



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**Um analisador quimiluminescente em fluxo-batelada
baseado em filmes digitais com extração em fase sólida
magnética aplicado a determinação de cobre em cachaças**

Renato Allan Navarro Andrade

**João Pessoa – PB - Brasil
Agosto de 2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**Um analisador quimiluminescente em fluxo-batelada
baseado em filmes digitais com extração em fase sólida
magnética aplicado a determinação de cobre em cachaças**

Renato Allan Navarro Andrade*

Tese de Doutorado apresentada Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

2º Orientador: Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima

* Bolsista CNPq e CAPES

João Pessoa – PB - Brasil

Agosto de 2017

Catálogo na publicação
Setor de Catalogação e Classificação

A553a Andrade, Renato Allan Navarro
 Um analisador quimiluminescente em fluxo-batelada baseado em filmes
 digitais com extração em fase sólida magnética aplicado a determinação de
 cobre em cachaças / Renato Allan Navarro Andrade. – João Pessoa, 2017.
 132 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo.
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima
Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN/PPGQ

1. Química analítica. 2. Nanopartícula magnética. 3. Análise em fluxo –
batelada. 4. Quimiluminescência. 5. Filmes digitais. 6. Cobre em cachaça.
I. Título.

UFPB/BC

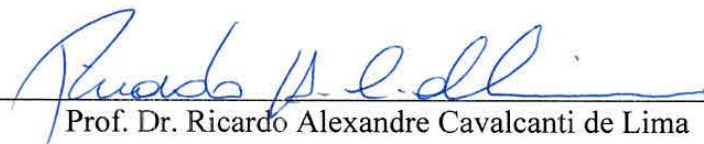
CDU - 543(043)

Um analisador quimiluminescente em fluxo-batelada baseado em filmes digitais com extração em fase sólida magnética aplicado a determinação de cobre em cachaças.

Tese apresentada pelo aluno Renato Allan Navarro Andrade e aprovada pela banca examinadora em 28 de agosto de 2017.



Prof. Dr. Mario César Ugulino de Araújo
Orientador/Presidente



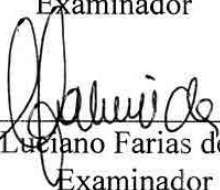
Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima
2º. Orientador



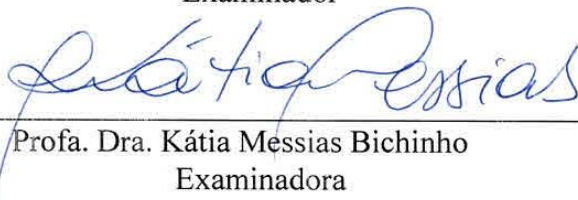
Prof. Dr. Pablo Nogueira Teles Moreira
Examinador



Dr. Wellington da Silva Lyra
Examinador



Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida
Examinador



Prof. Dra. Kátia Messias Bichinho
Examinadora

Ao meu pai Roberto e a minha mãe Dayse, pelo amor, carinho e incentivo.

A toda minha família.

Com amor e gratidão,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ter me abençoado, fortalecido e presenteado com dádivas e vitórias a cada dia.

Aos meus amados pais, Roberto Andrade e Dayse Navarro.

A minha esposa Lucivânia Navarro pela paciência e companheirismo sempre.

A minha segunda mãe Severina Maria (mocinha).

Aos meus irmãos Robledo Jorge e Renan Henrique pelo apoio e companheirismo.

Ao Professor Mário César Ugulino de Araújo pela orientação, dedicação e confiança.

Ao professor Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima, pela amizade, pela disponibilidade e paciência dedicada a esse trabalho.

Aos professores Márcio José Coelho de Pontes e Edvan Cirino da Silva pelas contribuições acadêmico-científicas.

Aos Professores Luciano Farias de Almeida e Kátia Messias Bichinho pela participação na banca examinadora no Exame de Qualificação e pelas valiosas sugestões que enriqueceram este trabalho.

Aos amigos Francisco Cunha, Pedro Lemos, Amália Gama, Stéfani Yuri, Wellington Lyra pela amizade, companheirismo e pelas constantes contribuições científicas.

Ao LACOM e ao TECNOMAT pela disponibilização de equipamentos, os quais contribuíram para realização deste trabalho. Em especial aos amigos Laís Chantelle e Lucas Ricardo pela colaboração.

Aos amigos do IFRN Campus Ipanguaçu Ozanira Maciel, Nathécia Cunha, Fernanda Souza e Wesley Silva pela amizade e os bons momentos vividos.

Aos amigos Flaviano, Lucas, Daniel, Matheus (Chuchu), Urão, Netão, Manucita, Welma, David, Sófacles, Willy, Dayvison, Osmundo, Jonathan, Eduardo, Mayara, Kelly, Rodrigo, Danilo, Laila, Valéria, Cinthia, Andréa, Adenilton e a todos do LAQA que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas e apoio financeiro.

Tempestades certamente irão nos alcançar
Longe no alto mar sem uma estrela a nos guiar

Mas a calmaria virá
Com águas tranquilas em mãos
Na luz que dá nome à manhã
Mais perto estaremos do lar.

(Os Arrais)

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido uma metodologia completa para determinação de íons cobre (II) em cachaça. A metodologia consiste nas seguintes etapas: (1) adsorção química do analito utilizando nanopartículas magnéticas de magnetita (Fe_3O_4) recobertas com alumina (Al_2O_3) e funcionalizadas com dodecil sulfato de sódio e 1-(2-piridilazo)-2-naftol; (2) dessorção do analito em meio ácido e (3) detecção do analito por meio de seu efeito catalítico sobre a reação quimiluminescente entre luminol e H_2O_2 . As duas primeiras etapas são realizadas de modo automático utilizando um sistema em fluxo-batelada projetado exclusivamente para este fim, enquanto que a detecção realizada a partir de filmes digitais dentro do próprio sistema automático. Após a síntese, as partículas de magnetita foram caracterizadas por difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura que indicaram diâmetros de partícula da ordem de nanômetros e distribuição uniforme de tamanho, respectivamente. O sistema automático em fluxo-batelada possui uma câmara de mistura especial em politetrafluoretileno com uma janela circular em quartzo que permite o registro *on-line* do fenômeno quimiluminescente por filmes digitais. Acoplado a esta, um dispositivo robótico com ímãs de neodímio foi utilizado para geração de campos magnéticos. Todo processo foi gerenciado utilizando um programa escrito em linguagem *ActionScript 3.0*. Os filmes digitais foram registrados com uma taxa de captura de 30 quadros por segundo. A partir dos filmes foi obtida a curva analítica utilizando o conceito de norma do vetor no espaço do sistema de cor RGB. Os fatores que influem na magnitude da resposta analítica foram estudados e otimizados por meio de planejamento fatorial e metodologia da superfície de resposta, respectivamente. A metodologia definitiva utilizada permitiu estimar limites de detecção e quantificação de 3,73 e 22,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu (II) respectivamente. A exatidão da metodologia proposta foi avaliada em termos de testes de recuperação, cujas taxas obtidas estão entre 95 e 106% em amostras reais de cachaça. Tais características de desempenho são um indicativo razoável da viabilidade da metodologia proposta para fins de monitoramento do teor de íons cobre (II) na referida bebida.

Palavras-chave: nanopartícula magnética; análise em fluxo-batelada; quimiluminescência; filmes digitais; cobre em cachaça.

ABSTRACT

This work proposes a full methodology for determination of copper (II) ions in spirits. The methodology consists in three steps: (1) chemical adsorption of the analyte in magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles covered aluminium oxide and functionalized with sodium dodecyl sulfate and 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol ; (2) desorption of the analyte in acid medium and (3) detection of the analyte by means of its catalytic effect over the chemiluminescent reaction between luminol and hydrogen peroxide (H_2O_2). The first two steps are carried out in automatic manner using a flow-batch analyzer specially designed for this aim, as the detection was carried out from digital movies inside the automatic system. After synthesis, magnetic nanoparticles were characterized by X-Ray Diffraction and Scanning Electron Microscopy which indicated particle sizes in the order of nanometers with uniform distribution of sizes, respectively. The flow-batch automatic system has an especial mixing chamber in polytetrafluorethylene with a quartz circular window for on-line recording of the chemiluminescent phenomenon by digital films. Coupled to it, a robotic device with neodymium magnets was used in order to generate magnetic fields. The whole process was managed by a software written in *ActionScript 3.0*. Digital movies have been recorded at a rate of 30 frames per second. Analytical curves have been obtained by means of the concept of norm of the vector in the space RGB color system. The significant experimental factors over the analytical response were studied and optimized by means of factorial design and response surface methodology, respectively. The definitive methodology allowed to estimate limit of detection and quantification of 3.73 e $22.4 \mu\text{g L}^{-1}$ of Cu(II) ions, respectively. Accuracy was assessed in terms of recovery tests whose rates were between 95 and 106% in actual spirit samples. Such performance characteristics are a reasonable indicative of the feasibility of the proposed methodology for monitoring copper (II) ions content in the mentioned beverage.

Key-words: magnetic nanoparticle; flow-batch analysis; chemiluminescence; digital movies; copper in cachaça.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Descrição geral da reação quimiluminescente direta envolvendo o luminol. Adaptada de ASLAN; GEDDES, 2009.....	11
Figura 2.2 Descrição geral da reação quimiluminescente indireta envolvendo o luminol. Adaptada de ASLAN; GEDDES, 2009.....	11
Figura 2.3 Ilustração de tipos de nanoestruturas. (a) núcleo de magnetita sem recobrimento; (b) núcleo de magnetita recoberta. Fonte: o autor 2017.....	17
Figura 2.4 Tipos de recobrimento do núcleo das partículas magnéticas. Adaptada de GIAKISIKLI e ANTHEMIDIS, 2013.....	18
Figura 2.5 Modelo sugerido de ligação entre o SDS-PAN na superfície de nanoalumina. Adaptada de EZODDIN <i>et al.</i> , 2010.	19
Figura 2.6 Formas adquiridas pelo ligante PAN dependendo do pH do meio. Fonte: SOARES, 2006.	20
Figura 2.7 Reação química entre o complexante PAN e íons de cobre (II). Adaptada de SARKER, K. C.; ULLAHA, RAFIQUE 2013.....	20
Figura 2.8 Representação esquemática das etapas da extração em fase sólida magnética (MSPE). Adaptada de FARAJI, 2016	22
Figura 2.9 Esquema dos principais componentes do sistema FBA. (a) bomba peristáltica, (b) válvulas solenoides, (c) câmara de mistura, (d) agitador magnético, (e) sistema de detecção, (f) acionador de válvulas e (g) computador. Fonte: o autor 2017.	27
Figura 2.10 Bomba pistão acoplada à câmara de mistura para propulsão dos fluidos em um sistema em fluxo-batelada. (a) motor de passo, (b) eixo do embolo e (c) Câmara de mistura. Fonte: o autor (2017).	29

Figura 2.11 Miniaturização da câmara de mistura empregada no sistema μ FBA. Fonte: o autor 2017.	30
Figura 2.12 Ilustração geométrica do sistema RGB. Adaptada de Lyra 2008.	33
Figura 3.1 Ilustração das etapas envolvidas no procedimento de síntese das nanopartículas magnéticas. Adaptada de (BARRETO, 2016).	45
Figura 3.2 Fotografia do sistema automático em fluxo-batelada. (a) recipientes para amostra e reagentes, (b) bomba peristáltica, (c) válvulas solenoides (d) acionador de válvulas, (e) caixa escura para disposição da câmara de mistura e webcam, (f) dispositivo magnético-mecânico (DMM), (g) webcam, (h) câmara de mistura e (i) notebook.	53
Figura 3.3 Diagrama esquemático das dimensões da câmara de mistura. Onde: (J) janela lateral de quartzo, (E) canais de entrada e (S) canais de saída. Fonte: o autor 2017.	54
Figura 3.4 Diagrama esquemático simplificado do circuito eletrônico para acionamento das válvulas solenoides, controle da bomba peristáltica, agitador mecânico e do dispositivo magnético-mecânico através do Arduino Mega 2560. Fonte: o autor 2017.	56
Figura 3.5 Detalhes do DMM. Posição de (a) aproximação e de (b) distanciamento do campo magnético em relação a câmara de mistura. Fonte: o autor 2017.	57
Figura 3.6 Diagrama esquemático do DMM desenvolvido. Fonte: o autor 2017.	57
Figura 3.7 Webcam utilizada como detector no sistema automático (FB) proposto. Fonte: Microsoft®.	58
Figura 3.8 Interface de controle do sistema automático (FB) utilizado. Fonte: o autor 2017.	58
Figura 3.9 Obtenção dos dados analíticos obtidos através do programa utilizado.	60
Figura 3.10 Diagrama esquemático do sistema automático FB proposto. BP: bomba peristáltica, V_1 , V_3 , V_4 e V_5 : válvulas solenoides, V_2 e V_6 : válvulas tipo pinça, DMM: dispositivo magnético-mecânico, AM: agitador mecânico, H: haste de agitação, CE: câmara de	

mistura, J: Janelas de quartzo, A/P: amostra/padrão, NPM: nanopartículas magnéticas, L: Luminol e WC: <i>webcam</i>	61
Figura 3.11 Etapas do procedimento de análise (1-8). Em verde são os eventos que estão ocorrendo na etapa especificada e em vermelho são os eventos inativados no momento de cada etapa.....	63
Figura 4.1 a) Nanopartículas magnéticas obtidas pelo método de coprecipitação. b) núcleo magnético recoberto com alumina.....	74
Figura 4.2 Nanopartículas magnéticas de magnetita dispersas em etanol (a) e sob ação de um campo magnético gerado por ímã de neodímio (b).	75
Figura 4.3 Micrografia obtida pelo MEV mostrando a morfologia das nanopartículas magnéticas.	76
Figura 4.4 Micrografia obtida por MEV mostrando a morfologia das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Al}_2\text{O}_3$	76
Figura 4.5 Difratoograma típico da NPM de magnetita sintetizada.	77
Figura 4.6 Difratoograma típico de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Al}_2\text{O}_3$	79
Figura 4.7 Progresso da reação quimiluminescente para solução de íons cobre (II) com $850 \mu\text{g L}^{-1}$ usando o modelo proposto por Lyra 2008.	84
Figura 4.8 Gráfico dos valores médios individuais das componentes R, G e B das imagens digitais obtidas após as filmagens para as soluções de calibração de Cu (II).	85
Figura 4.9 Curva analítica para a determinação de íons cobre (II) em amostras de cachaça.	86
Figura 4.10 Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo do método proposto.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Procedimento automático para análise da amostra de cachaça para extração e determinação quimiluminescente on-line do íon cobre (II).....	65
Tabela 3.2 Equações para ANOVA aplicada a um modelo obtido pelo método dos mínimos quadrados.....	70
Tabela 4.1 Ângulos de difração de Bragg correspondente aos picos de difração do difratograma das nanopartículas de magnetita após serem sintetizadas.	78
Tabela 4.2 Fatores e níveis usados no planejamento fatorial 2^4 fatorial.	80
Tabela 4.3 Intervalo de confiança dos efeitos do planejamento fatorial 2^4	81
Tabela 4.4 Vazões médias dos canais individuais das soluções.....	83
Tabela 4.5 Análise de variância (ANOVA) para o modelo linear obtido pelo método proposto.	88
Tabela 4.6 Coeficientes de regressão e intervalos de confiança para os valores populacionais (β_0 e β_1) do modelo linear obtido para o método proposto.....	89
Tabela 4.7 Parâmetros obtidos pelo método proposto para determinação de cobre em cachaça.	89
Tabela 4.8 Resultados obtidos para a determinação de cobre (II) em amostras de cachaça em mg L^{-1} utilizando o sistema quimiluminescente automático com detecção por imagens digitais a partir das filmagens e o método de referência por absorção atômica em forno de grafite ($n = 3$).....	90
Tabela 4.9 Teste de recuperação para íons cobre (II) nas amostras de cachaça ($n = 3$)	92

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
CCD	dispositivo de carga acoplada
CM	câmara de mistura
CMOS	semicondutor de óxido metálico complementar
DC	Corrente contínua
DIB	baseado em imagem digital
DMM	dispositivo magnético-mecânico
DMM	dispositivo magnético-mecânico
DRX	difração de raios-X
FAAS	espectrometria de absorção atômica em chama
FBA	analisador em fluxo-batelada
FPS	quadros por segundo
FPS	quadrado por segundo
GF-AAS	espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho
LOD	limite de detecção
LOQ	limite de quantificação
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MSPE	extração em fase sólida magnética
NPM	nanopartícula magnética
PAN	1-(2-piridilazo)-2-naftol
PMT	tubo fotomultiplicador
PTFE	politetrafluoretileno
PWM	modulação por largura de pulso
QL	quimiluminescência
RGB	vermelho-verde-azul
RPM	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Caracterização da problemática	2
1.2. Objetivo.....	3
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	5
2.1. Quimiluminescência.....	6
2.2. Breve considerações sobre as nanopartículas magnéticas.....	14
2.3. Sistemas automáticos de análise química.....	24
2.4. Imagens digitais.....	32
2.5. Sistema de cor RGB	33
2.6. Imagens digitais e sua utilização na análise química	34
2.7. Métodos analíticos baseados em imagens digitais	35
2.8. Breves considerações sobre filmes digitais	37
2.9. Determinação de cobre na cachaça	40
3. EXPERIMENTAL	43
3.1. Síntese das NPMs.....	44
3.1.1. Reagentes e equipamentos para síntese	44
3.2. Caracterização das NPMs.....	47
3.3. Determinação de cobre em amostras de cachaça	48
3.4. Desenvolvimento do sistema automático	51
3.5. Precisão das válvulas solenoides.....	60

3.6.	Procedimento automático de análise	61
3.7.	Procedimentos para avaliação do desempenho analítico	66
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1.	Síntese das nanopartículas magnéticas de Fe ₃ O ₄ por coprecipitação	74
4.1.1.	Aspectos visuais das nanopartículas magnéticas	74
4.1.2.	Caracterização morfológica das nanopartículas magnéticas.....	75
4.1.3.	Caracterização cristalográfica das nanopartículas magnéticas	77
4.2.	Otimização das condições experimentais.....	79
4.3.	Parâmetros do sistema automático em fluxo-batelada	82
4.3.2.	Obtenção da curva analítica baseada nos valores da norma	83
4.3.3.	Validação da curva analítica	86
4.3.4.	Análise das amostras.....	90
4.3.5.	Teste de recuperação.....	91
5.	CONCLUSÕES	93
5.1.	Conclusões	94
5.2.	Perspectivas.....	96
6.	REFERÊNCIAS	97

1

INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização da problemática

A análise de metais ao nível de traços (ng mL^{-1} a pg mL^{-1}) em matrizes variadas é frequentemente realizada por meio de técnicas analíticas espectrométricas tais como: espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF-AAS), fluorescência de raios-X (XRF), espectrometria de emissão ótica em plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e espectrometria de plasma induzido a laser (LIBS) (KIM *et al.*, 2013). O escopo destas técnicas pode ainda ser aumentado quando usadas em conjunto com a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Embora essas técnicas sejam confiáveis e sensíveis, o alto custo de aquisição e manutenção dos equipamentos torna-se um desafio para laboratórios de análise que não dispõem de aporte financeiro.

Uma alternativa bastante atraente do ponto de vista financeiro para a análise de metais ao nível de traço é a quimiluminescência (QL) que ainda possibilita a determinação de compostos orgânicos no campo das análises clínicas, ambiental, alimentar e farmacêutica (KIM *et al.*, 2013). Todavia, a falta inerente de seletividade das reações quimiluminescentes, e em especial, a reação luminol- H_2O_2 é um grande obstáculo à sua aplicação, uma vez que, a medida do sinal QL do analito torna-se muito susceptível à interferência envolvendo outra(s) espécie(s) concomitante(s) na matriz, prejudicando a exatidão do método (KIM *et al.*, 2013; LEITE, 2016). A fim de contornar este inconveniente recorre-se a procedimentos de extração do analito prévios à detecção por QL (IRANIFAM, 2013).

Para o pré-tratamento de amostras, uma técnica chamada extração em fase sólida magnética (MSPE) mostra-se bastante promissora uma vez que utiliza um sorbente magnético disperso na matriz líquida para a extração dos analitos. Após atingir o tempo de equilíbrio, um ímã é utilizado para separar a matriz da fase extratora. Por fim, os analitos são eluídos

em um solvente adequado e conduzidos para análise instrumental, dispensando assim etapas de centrifugação, filtração e separação de membrana.

Nessa abordagem, a combinação de um procedimento MSPE com detecção QL ainda pode ser melhorada em termos de frequência analítica. A utilização de filmes digitais (DM) dentro uma câmara de mistura de um analisador em fluxo-batelada (FBA) (LIMA *et al.*, 2016) agrega então ao procedimento supracitado rapidez, precisão, baixo consumo de amostras e reagentes, baixa geração de resíduos, além da amostragem, extração e detecção serem automáticas.

O presente trabalho tem como principal objetivo desenvolver uma metodologia analítica que combine MSPE e QL em um sistema FBA com detecção por DM para determinação de cobre em amostras de cachaça. Apesar de ser bastante consumida no Brasil, esta bebida encontra dificuldades para ser exportada, pois organismos internacionais exigem o controle da concentração do referido analito a níveis de traço e muitas indústrias e engenhos não dispõem estrutura física e financeira para manter análises com a metodologia oficial.

