoversílico de 0,5 mm de diâmetro interno e este ao cepto de teflon. O volume total de solução foi de 2,25 mL.

As concentrações resultantes das soluções foram [TCPO]: 1×10^{-5} mol.L⁻¹, [H₂O₂]: 1×10^{-3} mol.L⁻¹, [imidazol]: 1×10^{-4} mol.L⁻¹, [3-AFA]: 1×10^{-4} mol.L⁻¹, concentração do íon metálico variando de $(0-1,0) \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ e teor ACN/água (% v/v): 60/40

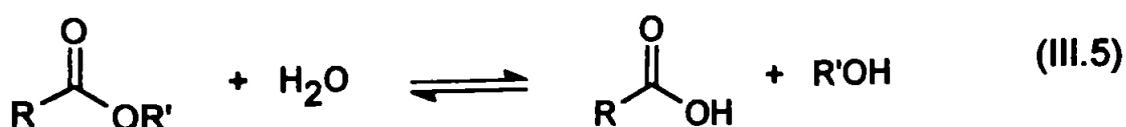
Nos experimentos para verificar a influência das concentrações de imidazol ou 3-AFA, as concentrações finais estão indicadas nas legendas das figuras.

Experimentos em meio de acidez controlada foram realizados empregando-se os tampões: HTRIS⁺/TRIS e H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ e as concentrações nas soluções finais estão indicadas nas figuras III.8 e 9.

Quando o meio foi tamponado com o catalisador IMI, as soluções tampões foram preparadas diretamente na célula de quartzo pela adição de IMI e HNO₃ ou NaOH. A concentração de IMI livre foi mantida constante em 1×10^{-2} mol.L⁻¹. A concentração de HIMI⁺ foi controlada pela adição de solução de HNO₃, sendo portanto a concentração de imidazol total diferente para cada tampão.

III.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A desvantagem da detecção quimiluminescente envolvendo TCPO é a baixa solubilidade e estabilidade do reagente em sistemas aquosos, devido a hidrólise de ésteres (equação III.5). A baixa solubilidade, 3×10^{-3} mol.L⁻¹ em ACN restringe a geração do possível intermediário 1,2-dioxetanodiona (5) (esquema III.2) em concentrações apreciáveis⁸⁷.



III.4.1- ESTUDOS EM MEIO NÃO-TAMPONADO

III.4.1.1 - Influência do teor de água

Em meio não tamponado e na ausência de íons metálicos, o teor de água na composição da solução resultante apresentou uma forte influência na intensidade de emissão quimiluminescente.

a) a altura máxima do pico (I_{max}) e o tempo total de emissão (t) se mostraram fortemente dependentes do teor ACN/H₂O (%v/v) (figura III.2);

b) cabe salientar que a área sob a curva intensidade relativa de emissão vs tempo é muito maior para meio contendo mais do que 90% (v/v ACN) (figura III.2)

c) entre (60-80)% ACN não houve variação apreciável de I_{max} . Para teor de ACN menor que 60% e maiores que 80% há um brusco aumento de I_{max} .

d) t_{max} e t aumentaram significativamente para teor de ACN maior que 90%. Abaixo desse valor, t diminui mais gradativamente.

Estudos em meio não-tamponado foram feitos em 60% de ACN. A utilização de um teor maior água é impraticável devido a baixa solubilidade e estabilidade de TCPO em água.

Na ausência de uma base, R. Weinberger⁸⁸ concluiu que a distribuição de carga na ACN é localizada (momento de dipolo = 3,92 D), fazendo com que a molécula de TCPO seja fortemente solvatada e resista ao ataque do peróxido. Como resultado, t é maior para meio com alto teor de solvente orgânico.

A influência da composição final do solvente sobre t e t_{\max} oferece algumas possibilidades para otimização do sistema analítico⁸⁰.

III.4.1.2 - Efeito da concentração de imidazol

Na figura III.3 está representado o efeito da variação da área sob a curva I_{relativa} vs tempo (A_0) com a concentração de imidazol, mostrando que na ausência de íons metálicos ocorre um aumento acentuado da intensidade de emissão para concentração de imidazol maior que $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

III.4.1.3 - Efeito da presença de Cr(III)

Na figura III.4 está representado o perfil da intensidade relativa de emissão vs tempo com a adição de íons Cr(III).

Na presença de íons Cr(III), ocorreu diminuição de I_{\max} e A , não sendo observado um alargamento da área sob a curva para as condições descritas ([imidazol] $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), ao contrário do que foi descrito por Steijger et al.⁸², (vide figura III.1).

III.4.1.4 - Efeito da concentração de 3-aminofluoranteno

A adição de íons Cr(III) ($0-2,4 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em concentrações variadas do fluoróforo 3-AFA ($10^{-6}-10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), na presença de imidazol em concentração 1×10^{-4}

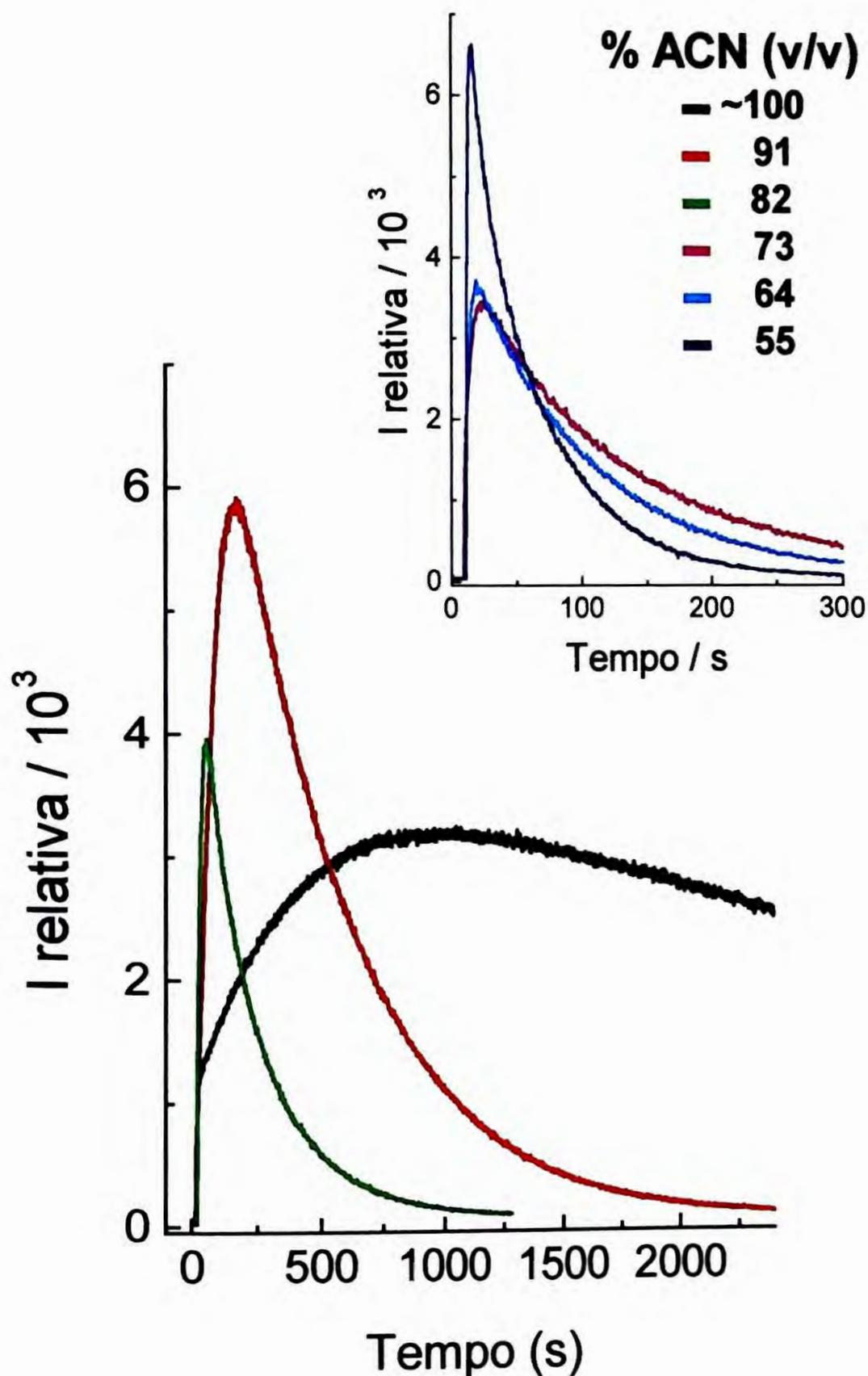


Figura III.2 - Perfil da intensidade relativa de emissão vs tempo com a variação da %acetonitrila/ H_2O (v/v). Condições experimentais: $[\text{TCPO}]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]$: $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{imidazol}]$: $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{3-AFA}]$: $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

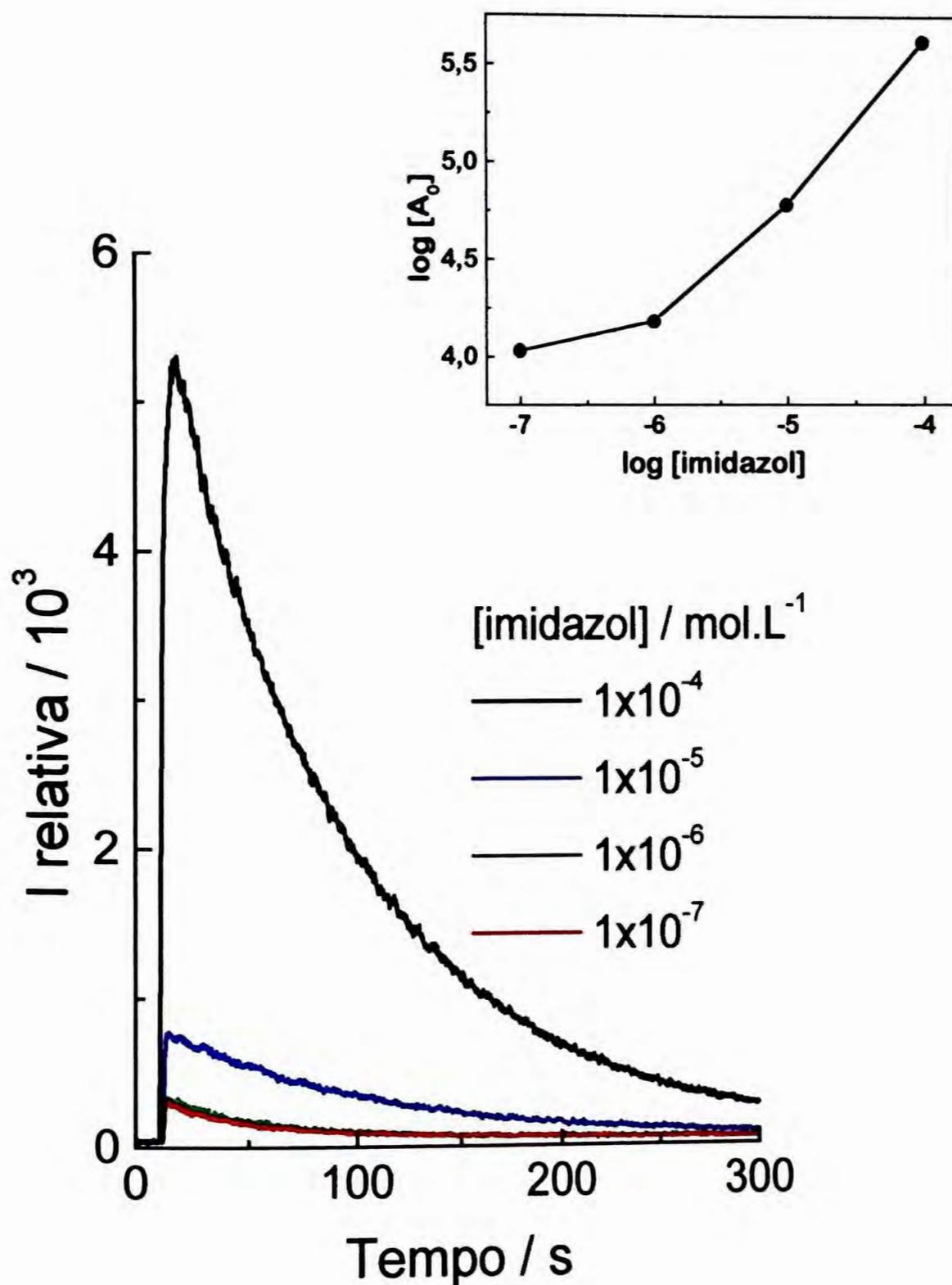


Figura III.3 - Perfil da intensidade relativa de emissão vs tempo com a variação da concentração de imidazol. Condições experimentais: % ACN/H₂O (v/v): 60%, [TCPO]: 1×10^{-5} mol.L $^{-1}$, [H₂O₂]: 1×10^{-3} mol.L $^{-1}$, [3-AFA]: 1×10^{-4} mol.L $^{-1}$.

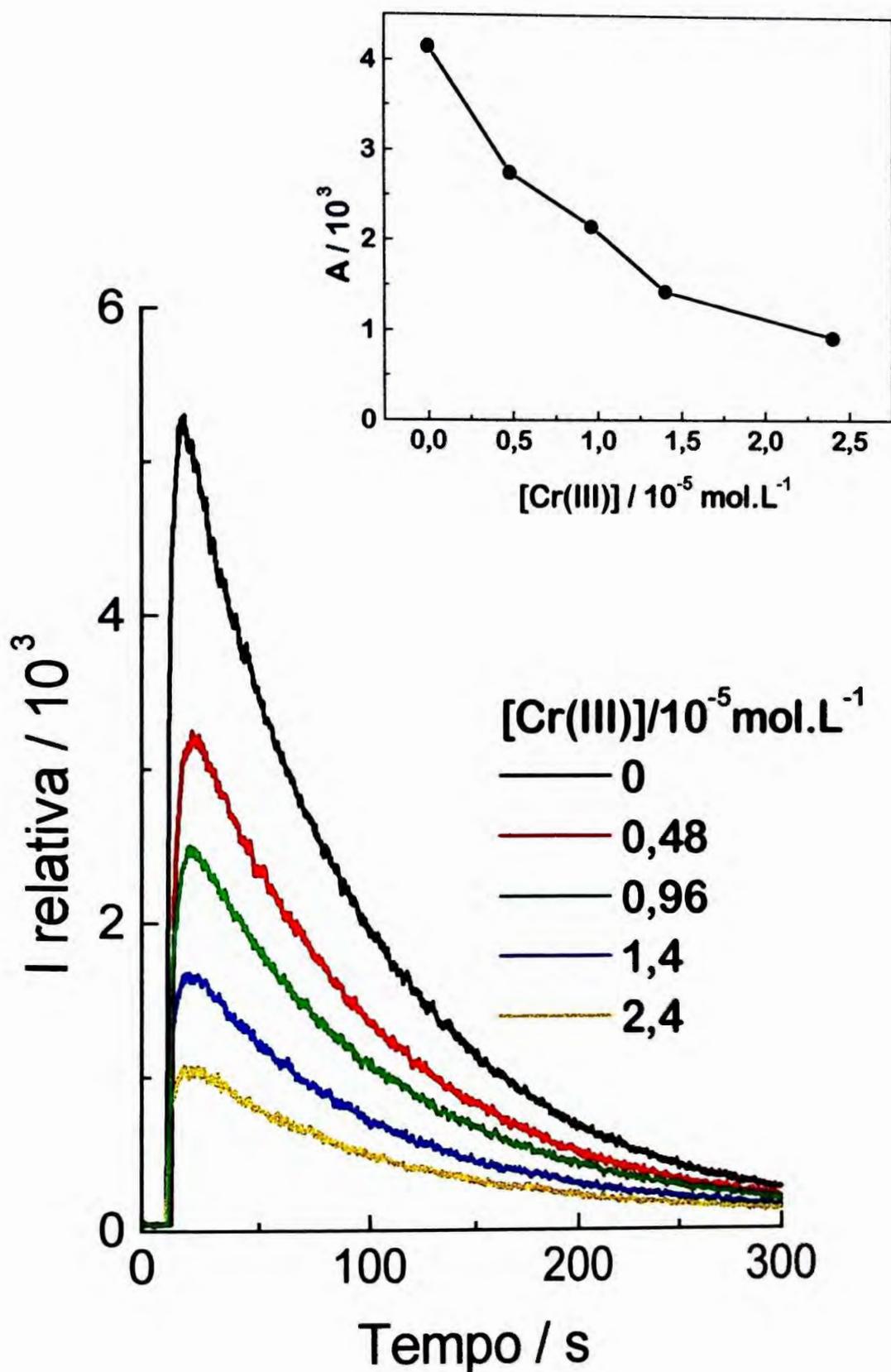


Figura III.4 - Perfil da intensidade relativa de emissão vs tempo na presença de íons Cr(III) . Condições experimentais: %ACN/ H_2O (v/v): 60%, $[\text{TCPO}]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]$: $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, [imidazol]: $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, [3-AFA]: $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

mol.L⁻¹ não acarretou mudança no perfil dos gráficos de $\frac{A}{A_0}$ vs concentração de Cr(III) (figura III.5). A e A₀ representam, respectivamente, a área sob a curva de intensidade de emissão vs tempo, na presença e na ausência do íon metálico.

Estes estudos em concentração variável de 3-AFA visava verificar se o íon Cr(III) apresentava interação com o fluoróforo, no efeito de supressão da intensidade de emissão, conforme reportado na figura III.4. A análise da figura III.5 revela que para concentrações crescentes de Cr(III) de 0-2,4x10⁻⁵ mol.L⁻¹, a relação $\frac{A}{A_0}$ independe da concentração do fluoróforo. Como esta relação aumenta com a concentração de 3-AFA, aparentemente o íon metálico Cr(III) não interage com este fluoróforo nessa acidez.

III.4.2 - ESTUDOS EM MEIO TAMPONADO

Como a reação quimiluminescente de peróxi-oxalatos é catalisada por bases, a intensidade e o tempo total de emissão são influenciados pela acidez do meio. Abaixo de um pH ótimo, o ataque do peróxido de hidrogênio para a formação do perácido é impedida pela estabilidade relativa do éster-oxalato. Como resultado, o tempo total de emissão torna-se relativamente longo e inversamente proporcional à intensidade. Acima do pH ótimo, o tempo total de emissão e a intensidade de emissão caem abruptamente. As explicações para estes efeitos são:

- a) hidrólise do éster-oxalato a uma velocidade maior que o ataque do peróxido e;
- b) rápida formação da espécie excitada, e decomposição em processos colisionais com as moléculas do solvente⁸⁸.