1.2. Objetivo

1.2.1. Objetivo Geral

Desenvolver um método analítico automático para determinação quimiluminescente de cobre (II) em amostras de cachaça utilizando um sistema em fluxo-batelada com extração em fase sólida magnética *on-line* e uma *webcam* como sistema de detecção.

1.2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar das nanopartículas magnéticas de magnetita recobertas com alumina e funcionalizadas com dodecil sulfato de sódio (SDS) e 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN);

- Caracterizar as partículas obtidas quanto às suas propriedades químicas, estruturais e morfológicas;
- Desenvolver um método para extração em fase sólida magnética *on-line* de cobre (II) em amostras de cachaça;
- Desenvolver um dispositivo magnético-mecânico para geração do campo magnético;
- Desenvolver uma câmara de mistura para detecções quimiluminescentes e adaptada para o dispositivo magnético-mecânico.
- Montar o sistema automático em fluxo-batelada, integrando a câmara de mistura ao dispositivo magnético-mecânico;
- Desenvolver o sistema automático em fluxo-batelada adaptado para o emprego de extração em fase sólida magnética *on-line*, quimiluminescência e imagens digitais;
- Implementar um programa de gerenciamento do sistema automático para controle de válvulas, dispositivo magnético-mecânico, aquisição e tratamento das imagens digitais a partir das filmagens;
- Determinar os íons cobre (II) em amostras de cachaça empregando o método proposto;
- Avaliação o desempenho analítico do método proposto frente ao método de referência espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF-ASS).

2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Quimiluminescência

A quimiluminescência (QL) é um tipo de luminescência molecular em que a radiação eletromagnética (REM) emitida, geralmente na região do visível, é gerada com o produto de uma reação química. Este fenômeno pode ser observado quando um dos intermediários ou produtos da reação é formado num estado eletronicamente excitado, que emite radiação eletromagnética ao retornar ao estado fundamental, ou transfere a sua energia para outra molécula, que, uma vez excitada, também emite REM (FEREJA; HYMETE; GUNASEKARAN, 2013; OCAÑA-GONZÁLEZ *et al.*, 2014)

O processo pelo qual a quimiluminescência é produzida é semelhante à fotoluminescência (fluorescência ou fosforescência), com exceção que nenhuma excitação por fonte de luz é necessária. Todavia, ao contrário da fotoluminescência, a produção do estado eletronicamente excitado em reações quimiluminescentes depende de processos físicos e químicos como mistura da solução e da cinética da reação química (FEREJA; HYMETE; GUNASEKARAN, 2013; OCAÑA-GONZÁLEZ *et al.*, 2014).

Para uma reação química resultar na emissão de radiação, alguns requisitos são essenciais (FEREJA; HYMETE; GUNASEKARAN, 2013; GARCÍA-CAMPAÑA; BAEYENS, 2000):

1. **A reação deve ser exotérmica para liberar energia suficiente para formar o estado eletronicamente excitado.** A energia necessária para produzir uma espécie em seu estado excitado e emitir radiação eletromagnética na região do visível compreende cerca de 40 a 71 kcal mol⁻¹. Esta quantidade de energia é sempre liberada por reações de oxidação, particularmente aquelas que envolvem oxigênio, peróxidos e outros oxidantes fortes.

2. **O meio reacional deve ser favorável para direcionar energia para a formação de um estado eletronicamente excitado.** No caso da energia química ser perdida na forma de calor, ou através de formas de energia vibracionais ou rotacionais, não ocorrerá reação quimiluminescente.
3. **O estado excitado deve ser luminescente ou transferir a sua energia para outra molécula luminescente.**

Nos processos luminescentes, a intensidade da emissão de fótons depende da eficiência na geração de moléculas no estado excitado, a qual é representada pela eficiência quântica (ou rendimento quântico), e pela velocidade da reação. Em se tratando de reações quimiluminescentes, a intensidade da emissão pode ser expressa de acordo com a **Equação 1**.

$$I_{QL} = \Phi_{QL} \left(-\frac{dA}{dt} \right) \quad (1)$$

onde I_{QL} é a intensidade da emissão quimiluminescente, em números de fótons emitidos por segundo, Φ_{QL} , é o rendimento quântico da reação quimiluminescente em número de fótons emitidos por molécula excitada e dA/dt , é a taxa de consumo do precursor A .

O rendimento quântico pode ser expresso como o produto de duas eficiências, conforme a **Equação 2**.

$$\Phi_{QL} = \Phi_{EX} \cdot \Phi_L \quad (2)$$

onde Φ_{EX} é a eficiência da produção de espécies eletronicamente excitadas, expressa pelo número de estados excitados formado por molécula e Φ_L é a eficiência de luminescência das espécies quimiluminescente, ou seja, a eficiência de decaimento radioativo entre os estados

excitados depende do meio e condições reacionais (GARCÍA-CAMPAÑA; BAEYENS, 2000; SANTOS, 2008).

As principais características que tornam as reações quimiluminescentes atraentes para aplicações analíticas são os excelentes limites de detecção que podem ser atingidos e a simplicidade instrumental necessária para o monitoramento da radiação (ANDRADE, 2011; BOWIE; SANDERS; WORSFOLD, 1996).

A elevada sensibilidade obtida nas técnicas baseadas em reações quimiluminescentes, está associada a vários fatores, principalmente a ausência da necessidade de uma fonte de radiação, eliminando problemas devido à dispersão de luz, instabilidade e/ou ruído proveniente deste tipo de componente. Dessa forma, é possível aplicar maiores diferenças de potencial nos detectores. Em geral, as fotomultiplicadoras (PMT) são utilizadas, aumentando a razão sinal/ruído, e a sensibilidade analítica. Limites de detecção na ordem de fentomol (10^{-15} mol) são possíveis em técnicas quimiluminescentes (BOWIE; SANDERS; WORSFOLD, 1996; ROBARDS; WORSFOLD, 1992).

A reação quimiluminescente que apresenta maior potencial para aplicação analítica na fase líquida é a oxidação do luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) em meio alcalino, que conduz a emissão de luz no intervalo de 425 a 431 nm; (OCAÑA-GONZÁLEZ et al., 2014).

A reação de oxidação do luminol é uma das reações quimiluminescentes clássicas mais estudadas. Data de 1928 o trabalho pioneiro sobre a reação do luminol publicado por Albrecht (FERREIRA; ROSSI, 2002; MOREIRA, 2009). A oxidação do luminol por H_2O_2 em meio alcalino foi a primeira reação quimiluminescente descrita e suas propriedades termodinâmicas e cinéticas continuam sendo intensamente estudadas até os dias atuais (CHEN et al., 2017).

O mecanismo dessa reação ainda é considerado um dos mais complexos. Mesmo sendo uma reação clássica, apenas algumas etapas foram estabelecidas, restando ainda aspectos a

serem elucidados (MOREIRA, 2009; VLADIMIROV; PROSKURNINA, 2009; XIAO *et al.*, 2000). Apesar disso, as aplicações analíticas desta reação têm se mostrado bastante versáteis.

Neste contexto, as determinações de metais de transição, e de outros modificadores de reação estão se disseminando e cada vez mais sendo utilizadas em conjunto com métodos de análise em fluxo (MOREIRA, 2009).

2.1.1. Fatores que influenciam a emissão quimiluminescente

As determinações quimiluminescentes são fortemente influenciadas por fatores experimentais que afetam o sinal analítico da emissão luminescente (GARCÍA-CAMPAÑA *et al.*, 2001; LEITE, 2005), como:

- **Volume de amostra:** a emissão de luz é diretamente proporcional ao volume da amostra quando a concentração e a razão dos reagentes não são alteradas;
- **Taxa de reação:** a cinética das reações quimiluminescentes pode ser lenta ou rápida, dependendo do tipo de molécula emissora, do analito e das condições na qual estas reações ocorrem;
- **Concentração dos reagentes:** a concentração do material luminescente afeta diretamente a intensidade da emissão de luz produzida na reação quimiluminescente;
- **Homogeneização dos componentes:** a homogeneização entre os reagentes e a amostra deve ser extremamente reprodutível;
- **pH do meio reacional:** o pH do meio reacional afeta a intensidade da emissão de luz em reações quimiluminescentes;
- **Luz externa:** as reações quimiluminescentes devem ocorrer em ambiente isolado da luz externa para evitar o deslocamento da linha de base.
- **O catalisador selecionado:** catalisadores como íons Co(II), Cr(II) ou Cu(II); possuem atividade catalítica distintas quanto à cinética de reação e à faixa de resposta linear.

- **A temperatura:** modifica a intensidade de emissão QL, podendo até mesmo extingui-la.

Se todos os fatores mencionados acima forem controlados, a intensidade do sinal analítico poderá ser relacionada proporcionalmente com a concentração do analito envolvido na reação quimiluminescente, um princípio básico da análise quantitativa.

Apesar das grandes dificuldades para elucidar o mecanismo mais provável da reação do luminol e verificar os fatores que influenciam o seu rendimento quântico, esta reação apresenta uma grande potencialidade para o desenvolvimento de novos métodos analíticos (FEREJA; HYMETE; GUNASEKARAN, 2013). Este comportamento pode ser verificado pelo grande número de artigos científicos envolvendo esse reagente, publicados no decorrer dos últimos anos (OCAÑA-GONZÁLEZ *et al.*, 2014).

2.1.2. Aplicação do luminol para fins analíticos

A exploração da quimiluminescência do luminol para fins analíticos foi iniciada por volta da década de 50, quando este reagente foi empregado como indicador em titulações (KENNY; KURTZ, 1951a, 1951b). No entanto, somente a partir da década de 80 as reações quimiluminescentes passaram a ter aplicações em análises de rotina. Desde então, o número de reações que produz quimiluminescência descrito na literatura tem aumentado, particularmente em aplicações na biomedicina (GRIBAS; ZHAO; SAKHAROV, 2014), análise de alimentos (KHAJVAND; CHAICHI; COLAGAR, 2015), ambiental (KHATAEE *et al.*, 2015) e toxicológica (SAJEWICZ; ZALEWSKA; MILNEROWICZ, 2015).

As aplicações da reação quimiluminescente do luminol em química analítica podem ser divididas de acordo com a participação do analito na reação (FEREJA; HYMETE;

GUNASEKARAN, 2013), como pode ser observado no esquema simplificado das **Figura 2.1** e **Figura 2.2**.

Reação direta

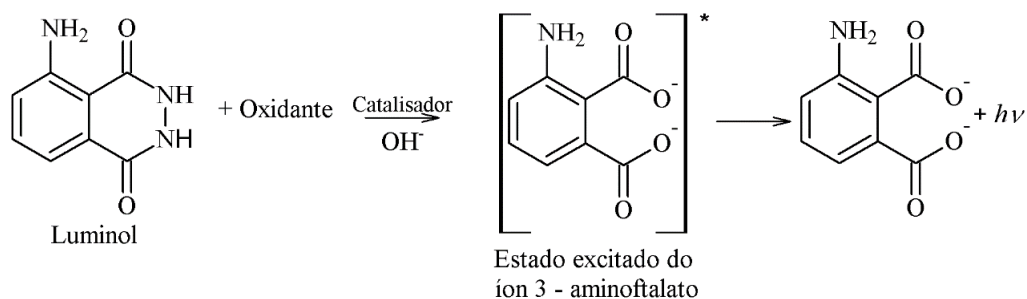


Figura 2.1 Descrição geral da reação quimiluminescente direta envolvendo o luminol. Adaptada de ASLAN; GEDDES, 2009.

Reação indireta

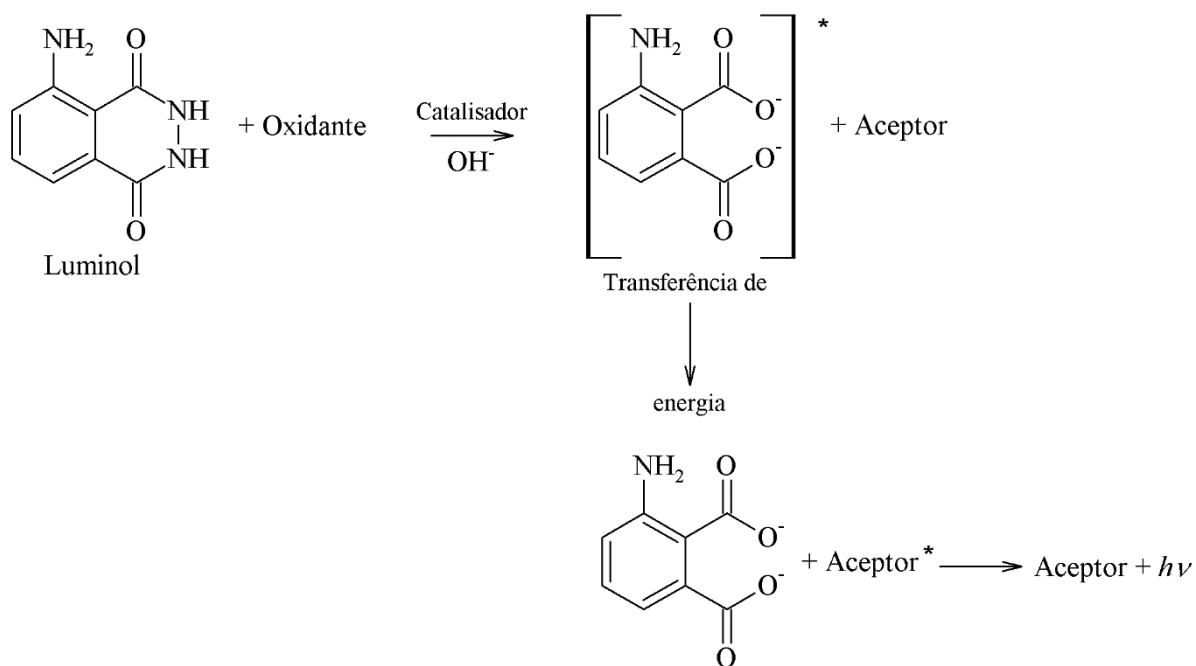


Figura 2.2 Descrição geral da reação quimiluminescente indireta envolvendo o luminol. Adaptada de ASLAN; GEDDES, 2009.

Na reação direta, o luminol e um oxidante reagem para formar um produto na presença de um catalisador, do qual uma fração do produto formará um estado eletronicamente excitado, que ao retornar ao estado fundamental emitirá REM (GARCÍA-CAMPAÑA *et al.*, 2001).

A reação indireta é baseada num processo de transferência de energia da espécie eletronicamente excitada para um aceptor. Neste tipo de reação, o estado eletronicamente excitado do produto da reação quimiluminescente age como doador de energia para o aceptor, o qual não está diretamente envolvido neste tipo de reação. Ao receber esta energia, o aceptor forma seu estado eletronicamente excitado emitindo REM ao retornar ao estado fundamental (GARCIA-CAMPANA, 2001)

As aplicações indiretas destacam-se na determinação de substâncias geradas em reações preliminares e, subseqüentemente, determinadas pela reação quimiluminescente. Com este tipo de aplicação, diferentes tipos de substratos de enzimas foram analisados na determinação de H_2O_2 em medicamentos, glicose e colesterol em alimentos (FERREIRA; ROSSI, 2002), aminoácidos (LIU; LIU, 2010) e DNA (PASSI *et al.*, 2012)

Nas aplicações diretas, o analito catalisa a reação quimiluminescente, podendo ser comumente empregado na determinação de metais de transição, ou promove a inibição da radiação quimiluminescente, que é utilizada para a determinação de compostos orgânicos em fármacos (FERREIRA; ROSSI, 2002; LEITE, 2005) como paracetamol (RUENGSIAGOON; LIAWRUANGRATH; TOWNSHEND, 2006), dopamina (NALEWAJKO; RAMÍREZ; KOJLO, 2004) e captopril (ECONOMOU *et al.*, 2002)

Existem várias aplicações quimiluminescentes baseadas no efeito catalisador ou supressor (*queching*) de espécies orgânicas e inorgânicas. São conhecidos mais de trinta íons metálicos que inibem ou catalisam a luminescência do luminol, entre eles pode-se citar: Al(III), Ag(I), Au(III), Bi(III), Ce(IV), Cd(II), Co(II), Cr(III), Cu(II), Fe(II), Fe(III), Hg(II), Mn(II),

Ni(II), Os(III), Pb(II), Pd(II), Sb(II), Sn(II), U(VI), V(III), Zn(II), Zr(IV) (GARCIA-CAMPANA, 2001; MOREIRA, 2009)

2.1.3. Quimiluminescência e seletividade

Procedimentos analíticos baseados em medidas por quimiluminescência caracterizam-se por apresentar alta sensibilidade e ampla faixa de resposta linear. Além disso, a detecção do sinal pode ocorrer em baixos níveis de concentração, permitindo a determinação de uma grande variedade de espécies em níveis de traço ($\mu\text{g L}^{-1}$) (ALMEIDA, 2012).

No entanto, uma limitação para a aplicação generalizada desta técnica é, muitas vezes, a pouca seletividade da própria detecção QL, visto que muitas substâncias coexistentes podem reagir com luminol ou outros reagentes QL, emitindo luz. Assim a maioria dos sistemas QL não podem ser utilizados para determinação direta de analitos (LI *et al.*, 2006). Por exemplo, uma variedade de íons metálicos como Co (II), Cu (II), Ni (II), Mn (II), Fe (II) e Cr (III) possuem capacidade de influenciar o sistema quimiluminescente luminol- H_2O_2 devido ao seu efeito catalítico nessa reação (HUANG *et al.*, 1996). Dessa forma, graves efeitos de interferentes mútuos e falta de seletividade limitam a sua aplicação.

Dessa forma, procedimentos de pré-tratamento ou separação geralmente são necessários para a determinação seletiva na análise quimiluminescente. A utilização de agentes mascarantes (ALAHMAD *et al.*, 2016), separador de fase de membrana (HASANIN *et al.*, 2016), extração por solvente (WU; LV, 2007) já foram relatadas. Para a determinação simultânea de uma mistura multicomponente, a maioria dos sistemas QL foram combinados com cromatografia líquida de alta eficiência (DI *et al.*, 2011), cromatografia gasosa (MARLEY *et al.*, 2004) ou eletroforese capilar (ZHOU *et al.*, 2015).

Diante do exposto, existe a necessidade de encontrar novos sistemas e otimizar sistemas convencionais, visando melhorar a seletividade do método QL para análise quantitativa em matrizes complexas, incluindo amostras biológicas, ambientais e alimentos.

Neste contexto, a integração sinérgica das nanopartículas magnéticas com métodos QL pode atender a alguns requisitos como: alta sensibilidade e seletividade, nos quais as NPMs podem participar das reações QL como catalisadores, transportar biomoléculas e atuar como ferramenta de separação e pré-concentração (IRANIFAM, 2013) e possibilitar a automatização que traz a vantagem de maior frequência analítica.

2.2. Breve considerações sobre as nanopartículas magnéticas

Nanopartículas magnéticas (NPMs) são materiais nanoestruturados constituídos por aglomerados de átomos ou moléculas, que orientam sua movimentação na presença de um campo magnético, e apresentam dimensões reduzidas compreendidos na faixa entre 1 e 100 nm de diâmetro (BATLLE; LABARTA, 2002; GUBIN *et al.*, 2005; HEDAYATNASAB; ABNISA; DAUD, 2017).

As NPMs consistem, geralmente, de magnetita (Fe_3O_4) e exibem um comportamento peculiar, o superparamagnetismo, que possibilita a aplicação de um campo magnético, sem a retenção de qualquer magnetismo residual depois que o campo é removido (BARRETO, 2016; MOHAMMED *et al.*, 2017)

As principais características das NPMs responsáveis por torná-las potencialmente importantes em aplicação tecnológica são: a formação de monodomínios magnéticos que originam uma magnetização espontânea, formando um elevado momento magnético gigante; a existência de grande área superficial em relação ao volume, que resulta em uma maior capacidade de adsorção; a possibilidade de recobri-las com diversos tipos de ligantes específicos e a capacidade de reutilização (BAGHERI *et al.*, 2012; FRANCISQUINE;

SCHOENMAKER; SOUZA, 2014; GIAKISIKLI; ANTHEMIDIS, 2013). Estas características permitem que as NPMs possuam uma ampla faixa de potenciais aplicações em áreas como: médica, biológica, análise de alimentos, farmacêutica, ambiental, óptica, eletrônica, química e bioquímica (GIAKISIKLI; ANTHEMIDIS, 2013; PRADEEP, 2007).

De maneira geral, a composição básica de uma NPM é um metal (M) diretamente ligado a um óxido de ferro, que pode ser exemplificado como MFe_2O_4 . Assim, os sistemas magnéticos nanoparticulados podem ser dispostos em duas classes: as nanopartículas constituídas de metais de transição (Mn, Co, Ti) e as nanopartículas de óxidos metálicos ($FeO.Fe_2O_3$, NiO, FeO) (SOUZA, 2011). Entre os óxidos metálicos nanoparticulados, a magnetita (Fe_3O_4), pode ser considerada seu principal representante, pois apresenta uma série de características como, biocompatibilidade com materiais orgânicos, resultando em grande potencial de aplicação áreas industrial, medicinal e ambiental e possuem baixa toxicidade. Essas características tornam as NPMs de magnetita base para o desenvolvimento de sistemas mais complexos e com aplicações nas mais diferentes vertentes tecnológicas (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007; SOUZA, 2011).