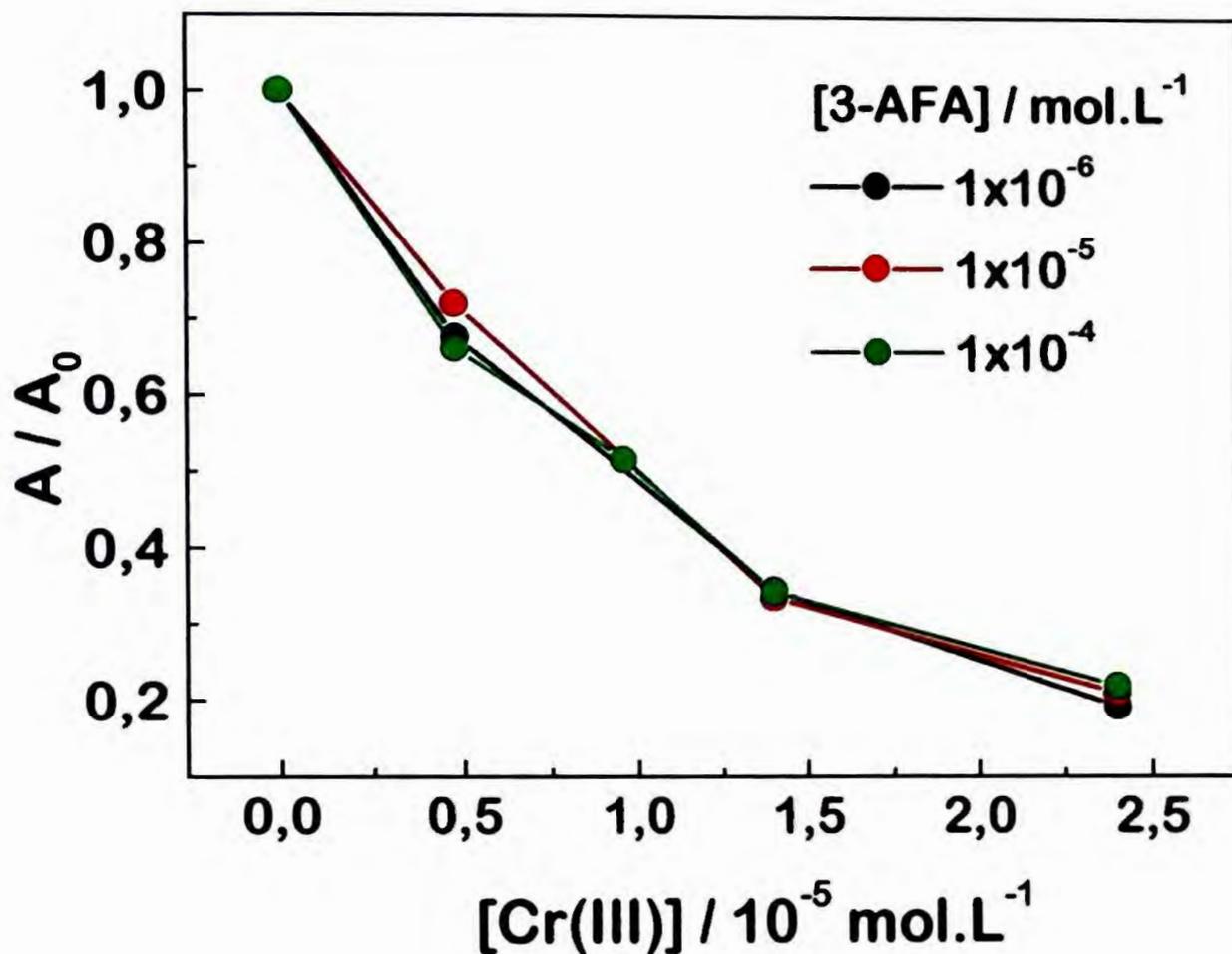


Figura III.5 - Efeito da presença de íons Cr(III) sobre a curva de intensidade relativa de emissão vs tempo com a variação da concentração de 3-AFA. Condições experimentais: %ACN/H₂O (v/v): 60%, [TCPO]: 1x10⁻⁵ mol.L⁻¹, [H₂O₂]: 1x10⁻³ mol.L⁻¹, [imidazol]: 1x10⁻⁴ mol.L⁻¹.

III.4.2.1. - Meio tamponado com tris(hidroximetil)aminometano ou H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻

Os experimentos realizados em meio tamponado com tris(hidroximetil)amino metano (HTRIS⁺/TRIS) ou H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 4x10⁻² mol.L⁻¹ estão representados nas figura III.6 e 7. Podem ser feitas as seguintes considerações:

- a) com o aumento do pH, I_{\max} aumenta, sendo esse efeito mais pronunciado na presença de tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 4×10^{-2} mol.L⁻¹ (figura III.7a);
- b) em tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 4×10^{-2} mol.L⁻¹, a área também aumenta com o pH, ao contrário do que ocorre em meio contendo $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 4×10^{-2} mol.L⁻¹ e imidazol 1×10^{-4} mol.L⁻¹ ou somente HTRIS⁺/TRIS 4×10^{-2} mol.L⁻¹ (figura III.7b);
- c) o tempo total de emissão (t) é maior em meio tamponado com H⁺TRIS/ TRIS 4×10^{-2} mol.L⁻¹ (figura III.6a);
- d) para um mesmo pH e tampão, I_{\max} na presença de imidazol em concentração 1×10^{-4} mol.L⁻¹ é maior;
- e) em meio tamponado com HTRIS⁺/TRIS ou $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 4×10^{-2} mol.L⁻¹ nos valores de pH indicados nas figuras III.6 a e b, a presença de Cr(III) 1×10^{-5} mol.L⁻¹ não afeta a intensidade de emissão.

III.4.2.2. - Meio tamponado com imidazol

Imidazol pode ser utilizado para tamponar o meio, pois apresenta o equilíbrio ácido-base representado pela equação (III.6)



O controle da acidez do meio empregando o tampão HIMI⁺/IMI foi realizado para evitar o uso de outros tampões cuja natureza influencia na intensidade de emissão, bem como na possibilidade de formar complexos com o íon metálico. Foi verificado que em meio tamponado com HTRIS⁺/TRIS ou $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 4×10^{-2} mol.L⁻¹, a adição de Cr(III) 1×10^{-5} mol.L⁻¹ não influencia a intensidade de emissão.

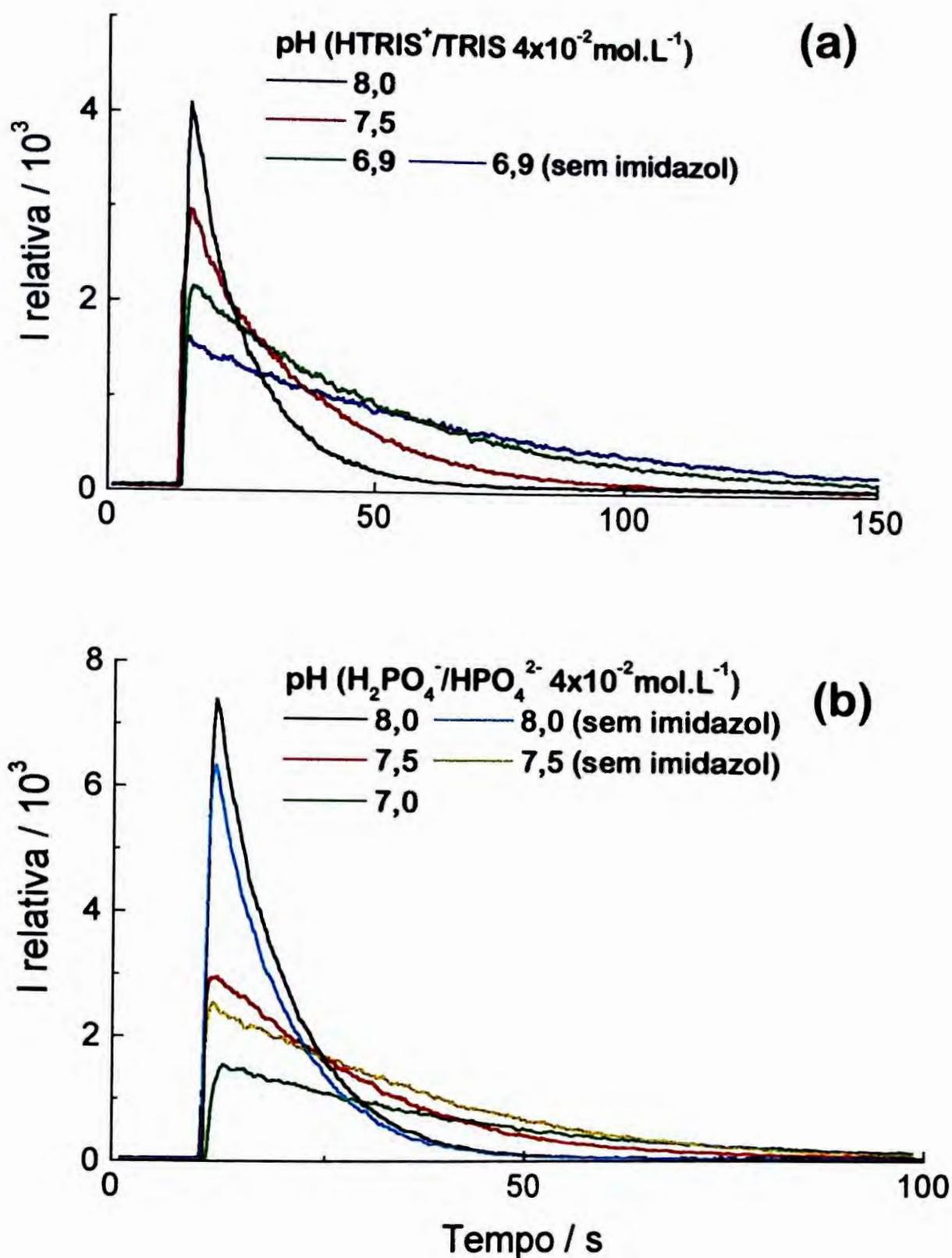


Figura III.6 - Perfil da intensidade relativa de emissão vs tempo com a variação de pH. a) $\text{HTRIS}^+/\text{TRIS}$, b) $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$. Condições experimentais: % ACN/ H_2O (v/v): 60%, $[\text{TCPO}]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]$: $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{imidazol}]$: $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{3-AFA}]$: $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