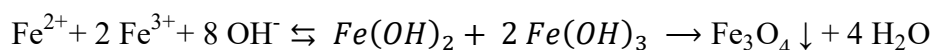
2.2.1. Breve abordagem sobre os métodos de síntese das NPMs e método de coprecipitação

A literatura reporta diferentes métodos para a síntese de NPMs baseadas em óxido de ferro. Entre os mais citados, estão os métodos: de coprecipitação, síntese hidrotérmica e solvotérmica, sol-gel, decomposição térmica, microemulsão e síntese sonoquímica (WU; HE; JIANG, 2008). O desenvolvimento desses métodos tem despertado uma atenção especial em relação ao escalonamento de produção e o controle das características das partículas, tais como a cristalinidade, estabilidade química, tamanho e estrutura. Estas características influenciam as propriedades magnéticas das partículas e podem ser ajustadas através do controle das condições

reacionais (pH, velocidade de agitação e temperatura de reação) (SILVA *et al.*, 2016; WU; HE; JIANG, 2008)

O método clássico e usual para obtenção da magnetita é a coprecipitação, devido à simplicidade de síntese e eficiência para obter partículas com um largo espectro de tamanho que varia de 5 a 180 nm (WU; HE; JIANG, 2008).

Através desse método, a magnetita é obtida por uma mistura estequiométrica de sais ferrosos e férricos, na proporção molar de 1:2, em meio aquoso com a adição de uma base à temperatura ambiente ou sob aquecimento. As NPMs de Fe_3O_4 são facilmente oxidadas a hematita ($\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$), dessa forma o meio reacional deve ser mantido sob atmosfera inerte (SILVA *et al.*, 2016) (DA SILVA, NETO, *et al.*, 2016). A equação química simplificada para a formação de Fe_3O_4 pode ser descrita conforme:



Esse método é simples, reproduzível e possui a vantagem de sintetizar uma grande quantidade de nanopartículas com boa reatividade e uniformidade, com pouca aglomeração, em um tempo de reação relativamente pequeno e baixo custo (FERREIRA, 2009; TARTAJ *et al.*, 2005).

Propriedades como natureza, homogeneidade, tamanho e comportamento magnético das partículas são afetadas pelas condições nas quais as partículas são formadas, sendo necessário o controle de alguns parâmetros da síntese (FERREIRA, 2009). Estes parâmetros incluem: o tipo de sais utilizados (cloretos, sulfatos, nitratos), razão entre os sais, velocidade de agitação, temperatura e força iônica dos meios. Além disso, o uso de alto valor de pH na mistura reacional pode auxiliar na obtenção de NPMs uniformes (FRANCISQUINE; SCHOENMAKER; SOUZA, 2014; SILVA *et al.*, 2016; WU; HE; JIANG, 2008).

2.2.2. Recobrimento das NPMs

As NPMs geralmente são recobertas devido à instabilidade que este tipo de material pode apresentar, sendo vulneráveis a oxidações pelo oxigênio do ar, o que é com tendência a formação de aglomerados (JAMSHAID *et al.*, 2016). A oxidação das NPMs resulta geralmente na perda do magnetismo, sendo assim crucial desenvolver estratégias de proteção para estabilizar quimicamente as NPMs contra a degradação após a sua síntese (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007).

Por meio do recobrimento é possível promover a inserção de um ligante funcional, de modo que as nanoestruturas apresentem seletividade nas suas propriedades e funcionalidades (PRADEEP, 2007), o que justifica a sua adequação às inúmeras aplicações. Em geral, as NPMs são recobertas na forma estrutural core@shell (núcleo magnético@recobrimento), **Figura 2.3**.

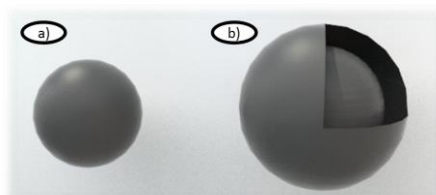


Figura 2.3 Ilustração de tipos de nanoestruturas. (a) núcleo de magnetita sem recobrimento; (b) núcleo de magnetita recoberta. Fonte: o autor 2017.

Os recobrimentos dos núcleos das NPMs podem ser realizados com materiais inorgânicos, orgânicos ou híbridos por meio de ligações químicas ou interações físicas. Para designar o recobrimento mais adequado, é importante considerar a natureza da interação entre analito e o sorbentes, como também conhecer o sistema químico a ser analisado (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007; SILVA *et al.*, 2016).

A **Figura 2.4** mostra classificação de alguns materiais, divididos em duas categorias, conforme o tipo de revestimento do núcleo magnético.

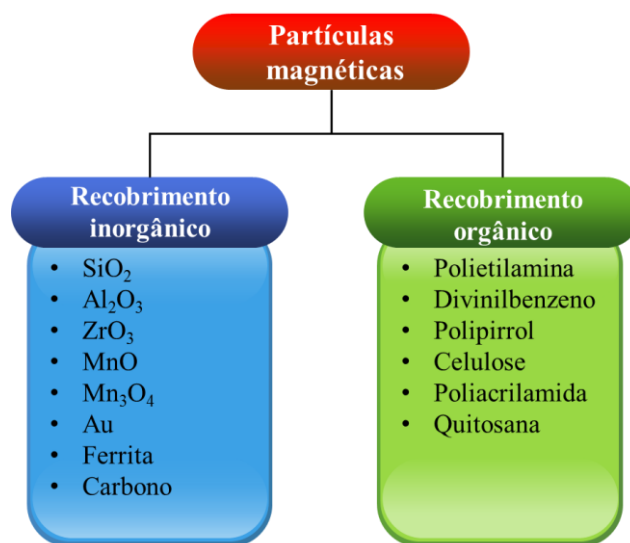


Figura 2.4 Tipos de revestimento do núcleo das partículas magnéticas. Adaptada de GIAKISIKLI e ANTHEMIDIS, 2013.

A alumina tem sido proposta como um eficiente revestimento inorgânico, protegendo o núcleo magnético, prolongando sua utilização sem perder suas propriedades magnéticas e servindo como suporte para funcionalização, uma vez que apresenta estabilidade química, elevada área superficial, capacidade de adsorção rápida e eficiente (GIAKISIKLI; ANTHEMIDIS, 2013).

2.2.3. Funcionalização das NPMs

A adsorção de moléculas surfactantes como SDS em óxidos é um processo cooperativo, onde, inicialmente uma monocamada de surfactante (hemi-micelas) é formada a partir do grupo hidrofílico do surfactante e a superfície do óxido. Em seguida, ocorre a adsorção em definitivo,

por meio da formação das ad-micelas, que acontece devido às interações hidrofóbicas entre os grupos de hidrocarbonetos do surfactante, resultando na formação de agregados de superfície discretos (JAMSHIDI *et al.*, 2011).

Essas interações físicas e química nas micelas do surfactante, originam uma espécie de armadilha onde serão depositados os agentes complexantes para a separação e pré-concentração de metais, como ilustrado na **Figura 2.5**. Entre os complexantes, o 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) vem sendo empregado para determinação de metais (EZODDIN *et al.*, 2010).

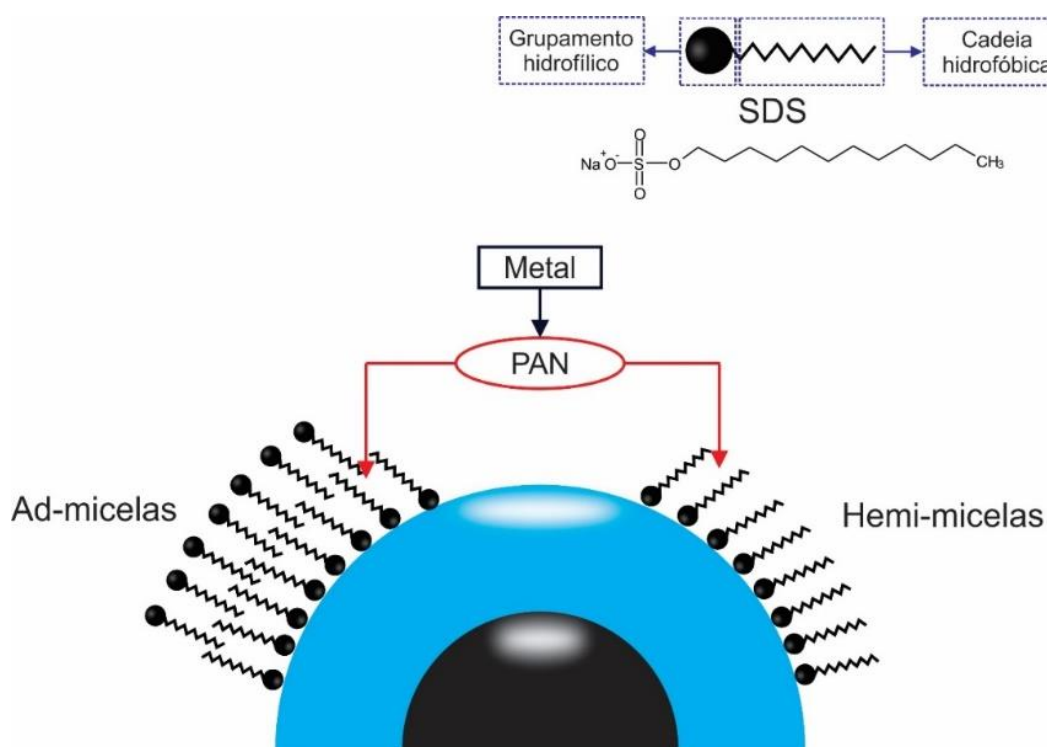


Figura 2.5 Modelo sugerido de ligação entre o SDS-PAN na superfície de nanoalumina. Adaptada de EZODDIN *et al.*, 2010.

As reações de formação de composto de coordenação entre íons metálicos e o complexante PAN é extremamente dependente da variação da concentração hidrogênica do meio reacional. Isso se deve à protonação em meio ácido do átomo de nitrogênio do grupo piridina e, conseqüentemente, ionização do hidrogênio do grupo hidroxila em meio básico (SOARES, 2006). Logo, o controle de pH é de absoluta importância em todo trabalho analítico

com esse complexante, haja vista que a reação do PAN com íons metálicos ocorre numa faixa de pH entre 2,5 e 12, na qual o complexante encontra-se presente basicamente na forma neutra (SOUSA, 2009), como é mostrado no equilíbrio apresentado na **Figura 2.6**.

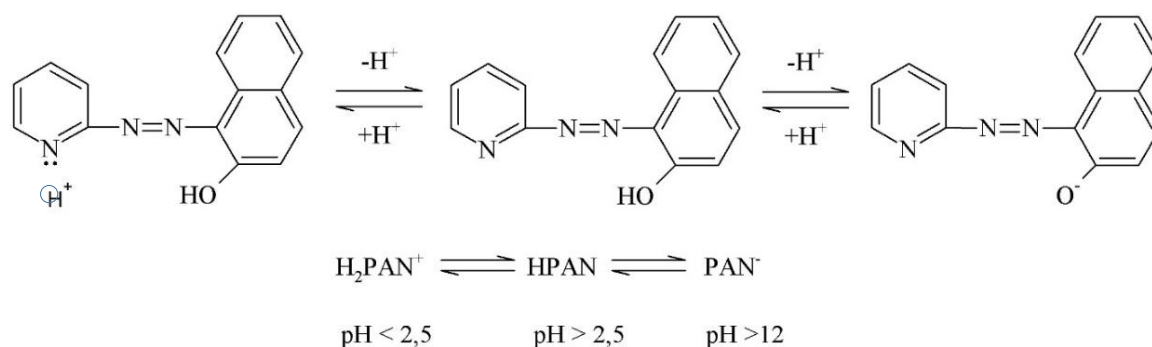


Figura 2.6 Formas adquiridas pelo ligante PAN dependendo do pH do meio. Fonte: SOARES, 2006.

Quando a complexação ocorre entre o PAN e um íon metálico, como o cobre (II), formam-se dois anéis quelatos de cinco membros. O nitrogênio heterocíclico, o grupo hidroxila e o átomo de nitrogênio mais distante do anel piridina estão envolvidos na formação do complexo (OOI; CARTER; FERNANDO, 1967). Por ser um ligante tridentado, a estequiometria do complexo é 1:2 para formação de um sítio octaédrico. Uma estrutura química plausível para esses compostos de coordenação é demonstrada na **Figura 2.7**.

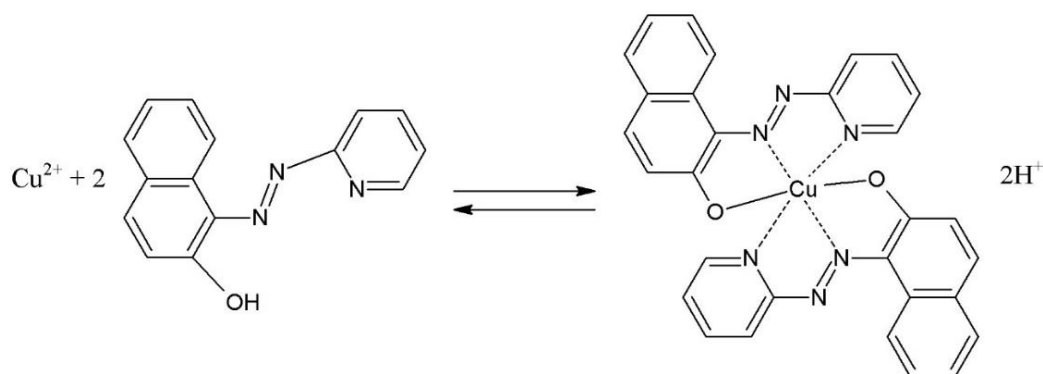


Figura 2.7 Reação química entre o complexante PAN e íons de cobre (II). Adaptada de SARKER, K. C.; ULLAHA, RAFIQUE 2013.

Recentemente, a utilização do PAN foi explorada na determinação de cobre em bebidas alcoólicas.

Souza e colaboradores (2016) propuseram uma técnica analítica rápida e sensível para determinação espectrofotométrica de íons cobre (II) em aguardente de cana-de-açúcar, empregando o agente complexante (PAN). Sistemas ternários homogêneos de solventes ou solução em fase única, foram utilizados como alternativa para pré-concentração das amostras. A complexação do cobre ocorreu em pH em torno de 4. Os limites de detecção e de quantificação foram $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,13 \text{ mg L}^{-1}$. Este sistema proposto permitiu a obtenção de parâmetros de desempenho analítico satisfatórios (SOUZA *et al.*, 2016).

De Souza e coautores (2016) apresentaram um método analítico para determinação de íons cobre (II) em uísque e cachaça utilizando um *spot-test* combinado a espectroscopia de reflectância difusa. O método é baseado nas medidas de reflectância do complexo a 559 nm formado a partir da reação entre os íons de cobre (II) com o agente complexante (PAN). A linearidade obtida encontrou-se na faixa de concentração de $0,47 \text{ mg L}^{-1}$ a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de íons cobre (II) e os limites de detecção e quantificação foram estimados em $0,12$ e $0,47 \text{ mg L}^{-1}$ de íons cobre (II), respectivamente (SOUZA; PEZZA; PEZZA, 2016).

2.2.4. Considerações sobre extração em fase sólida magnética

A utilização de NPMs em preparo de amostra recebeu seu principal destaque no ano de 1996 com o trabalho reportado por Towler, Smith e Dixon, (1996), no qual empregaram a $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MnO}_2$ para a extração de rádio, paládio e chumbo em água do mar (TOWLER; SMITH; DIXON, 1996). Após três anos, o termo extração em fase sólida magnética (do inglês: *magnetic solid phase extraction*, m-SPE ou MSPE) foi introduzido por (ŠAFAŘÍKOVÁ; ŠAFAŘÍK, 1999) ao utilizar $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ -ftalocianina de cobre) na extração de compostos orgânicos

como corante trifenilmetano, hidrocarbonetos poliaromáticos e alguns derivados (SILVA *et al.*, 2016).

A MSPE é baseada na extração de diferentes compostos da amostra usando sólidos com propriedades magnéticas. Esta técnica pode ser visualizada como uma separação magnética comumente usada para separar fases magnéticas de fases não magnéticas. Nesse procedimento, as NPMs são adicionadas à solução da amostra para que analito seja adsorvido na superfície do material magnético, que são separadas da solução por meio de uma força magnética externa. Então, o analito é desorvido mediante uma eluição com um solvente apropriado para posterior análise (GIAKISIKLI; ANTHEMIDIS, 2013), como mostrado esquematicamente na **Figura 2.8**.

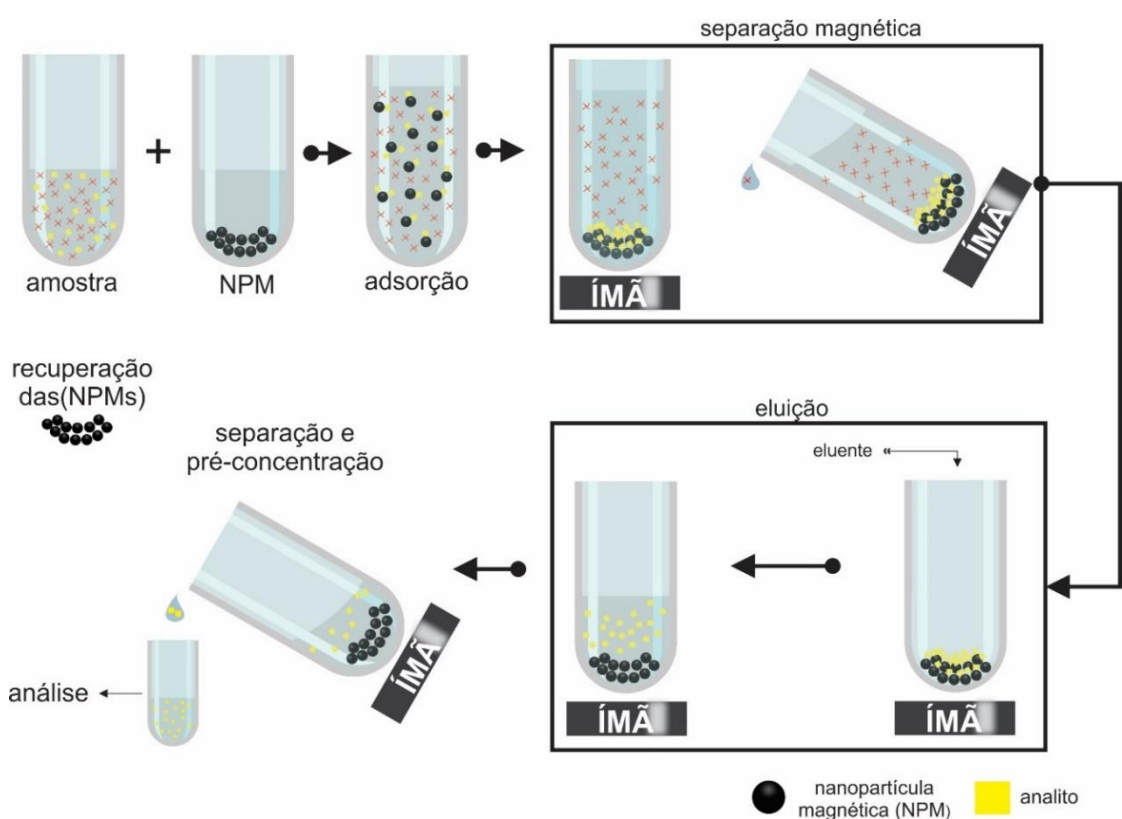


Figura 2.8 Representação esquemática das etapas da extração em fase sólida magnética (MSPE). Adaptada de FARAJI, 2016

Esta abordagem apresenta vantagens em relação à extração em fase sólida tradicional:

(i) evita procedimentos demorados e tediosos na coluna de extração em fase sólida; (ii) proporciona uma separação do analito de forma rápida e simples, o que evita a necessidade de centrifugação ou filtração; (iii) os sorbentes magnéticos sintetizados possuem alta seletividade, mesmo em matrizes complexas como ambientais ou biológicos; (iv) uma vez que a maioria das impurezas da amostra são diamagnéticas, não interagem com as partículas magnéticas durante a separação magnética e (v) a automação de todo o processo é possível por meio de métodos de análise em fluxo, o que possibilita o desenvolvimento de métodos rápidos, seletivos e sensíveis para determinações de rotina (FARAJI, 2016; HERRERO-LATORRE *et al.*, 2015).

Devido às características inerentes da técnica, a MSPE permite ser empregada em diferentes métodos analíticos. Todavia, no campo da QL ainda se trata de uma técnica pouco explorada. Na literatura, poucos trabalhos envolvendo o desenvolvimento de métodos baseados em QL-MSPE são reportados.

Abdolmohammad-Zadeh e Talleb (2014) desenvolveram um novo método de extração de fase sólida magnética para a especiação de As (III)/As (V) em soluções aquosas utilizando Fe_3O_4 dopado com Mg-Al como um nano-sorbente. O método baseia-se na separação e pré-concentração de As(V) pelo nano-híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Mg-Al}$ antes da determinação por técnica de quimiluminescência. A rota QL envolve a oxidação do luminol pelo ácido heteropólio de vanado-molibdo-arsenato (HPA-VMoAs) em um meio básico. Esse novo método foi aplicado com sucesso na especiação de arsênio em amostras de água (ABDOLMOHAMMAD-ZADEH; TALLEB, 2014).