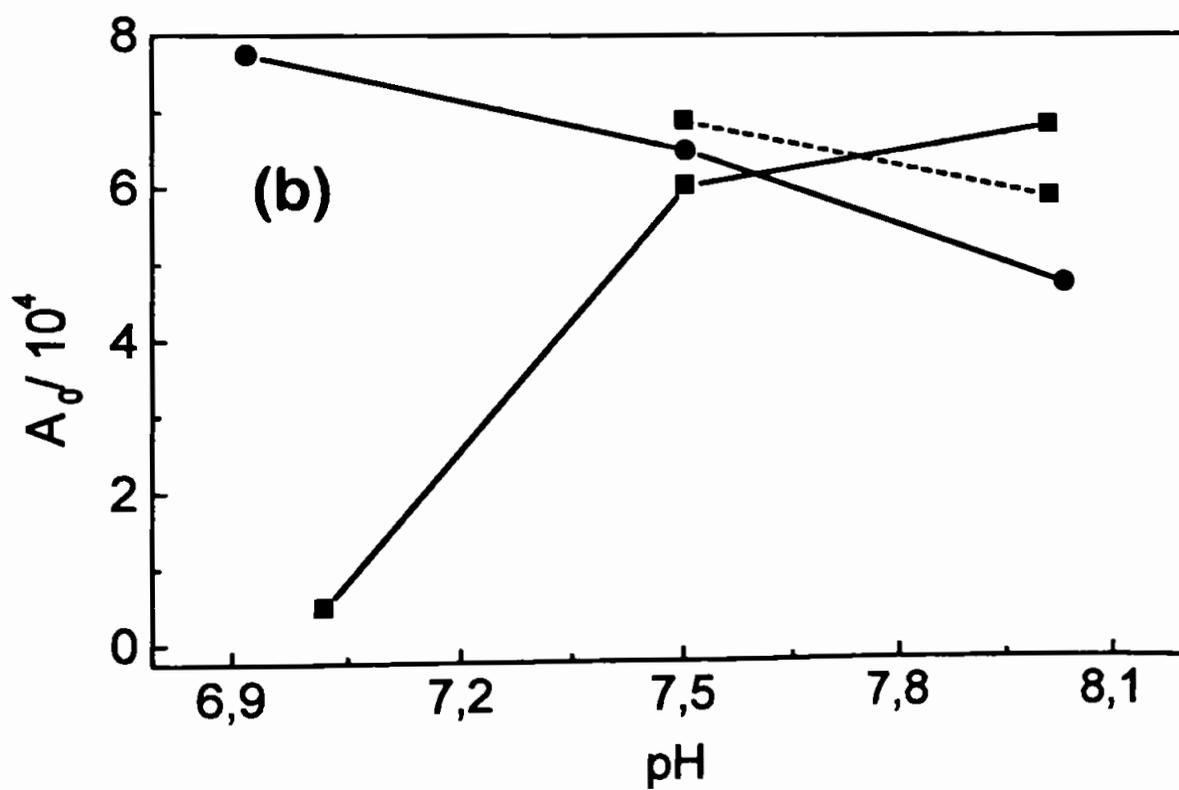
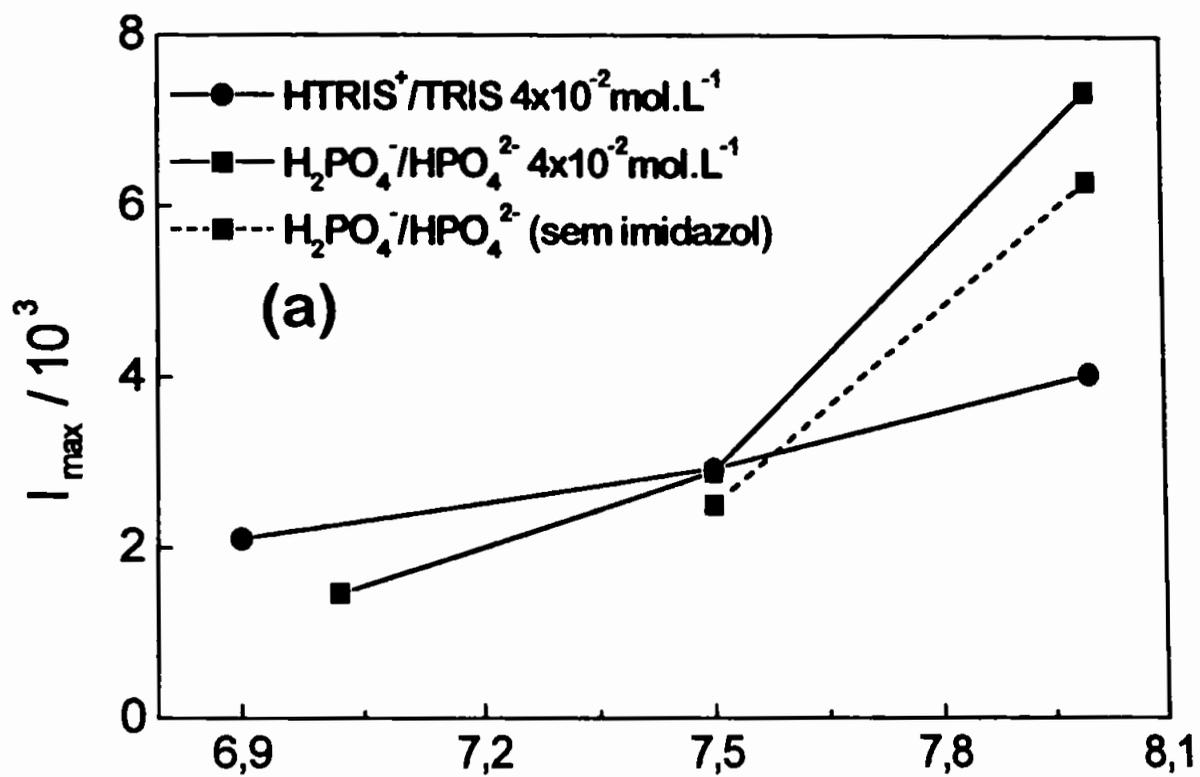


Figura III.7 - Representação da variação de a) I_{\max} e b) área conforme figura III.6

O tampão HIMI^+/IMI foi preparado para estudos na faixa de pH 6 a 9, empregando HNO_3 ou NaOH para realizar o ajuste do pH. Honda et al.⁸¹ verificaram que, ao contrário dos haletos, íons nitrato não apresentaram efeito supressor na intensidade de emissão.

No presente trabalho a concentração da espécie não protonada IMI foi mantida constante em $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em toda a faixa de pH. Essa concentração relativamente elevada de IMI garante uma boa capacidade tamponante. Além do mais, havendo a possibilidade de formação de complexos entre M^{n+} e imidazol, a variação relativa de IMI livre pela adição de íons metálicos seria pequena (equação III.7).

Da maneira como foi preparado o tampão, a concentração de imidazol total é diferente para cada tampão, mas IMI foi mantida constante em $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. Assim, a concentração livre do catalisador não foi alterada.

Quando o imidazol está totalmente protonado, HIMI^+ , a intensidade de emissão é relativamente muito baixa.

Mantendo o pH constante, próximo ao pK_a , ou seja, a relação $\frac{\text{IMI}}{\text{HIMI}^+} = 1$, observa-se na figura III.8 que aumentando a concentração de IMI livre ocorre uma diminuição do tempo total de emissão (t) e um aumento de I_{max} . Sendo que a área sob a curva de intensidade relativa de emissão vs tempo é bem maior quando a concentração de IMI livre é de $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

Na figura III.9a observa-se a variação de intensidade relativa de emissão com a variação de pH utilizando TCPO, e na figura III.9b 2-NPO. A utilização de 2-NPO aumenta a sensibilidade, pois a intensidade de emissão, I_{max} e A_0 são

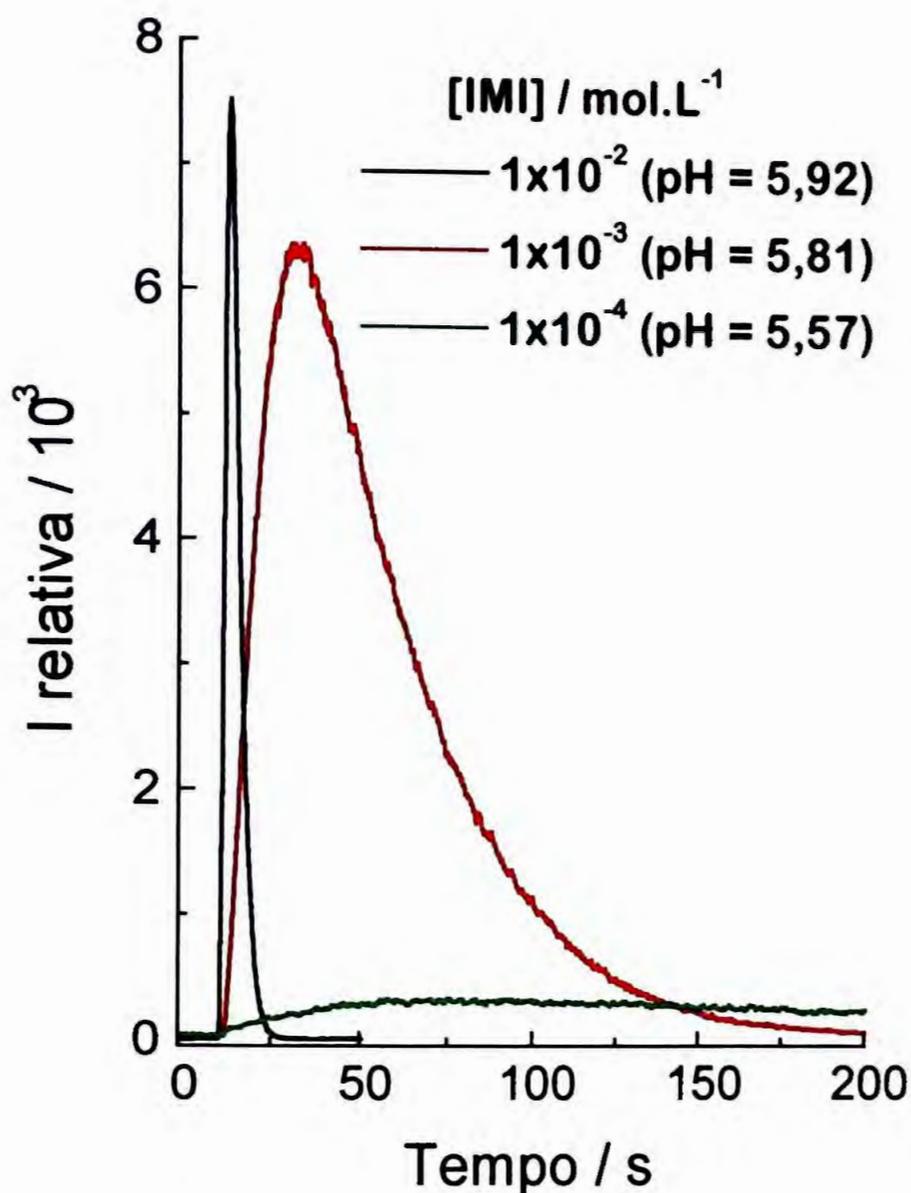


Figura III.8 - Perfil da intensidade relativa de emissão vs tempo com a variação da concentração de imidazol livre [IMI], mantendo o pH constante. Condições experimentais: %ACN/H₂O(v/v): 85%, [TCPO]: 1x10⁻⁵ mol.L⁻¹, [H₂O₂]: 1x10⁻³ mol.L⁻¹, [3-AFA]: 1x10⁻⁶ mol.L⁻¹.

maiores, sendo necessário a diminuição do abertura de fenda de emissão para efetuar medições nas mesmas concentrações dos reagentes. Em ambos casos há decréscimo acentuado da intensidade relativa de emissão para valores de pH maiores que 7.

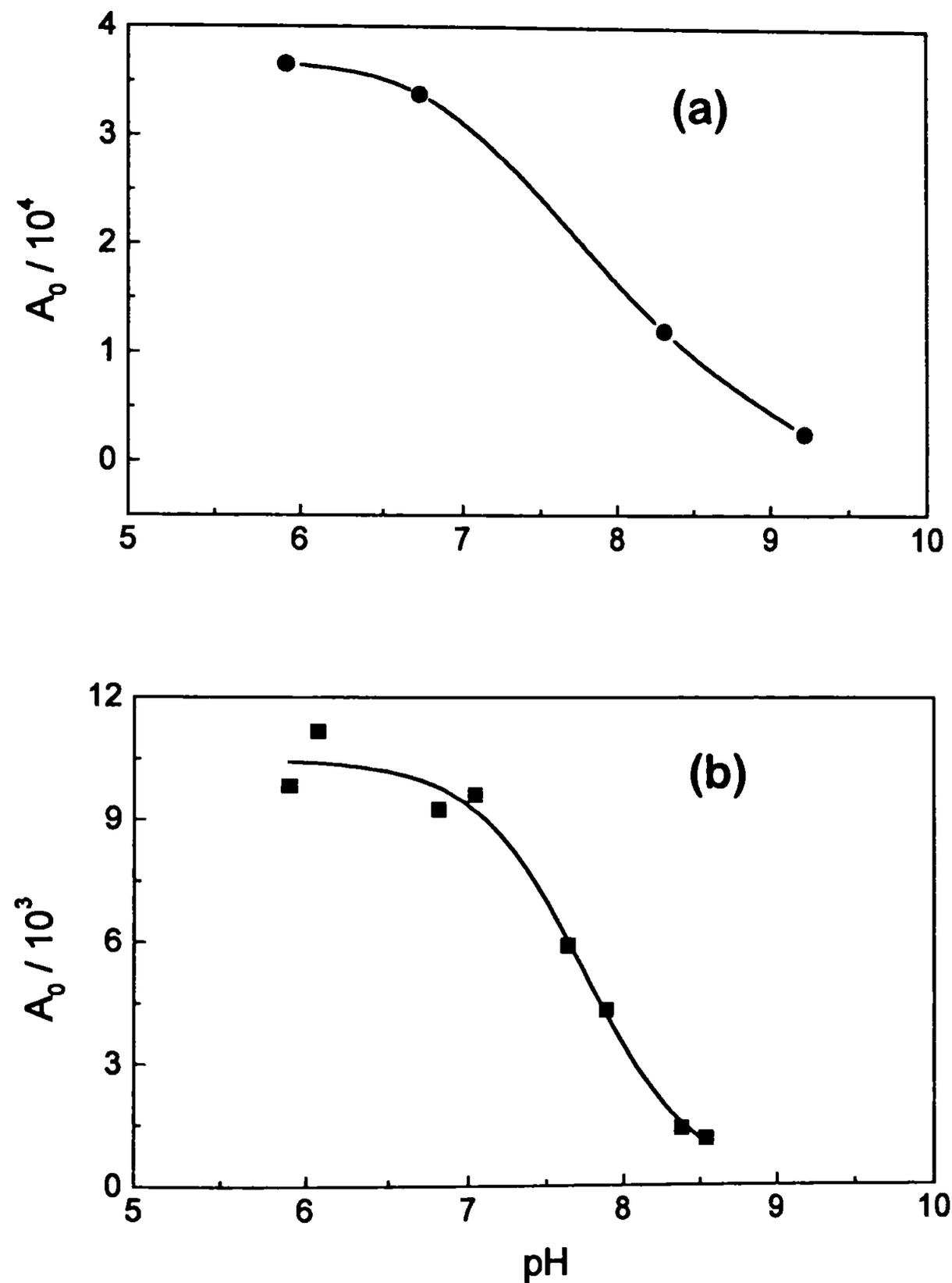


Figura III.9 - Influência da acidez do meio (tampão HIMI⁺/IMI) na área sob a curva de intensidade relativa de emissão vs tempo, para os ésteres-oxalatos a) [TCPO]: 1×10^{-5} mol.L⁻¹, b) [2-NPO]: 1×10^{-5} mol.L⁻¹. Condições experimentais: %ACN/H₂O(v/v): 85%, [H₂O₂]: 1×10^{-3} mol.L⁻¹, [IMI]: 1×10^{-2} mol.L⁻¹, [3-AFA]: 1×10^{-6} mol.L⁻¹

III.4.2.3. - Meio tamponado com imidazol e na presença de íons metálicos

As figuras III.10a e III.10b, onde a concentração de IMI é de 1×10^{-4} e 1×10^{-3} mol.L⁻¹ (pH 6) respectivamente, mostram que a área sob a curva de intensidade relativa de emissão diminui com o aumento da concentração de Cr(III) no meio. A diminuição é mais pronunciada para a concentração de IMI menor (figura 10a).

Quando o teor de ACN/H₂O utilizado foi de 60/40 e na presença de 3-AFA 1×10^{-8} mol.L⁻¹, em concentrações de íons Cr(III) maiores que 1×10^{-4} mol.L⁻¹, houve lenta formação de um precipitado esverdeado, provavelmente Cr(OH)₃.

Na figura III.11 observa-se que em meio tamponado HIMI⁺/IMI, onde a concentração de IMI é de 1×10^{-2} mol.L⁻¹, a adição de íons Cr(III) aumenta a área sob a curva de intensidade de emissão vs tempo.

Em meio onde o imidazol apresenta maior capacidade tamponante, ou seja, próximo ao valor de pK_a, a adição de íons Cr(III) não produz variação na área. Ao contrário, na faixa de pH 8-9, onde a capacidade tamponante é menor, a presença de Cr(III) acarreta aumento da área, sem alterar o tempo total de emissão t (figura III.11). O aumento A/A_0 é maior quando o éster-oxalato adicionado é 2-NPO.

Como observado na figura III.8, o perfil da curva de intensidade de emissão vs tempo (I_{\max} e A_0) e o tempo total de emissão t são fortemente alterados pela variação da concentração de IMI livre.

A influência da presença de outros íons metálicos pode ser observada nas figuras III.12a e III.12b.

Da análise das figuras III.9a, III.9b, III.12a e III.12b conclui-se que:

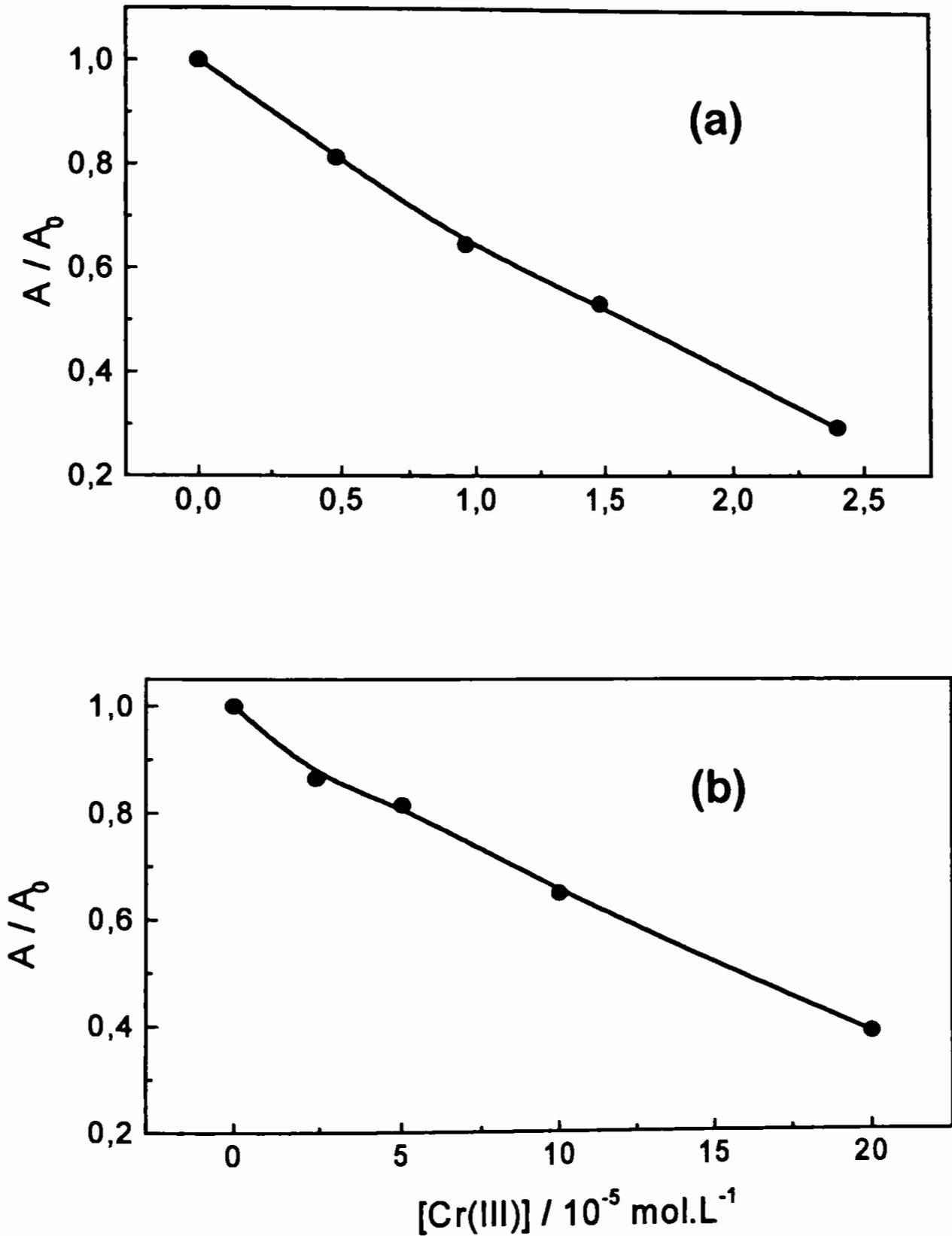


Figura III.10 - Efeito da concentração de íons Cr(III) na área sob a curva de intensidade relativa de emissão vs tempo, quando a) $[\text{IMI}]$: $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[\text{3-AFA}]$: $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, b) $[\text{IMI}]$: $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[\text{3-AFA}]$: $1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Condições experimentais: % $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}(\text{v/v})$: 60%, $[\text{TCPO}]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]$: $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