Samadi-Maybodi e colaboradores (2016) propuseram um novo método quimiluminescente usando NPMs de β -ciclodextrinas recobertas com CoFe_2O_4 para extração e determinação de montelucaste em plasma sanguíneo. O sistema químico luminol- H_2O_2 foi

investigado e verificou-se um aumento considerável da QL devido a seletividade do fármaco mediante a utilização das NPMs (SAMADI-MAYBODI; BAKHTIAR; FATEMI, 2016).

2.3. Sistemas automáticos de análise química

Métodos analíticos convencionais normalmente são elaborados e aplicados em grande parte das análises químicas e bioquímicas de rotina em laboratórios industriais, governamentais, ambientais, farmacêuticos, forenses e acadêmicos e centros de pesquisa. No entanto, nas últimas décadas tem-se assistido a um crescente interesse por parte dos laboratórios analíticos em desenvolver sistemas automáticos de análise com o propósito de simplificarem os procedimentos analíticos, de forma a realizar um número cada vez maior de determinações analíticas, mantendo os custos em valores aceitáveis. Além disso, a implementação de sistemas automáticos permite realizar análises químicas em menos tempo, com um menor consumo de reagentes e amostras, reduzindo a geração de resíduos. Ainda possibilitam o desenvolvimento de procedimentos mais sensíveis e reprodutíveis (ANDRADE, 2016; TROJANOWICZ, 2008).

De maneira geral, os analisadores automáticos podem ser organizados em três grupos, segundo a sua natureza e forma de automatização. Tal divisão compreende os analisadores em batelada ou discretos, robotizados e em fluxo (FACCHIN, 1996).

Os analisadores automáticos discretos, ou em batelada, são versões mecanizadas dos procedimentos clássicos realizados de forma manual. A principal característica desses sistemas de análise é a utilização de aparatos mecânicos para transportar a mistura reacional até o detector. Caracterizam-se, comumente, por empregar um recipiente individual para cada amostra e por transportar a mistura reacional para um detector através de um sistema mecânico. Normalmente, as medidas são realizadas após o estabelecimento do equilíbrio químico e físico da reação em estudo, objetivando alcançar a máxima sensibilidade analítica (FACCHIN, 1996).

Os analisadores robotizados têm por principal característica apresentar partes mecânicas controladas por computador, como um braço mecânico, para executar as operações analíticas requeridas, minimizando etapas executadas manualmente. Todavia, a complexidade mecânica e o elevado custo de aquisição fazem com que esses sistemas automáticos possuam limitação relacionada à sua implementação e manutenção. Contudo, desempenham um papel significativo em etapas preliminares de processos analíticos, sobretudo em tarefas que exigem a manipulação de produtos tóxicos ou explosivos. (FACCHIN, 1996).

Os analisadores em fluxo, por sua vez, têm como característica principal o processamento da amostra e reagente em fluxo contínuo, seccionado ou não por bolhas de ar. Como empregam uma instrumentação relativamente simples, esses analisadores necessitam de pouca intervenção do analista, baixo consumo de reagentes e amostra, frequência analítica e precisão de resultados, um menor custo por análise. Por esses, motivos esses sistemas automáticos vêm sendo utilizados em laboratórios para análise de rotina em substituição aos analisadores automáticos discretos ou robotizados e aos convencionais métodos em batelada.

Vale salientar que, apesar da importância dos métodos discretos ou em batelada e dos métodos robotizados na implementação e automatização de procedimentos químicos, os métodos em fluxo registram um acentuado crescimento, tanto em termos de divulgação científica, quanto em áreas de aplicação industrial e acadêmica (KOLEV; MCKELVIE, 2008). E, devido à quantidade crescente de analisadores em fluxo, a IUPAC (acrônimo, em inglês, de *International Union of Pure and Applied Chemistry*) (ZAGATTO *et al.*, 2002), tem recomendado uma classificação de acordo com o processamento da amostra e/ou reagente(s) bem como da característica básica de seu fluxo.

Como reporta Lima (2014), desde o desenvolvimento do primeiro analisador automático em fluxo, publicado em 1957 por Skeggs (SKEGGS, 1957), inúmeros analisadores têm sido propostos, dentre os quais se destacam: a análise por injeção em fluxo (do inglês: *flow*

injection analysis - FIA) (ŘUŽIČKA; HANSEN, 1975), análise em fluxo monossegmentado (*monosegmented flow analysis* - MSFA) (PASQUINI; DE OLIVEIRA, 1985), análise por injeção sequencial (*sequential injection analysis* - SIA) (ŘUŽIČKA; MARSHALL, 1990), análise em fluxo multicomutado (*multicommutation in flow analysis* - MFA) (REIS *et al.*, 1994) e análise em fluxo-batelada (*flow-batch analysis* - FBA) (HONORATO *et al.*, 1999).

Características como tipo de confluência, aspiração/bombeamento de amostra e reagente e sua segmentação definem as peculiaridades de cada sistema. Embora cada um desses sistemas em fluxo apresente suas características próprias, todos exibem uma configuração geral comum.

2.3.1. Sistemas automáticos em fluxo-batelada

Conforme descreve Diniz (2012) e os sistemas automáticos em fluxo-batelada (FBA) apresentam melhores características analíticas quando comparados a outros sistemas automáticos (DINIZ *et al.*, 2012b). Tais melhorias se devem à possibilidade de realização de procedimentos com menor limite de detecção e geração de resíduo e maior taxa de amostragem. Outras vantagens, quando comparado a sistemas de análise em fluxo, são a facilidade de preparar as soluções de calibração e etapas de extração *on-line*, rápida homogeneização, baixa geração de resíduos por análise, devido à ausência do fluido carregador e implementação do sistema de detecção acoplado (ANDRADE, 2016; LIMA, 2014) Essas vantagens do sistema FBA perante os outros sistemas deve-se a sua própria constituição, **Figura 2.9**.



Figura 2.9 Esquema dos principais componentes do sistema FBA. (a) bomba peristáltica, (b) válvulas solenoides, (c) câmara de mistura, (d) agitador magnético, (e) sistema de detecção, (f) acionador de válvulas e (g) computador.

Fonte: o autor 2017.

Como pode ser visto no esquema ilustrativo mostrado, o sistema FBA é constituído basicamente dos seguintes componentes:

- Sistema de propulsão: para realizar a propulsão dos fluidos no FBA, normalmente é empregado uma bomba peristáltica (**Figura 2.9 (a)**), devido a sua capacidade de impulsionar os líquidos por vários canais simultaneamente, mantendo a vazão constante. Todavia, dispositivos como microbombas de diafragma ou pistão, bombas seringas, podem ser utilizados para o mesmo propósito;
- Sistema de adição dos fluidos: no FBA, volumes predefinidos e precisos de reagentes e amostras, adicionados ou aspirados da câmara de mistura, são controlados pelas válvulas solenoides (**Figura 2.9 (b)**). Outros dispositivos para realizar a comutação

podem ser empregados, como válvulas pinça, válvulas SIA, microbombas (que executam a função da válvula e do sistema de propulsão) etc.;

- Câmara de mistura ou câmara reacional: é uma das principais características do sistema FBA (**Figura 2.9 (c)**). Trata-se de uma pequena peça cilíndrica construída em Teflon® ou acrílico. Nessa câmara de mistura ocorre a maior parte dos procedimentos analíticos, como a adição, homogeneização, pré-tratamento, reações, acondicionamento dos fluidos, preparo de soluções de calibração, detecção do analito, entre outros.
- A eficiente mistura dos fluidos pode ser alcançada pela utilização de uma pequena barra magnética no interior da câmara, sendo o movimento promovido pelo campo gerado por acionamento de um agitador magnético (**Figura 2.9 (d)**);
- Sistema de detecção: o dispositivo empregado para detecção (**Figura 2.9 (e)**) dependerá do método empregado na análise, podendo ser, caso necessário, acoplar ao detector à câmara;
- Sistema de controle: geralmente, todo o controle do sistema é realizado com o auxílio de um computador (**Figura 2.9 (g)**), garantindo velocidade analítica e mínima manipulação. Um acionador de válvulas é utilizado para controlar o funcionamento das válvulas (**Figura 2.9 (f)**).

A combinação desses acessórios garante as características intrínsecas dos analisadores em fluxo (alta velocidade analítica, baixo consumo de amostra e reagentes, baixo custo de montagem e facilidade de automatização) e dos analisadores em batelada (universalidade de aplicações, robustez e versatilidade) conferindo ao FBA parâmetros de desempenho como: alta precisão e velocidade analítica, baixo custo por análise, baixo consumo de amostras e reagentes, pouca manipulação e contaminação, assim como baixa geração de resíduo para o meio ambiente (ANDRADE, 2011).

Embora o sistema FBA tenha sido proposto originalmente para viabilizar a execução de titulações empregando o método de Fibonacci para detecção do ponto final, inúmeros trabalhos ao longo dos anos demonstram a viabilidade desse sistema automático para muitas outras aplicações analíticas. Nesse contexto, vários métodos vêm sendo desenvolvidos, explorando as características do FBA (ANDRADE, 2016; DINIZ *et al.*, 2012b).

Variações na configuração básica do FBA também têm sido realizadas. Almeida (2007), desenvolveu um sistema FBA utilizando uma bomba pistão acoplada à câmara de mistura para propulsão dos fluidos (ALMEIDA, 2007), como a **Figura 2.10**.



Figura 2.10 Bomba pistão acoplada à câmara de mistura para propulsão dos fluidos em um sistema em fluxo-batelada. (a) motor de passo, (b) eixo do embolo e (c) Câmara de mistura. Fonte: o autor (2017).

Nesse tipo de analisador, a propulsão é promovida dentro da própria câmara de mistura devido à ação de um pistão pneumático inserido no seu interior. O funcionamento desse sistema é baseado na diferença de pressão dentro da câmara de mistura pelo movimento do pistão. O acoplamento entre o motor de passos e o pistão forma a unidade de propulsão do analisador, que funciona de forma similar a uma bomba seringa.

Outra modificação do sistema FBA, ilustrada na **Figura 2.11**, foi a miniaturização da câmara de mistura, empregando a técnica de litografia UV em polímero uretano-acrilato (MONTE-FILHO *et al.*, 2011).

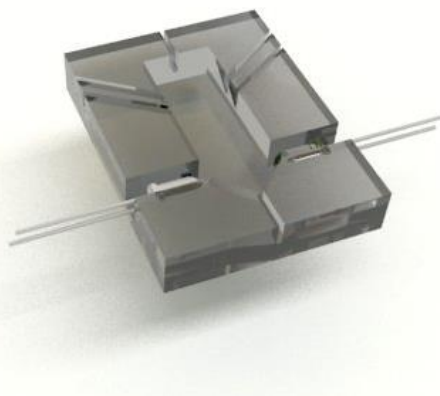


Figura 2.11 Miniaturização da câmara de mistura empregada no sistema μ FBA. Fonte: o autor 2017.

Com essa proposta de redução do sistema, procedimentos analíticos foram realizados utilizando um volume total de 200 μ L de amostra e reagentes.

2.3.2. Aplicações analíticas em fluxo-batelada de reações QL

Ao longo dos últimos anos, trabalhos envolvendo o uso de sistemas FBA com detecção quimiluminescente foram desenvolvidos para determinação de alguns analitos específicos.

Moreira (2009) propôs em seu trabalho a utilização de um planejamento experimental para otimização da reação entre o luminol e o peróxido de hidrogênio, visando desenvolver um sistema quimiluminescente em fluxo-batelada para determinação de Vitamina B₁₂ em medicamentos. Um espectrofluorímetro com um tubo fotomultiplicador foi utilizado para detecção do sinal quimiluminescente (MOREIRA, 2009).

Grünhant e colaboradores (2011) desenvolveram um sistema de análise em fluxo-batelada empregando detecção quimiluminescente para determinação de noradrenalina,

dopamina e epinefrina em fármacos. O método baseou-se no efeito inibidor das catecolaminas mencionadas acima em um sistema químico envolvendo o luminol e hexacianoferrato (III) de potássio em meio alcalino. A detecção do sinal analítico foi realizada em uma fotomultiplicadora, registrando a emissão de fótons a 425 nm. O sistema FBA proposto apresentou ser um método de análise simples, de baixo custo, versátil e de alta sensibilidade analítica. O tipo de analisador utilizado permitiu a preparação automática de soluções-padrão e o processo analítico pode ser realizado alterando-se apenas alguns parâmetros operacionais do programa do FBA (GRÜNHUT *et al.*, 2011).

Almeida (2012) propôs um método quimiluminescente baseado em imagens digitais que utilizava um analisador em fluxo-batelada para determinação de íons cromo (VI) em águas. O sistema proposto usava uma *webcam* como sistema de detecção para aquisição das imagens digitais geradas de acordo com o sistema de cor RGB (ALMEIDA, 2012).

Andrade e colaboradores (2013) desenvolveram um luminômetro simples e automático baseado em fotodiodo de silício que utiliza um sistema em fluxo-batelada para determinação quimiluminescente de vitamina B₁₂ em fármacos. A utilização de um fotodiodo acoplado à câmara de mistura mostrou-se eficiente frente a outros sistemas que utilizam celas de reação em espiral, celas de quartzo e minicolumnas de vidro, mesmo estas utilizando um sistema de detecção com uma fotomultiplicadora (ANDRADE *et al.*, 2013a).

Leite (2016) realizou um estudo sobre a utilização de reações quimiluminescentes em sistemas titulométricos, utilizando uma *webcam* como detector para determinação de íons ferro (II) em xaropes. A aquisição das imagens foi realizada por uma *webcam* acoplada sobre a câmara de mistura do sistema fluxo-batelada (LEITE, 2016).

Apesar do FBA ser uma técnica relativamente recente, quando comparado a outros analisadores em fluxo, suas potencialidades vêm sendo reconhecida no meio científico (BATISTA *et al.*, 2014).

2.4. Imagens digitais

Matematicamente, uma imagem digital pode ser entendida como uma matriz bidimensional cujos índices de linhas e colunas identificam um ponto na imagem. Os elementos dessa matriz digital são denominados de elementos de imagem ou *pixels*. Pode-se definir o *pixel* como o menor elemento de uma imagem digital, constituindo-se numa representação abstrata da imagem no domínio digital (GONZALEZ; WOODS, 2000).

Ao se utilizar um dispositivo baseado no sistema RGB para aquisição das imagens, cada *pixel* resulta da combinação das cores vermelho, verde e azul em diferentes proporções e intensidades. É possível formar qualquer cor variando do preto na ausência de qualquer radiação ao branco quando se tem a contribuição máxima das intensidades de R, G e B (GONZALEZ; WOODS, 2000).

A quantidade de *bits* usados para representar a cor de um único *pixel* numa imagem *bitmap* (profundidade de cor) define o número possível de valores de intensidades ou cores que um *pixel* pode assumir (SOLOMOM, C.; BRECKON, T., 2011). No caso das imagens no sistema RGB, a utilização de 24 *bits* permite alocar 8 *bits* para cada componente da cor, totalizando 256 níveis de cores por componente e 16,7 milhões de cores totais na imagem (MILANEZ, 2013)

Dessa forma, qualquer equipamento que possibilite a comparação da mudança de coloração em relação a uma referência tem potencial para ser utilizado para análises quantitativas (BYRNE *et al.*, 2000). Nesse sentido, as imagens digitais para fins analíticos podem ser produzidas por diversos dispositivos, incluindo *smartphones* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017), *scanners* (SOUTO *et al.*, 2015), *webcam* (TÔRRES *et al.*, 2011), câmeras digitais (DINIZ *et al.*, 2012a).

2.5. Sistema de cor RGB

O sistema de cor RGB (do inglês: *Red-Green-Blue*) (BERNS, 2000) se baseia na relação entre as cores primárias (vermelha, verde e azul) que compõem a imagem. Combinando as cores RGB aos pares é possível gerar cores resultantes: magenta (azul + vermelha), ciano (azul + verde) e amarela (vermelha + verde), conforme a **Figura 2.12**.

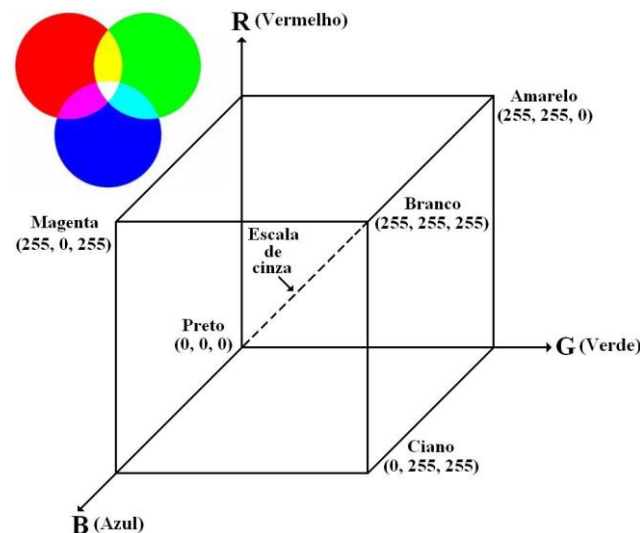


Figura 2.12 Ilustração geométrica do sistema RGB. Adaptada de Lyra 2008.

Na **Figura 2.12**, o sistema de cor RGB também é ilustrado geometricamente, cuja concepção baseia-se no princípio da percepção de cores da visão humana (LYRA, 2008). Neste sistema, cada eixo representa uma cor básica e os níveis de intensidade com que cada cor contribui na mistura. Com valores entre 0 e 255, as cores magenta, amarela e ciano são representadas, respectivamente, por diagonais nos planos RB, RG e BG. Na diagonal do cubo de cor, encontram-se os pontos que representam as combinações equitativas das três cores básicas. Essas combinações variam do preto, (0,0,0), passando pela escala de cinza até o branco resultante da mistura (255,255,255) (BERNS, 2000; LYRA, 2008). Portanto, uma cor pode ser considerada como um ponto em um espaço tridimensional, onde cada cor é representada por um trio de coordenadas RGB.

Um modelo matemático que se baseia no sistema de cores RGB e no conceito de norma de vetores foi proposto por Lyra 2008. No espaço vetorial RGB, cada cor é descrita por meio de um vetor posição, cuja norma $\|v\|$ pode ser calculada pela distância euclidiana no espaço cúbico (**Equação 3**).

$$\|v\| = \sqrt{R^2 + G^2 + B^2} \quad (3)$$

Esse modelo pode ser usado para definir a resposta analítica usada na construção das curvas analíticas. Um vetor posição v é associado à imagem digital de cada solução padrão ou amostra, constituindo-se e, resposta ou sinal analítico.

Desta forma, a partir de uma área selecionada na imagem é possível extrair e expressar um valor matemático que pode ser usado para construir a curva analítica, assumindo-se uma relação linear entre a resposta analítica e a concentração do analito e estimar a concentração do analito nas amostras (LIMA, 2014).

2.6. Imagens digitais e sua utilização na análise química

O uso de imagens digitais para fins de análise química, teve início com o trabalho realizado por Momeni e colaboradores, (1999), (MOMENI *et al.*, 1999). Esse artigo introduziu o uso de imagens digitais em química analítica, ao propor um método para quantificar retinol por quimioluminescência capilar. No ano seguinte, Lampen e colaboradores (2000) publicaram um artigo com informações químicas e mineralógicas de rochas e solos do planeta Marte obtidas de imagens digitais (LAMPEN *et al.*, 2000).

As imagens digitais apresentam informações relevantes de interesse químico, como cor, tamanho e forma, sendo aproveitadas na obtenção de resultados qualitativos ou quantitativos. Essas informações podem ser obtidas por meio de programas computacionais de processamento e análise de imagens digitais (SOLOMOM, C.; BRECKON, T., 2011). Como técnica analítica,

trata-se de uma ferramenta não destrutiva e não invasiva, a qual possibilita obter informações quantitativas e qualitativas sobre amostras de interesse (DANTAS, 2015).

Os dispositivos para aquisição de imagens digitais que empregam sensores CCD (dispositivo de carga acoplada) e sensores baseados em tecnologia CMOS (semicondutor de óxido metálico complementar), como as câmeras digitais e *webcams*, foram introduzidos na química por diferentes razões, tais como, aquisição rápida de sinal, linearidade, apropriado para o desenvolvimento de novos métodos analíticos com alta sensibilidade, robustez, baixo custo de implementação, operação e manutenção. Esses sensores são capazes de converter a intensidade de luz incidente em valores digitais armazenáveis para gerar resposta a partir de uma imagem baseada no modelo de cor RGB (FRANCO; SUAREZ; DOS SANTOS, 2017).

2.7. Métodos analíticos baseados em imagens digitais

Na literatura são descritos modelos matemáticos que utilizam dados do sistema de cor RGB das imagens digitais para a obtenção de respostas analíticas em diversas determinações. Alguns desses modelos são descritos a seguir.

Lima e colaboradores (2013) apresentaram, pela primeira vez, a combinação de imagens digitais obtidas com uma *webcam* com sensor CCD e um microanalisador em fluxo-batelada como uma nova estratégia de análise química quantitativa. O sistema DIB- μ FBA utilizou o modelo de cores RGB para determinação de taninos em amostras de chá verde empregando o método de tartarato ferroso (LIMA *et al.*, 2013).

Em 2103, Andrade e coautores desenvolveram um analisador em fluxo-batelada baseado em imagem digital (DIB-FBA) para determinações de íons alumínio (III) e íons cromo (VI) em águas naturais. Uma *webcam* dispoñdo de um sensor CCD foi utilizada para captura das imagens. Os dados do sistema de cor RGB foi utilizado para construir as curvas analíticas (ANDRADE *et al.*, 2013b).

Lima (2015) desenvolveu um novo método quimiluminescente em fluxo-batelada para determinação de ferro total em matrizes viscosas (óleo comestível, óleo lubrificante e biodiesel) empregando pontos quânticos de telureto de cádmio com detecção por imagens digitais via *webcam*. Para a construção da curva analítica, foi utilizado um modelo matemático baseado nos valores de cor RGB, sendo assim considerada a norma dos vetores como resposta. Esse novo método mostrou-se viável, permitindo o desenvolvimento de novas estratégias analíticas potencialmente úteis empregando pontos quânticos, automação e imagens digitais (LIMA, 2014).

Benedetti e colaboradores (2015) propuseram um método analítico de baixo custo para a quantificação de etanol em bebidas com base na combinação de um *spot test* colorimétrico e um método baseado em imagem digital (DIB). As imagens digitais das reações foram capturadas usando uma câmera digital projetada com controle de iluminação interna. As imagens foram decompostas por uma abordagem RGB usando *software* livremente disponível. O método desenvolvido foi eficiente para quantificação do etanol em amostras de bebidas alcoólicas, com resultados em concordância com os obtidos por método espectrofotométrico (DOS SANTOS BENEDETTI *et al.*, 2015).

Moura (2016) descreveu o desenvolvimento de microssistemas fluidicos construídos à base de uretano-acrilato com células de detecção fluorimétricas e quimiluminescentes integradas. Esse trabalho propôs-se a utilizar como detector alternativo uma *webcam* para realizar determinações envolvendo medidas de fluorescência molecular e quimiluminescência. A detecção foi baseada em imagens digitais produzidas durante o monitoramento contínuo da célula de fluxo do sistema miniaturizado, usando o modelo de cor RGB e aplicado para a realização de medidas de quimiluminescência para a determinação de paracetamol em amostras de medicamentos (MOURA, 2016).

De Oliveira e colaboradores (2017) propuseram uma concepção melhorada para um espectrômetro portátil baseado em *smartphone* que funciona nos modos de absorção e emissão molecular. Um programa desenvolvido para o *smartphone* processa os dados de imagem adquiridos e decompõe os *pixels* em seus valores de RGB. O instrumento desenvolvido foi aplicado para determinar Fe^{2+} em amostras de medicamentos e Na^+ em solução salina e amostras de águas naturais, (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Franco e coautores (2017) propuseram um novo procedimento analítico, simples e de baixo custo para determinação *in situ* de furfural em amostras de aguardente de cana-de-açúcar (cachaça) baseando-se na combinação de *spot test* colorimétrico baseado em imagens digitais (DIB). As imagens digitais foram obtidas a partir de uma câmara de *smartphone* e processadas por um programa que decompõe a imagem em uma matriz RGB. O método DIB acoplado ao *spot test* mostrou-se uma alternativa viável e importante para determinar analitos como o furfural durante a produção de bebidas alcoólicas (FRANCO; SUAREZ; DOS SANTOS, 2017).

2.8. Breves considerações sobre filmes digitais

Filmes ou vídeos digitais são compostos por uma série de imagens digitais que são formadas por *bitmaps* ortogonais (*frames*) exibidos em uma rápida sucessão a uma taxa constante, dando ao espectador uma sensação de movimento. A frequência dos quadros (ou *frame*), expressa em quadros por segundo (FPS), é a frequência com que um dispositivo de imagem apresenta imagens consecutivas (LIMA *et al.*, 2016; SIQUEIRA *et al.*, 2017).

As taxas de quadros de alguns dispositivos como câmaras digitais e *webcams* normalmente variam entre 24, 25, 30 e 60 FPS, ou seja, para um vídeo digital de 4 segundos a uma frequência de 30 FPS, existe um total 120 imagens digitais. Com a utilização de um programa de computador específico, é possível decompor o vídeo digital em imagens ou

simplesmente monitorar e processar, quase que instantaneamente, todas imagens dentro de um intervalo de tempo específico e extrair os dados de interesse para uma análise.

Na captura de imagens utilizando câmeras digitais e *webcams*, o obturador é aberto e fechado repetidas vezes durante um pequeno intervalo de tempo. Isso limita, em algumas situações, monitorar reações químicas que apresentam uma duração relativamente curta, uma vez que é possível existir alguma informação útil durante a fração de tempo em que o obturador estiver fechado, como no caso de algumas reações QL. Nesse sentido, para superar esse óbice, um vídeo digital pode ser utilizado em pesquisas a partir do processamento e análise das imagens digitais, como mostra o relato de trabalhos recentemente publicados.

Lima e colaboradores (2016) fizeram uso de vídeo digitais, utilizando uma *webcam* para realizar titulações automáticas, rápidas e precisas. A viabilidade do método foi comprovada pela aplicação em titulações ácido/base e amostras de óleos comestíveis. A determinação do ponto final foi realizada com sucesso comparando os *frames* descompilados de um vídeo digital do sistema de reação usando o coeficiente de correlação de Pearson para construir uma curva de titulação (LIMA *et al.*, 2016).

Santos e colaboradores (2016) utilizaram uma *webcam* como detector para um sistema em fluxo com multicomutação. A viabilidade dessa abordagem foi demonstrada para determinação de nitrato e nitrito em águas naturais. Vídeos produzidos a partir da *webcam* com taxa de 30 FPS foram capturados e armazenados como arquivos AVI. Para cada determinação, foi criado um arquivo de 90 segundos de gravação e, usando um programa específico, uma imagem foi extraída por segundo do arquivo de vídeo, totalizando 90 arquivos de imagem salvos em JPEG. Os valores de RGB foram extraídos das imagens com o programa *ImageJ* para construção da curva analítica (SANTOS *et al.*, 2016)

Siqueira e coautores (2017) propuseram uma nova metodologia automática para a detecção do ponto final nas determinações de dureza total e alcalinidade total em águas através

do uso de vídeos digitais. Neste trabalho, foi utilizado uma *webcam* como sistema de detecção e captura dos vídeos digitais. Os valores de RGB, obtidos de cada imagem do vídeo, foram utilizados para calcular os valores de coeficiente de correlação de Pearson e assim determinar o ponto final da titulação (SIQUEIRA *et al.*, 2017).

2.9. Determinação de cobre na cachaça

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a cachaça é denominação típica e exclusiva da Aguardente de Cana produzida no Brasil, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características peculiares, podendo ser adicionado açúcares até 6 g L^{-1} , expressos em sacarose (MAPA, 2005).

A cachaça é a bebida destilada mais consumida no Brasil e a quarta no mundo, ficando atrás apenas da vodka, soju e do baijiu (BORTOLETTO; ALCARDE, 2015). Estima-se existir no país 40 mil produtores e mais de 4 mil marcas dessa bebida. Em 2014, foi produzido aproximadamente 1,7 bilhão de litros de cachaça no Brasil, no entanto, menos de 1% desta produção foi exportada (IBRAC, 2017). O principal motivo que desfavorece a exportação da cachaça é o baixo controle de qualidade, sobretudo os elevados teores de cobre que em, geral, excedem o valor de 5 mg L^{-1} (BORTOLETTO; ALCARDE, 2015) determinado pela legislação brasileira (MAPA, 2005).

Comumente, a cachaça é produzida em alambiques de cobre, posto que o cobre favorece à qualidade da bebida, atuando como catalisador de importantes reações que ocorrem durante a destilação. Em vista disso, a cachaça apresenta peculiaridades sensoriais por reduzir a acidez e os níveis de aldeídos e compostos sulfurosos, os quais conferem à bebida, sabor e odor desagradáveis, comum às cachaças produzidas em alambiques confeccionados com outros materiais, como aço inox, alumínio e porcelana (DE SOUZA, 2012). No entanto, as cachaças produzidas em alambiques de cobre, geram, durante o processo de destilação, o “azinhavre”,

[Cu₂(OH)₂CO₃] um carbonato básico de cobre. Este composto é dissolvido por vapores alcoólicos ácidos, contaminando o destilado (MIRANDA; DIONÍSIO; PEREIRA-FILHO, 2010).

A presença de cobre em elevadas concentrações na cachaça é altamente indesejável, por trazer sérios danos à saúde (NEVES *et al.*, 2007). Um excesso de cobre no organismo provoca interferência nas atividades catalíticas de enzimas e pode resultar em doenças neurodegenerativas como a doença de Wilson, a doença de Menkes e a doença de Alzheimer, como também a esclerose e a artrite reumatóide. O excesso de cobre também pode ser cancerígeno, causando melanoma, um tipo de câncer maligno caracterizado pela aparência de manchas escuras na pele, potencialmente levando a cegueira e morte (SOUZA *et al.*, 2016, 2016).

Diversas metodologias ao longo dos últimos anos, têm sido propostas para a determinação de íons cobre (II) em amostras de cachaça utilizando diferentes técnicas, dentre as quais, a técnicas espectrométricas de absorção e emissão atômica são as mais utilizadas (DE SOUZA, 2012). O método sugerido pela AOAC (do inglês: *Association of Official Analytical Chemists*), por exemplo, utiliza a espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS), com os padrões analíticos na faixa de (0,0 a 0,96 mg L⁻¹) preparados em solução alcoólica a 50% (v v⁻¹) água e leitura direta de amostras sem ajuste de graduação alcoólica (DE SOUZA, 2012; LATIMER, 2012).

Um estudo realizado por Honorato e coautores (2002), que também utiliza a FAAS, indicou que existe um efeito de matriz considerável ao analisar cobre em amostras de cachaça. Nesse estudo, foi averiguado que o grau alcoólico em diferentes níveis corrobora para a causa do efeito de matriz. O principal motivo pelo qual a graduação alcoólica interfira na medida está relacionado à tensão superficial da solução. Quanto maior a graduação alcoólica, menor será a tensão superficial da solução e maior será a eficiência de nebulização. Para contornar este

inconveniente, os autores propuseram para esse tipo de análise, o emprego do método de adição de padrão (HONORATO *et al.*, 2002). No entanto, a execução do SAM é laboriosa e lenta e, portanto, só deve ser usada quando o efeito da matriz realmente for significativo.

O Instituto Adolfo Lutz, em seu guia de métodos físico-químicos para análise de alimentos, também recomenda o uso da espectrometria de absorção atômica, pelo método de adição de padrão para determinar cobre em amostras de cachaça. Nesse método a faixa de concentração se encontra de 0,2 a 1,0 mg L⁻¹ e o valor do branco é determinado com uma solução de álcool etílico a 8% (v v⁻¹) em água. A vantagem deste método é eliminar principalmente interferências provenientes da matriz. Entretanto, pode ser considerado um procedimento trabalhoso quando utilizado em análises de rotina em laboratórios com alta demanda de amostras (LUTZ, 1985)

Outro estudo realizado para determinação de cobre em cachaça, confere no emprego da técnica de espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS) e a utilização de padrões internos contendo (Ag, Bi, Co ou Ni), com o intuito de minimizar as interferências causadas pelos diferentes teores alcoólicos das amostras, evitando assim o uso do método de adição de padrões empregado por HONORATO e colaboradores (2002) (MIRANDA; DIONÍSIO; PEREIRA-FILHO, 2010)

Caldas e colaboradores (2009) fizeram uso da técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS) para a determinação simultânea dos metais (As, Cu e Pb) em cachaça, sem digestão previa de amostra. Para minimizar o efeito de matriz foram utilizados padrões internos com Bi e Sb, corrigindo dessa forma, possíveis erros sistemáticos e eliminando influências geradas por flutuações de ajustes do instrumento. Modificadores químicos como Pd(NO₃)₂ e Mg(NO₃)₂ foram utilizados para enfatizar eficácia do método de padronização interna e estender a vida útil do tubo de grafite (CALDAS; OLIVEIRA; NETO, 2009).

A técnica de espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-vis também já foi explorada para determinação de cobre em cachaça (DO NASCIMENTO ROCHA *et al.*, 2008). Nesse trabalho, a biquinolina foi empregada para a formação de um complexo cromóforo com o cobre, o qual foi monitorado no comprimento de onda de 545 nm. A reação mostrou alta seletividade em presença de outros metais. Uma faixa linear de 1 a 17,0 mg L⁻¹ foi obtida através desse método, o qual não necessita pré-concentração no preparo de amostra, permitindo direta quantificação de cobre.

Técnicas eletroanalíticas também já foram empregadas na determinação de íons cobre (II) em amostras de cachaça (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Nesse trabalho, os autores empregaram o uso do biochar como modificador de eletrodo juntamente com técnicas de voltametria de pulso diferencial com redissolução adsorptiva (DPAdSV) para pré- concentração e determinação de íons de cobre (II) em amostras de bebidas (cachaça, vodka, gin e tequila). Em comparação com os procedimentos de espectrometria atômica, o método proposto apresentou resultados satisfatórios em termos de seletividade, sensibilidade e custo instrumental.

3

EXPERIMENTAL

3.1. Síntese das NPMs

3.1.1. Reagentes e equipamentos para síntese e caracterização das NPMs de Fe₃O₄

Para realização da síntese das nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ foram utilizados os seguintes reagentes: cloreto de ferro (III) hexahidratado (Sigma-Aldrich); cloreto de ferro (II) tetra hidratado (Sigma-Aldrich); ácido clorídrico (Vetec); hidróxido de sódio (Vetec); etanol anidro (Neon); isopropóxido de alumínio (Sigma-Aldrich); 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) (Sigma-Aldrich) e dodecil sulfato de sódio (SDS) (Merck). Água sempre recém-destilada e posteriormente deionizada por um sistema de purificação Milli-Q Plus® (Millipore Corporation), com resistividade específica de 18,2 MΩ cm⁻¹ a 25 °C, foi utilizada quando necessário. Para promover uma atmosfera inerte a fim evitar oxidação das NPMs durante o processo de síntese, foi utilizado o gás nitrogênio ultrapuro (Linde gás). A descontaminação de vidrarias e recipientes foi realizada utilizando uma solução de HNO₃ 10% (vv⁻¹) em um banho ultrassônico (UltraSonic Cleaner, Unique, modelo USC-1800A) durante 20 minutos. O complexante PAN foi utilizado em solução alcoólica. Essa solução foi preparada a partir de 0,25 g do quelante em 100 mL de etanol.

3.1.2. Descrição das etapas de síntese das NPMs de Fe₃O₄

O procedimento de síntese das nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ recobertas com Al₂O₃ e funcionalizadas com SDS e PAN foi realizado em três etapas, conforme ilustrado na **Figura 3.1.**



Figura 3.1 Ilustração das etapas envolvidas no procedimento de síntese das nanopartículas magnéticas. Adaptada de (BARRETO, 2016).

A primeira etapa do procedimento de síntese do sorbente magnético consiste na formação do núcleo de magnetita. Em seguida, na segunda etapa, o núcleo nanoestruturado é recoberto com alumina (Al_2O_3). E por fim, na última etapa, foi realizada a funcionalização das nanopartículas magnéticas com o surfactante SDS e o complexante PAN.

3.1.3. Síntese do núcleo de Fe_3O_4

A síntese do núcleo das nanopartículas magnéticas foi realizada pelo processo químico de coprecipitação, conforme reporta a literatura especializada (KANG *et al.*, 1996) e (TEKIYE; AGHAJANI; SHARIF, 2017).

Para obtenção das nanopartículas de Fe_3O_4 , foram adicionados em um balão de três vias, 25 mL de água deionizada e acrescentados, 2,0 g de cloreto de ferro (II) tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 5,2 g de cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) juntamente com 850 μL de ácido clorídrico concentrado. Essa solução foi homogeneizada à temperatura ambiente por 5 minutos. Logo após essa etapa, à temperatura de 80 °C, foi adicionado 250 mL de hidróxido de sódio a 1,5 mol L^{-1} gota a gota, sob agitação vigorosa e em fluxo de nitrogênio. Com o gotejamento da base, foi observado o surgimento de um precipitado escuro na solução,

evidenciando a formação dos óxidos de ferro. A solução resultante permaneceu nessas condições por 2 horas.

Posteriormente, o sistema foi resfriado à temperatura ambiente e o sólido resultante foi separado da solução sob a ação de um campo magnético e lavado cinco vezes (5 x 50 mL) com etanol anidro e seco a 60 °C em estufa.

3.1.4. Recobrimento do núcleo de Fe_3O_4 com a alumina

Para o recobrimento das nanopartículas de óxido de ferro com alumina foi realizado o procedimento descrito por (BARRETO, 2016) e (TEKIYE; AGHAJANI; SHARIF, 2017). Inicialmente, 1,0 g do reagente isopropóxido de alumínio foi dissolvido em 60 mL de etanol anidro, formando uma solução homogênea. Então, 0,1 g das nanopartículas de Fe_3O_4 obtido foram adicionados à solução e solubilizados por 5 minutos em um ultrassom. A essa suspensão, foi adicionado lentamente 100 mL de uma mistura de água e etanol (1:5 v v⁻¹) sob agitação vigorosa durante 30 minutos. Por fim, com a auxílio de um ímã, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado várias vezes com etanol e seco em estufa a 60 °C e em seguida, calcinado em mufla a 500 °C durante 3 horas.

3.1.5. Funcionalização das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Al}_2\text{O}_3$

Após as etapas de síntese e recobrimento do núcleo de Fe_3O_4 , foi realizado a funcionalização das nanopartículas seguindo o procedimento descrito por Shemirani e Akhavi (2001) (SHEMIRANI; AKHAVI, 2001) e Barreto (2016) (BARRETO, 2016). Inicialmente foram misturados 1,5 g de nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Al}_2\text{O}_3$, 100 mg do surfactante SDS e 1 mL da solução do complexante PAN com um volume de 100 mL de etanol anidro. O

pH dessa solução foi ajustado para aproximadamente 1,0 com uma solução de HCl (3,0 mol L⁻¹).

Essa solução foi submetida a uma agitação mecânica em baixa rotação, por um tempo de aproximadamente 15 minutos. Por fim, as nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄@Al₂O₃ funcionalizadas com SDS e PAN foram isoladas sob a ação de um campo magnético externo e lavadas com etanol anidro por 3 vezes (3 x 50 mL).

3.2. Caracterização das NPMs

Concluída a etapa de síntese das NPMs e funcionalização, estas foram submetidas a dois métodos de caracterização: a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a difração de raios-X (DRX). Com os métodos de MEV e DRX, foi possível caracterizar as amostras quanto à sua morfologia e distribuição de tamanhos de partícula, como também realizar a caracterização cristalográfica das nanopartículas magnéticas.

3.2.1. Difração de raios-X

Para confirmar a constituição do núcleo e do revestimento das nanopartículas magnéticas sintetizadas, foi utilizada a técnica de difração de raios-X. Os difratogramas de raios X foram obtidos em um difratômetro Shimadzu, modelo XRD - 6000, na faixa de $2\theta = 10$ a 80° , com um passo de $2^\circ \text{C min}^{-1}$ e tempo de passo de 0,60 segundos, utilizando como fonte de radiação monocromática a radiação Cu-K α . Os difratogramas foram coletados no Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os resultados obtidos foram comparados com os padrões cristalográficos do banco de dados do JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*).

3.2.2. Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia e as características nanoestruturais das partículas obtidas, foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura ZEISS DSM, modelo 940 A. Uma pequena quantidade das amostras foram dispersas em acetona, gotejadas no suporte do porta-amostra do MEV e deixadas para secagem. Antes das análises ocorrerem, as partículas foram recobertas com uma fina camada de ouro de aproximadamente 40 nm. Esse procedimento se faz necessário para a uniformização, dispersão e espalhamento eletrônico na superfície do material. O metalizador Mtech, modelo K 550X foi empregado para realizar a deposição do ouro, pela técnica de *sputtering*, no material sintetizado. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Novos Materiais (Tecnomat), no Departamento de Engenharia de Materiais/CT da UFPB.

3.3. Determinação de cobre em amostras de cachaça

3.3.1. Reagentes, soluções e amostras

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se reagentes de grau analítico. Para realização de todo o processo analítico utilizou-se água previamente destilada e deionizada, apresentando condutividade $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ (sistema de deionização Milli-Q *Millipore Corporation*).

Para o método de referência, foi utilizada um padrão de íons cobre (II) de 1.000 mg L^{-1} (Fluka). As soluções padrão empregadas nos estudos (entre $1,0$ a $10,0 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) foram preparadas a partir de diluições apropriadas deste padrão.

Para o método proposto, soluções padrão de íons cobre (II) foram preparadas a partir de diluições do padrão de 1.000 mg L^{-1} (Fluka). As diluições foram realizadas utilizando etanol anidro, mantendo as soluções a um nível de 40% de etanol e pH próximo a quatro, ajustadas

com uma solução tampão (pH 4,0) preparada a partir do acetato de sódio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (Vetec, 99% P.A.) e ácido cítrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (Vetec, 99,5% P.A.).