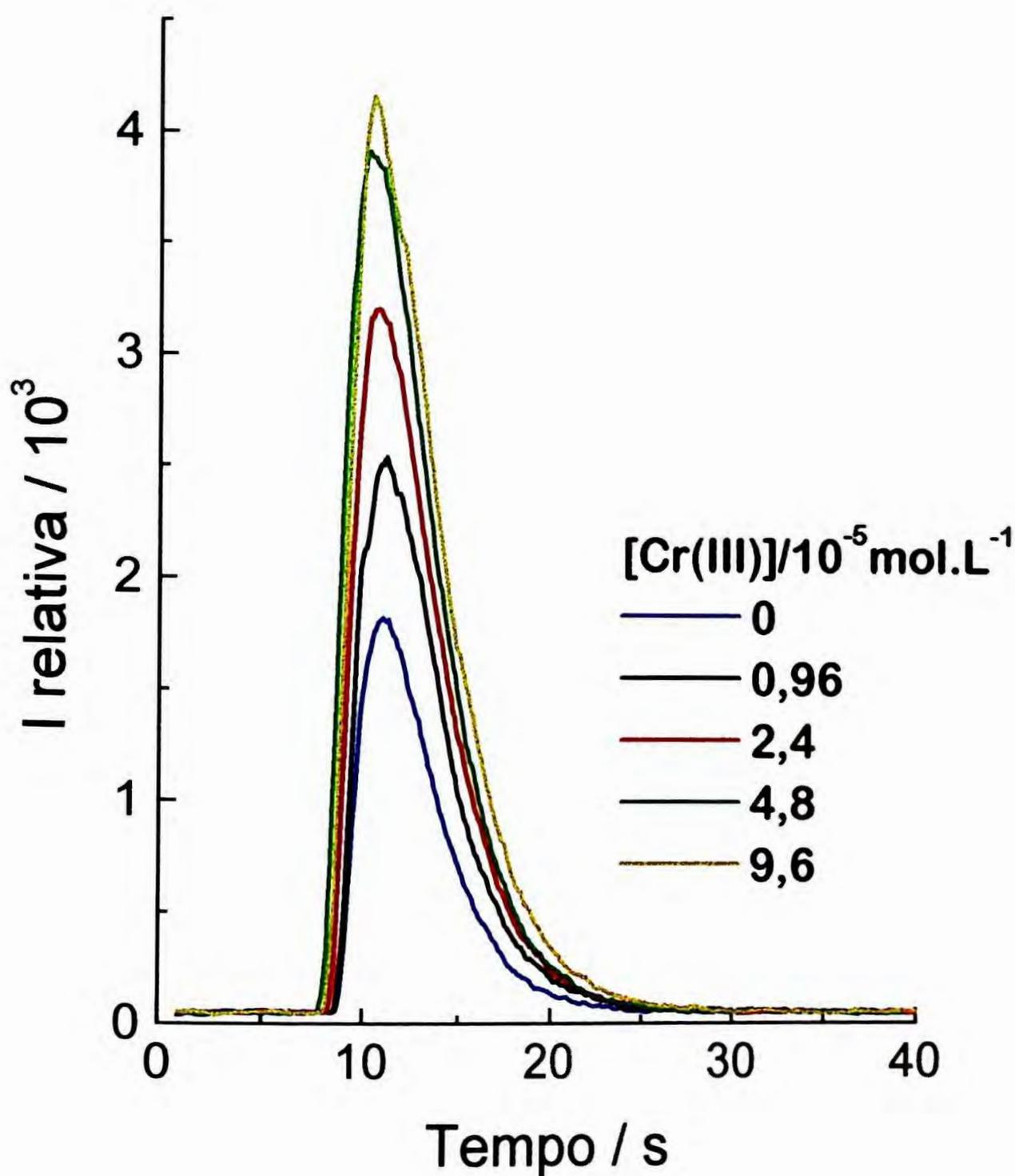


Figura III.11 - Perfil da intensidade relativa de emissão vs tempo com a adição de íons Cr(III) em meio tamponado por HIMI^+/IMI . Condições experimentais: %ACN/ H_2O (v/v): 85%, $[\text{TCPO}]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2]$: $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{IMI}]$: $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 8), $[\text{3-AFA}]$: $1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

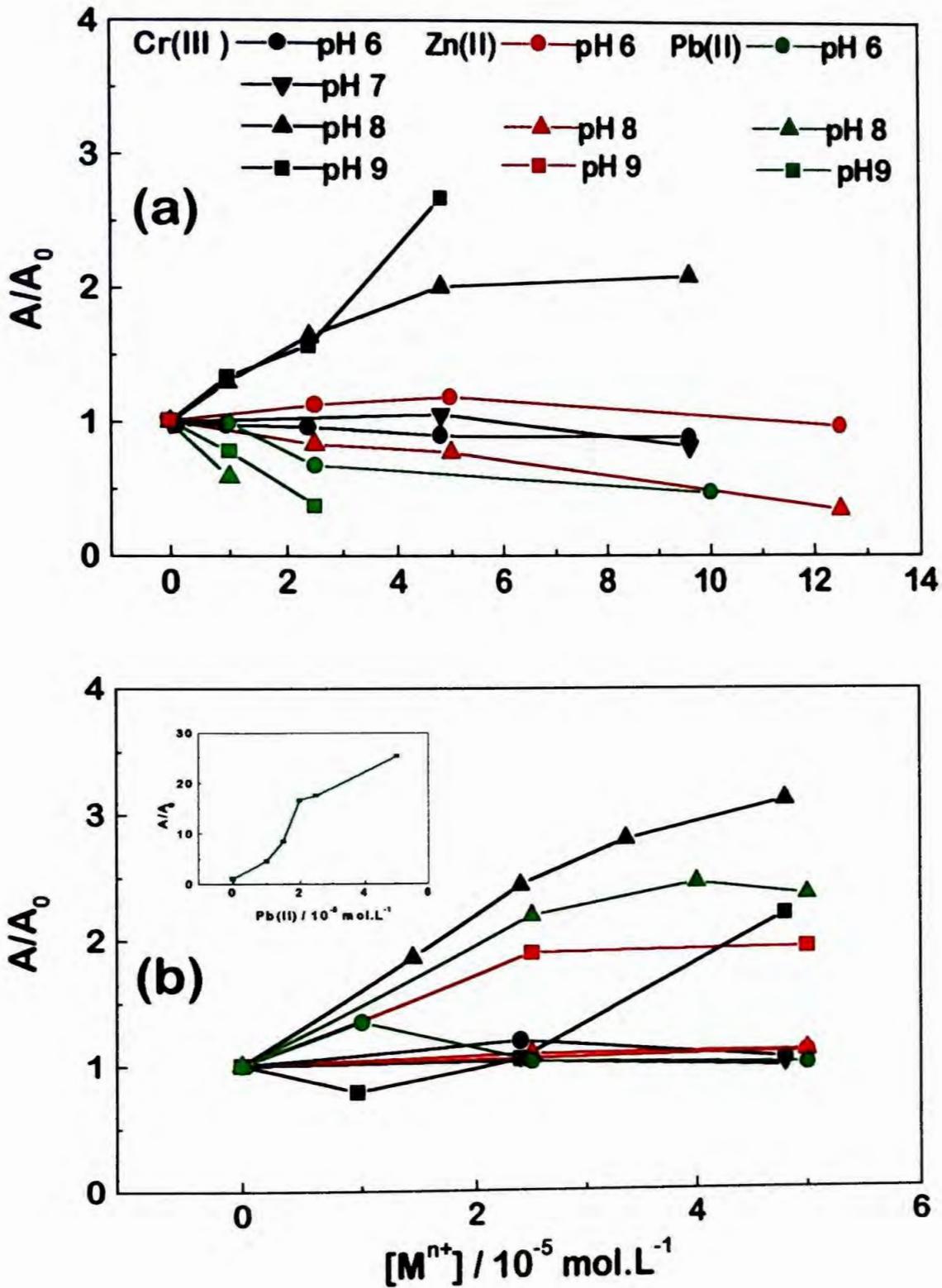


Figura III.12 - Representação da variação de A/A_0 , na presença de Cr(III), Zn(II) ou Pb(II), em meio tamponado ($HIMI^+/IMI$). Condições experimentais: %ACN/ H_2O (v/v): 85%, $[H_2O_2]$: $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $[IMI]$: $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, $[3-AFA]$: $1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. a) $[TCPO]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, b) $[2-NPO]$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$

- a) quando se utiliza 2-NPO, a variação da área A_0 com o pH é maior (figura III.9b);
- b) a acidez do meio é muito importante. Em pH 6-7, os íons metálicos praticamente não alteram a área (figuras III.12a, III.12b);
- c) com a utilização de TCPO, em pH 8 e 9 observa-se aumento de $\frac{A}{A_0}$ com a concentração de íons Cr(III), onde Cr(III) > Zn(II) (pH 6) (figura III.12a). Para os demais íons metálicos, não foi observado aumento. No entanto, com a utilização de 2-NPO a influência de Pb(II) é marcante quando comparada aos demais íons metálicos (figura III.12b).

III.5 - Conclusões gerais

Dos experimentos realizados no presente trabalho, podem ser considerados fundamentais os seguintes fatores:

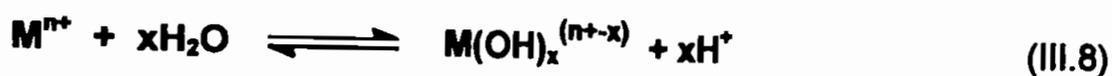
- a) influência do teor de água. Quanto menor o teor de água, maior é a área sob a curva intensidade relativa vs tempo, embora I_{\max} seja maior para ACN/H₂O (v/v) 50% (figura III.2). No entanto, em meio tamponado HIMI⁺/IMI (1×10^{-2} mol.L⁻¹, pH 6), variando o teor de ACN/H₂O(v/v) de 60-90% não foi observada qualquer variação na área, evidenciando que a acidez do meio é o fator mais importante a ser considerado;
- b) em meio não tamponado a área aumenta com a concentração de imidazol utilizado como catalisador (figura III.3),

- c) em meio não tamponado e baixas concentrações de imidazol, a adição de Cr(III) $(0,48-2,4) \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ diminui I_{max} e a área (figura III.5);
- d) aumentando a concentração do fluoróforo (3-AFA), há um aumento da área. No entanto, há evidências de que o íon metálico Cr(III) não interage com o fluoróforo (figura III.6). Para maiores esclarecimentos, deverão ser realizados experimentos em pH 8-9 para avaliar o efeito do pH e assim considerar a possibilidade de formação de um complexo entre o M^{n+} e fluoróforo, conforme enfatizado no caso do uso de 8-hidroxiquinolina⁸⁴ (página 64);
- e) a natureza do tampão é um fator importante, sendo que em meio tamponado por $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-} 4 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ a área aumenta como pH (7-8) (figura III.7b) enquanto que com tampão $\text{HIMI}^+ / \text{IMI}$ há uma acentuada diminuição (figura III.9);
- f) o aumento da concentração de IMI livre do tampão $\text{HIMI}^+ / \text{IMI}$, mantendo o pH constante, altera drasticamente o perfil da intensidade de emissão (figura III.8);
- g) o aumento de área na presença de Cr(III) somente foi observado em pH 8 e 9, para IMI livre $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. Empregando-se 2-NPO, especialmente para íon Pb(II) a relação $\frac{A}{A_0}$ é bem maior (figura III.12b).

Os nossos resultados não concordam com aqueles descritos por Steijger et al.⁸² apresentados nas figuras III.1 e III.2. Estes autores não conduziram os experimentos em meio de acidez controlada, não mantendo a concentração de IMI livre constante.

Uma das considerações que pode ser abordada é a formação de complexos do íon metálico com o imidazol ou com íons hidroxila, de acordo com os equilíbrios

III.7 e III.8:



Com a formação de complexo entre o íon metálico e o imidazol, ocorre diminuição da concentração do catalisador livre (IMI), deslocando equilíbrio ácido-base descrito na equação III.6, aumentando a concentração de íons H^+ , ou seja, diminuição de pH. Ocorre o mesmo efeito com a hidrólise de cátions (equação III.8). Como verificado na figura III.9 a e b, dependendo do pH, uma pequena variação de pH acarreta em uma variação significativa na área sob a curva de intensidade relativa de emissão vs tempo.