Uma solução estoque de luminol ou 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona ($\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$, Sigma-Aldrich, 97% P.A.) de concentração $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em meio ao tampão carbonato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 11,5 e diluída conforme requerido (entre $1,0 \times 10^{-3}$ a $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e mantida sob refrigeração a 8°C .

Soluções de peróxido de hidrogênio com concentração variando entre $2,0 \times 10^{-2}$ e $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, foram preparadas diariamente a partir da diluição apropriada de H_2O_2 (30 % m/v, Merck).

Soluções de ácido nítrico com concentração entre 0,1 e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, foram preparadas a partir de uma solução estoque de HNO_3 (ultrapuro, Merck), $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Uma solução estoque de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de NPMs sintetizados foi preparada dissolvendo-se a massa obtida da nanopartícula em etanol anidro.

Para a avaliação do método analítico proposto, foram analisadas 10 amostras de cachaça de diferentes marcas, sendo nove comerciais e uma artesanal, com grau alcoólico variando de 39 a 42 GL. Todas as amostras foram adquiridas no mercado local das cidades de João Pessoa e Areia, situados na Paraíba, Brasil e na cidade de Natal, situado no Rio Grande do Norte, Brasil.

3.3.2. Otimização das variáveis de interesse para determinação de cobre em cachaça

Com a finalidade de se investigar as melhores condições para extração em fase sólida magnética e para determinação quimiluminescente do analito, foi realizado um planejamento fatorial 2^4 .

Foram estudados os seguintes parâmetros: quantidade de nanopartículas magnéticas, concentração do HNO_3 , concentração de H_2O_2 e concentração de luminol.

Como reporta (BARRETO, 2016) a quantidade de sorbente disponível no meio reacional influencia diretamente na obtenção de adsorções quantitativas do metal trabalhado. Dessa forma a quantidade de nanopartículas magnéticas investigadas variou na faixa de 100 e 500 mg. Para serem incorporadas ao sistema em fluxo, as NPMs foram dispersas em etanol anidro.

A literatura alude o HNO_3 como um eluente eficiente em diferentes métodos na determinação de alguns metais (MISHRA, 2014; QUEIROZ *et al.*, 2002). Com a adição do HNO_3 foi observado um aumento significativo do sinal QL, dessa forma foi estudado a faixa de 0,01 e 0,1 mol L^{-1} . Como reações QL são altamente dependentes de pH alcalino, este foi mantido em torno de pH 11,5 mesmo após a adição do HNO_3 ,

O peróxido de hidrogênio é responsável pela oxidação do luminol, e tem um papel limitante na reação, podendo elevar ou atenuar o sinal quimiluminescente. Baseando em estudos realizado (MOREIRA, 2009), selecionou-se as seguintes concentrações: $2,0 \times 10^{-3}$ e $2,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} .

Na reação quimiluminescente, a concentração de luminol deve-se apresentar em excesso, porém se faz necessário um estudo quantitativo de sua concentração para alcançar o valor ótimo de trabalho além de evitar gastos excessivos do reagente. Para isso foram estabelecidos dois diferentes níveis de concentração: 1,0 e 2,5 mmol L^{-1} .

Em todos experimentos, o pH foi mantido em 4,0 de acordo com estudos que empregam a alumina e o PAN para determinação de cobre (SOUZA *et al.*, 2016; SOYLAK; NARIN; DOGAN, 1997).

Otras variáveis a citar, o tempo de extração utilizando as NPMs e eluição foram mantidas constantes durante a realização das análises sendo estas 120 e 30 segundos respectivamente. Testes preliminares foram realizados a fim de alcançar esses resultados.

Sendo assim a matriz do planejamento proposto ficou definida pelos quatro fatores descritos inicialmente variando em dois níveis diferentes cada, portanto um planejamento fatorial 2^4 , composto naturalmente por 16 ensaios. Cada ensaio foi repetido três vezes para, no final do planejamento, obter um total de 48 respostas. Com esse número de replicatas foi possível obter uma melhor estimativa para definir com mais segurança se um fator ou interação é ou não significativo e digno de interpretação para certo nível de confiança.

3.3.3. Método de referência

O procedimento de referência para as amostras foi realizado em um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (Shimadzu, AA 6800), equipado com um amostrador automático, modelo ASC 6100, uma lâmpada de deutério para correção da radiação de fundo e um tubo de grafite pirolítico de aquecimento longitudinal. Foi utilizada uma lâmpada de cátodo de cobre (Hamamatsu Photonics, $\lambda_{\text{máx}}$: 324,8 nm) operando com uma corrente de 10mA. O gás Argônio (99,99%) foi empregado como atmosfera inerte nas etapas de pirólise e atomização em todas as medidas. O volume de 20 μL foi utilizado como volume final de amostragem no forno de grafite.

3.4. Desenvolvimento do sistema automático

3.4.1. Equipamentos e montagem

Para a montagem do sistema automático proposto foram empregados os equipamentos e componentes:

- Um *notebook*;
- Uma bomba peristáltica;
- Tubos de bombeamento dos fluidos;
- Seis válvulas solenoides;
- Um acionador de válvulas;
- Uma câmara de mistura;
- Uma *webcam*;
- Um agitador mecânico;
- Arduino Mega 2560;
- Servo motor

Uma fotografia do sistema automático em fluxo-batelada (FBA) desenvolvido para a análise quimiluminescente empregando como detecção uma *webcam* é mostrada na **Figura 3.2**. Para evitar a interferência da luz externa, a câmara de mistura juntamente com o dispositivo magnético-mecânico (DMM) foi colocada dentro de uma caixa escura com as seguintes dimensões: 141 x 228 x 190 mm. Os componentes especificados serão comentados nos tópicos subsequentes.

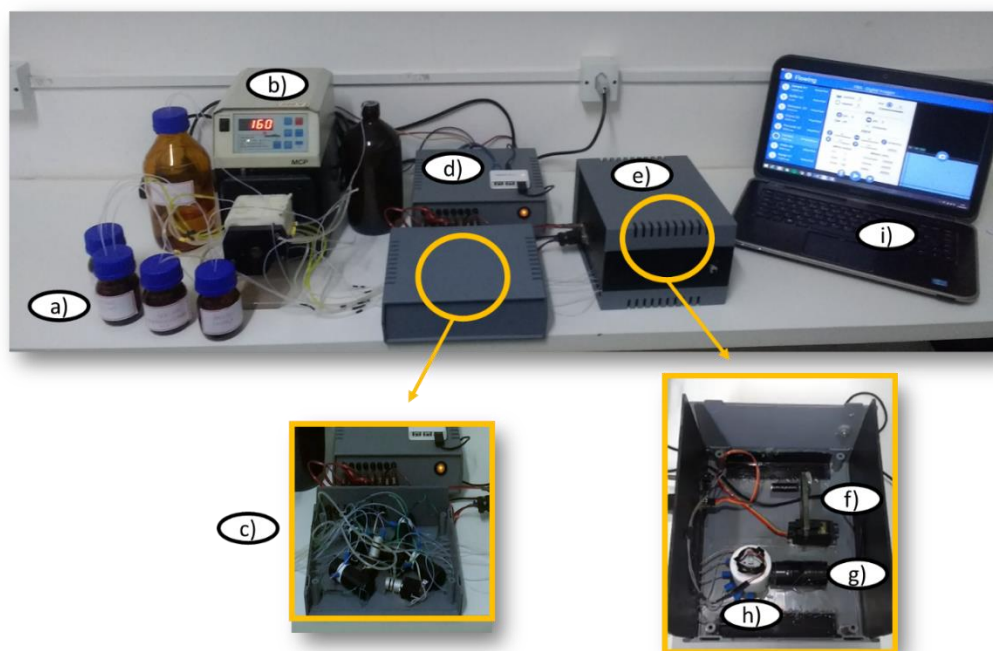


Figura 3.2 Fotografia do sistema automático em fluxo-batelada. (a) recipientes para amostra e reagentes, (b) bomba peristáltica, (c) válvulas solenoides (d) acionador de válvulas, (e) caixa escura para disposição da câmara de mistura e webcam, (f) dispositivo magnético-mecânico (DMM), (g) webcam, (h) câmara de mistura e (i) notebook.

Os dispositivos que constituem o sistema FBA proposto, foram acoplados a um *notebook* com processador Intel® Core i7 - 2.2 GHz e memória RAM de 8 Gb, integrado a uma interface de controle Arduino®.

A câmara de mistura (CM) foi construída em politetrafluoretileno (PTFE), conhecido comercialmente como Teflon®. A câmara possui uma janela lateral de quartzo, utilizada para o posicionamento da *webcam*, empregada como detector, como também possui uma cavidade lateral, necessária para promover uma maior aproximação entre o interior da CM e o ímã de neodímio-ferro-boro (NdFeB) utilizado para geração do campo magnético para retenção das partículas magnéticas. A CM também disponibiliza cinco canais de entrada e dois canais de saída e um volume interno de aproximadamente 8 mL. No interior da CM foi alocada uma haste de Teflon® de 0,4 mm de diâmetro, com uma das extremidades achatada e a outra ligada a um

mini motor DC (2400 RPM, 5 V) para promover a homogeneização dos fluidos e auxiliar na dispersão das partículas magnéticas.

O diagrama esquemático apresentando as dimensões da câmara de mistura é mostrado na **Figura 3.3**.

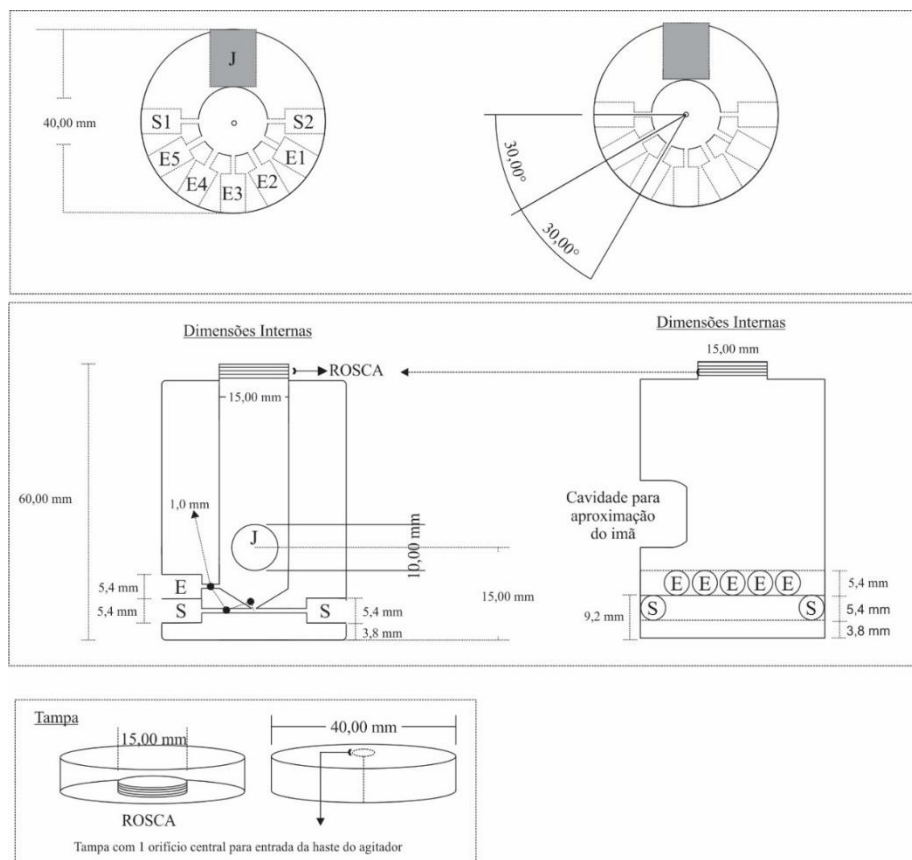


Figura 3.3 Diagrama esquemático das dimensões da câmara de mistura. Onde: (J) janela lateral de quartzo, (E) canais de entrada e (S) canais de saída. Fonte: o autor 2017.

Uma bomba peristáltica Ismatec®, modelo IPC, equipada com 8 canais e 12 roletes, utilizando tubos de bombeamentos de Tygon®, para as soluções de luminol, H_2O_2 , HNO_3 e água para promover a limpeza das CM e tubos de bombeamento Solvaflex® para os padrões e amostras, para solução contendo as NPMs e para o descarte, comunicados a quatro válvulas solenoides *three-way* da Cole Parmer® (modelo EW-01540-13) e duas válvulas tipo pinça da

ACL Italy® (série 730), utilizando tubos de Teflon®, foram empregados para propulsão e direcionamento dos fluidos à CM.

Foi desenvolvido um dispositivo único capaz de controlar o acionamento (abertura/fechamento) das válvulas solenoides, a bomba peristáltica, agitação mecânica na CM e o dispositivo magnético-mecânico (DMM) para a aproximação e distanciamento do campo magnético nas paredes da CM. Esse dispositivo utiliza um Arduino® com um microcontrolador ATmega2560 que possibilita controlar cada processo mencionado através das suas portas de saída PWM e de alimentação de 5V.

Para o acionamento das válvulas solenoides, foi utilizado o circuito integrado ULN2803, fabricado pela Toshiba®, que é um arranjo de oito transistores do tipo *Darlington*, apropriados para suportar alta tensão. O uso desse dispositivo possibilita a atuação independente ou simultânea, de até 8 portas de saída, ou seja, 8 dispositivos. As válvulas solenoides são alimentados com uma tensão de 12V, e seu acionamento é realizado pelo ULN2803, quando recebe uma tensão superior a 3,8V em uma de suas 8 portas de entrada, gerando uma corrente de 150 mA em cada porta de saída, onde estão conectadas válvulas. O comando de acionamento de cada válvula é realizado via notebook, através do interfaceamento com o Arduino®, o qual está conectado às portas de entrada do ULN2803.

Para o controle da bomba peristáltica e do agitador foram utilizados apenas as portas de saída *Pulse Width Modulation* (PWM) do Arduino® para o DMM foi usada uma porta de saída PWM juntamente com um dos pinos de alimentação de 5V e aterramento do próprio Arduino®.

Na **Figura 3.4** é apresentado um diagrama esquemático simplificado do circuito eletrônico do dispositivo mencionado e sua comunicação com as válvulas solenoides, bomba peristáltica, o agitador e o DMM.

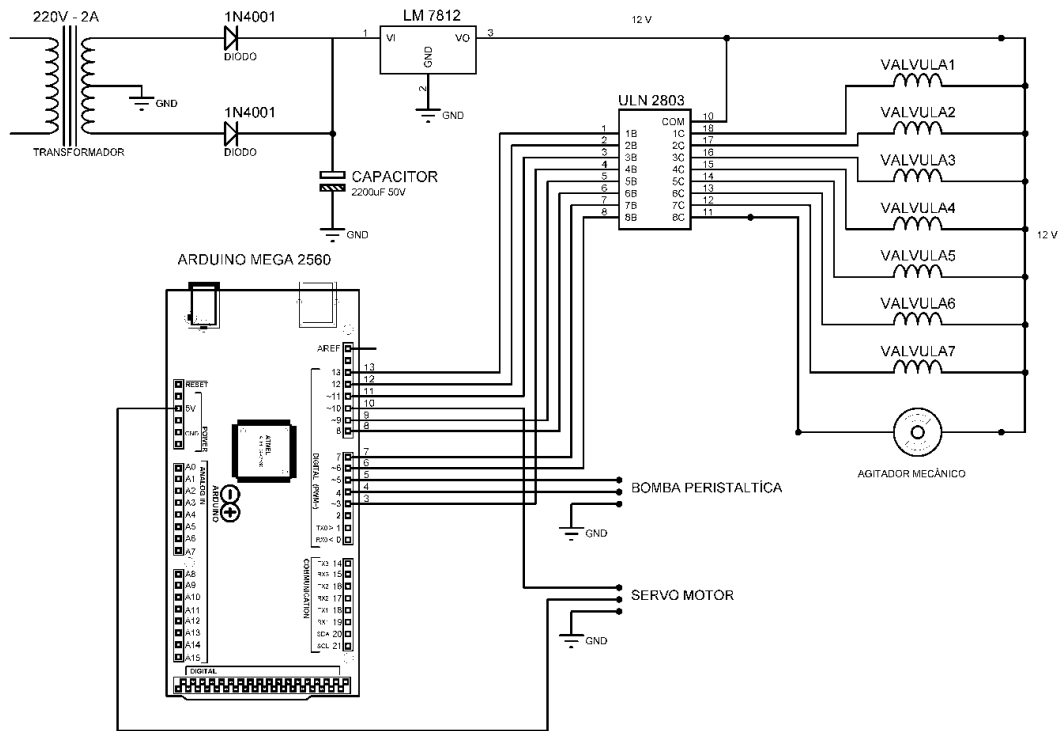


Figura 3.4 Diagrama esquemático simplificado do circuito eletrônico para acionamento das válvulas solenoides, controle da bomba peristáltica, agitador mecânico e do dispositivo magnético-mecânico através do Arduino Mega 2560. Fonte: o autor 2017.

Para a aproximação e distanciamento do campo magnético nas paredes da CM, foi desenvolvido um dispositivo magnético-mecânico, que utiliza um servo motor e um braço construído em acrílico e ímãs de neodímio-ferro-boro.

Uma barra de acrílico foi fixada na engrenagem central do servo motor, de forma que seu giro realizasse o deslocamento do ímã de neodímio (NdFeB) e consequentemente, a aproximação ou distanciamento do campo magnético em relação a câmara de mistura, conforme mostrado **Figura 3.5**.

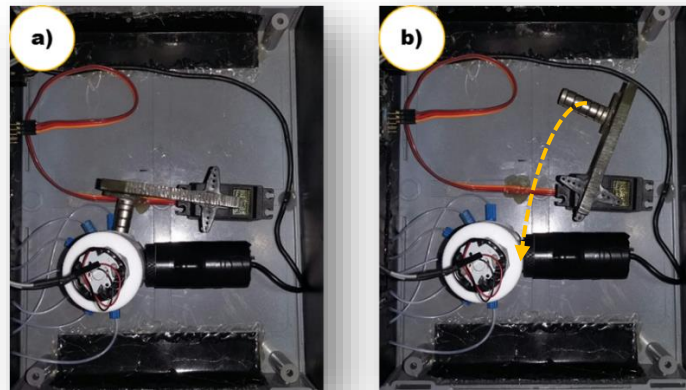


Figura 3.5 Detalhes do DMM. Posição de (a) aproximação e de (b) distanciamento do campo magnético em relação a câmara de mistura. Fonte: o autor 2017.

Um diagrama esquemático do DMM, com as dimensões de seus componentes, é mostrado na **Figura 3.6**.

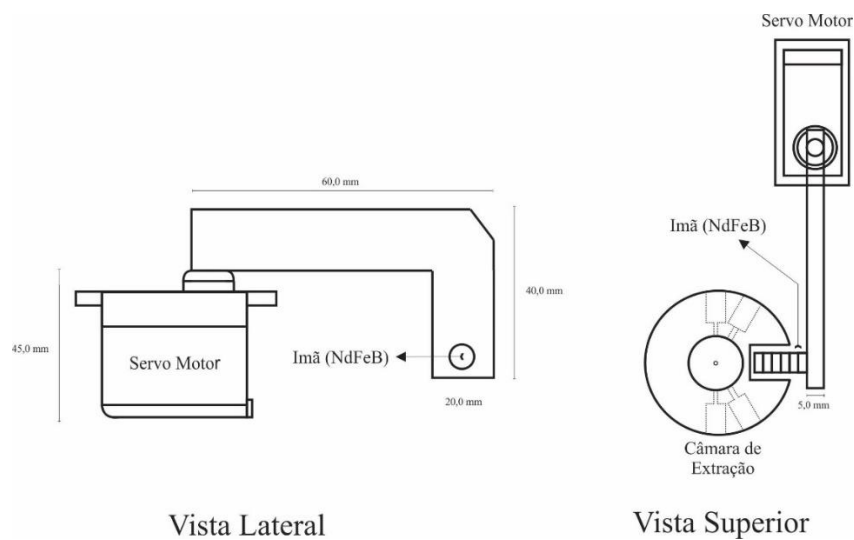


Figura 3.6 Diagrama esquemático do DMM desenvolvido. Fonte: o autor 2017.

Uma *webcam* da marca Microsoft® e modelo LifeCam Cinema com captura de vídeo em 720P (*High Definition*) em alta qualidade de até 30 FPS, com sensor CMOS, **Figura 3.7**, foi utilizada para detecção da radiação quimiluminescente.



Figura 3.7 Webcam utilizada como detector no sistema automático (FB) proposto. Fonte: Microsoft®.

3.4.2. Descrição do programa de controle

Para controle e gerenciamento do sistema automático proposto foi utilizado um programa que utiliza a plataforma *Adobe Air* para *Desktop*, programado em *ActionScript 3.0*. Através da interface de controle (**Figura 3.8**) é possível comandar as etapas da análise como: tempo de abertura das válvulas solenoides referentes a amostra, nanopartículas magnéticas, tampão, eluentes e descarte, em unidade de milissegundos (ms). Para isso, é realizado um estudo prévio de calibração em cada válvula solenoide, uma vez que os tempos de abertura das válvulas são proporcionais aos volumes adicionados na câmara de mistura. Todo esse procedimento é configurado em suas respectivas caixas de controle.

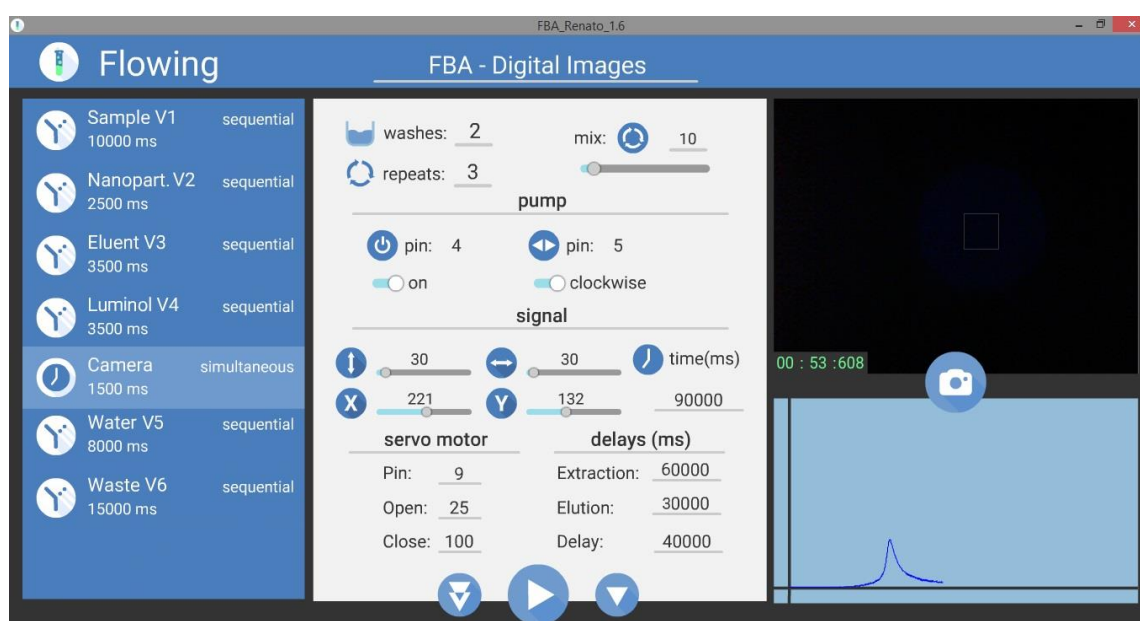


Figura 3.8 Interface de controle do sistema automático (FB) utilizado. Fonte: o autor 2017.

Outras funcionalidades do programa são referentes ao gerenciamento no controle da velocidade do agitador mecânico, da bomba peristáltica, do número de replicatas, distanciamento e afastamento do campo magnético nas paredes da CM pelo DMM e número de ciclos de limpeza da câmara de mistura. A velocidade do agitador mecânico é realizado por meio da caixa de controle que possui um valor arbitrário de 0 a 100, que corresponde a um valor de saída de tensão do Arduino® de 0 a 5V através da porta PWM. Para o controle do DMM são informados o ângulo de 0 a 180 graus a ser realizado pelo servo motor, afim de proceder com a aproximação e afastamento do campo magnético (“ação do imã”) em relação a câmara de mistura. O tempo em que o DMM permanece junto a CM é ajustado através de um tempo inserido na caixa de controle em milissegundos.

O programa desenvolvido também é responsável pelo tratamento das imagens digitais obtidas através da *webcam*. Este programa acessa as unidades internas da *webcam*, sendo capaz de capturar as imagens digitais da radiação quimiluminescente e extrair as propriedades RGB de cada imagem. Vale salientar que o sistema de detecção captura as imagens digitais uma taxa de 30 FPS, o que caracteriza um monitoramento e análise de dados por meio de filmes digitais.

Na etapa do tratamento das imagens digitais obtidas durante a análise, é necessário selecionar a região da imagem a ser processada, informando as coordenadas X e Y, como também é necessário dimensionar o tamanho dessa região. Nesse caso, foi delimitado uma região de 30 x 30 pixels. Então, com a área selecionada, o programa realiza os cálculos dos valores das componentes R, G e B e do valor da norma $\|v\|$ (**secão2.5**) do vetor referente a região selecionada.

Ao término de cada análise o programa gera um arquivo no formato .csv, com o qual é possível obter os dados de cada medida, como mostra a **Figura 3.9**.

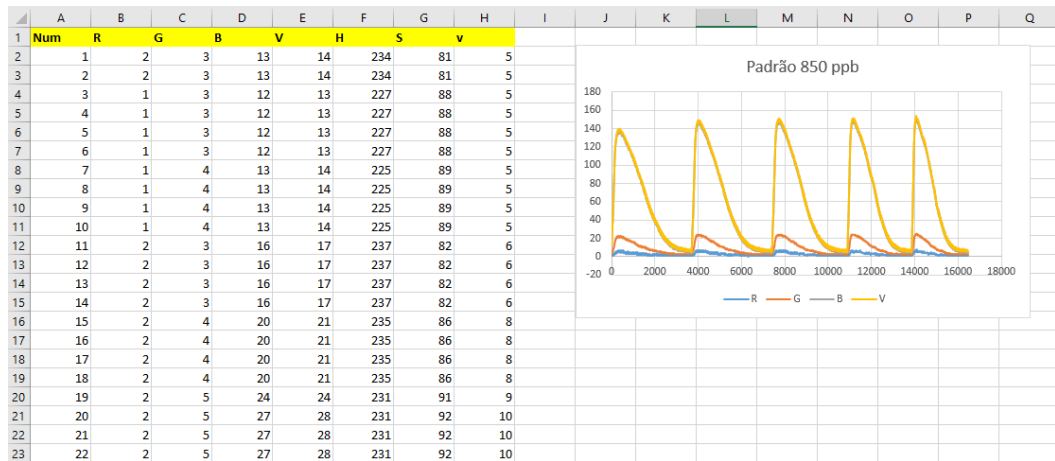


Figura 3.9 Obtenção dos dados analíticos obtidos através do programa utilizado.

3.5. Precisão das válvulas solenoides

Como todos os volumes adicionados da câmara de mistura são proporcionais ao tempo de acionamento das válvulas solenoides, foi necessário determinar a relação de tempo de acionamento com o volume adicionado envolvido no processo, ou seja, determinar a vazão em cada canal, para depois definir os tempos de acionamento das válvulas solenoides.

A vazão em cada canal foi determinada coletando, em intervalos de tempos predefinidos, alíquotas de água ou de amostra, e medindo, concomitantemente, a massa numa balança analítica (Scientech modelo AS210). A velocidades de rotação da bomba peristáltica foi ajustada para 160 rotações por minuto (RPM). Para a válvula solenoide empregada na adição das amostras, foi utilizado uma das amostras de cachaça com teor alcoólico de 40% em vez de água e da mesma forma, para as NPMs foi utilizado a própria solução. Isso foi necessário devido a densidade dos fluidos utilizados nesses canais serem diferentes da água. Depois, partindo-se do valor da densidade das soluções empregadas, foram estimados os volumes das alíquotas, e consequentemente, a vazão em cada canal do sistema, a partir do quociente dos volumes pelos tempos predefinidos.

3.6. Procedimento automático de análise

Na **Figura 3.10** é apresentado o diagrama esquemático do sistema proposto para realizar as etapas analíticas anteriores à detecção. Nenhuma modificação física do sistema FB foi realizada durante todos os procedimentos analíticos empregados na determinação de cobre (II) em amostras de cachaça.

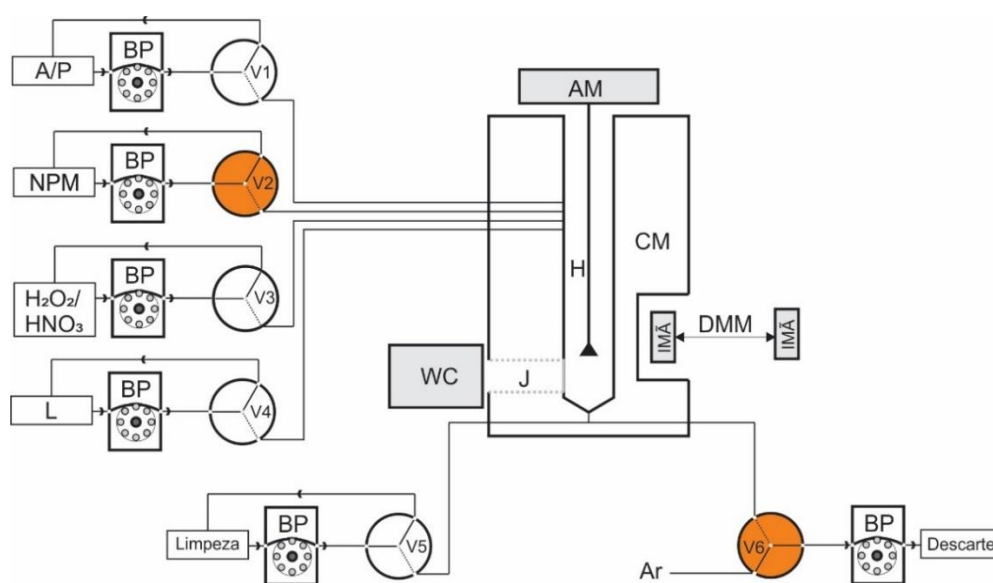


Figura 3.10 Diagrama esquemático do sistema automático FB proposto. BP: bomba peristáltica, V₁, V₃, V₄ e V₅: válvulas solenoides, V₂ e V₆: válvulas tipo pinça, DMM: dispositivo magnético-mecânico, AM: agitador mecânico, H: haste de agitação, CM: câmara de mistura, J: Janelas de quartzo, A/P: amostra/padrão, NPM: nanopartículas magnéticas, L: Luminol e WC: *webcam*.

3.6.1. Procedimento de enchimento dos canais

O enchimento dos canais é uma operação que deve ser realizada no início de qualquer procedimento do método automático. Primeiramente todas as soluções de trabalho de cada canal são bombeadas e redistribuídos aos seus respectivos reservatórios. Em seguida, as válvulas da amostra ou solução padrão (V₁), das nanopartículas magnéticas (V₂), do peróxido

de hidrogênio e ácido nítrico (V_3) e do luminol (V_4) são acionadas sequencialmente durante um tempo de 10 s, para cada válvula, e direcionadas para a câmara de mistura (CM), preenchendo todos os canais localizados entre as válvulas e a CM. Após essa etapa a válvula do descarte (V_6) é acionada durante 15 s e a CM é esvaziada por aspiração, empregando a bomba peristáltica. Esse procedimento de enchimento de canais é importante e deve ser realizado sempre que houver alteração do conteúdo do reservatório do reagente e amostra, como por exemplo, durante a etapa de troca de amostra e padrões. O procedimento de limpeza da CM é realizado pelo acionamento da válvula (V_5), adicionando etanol anidro. Em seguida, a válvula de descarte (V_6) é acionada removendo o conteúdo da CM. Este procedimento de limpeza e descarte deve ser feito duas vezes para permitir uma limpeza adequada da câmara de mistura.

3.6.2. Procedimento de análise das soluções de calibração e amostras

Na **Figura 3.11** são mostradas as etapas do procedimento de análise das soluções de calibração, empregadas na construção da curva analítica para determinação de Cu em cachaça.

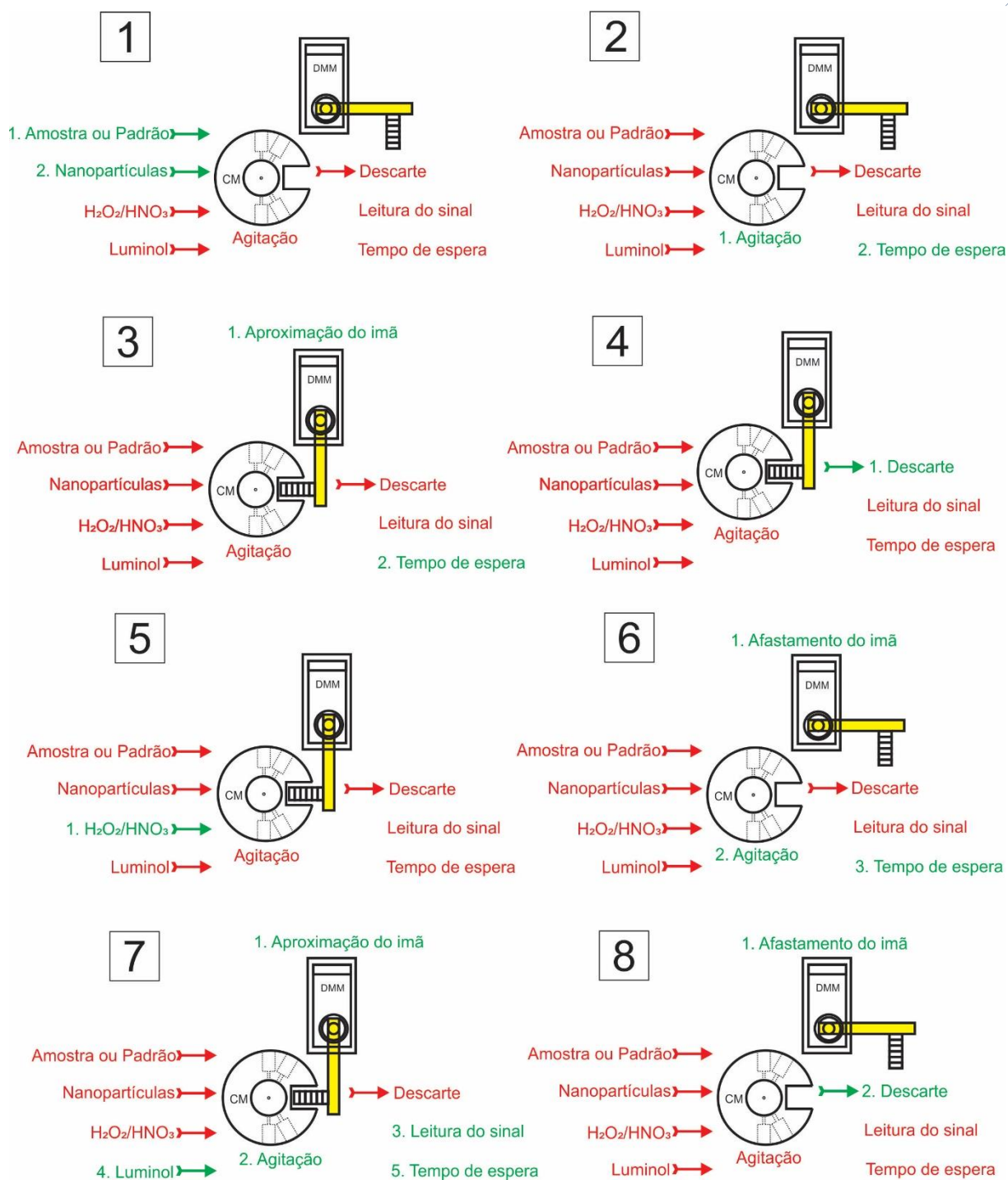


Figura 3.11 Etapas do procedimento de análise (1-8). Em verde são os eventos que estão ocorrendo na etapa especificada e em vermelho são os eventos inativados no momento de cada etapa.

Inicialmente, as válvulas V_1 e V_2 são acionadas de forma sequencial durante períodos de tempos pré-determinados. Esse procedimento possibilita a adição da solução padrão/amostra e das nanopartículas magnéticas, respectivamente, na CM, como mostra a **Etapa 1** da **Figura 3.11**. Na **Etapa 2**, o agitador mecânico é ativado, e um tempo é respeitado para que haja a dispersão e o contato do sorbente magnético com o analito. Em seguida, na **Etapa 3**, o agitador é desativado e ocorre a aproximação do imã na lateral da CM, com a ativação do DMM. Após isso, um tempo é aguardado para que ocorra a atração das partículas (com o analito adsorvido) pela ação campo magnético. Finalizada essa etapa, a válvula de descarte V_6 é acionada e o conteúdo presente na CM é eliminado, permanecendo apenas o sorbente-analito, **Etapa 4**. Em sequência, na **Etapa 5**, o eluente HNO_3 juntamente com peróxido de hidrogênio (oxidante na reação quimiluminescente) na válvula V_3 é adicionado a CM. Na **Etapa 6**, ocorre o afastamento do campo magnético da parede da CM, inicia a agitação e um tempo adequado de dessorção do analito é cumprido. Na **Etapa 7**, ocorre a aproximação do imã e a leitura do sinal pela *webcam* é iniciada. Assim que a adição do luminol na CM, acionando pela válvula V_4 , é iniciado, um tempo é respeitado para que a reação quimiluminescente ocorra, ao momento em que as imagens digitais capturadas, da mesma é registrada e processada pelo PC aliado ao programa desenvolvido. Na sequência, na **Etapa 8**, acontece processo de descarte do resíduo da CM e se inicia a etapa de limpeza da câmara de mistura. Esse procedimento é repetido em todas as soluções de calibração necessárias para a construção da curva analítica de referentes ao cobre.

Na **Tabela 3.1** estão elencadas as etapas do procedimento automático para análise da amostra/padrões com os respectivos tempos de acionamento das válvulas solenoides, bem como os respectivos tempos de acionamento das válvulas solenoides, do motor de agitação, do sistema magnético-mecânico, bem como os volumes envolvidos nas etapas como descritas na **Figura 3.11**.

Tabela 3.1 Procedimento automático para análise da amostra de cachaça para extração e determinação quimiluminescente on-line do íon cobre (II).

Etapa	Evento	Tempo (ms)	Volume (μL)
1	Adição da amostra (V ₁)	10.151	3.500
1	Adição de NPM (V ₂)	1.343	500
2	Homogeneização (extração)	120.000	-
3	Aproximação do imã	30.000	-
4	Descarte (V ₆)	15.000	-
5	Adição de H ₂ O ₂ e HNO ₃ (V ₃)	5.627	2.000
6	Retirada do campo magnético	-	-
6	Homogeneização (eluição)	30.000	-
7	Aproximação do imã/ Homogeneização	-	-
7	Adição de luminol (V ₄)	5.646	2.000
7	Aquisição do sinal quimiluminescente	60.000	-
8	Retirada do campo magnético	-	-
8	Descarte (V ₆)	15.000	-
	TOTAL	292.767	

Após ter concluído o procedimento de análise, duas etapas de limpeza da CM foram realizadas, através do acionamento da válvula V₅, sob agitação, permitindo ser adicionado um volume de 5 mL de água deionizada. Em seguida, a agitação é cessada e o descarte é realizado através da válvula V₆. Tal procedimento é realizado duas vezes garantindo dessa forma uma

limpeza eficiente da CM. Vale ressaltar que todas as etapas mencionadas anteriormente ocorrem na ausência do campo magnético.

3.7. Procedimentos para avaliação do desempenho analítico

Nesse trabalho de pesquisa foram avaliados parâmetros de validação que serão descritos brevemente a seguir. Tais parâmetros foram norteados pelas normas de validação para metodologias analíticas reportadas por (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002)

3.7.1. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) corresponde a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada por um dado método analítico sob condições experimentais estabelecida (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Comumente define-se o LOD em termos do desvio-padrão de medidas do branco.

O limite de detecção pode ser determinado como segue:

$$\text{LOD} = \frac{3.s}{S} \quad (4)$$

onde s é o desvio-padrão da resposta; S é o coeficiente angular da curva analítica (sensibilidade do método).

O limite de quantificação (LOQ) corresponde a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). O LOQ pode ser determinado fazendo-se uso **Equação 5**, como segue:

$$LOQ = \frac{10 \cdot s}{S} \quad (5)$$

onde: s é o desvio-padrão da resposta; S é o coeficiente angular do gráfico de calibração (sensibilidade do método).

3.7.2. Linearidade

É a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico (RIBANI *et al.*, 2004). A linearidade é obtida em termos da expressão matemática que relaciona a resposta analítica e a concentração do analito na amostra real. Esta equação é frequentemente obtida pelo método dos mínimos quadrados ordinários.

3.7.3. Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade de um método distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Sob o ponto de vista prático, pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada.

3.7.4. Precisão

É normalmente determinada para circunstâncias específicas para as quais as medidas são realizadas. As maneiras mais comuns de expressão da precisão são por meio da: repetitividade e reprodutibilidade (INMETRO, 2010). Para uma série de resultados, a precisão

e expressa em termos do desvio padrão conjunto, RSD conjunto (do inglês: *Relative Standard Deviation*) ou (coeficiente de variação, CV).

O coeficiente de variação é calculado como:

$$\text{RSD conjunto (\%)} = \frac{\sqrt{\frac{\sum s_i^2 \cdot q_i}{\sum q_i}}}{\text{CMD}} \times 100 \quad (6)$$

onde: s_i é o desvio padrão da concentração determinada; q_i é o número de replicatas da medida; CMD é a concentração média determinada.

A repetitividade expressa a precisão considerando as seguintes condições de medida: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições no mesmo espaço de tempo possível (LYRA, 2012). Neste trabalho a precisão foi avaliada em termos de repetitividade.

3.7.5. Exatidão

A exatidão é definida como a concordância entre um resultado analítico e o valor convencionalmente aceito como verdadeiro. Com o objetivo de avaliar a exatidão de um método analítico o teste de recuperação é o procedimento mais realizado e simples de ser empregado. No ensaio de recuperação, quantidades conhecidas do analito são adicionadas nas amostras para respectiva quantificação. (INMETRO, 2010). Deve-se ressaltar que essas adições são realizadas em concentrações adequadas e semelhante às obtidas para execução do ensaio.