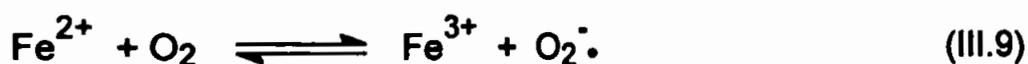
Dos íons metálicos estudados, encontram-se na literatura as constantes de equilíbrio dos complexos de imidazol com Cu(II) e Zn(II) (tabela III.2)⁹¹

Tabela III.2 - Alguns valores de constantes de equilíbrio para Cu(II) e Zn(II) com imidazol⁹¹.

M^{n+}	$\log K_1$	$\log K_2$	$\log K_3$	$\log K_4$
Cu(II)	4,4	8,0	11,0	13,0
Zn(II)	2,7	5,0	7,5	9,0

Nos nossos experimentos, nos casos de Cr(III) e Pb(II) (pH 8 e 9), a medição da variação de pH do meio com a adição do íon metálico não é suficiente para explicar o aumento da área A/A_0 .

O único trabalho encontrado na literatura, referente a oxidação de TCPO por peróxido de hidrogênio em meio tamponado (tampão borato e fosfato, pH 9) e na ausência de IMI foi realizado por U. Quab e D. Klockow⁷⁶ para a determinação de Fe(II) e peróxido de hidrogênio. Nesse caso, o aumento do sinal devido a presença de Fe(II), na ausência de peróxido de hidrogênio foi atribuída à formação de radicais peróxido conforme as reações abaixo;



Todas essas considerações são importantes quando do uso da reação quimiluminescente de oxidação de ésteres-oxalatos, na presença de um fluoróforo, em métodos analíticos para a determinação de peróxido de hidrogênio, hidrocarbonetos poliaromáticos e íons metálicos. Cuidados especiais devem ser tomados quanto à acidez do meio, composição do solvente e presença de íons metálicos, principalmente Cr(III), Pb(II) e Zn(II).

PERSPECTIVAS FUTURAS

IV - PERSPECTIVAS FUTURAS

Em relação à reação com o luminol, devem ser efetuados estudos com amostras naturais e biológicas contendo baixas concentrações de íons metálicos.

Vários aspectos relacionados ao sistema peróxi-oxalato merecem ser abordados:

- a) Adição de surfactantes, proporcionando aumento de sensibilidade e estabilidade dos ésteres-oxalatos, visando conduzir os estudos em meio contendo maior teor de água;
- b) Estudos comparativos em várias concentrações de tampão HIMI⁺/IMI;
- c) Influência de íons Cu(II) na intensidade de emissão, em concentrações de 1×10^{-7} mol.L⁻¹;
- d) Verificação da possível interação de diferentes fluoróforos com o íon metálico, efetuando estudos em meios de diferente acidez e concentração do fluoróforo;
- e) Acompanhamento espectrofotométrico (em paralelo) da liberação do 2,4,6-triclorofenol ou 2-nitrofenol visando verificar a participação do íon metálico na reação, na ausência do fluoróforo;
- f) Avaliação das constantes de equilíbrio ou de formação através de medições da variação de pH (ou potencial) do tampão HIMI⁺/IMI, com a adição de íon metálico;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A.K. Babko e N.M. Lukovskaya, A photographic chemiluminescent method for the determination of microamounts of copper and hydrogen peroxide, *J. Anal. Chem. USSR*, **17**, 47-50 (1962).
2. C.V. Stevani, "Estudo mecanístico do sistema peróxi-oxalato", Tese de Doutorado, IQ - USP, São Paulo (1997)
3. K. Robards e P.J. Worsfold, Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence, *Anal. Chim. Acta*, **266**, 147-173 (1992)
4. W.L. Hinze, N. Srinivasan, T.K. Smith, S. Igarashi e H. Hoshino, Organized assemblies in analytical chemiluminescence spectroscopy: an overview, In: "Advances in Multidimensional Luminescence", vol.1, p. 149-206, JAI Press, (1991) [fotocópia].
5. A. Hartkopt, e R. Delumyea, Use of the luminol reaction for metal ion detection in liquid chromatography, *Anal. Lett.*, **7**, 79-88 (1974)
6. W.R. Seitz e M.P. Neary, Chemiluminescence and bioluminescence in chemical analysis, *Anal. Chem.*, **46**, 188A-202A (1974)
7. U. Isacsson e G. Wettermark, Chemiluminescence in analytical chemistry, *Anal. Chim. Acta*, **68**, 339-362 (1974)
8. D.B. Paul, Recent analytical developments using chemiluminescence in solution, *Talanta*, **25**, 377-382 (1978)

9. P.A. Sherman, J. Holzbecher e D.E. Ryan, Analytical applications of peroxyoxalate chemiluminescence, *Anal. Chim. Acta*, **97**, 21-27 (1978)
10. R.L. Veazey e T.A. Nieman, Chemiluminescent determination of clinically important organic reductants, *Anal. Chem.*, **51**, 2092-2096 (1979)
11. L.J. Kricka e G.H. G. Thorpe, Chemiluminescent and bioluminescent methods in analytical chemistry - a review, *Analyst (London)* **108**, 274-1296 (1983)
12. A.K. Campbell, "*Chemiluminescence - Principles and applications in biology and medicine*", Ellis Horwood, Chichester (1988)
13. G.J. Jong e P.J. M. Kwakman, Chemiluminescence detection for high performance liquid chromatography of biomedical samples, *J. Chromatogr.*, **492**, 319-343 (1989)
14. A. Townshend, Solution chemiluminescence-some recent analytical developments: plenary lecture, *Analyst (London)*, **115**, 495-500 (1990)
15. P.J. Kwakman e U.T.Th. Brinkman, Peroxyoxalate chemiluminescence detection in liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta*, **266**, 175-192 (1992).
16. A.R. Bowie, M.G. Sanders e P.J. Worsfold, Analytical applications of liquid phase chemiluminescence reactions - a review, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **11**, 61-90, (1996)
17. R.D. Jalkian e M.B. Denton, Ultra-trace-level determination of cobalt, chromium and hydrogen peroxide by luminol chemiluminescence detected with a charge-coupled device, *Appl. Spectrosc.*, **42**, 1194-1199 (1988).

18. D. Pérez-Bendito, M. Silva, *"Kinetic Methods in Analytical Chemistry"*, Ellis Horwood, Chichester (1988)
19. K.D. Gundermann e F. McCapra, *"Chemiluminescence in Organic Chemistry"*, Springer Verlag, Berlin, 77-108, 167-191 (1987)
20. E.H. White, O. Zafiriou, H.H. Kagi e J.H.M. Hill, Chemiluminescence of luminol: the chemical reaction, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 940-941 (1964)
21. Z.H. Lan e H.A. Mottola, Carbon dioxide-enhanced luminol chemiluminescence in the absence of added oxidant, *Analyst (London)*, **121**, 211-218 (1996)
22. T.G. Burdo e W.R. Seitz, Mechanism of cobalt catalysis of luminol chemiluminescence, *Anal. Chem.*, **47**, 1639-1643 (1975)
23. V.V.S.E. Dutt e H.A. Mottola, Some analytical applications of reaction-rate-promoting effects, *Anal. Chem.*, **46**, 1090-1094 (1974)
24. J. Ruzicka e E.H. Hansen, *"Flow Injection Analysis"*, John Wiley & Sons, New York (1988)
25. A.R. Bowie, M.G. Sanders e P.J. Worsfold, Analytical applications of liquid phase chemiluminescence reactions, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **11**, 61-90 (1996)
26. D.B. Paul, Recent analytical developments using chemiluminescence in solution, *Talanta*, **25**, 377-382 (1978)
27. W.R. Seitz, W.W. Suydam e D.M. Hercules, Determination of traces amounts of chromium(III) using chemiluminescence analysis, *Anal. Chem.*, **44**, 957-962 (1972)

28. R. Escobar, Q. Lin, A. Guiraúm e F.F. de la Rosa, Flow injection chemiluminescence method for the selective determination of chromium(III), *Analyst (London)*, **118**, 643-647 (1993)
29. J.L. Bowling, J.A. Dean, G. Goldstein e J.M. Dale, Rapid determination of chromium in natural waters by chemiluminescence with a centrifugal fast analyzer, *Anal. Chim. Acta*, **76**, 45-55 (1975)
30. U.P. Patnaik e J. Muralidhar, Estimation of chromium in ores and beneficiated products: an ultrasonic approach, *Talanta*, **42**, 553-556 (1995)
31. V.I. Rigin e A.I. Blokhin, Selective chemiluminescence kinetic determination of microamounts of iron and cobalt, *J. Anal. Chem. USSR*, **32**, 246-249 (1977)
32. V. Nau e T.A. Nieman, Application of microporous membranes to chemiluminescence analysis, *Anal. Chem.*, **51**, 424-428 (1979)
33. J.L. Burguera e A. Townshend, Monitoring chemiluminescent reactions by flow injection analysis, *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, **16**, 263-264 (1979)
34. L.L. Klopff e J.A. Nieman, Effect of iron(II), cobalt(II), copper(II) and manganese(II) on the chemiluminescence of luminol in the absence of hydrogen peroxide, *Anal. Chem.*, **55**, 1080-1083 (1983)
35. E.A. Boyle, B. Handy e A. Van Geen, Cobalt determination in natural waters using cation-exchange liquid chromatography with luminol chemiluminescence, *Anal. Chem.*, **59**, 1499-1503 (1987)

36. H. Sakai, T. Fujiwara, M. Yamamoto e T. Kumamaru, Determination of ultra-trace levels of cobalt by ion chromatographic separation and chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta*, **221**, 249-258 (1989)
37. P. Jones, T. Williams e L. Ebdon, Determination of cobalt at picogram levels by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta*, **217**, 157-163 (1989)
38. B. Yan e P.J. Worsfold, Determination of cobalt(II), copper(II) and iron(II) by ion chromatography with chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta*, **236**, 287-292, (1990)
39. Y.X. Zhou e G.Y. Zhu, Rapid automated in-situ monitoring of total dissolved manganese in underground water by reverse-flow injection with chemiluminescence detection during the process of water treatment, *Talanta*, **44**, 2042-2049 (1997)
40. W. Qin, Z.J. Zhang e F.C. Wang, Chemiluminescence flow system for the determination of Fe(II) and Fe(III) in water, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **360**, 130-132 (1998)
41. A.F. Danet, M. Badea, A. Ciucu e S. Jipa, Flux injection analysis (FIA) with mercury ions chemiluminescence detection (II) by alcohol oxidase inhibition, *Rev. Chim.*, **49**, 25-30 (1998)
42. J.L. Burguera e A. Townshend, Determination of manganese(II) by a chemiluminescence reaction, *Talanta*, **28**, 731-735 (1981).

43. A. Gaikwad, M. Silva e D. Perez Bendito, Selective stopped-flow determination of manganese with luminol in the absence of hydrogen peroxide, *Anal. Chim. Acta*, **302**, 275-282 (1995)
44. J.L. Burguera, M. Burguera e A. Townshend, Determination of zinc and cadmium by flow injection analysis and chemiluminescence - short communication, *Anal. Chim. Acta*, **127**, 199-201 (1981).
45. R.T. Li e D.M. Hercules, Determination of chromium in biological samples using chemiluminescence, *Anal. Chem.*, **46**, 916-919 (1974)
46. D.E. Bause e H.H. Patterson, Enhancement of luminol chemiluminescence with halide ions, *Anal. Chem.*, **51**, 2288-2289 (1979)
47. C.A. Chang e H.H. Patterson, Halide ion enhancement of chromium(III), iron(II) and cobalt(II) catalysis of luminol chemiluminescence, *Anal. Chem.*, **52**, 653-656 (1980)
48. C. A. Chang, H. H. Patterson, L. M. Mayer e D. E. Bause, Determination of trivalent chromium in seawater by chemiluminescence, *Anal. Chem.*, **52**, 1264-1267 (1980).
49. T. Williams, P. Jones e L. Ebdon, Simultaneous determination of Cr(III) and Cr(VI) at ultratrace levels using ion chromatography with chemiluminescence detection, *J. Chromatogr.*, **482**, 361-366 (1989).
50. B. Gammelgaard, O. Jons e B. Nielsen, Simultaneous determination of chromium(III) and chromium(VI) in aqueous solutions by ion chromatography and chemiluminescence detection, *Analyst (London)*, **117**, 637-640 (1992)

51. M.A.M. Sanchez, M.E.D. Garcia e A.S. Medel, Simultaneous determination of cobalt and chromium by ion chromatography with chemiluminescence detection and its application to glass analysis, *Mikrochim. Acta*, **106**, 227-234 (1992).
52. A.A. Alwarthan, S.A. AlTamrah e A.A. Akel, Determination of promethazine by its inhibition of the chemiluminescence of the luminol-hydrogen peroxide-chromium(III) system, *Anal. Chim. Acta*, **282**, 69-174 (1993).
53. H.G. Beere e P. Jones, Investigation of chromium(III) and chromium(VI) speciation in water by ion chromatography with chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta*, **293**, 237-243 (1994)
54. Z.J. Zhang, W. Qin e S.N. Liu, Chemiluminescence flow system for the monitoring of chromium(VI) in water, *Anal. Chim. Acta*, **318**, 71-76 (1995).
55. R. Escobar, Q. Lin, A. Guiraúm e F.F. de la Rosa, Determination of trivalent and hexavalent chromium in waste water by flow injection chemiluminescence analysis, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **61**, 169-175 (1995)
56. B. Gammelgaard e Y.P. Liao, Improvement on simultaneous determination of chromium species in aqueous solution by ion chromatography and chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta*, **354**, 107-113 (1997)
57. J. Basset, R.C. Denney, G.H. Jeffery e J. Mendham, In: "Vogel, *Análise Inorgânica Quantitativa*", Titrimetria e Gravimetria, p. 168-299, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (1992)
58. A.I. Vogel, "Química Analítica Qualitativa", Reações dos Cátions, p. 214-325, Mestre Jou, São Paulo (1979)

59. N. Baccan, J.C. de Andrade, O.E.S. Godinho, J.S. Barone, "*Química Analítica Quantitativa Elementar*", Práticas de Laboratório, p. 154-212, Edgard Blucher, São Paulo (1985)
60. A.G. Hadd e J.W. Birks, Peroxyoxalate chemiluminescence: mechanism and analytical detection, In: "*Selective Detectors, Environmental and Biomedical Applications*", p. 209-240, John Wiley & Sons, New York (1995) [Chemical Analysis, v. 131]
61. M.M. Rauhut, Chemiluminescence from concerted peroxide decomposition reactions, *Acc. Chem. Res.*, **2**, 80-87 (1969)
62. F. McCapra, Chemiluminescence of organic compounds, *Prog. Org. Chem.*, **8**, 231 (1973)
63. G.B. Schuster, Chemiluminescence of organic peroxides. Conversion of ground-state reactants to excited-state products by the chemically initiated electron-exchange luminescence mechanism, *Acc. Chem. Res.*, **12**, 366-373 (1979)
64. A.G. Hadd. e A.G. Birks, Kinetics and mechanism of the nucleophilic substitution reaction of imidazole with bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate and bis(2,4-dinitrophenyl)oxalate, *J. Org. Chem.*, **61**, 2657-2663 (1996)
65. C.V. Stevani, D.F. Lima, V.G. Toscano e W.J. Baader, Kinetic studies on the peroxyoxalate chemiluminescent reaction: imidazole as a nucleophilic catalyst, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2*, p. 989-995 (1996)

66. C.V. Stevani e W.J. Baader, Kinetic studies on the chemiluminescent decomposition of an isolated intermediate in the peroxyoxalate reaction *J. Phys. Org. Chem.*, **10**, 593-599 (1996)
67. H. Neuvonen, Kinetics and mechanism of reactions of pyridines and imidazoles with phenyl acetates and trifluoroacetates in aqueous acetonitrile with low contents of water: nucleophilic and general base catalysis in ester hydrolysis, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.2*, p. 159-167 (1987)
68. F.J. Alvarez, N.J. Parekh, B. Matuszewski, R.S. Givens, T. Higuchi e R.L. Schowen, Multiple intermediates generate fluorophoro-derived light in the oxalate/peroxide chemiluminescence system, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 6435-6437 (1986)
69. K.W. Sigvardson e J.W. Birks, Peroxyoxalate chemiluminescence detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **55**, 432-435 (1983)
70. K.W. Sigvardson e J.W. Birks, Peroxyoxalate chemiluminescence detection of polycyclic aromatic amines in liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **56**, 1096-1102 (1984)
71. K.W. Sigvardson e J.W. Birks, Detection of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid chromatography by zinc reduction and peroxyoxalate chemiluminescence, *J. Chromatogr.* **316**, 507-518 (1984)

72. G. Scott, W.R. Seitz e J. Ambrose, Improved determination of hydrogen peroxide by measurement of peroxyoxalate chemiluminescence, *Anal. Chim. Acta*, **115**, 221-228 (1980)
73. P.V. Zoonen, D.A. Kamminga, C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei e G. Gübitz, A solid-state chemiluminescence detector for hydrogen peroxide based on an immobilized luminophore - application to rain water, *Anal. Chim. Acta*, **174**, 151-161, (1985)
74. P.V. Zoonen, D.A. Kamminga, C. Gooijer, N.H. Velthorst e R.W. Frei, Flow injection determination of hydrogen peroxide by means of a solid-state peroxyoxalate chemiluminescence reactor, *Anal. Chim. Acta*, **167**, 249-256 (1985)
75. J.R. Poulsen, J.W. Birks, G. Gübitz, P.V. Zoonen, C. Gooijer, N.H. Verthorst e R.W. Frei, Solid-state peroxyoxalate chemiluminescence detection of hydrogen peroxide generated in a post-column reaction, *J. Chromatogr.*, **360**, 371-383 (1986)
76. U. Quab e D. Klockow, Determination of Fe(II) and H₂O₂ in atmospheric liquid water by peroxyoxalate chemiluminescence, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **60**, 361-375 (1995)
77. P.J. Kwakman. e U.A.Th. Brinkman, Peroxyoxalate chemiluminescence detection in liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta*, **266**, 175-192 (1992).

78. P.V. Zoonen, D.A. Kamminga, C. Gooijer, N.H. Velthorst e R.W. Frei, Quenched peroxyoxalate chemiluminescence as a new detection principle in flow injection analysis and liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **58**, 1245-1248 (1986)
79. P.V. Zoonen, H. Bock, C. Gooijer, N.H. Velthorst e R.W. Frei, Quenched peroxyoxalate chemiluminescence detection in aqueous liquid chromatographic separations, *Anal. Chim. Acta*, **200**, 131-141 (1987)
80. C. Gooijer e N.H. Velthorst, Low-level interferences in peroxyoxalate chemiluminescence, *Biomed. Chromatogr.*, **4**, 92-95 (1990).
81. K. Honda, J. Sekino e K. Imai, Bis(2,4-dinitrophenyl)oxalate as a chemiluminescence reagent in determination of fluorescent compounds by flow injection analysis, *Anal. Chem.*, **55**, 940-943 (1983)
82. O.M. Steijger, P.H.M. Rodenburg, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman e J.J.M. Holthuis, Influence of metal ions on peroxyoxalate chemiluminescence, *Anal. Chim. Acta*, **266**, 233-241(1992)
83. O.M. Steijger, H.C.M.den Nieuwenboer, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman e J.J.M. Holthuis e A.K. Smilde, Enhancement of peroxyoxalate chemiluminescence by copper(II) in flow injection analysis; optimization by factorial design analysis, *Anal. Chim. Acta*, **320**, 99-105 (1995)
84. K. Sato e S. Tanaka, Determination of metal ions by flow injection analysis with peroxyoxalate chemiluminescence detection, *Microchem. J.*, **53**, 93-98 (1996)
85. M.M. Rauhut, L.J. Bollyky, B.G. Roberts, M. Loy, R.H. Whitman, A.V. Iannotta, A.M. Semsel e R.A. Clarke, Chemiluminescence from reactions of

eletronegatively substituted aryl oxalates with H_2O_2 and fluorescent compounds, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 6515-6522 (1967)

86. A.G. Mohan e N.J. Turro, A facile and effective chemiluminescence demonstration experiment, *J. Chem. Educ.*, **51**, 528-529 (1974)
87. K. Imai, Y. Matsunaga, Y. Tsukamoto e Y. Nishitani, Application of bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadecyloxycarbonyl)-phenyl]oxalate to post-column chemiluminescence detection in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **400**, 169-176 (1987)
88. R. Weinberger, Solvent and pH effects on peroxyoxalate chemiluminescence detection for liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **314**, 155-165 (1984)
89. G.J. de Jong, N. Lammers, F.J. Spruit, R.W. Frei e U.A.Th. Brinkman, Analytical implications of the half-life of the chemiluminescence signal in the peroxyoxalate detection system for liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **353**, 249-257 (1986)
90. S.A. El-Gyar, M.M.A. Hamed, E.M. Abdalla e M.R. Mahmoud, *Monatsh. Chem.*, **124**, 127-133 (1993)
91. R.M. Smith, A.E. Matell e R.J. Motekaitis, NITST Critically selected stability constants of metal complexes database, version 3.0, Gaithersburg, (1997) [software].