Para as amostras de cachaça os níveis trabalhados foram 200, 500 e 900 $\mu\text{g L}^{-1}$ realizadas em todas as amostras.

A taxa de recuperação é calculada empregando a **Equação 7**.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (7)$$

onde: C_1 = concentração da substância de referência mais a concentração da amostra.
 C_2 = concentração da amostra. C_3 = concentração da substância de referência adicionada.

3.7.6. Seletividade

O termo seletividade, que muitas vezes é utilizado como sinônimo de especificidade, indica a capacidade do método em produzir resposta para vários analitos, apesar de distinguir o sinal de um analito frente aos outros. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Sendo assim, a seletividade indica quanto a resposta está livre de interferência de outras espécies contidas na matriz da amostra. Para análise quantitativa, a seletividade pode ser estimada pela comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o teste não é afetado por estes materiais. Quando a impureza ou padrão do produto não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados dos testes das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado, como o método de referência (LYRA, 2012).

3.7.7. Análise de variância

Em análise química, o modelo de calibração somente pode ser usado para estimar a concentração do analito se for capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento dos valores experimentais. Portanto, o modelo não pode apresentar evidência estatística de falta de ajuste. Além disso, deve refletir uma regressão estatisticamente significativa. Para esse

propósito, a validação do modelo pode ser realizada por meio da análise de variância, ANOVA (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010) e (PIMENTEL; NETO, 1996). A **Tabela 3.3** mostra as equações para ANOVA do modelo ajustado aos dados experimentais empregando-se o método dos mínimos quadrados (MMQ).

Tabela 3.2 Equações para ANOVA aplicada a um modelo obtido pelo método dos mínimos quadrados.

Fonte de variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade	Média Quadrática (MQ)
Regressão (R)	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$
Resíduos (r)	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$
Falta de ajuste (faj)	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$
Erro puro (ep)	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$
Total (T)	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	$MQ_T = \frac{SQ_T}{n - 1}$

O índice i indica o nível da variável X; o índice j refere-se às medidas repetidas da variável Y em um dado nível de X; p = número de parâmetros do polinômio do modelo de calibração; n = número total de medidas; m = número de níveis da variável independente X.

A validação de modelos lineares pela aplicação do método dos mínimos quadrados consiste de análise dos resíduos, teste de significância da regressão e teste de falta de ajuste. Na análise do gráfico dos resíduos, verifica-se o comportamento dos erros de previsão do modelo

(resíduos) em relação aos dados experimentais. No gráfico de resíduos é possível identificar o tipo de erro experimental associado aos dados experimentais. Caso os resíduos apresentem algum perfil ou estrutura tem-se um erro sistemático associado aos dados experimentais. Caso os resíduos distribuam-se aleatoriamente em torno de zero, tem-se apenas erros aleatórios associados aos dados experimentais.

No teste de significância da regressão, compara-se a razão entre a média quadrática devido à regressão (MQ_R) e a média quadrática residual (MQ_r) com o valor do ponto da distribuição F referente aos graus de liberdade de MQ_R e MQ_r a um certo nível de confiança estatística, que é em geral, 95% de confiança. Se a referida razão for maior que o valor de F , conclui-se que a regressão é estatisticamente significativa. Do contrário, não se pode admitir a existência de uma relação funcional (linear, quadrática, polinomial etc.) entre as variáveis que possa ser descrita pelo modelo.

O teste de falta de ajuste compara, para os vários níveis da variável X , a média quadrática da falta de ajuste (MQ_{faj}) com a média quadrática devida ao erro puro (MQ_{ep}). Assim, se a razão $(MQ_{faj})/(MQ_{ep})$ for menor que o valor do ponto de distribuição F , referentes aos graus de liberdade de MQ_{faj} e MQ_{ep} e para um nível de 95% de confiança, temos um modelo sem falta de ajuste. Neste caso, as duas médias quadráticas refletirão apenas os erros aleatórios associados aos desvios em relação à média. Caso contrário, o modelo apresenta falta de ajuste e necessita ser reestimado e revalidado.

3.7.8. Teste t emparelhado

A implementação do teste t pareado, baseado no conceito de intervalo de confiança, requer o cálculo da média das diferenças entre os valores de concentração, obtidos por dois métodos distintos, para cada par de resultados. Admitindo-se que Δ é a diferença média

verdadeira entre os resultados dos dois métodos, o intervalo de confiança para Δ é encontrado pela aplicação da **Equação 8**.

$$\Delta = \bar{d} \pm t_v \frac{s_d}{\sqrt{n}} \quad (8)$$

onde: n é o número de amostras, S_d é o desvio padrão da média das diferenças e t_v é o ponto de distribuição t correspondente ao número de graus de liberdade (v) no nível de confiança desejado (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010)

O intervalo de confiança pode ser interpretado da seguinte maneira:

Se o valor “zero” estiver contido dentro do intervalo construído, não existe diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados dos dois métodos. Neste caso, a hipótese nula não pode ser rejeitada e a média das diferenças (d) deve ser um ponto da distribuição t com $\Delta = 0$. Caso contrário, existe uma diferença sistemática significativa entre os resultados dos métodos ao nível adotado de confiança estatística.

4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 por coprecipitação

A obtenção das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 recobertas com a alumina Al_2O_3 foi dividida em duas etapas: a síntese e a caracterização do núcleo magnético. O recobrimento tem a função de proteger o núcleo magnético de possíveis oxidações e concede a elas propriedades superficiais para aplicações específicas, como a funcionalização, para que desempenhem uma função requerida.

Diante disso, nas próximas seções serão abordadas as características do material obtido após a conclusão da síntese do núcleo magnético, assim com a etapa de recobrimento, conforme descrito na **Seção 3.1**.

4.1.1. Aspectos visuais das nanopartículas magnéticas

Na **Figura 4.1** é mostrado o material obtido mediante a síntese da NPMs pelo método de coprecipitação, assim como o núcleo magnético recoberto com alumina.

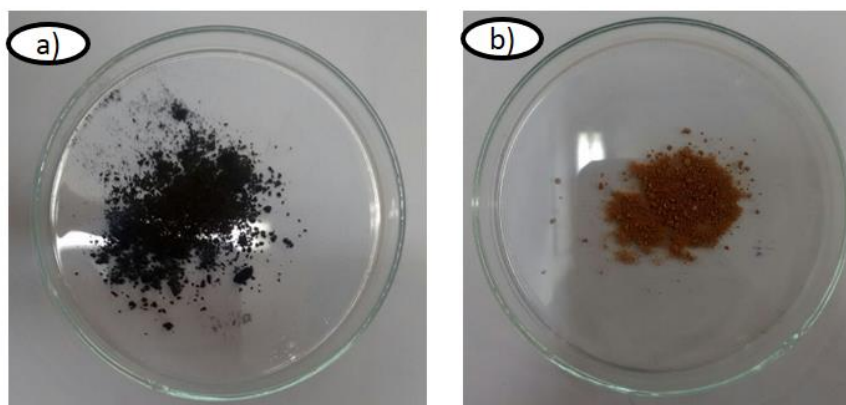


Figura 4.1 a) Nanopartículas magnéticas obtidas pelo método de coprecipitação. b) núcleo magnético recoberto com alumina.

Com o intuito de ilustrar as características do nanomaterial sintetizado neste trabalho, na **Figura 4.2** pode ser observado o efeito do campo magnético promovido pelo imã de neodímio sobre as nanopartículas, comprovando a existência de propriedades magnéticas do material.

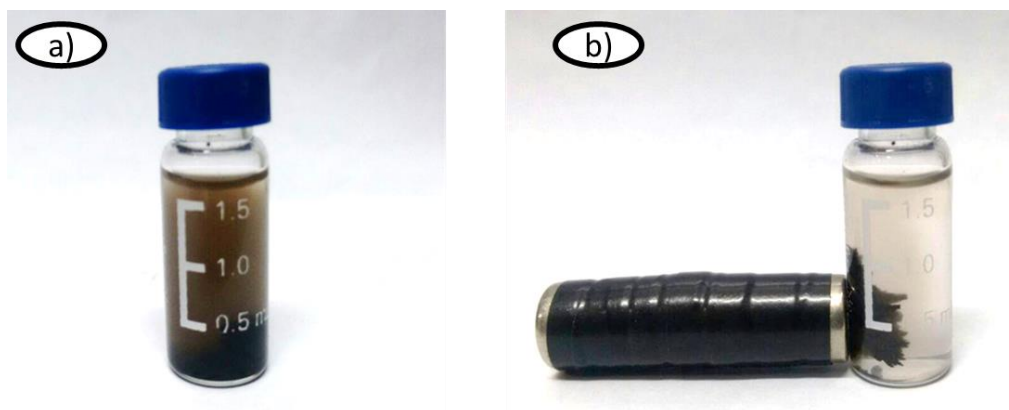


Figura 4.2 Nanopartículas magnéticas de magnetita dispersas em etanol **(a)** e sob ação de um campo magnético gerado por imã de neodímio **(b)**.

4.1.2. Caracterização morfológica das nanopartículas magnéticas

A análise da morfologia e distribuição de tamanho das nanopartículas magnéticas foi possível por meio das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A partir das micrografias, foi possível observar que as partículas se encontravam ligeiramente agregadas, devido as próprias forças de interação entre as partículas. Isto significa que o núcleo da nanopartícula se comporta como um único dipolo magnético, apresentando, desta forma, um elevado momento magnético. Desta maneira, pode afirmar-se que as nanopartículas de magnetita sintetizadas pelo método de coprecipitação têm potencial para serem superparamagnéticas (ALVES, 2012) e (DENG *et al.*, 2003). Na **Figura 4.3**, é mostrada a micrografia eletrônica do núcleo sem recobrimento.

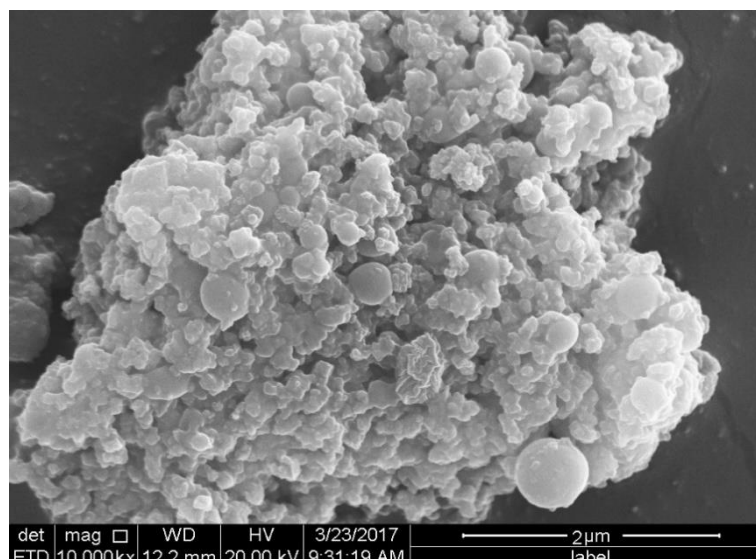


Figura 4.3 Micrografia obtida pelo MEV mostrando a morfologia das nanopartículas magnéticas.

Na **Figura 4.4** pode ser visualizado a microscopia eletrônica das nanopartículas, após a etapa de recobrimento com a alumina.

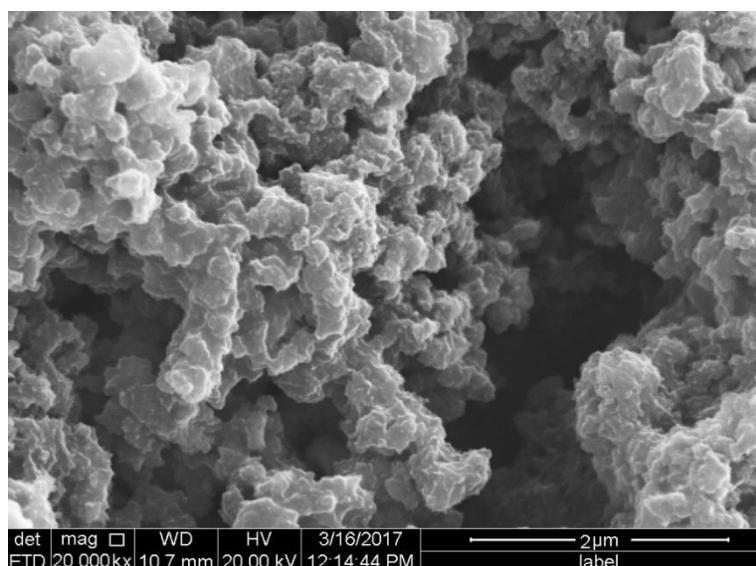


Figura 4.4 Micrografia obtida por MEV mostrando a morfologia das nanopartículas de Fe₃O₄@Al₂O₃.

Conforme reporta Barreto (2016), através da análise da morfologia superficial das nanopartículas revestidas, é possível observar que o recobrimento do núcleo magnético não prejudica as características morfológicas do nanomaterial. Resultados análogos foram observados em alguns trabalhos científicos com a microscopia eletrônica de varredura para o

mesmo material (TEKIYE; AGHAJANI; SHARIF, 2017) e (BARRETO, 2016) indicando a consistência dos resultados aqui apontados

4.1.3. Caracterização cristalográfica das nanopartículas magnéticas

A partir da análise do difratograma da **Figura 4.5**, foi possível constatar a presença de picos característicos da magnetita no intervalo de 20° a 67° , consistentes com os valores de identificação (2θ) fornecidos pela ficha cristalográfica de referência JCPDS **19-0629**. Dessa forma, pode-se inferir que a fase predominante corresponde à estrutura cristalina cúbica do tipo espinélio inversa característica de magnetitas, que apresenta os planos cristalográficos (220), (311), (400), (422), (511), (440), bem definidos (SOUZA, 2011) e (YU; KWAK, 2010).

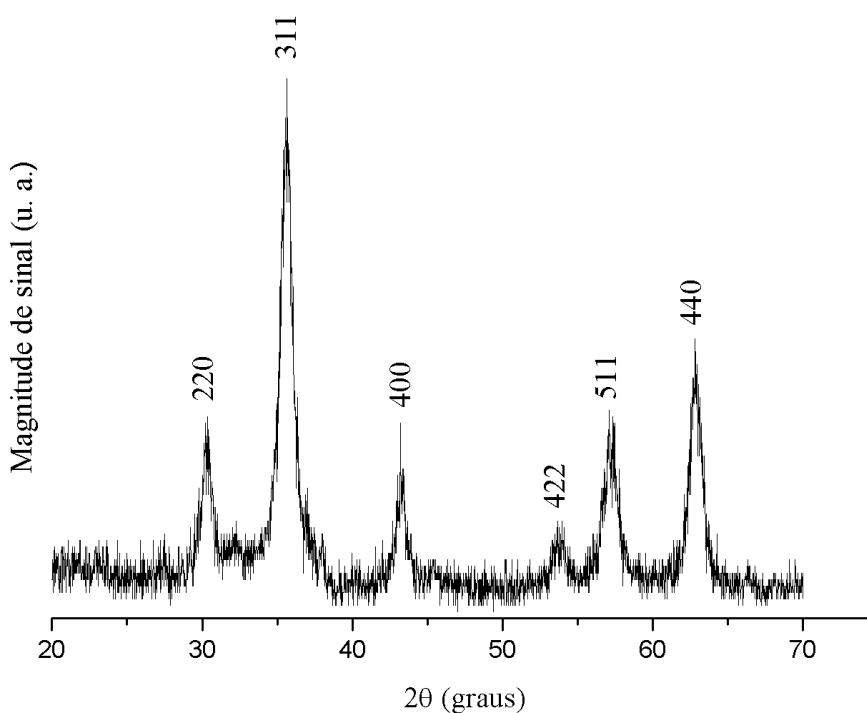


Figura 4.5 Difratograma típico da NPM de magnetita sintetizada.

A **Tabela 4.1** apresenta os ângulos de Bragg para cada plano cristalino identificado para as nanopartículas de magnetita.

Tabela 4.1 Ângulos de difração de Bragg correspondente aos picos de difração do difratograma das nanopartículas de magnetita após serem sintetizadas.

Plano de reflexão	2 θ (graus) Ficha catalográfica JCPDS 19-0629	2 θ (graus) Experimental Fe₃O₄
220	30,10	30,22
311	35,42	35,54
400	43,05	43,12
422	53,39	53,43
511	56,94	57,12
440	62,52	62,58

Através dessa tabela é possível observar, um desvio sistemático nos valores de 2θ em relação aos valores de referência tabelados, provavelmente devido a um pequeno desalinhamento no sistema de medida, mas que não afeta de maneira significativa a conclusão dos resultados.

Os resultados obtidos para síntese das nanopartículas magnéticas de magnetita pelo método de coprecipitação foram satisfatórios, uma vez que os picos característicos do material obtido se encontram próximos aos valores de identificação da ficha cristalográfica da magnetita JCPDS 19-0629. Vale salientar, que picos característicos de outros materiais como, a hematita (Fe₂O₃) (em $2\theta = 33,15^\circ$, JCPDS 86-0550) e maghemita (γ -Fe₂O₃), (em $2\theta = 32,17^\circ$, JCPDS 04-0755), (YU; KWAK, 2010) não foram detectados. Isso é um indicativo de que não houve a formação de reações paralelas durante a síntese, bastante comum nesse meio reacional (BRANCO, 2013).

Uma análise semelhante foi realizada para as nanopartículas recoberta com alumina. No difratograma da **Figura 4.6**, pode-se observar a presença da fase de magnetita e picos extras em nas posições indicadas que são atribuídos à presença da alumina, de acordo com a ficha cristalográfica de referência 29-0063 da base de dados JCPDS. Trabalhos publicados na literatura reportam difratogramas idênticos ao obtido, a citar (TRIPATHY; ADEYEYE; SHANNIGRAHI, 2007), (KARIMI; KAFI, 2015) e (TEKIYE; AGHAJANI; SHARIF, 2017).

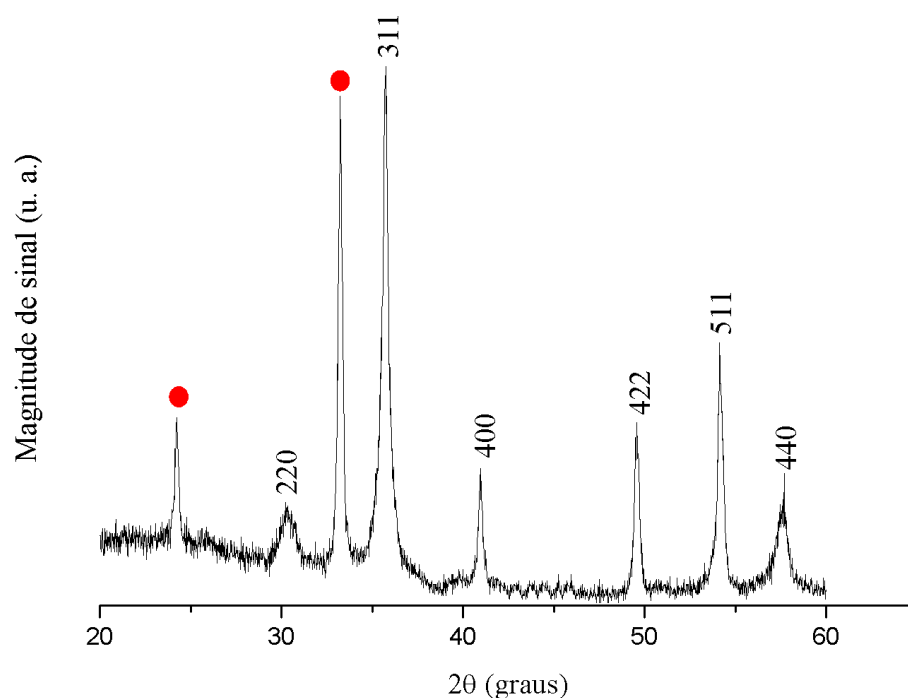


Figura 4.6 Difratoograma típico de Fe₃O₄@Al₂O₃.

Assim, pode-se afirmar que a segunda etapa de síntese foi realizada de forma satisfatória. Além disso, a observação de picos alargados e de baixa intensidade, nos dois difratogramas, estão associados ao tamanho manométrico das partículas, como sugere a literatura (SOUZA, 2011), (FÉLIX, 2013) e (ALVES, 2012b)

4.2. Otimização das condições experimentais

Para otimização da metodologia proposta foi utilizado o planejamento fatorial, seguido da metodologia da superfície de resposta. Os fatores a serem analisados são codificados como: massa da nano partícula magnética (A), concentração de HNO₃ (B), concentração de H₂O₂ (C) e concentração de luminol (D). Para cada uma foi atribuído um nível (-) e (+) conforme a **Tabela 4.2**. A avaliação dos efeitos destes fatores foi realizada por meio de um planejamento fatorial 2⁴. A ordem dos ensaios foi aleatorizada.

Tabela 4.2 Fatores e níveis usados no planejamento fatorial 2^4 fatorial.

Código	Fatores	Níveis	
		–	+
A	Massa da nano partícula magnética (mg)	100,0	500,0
B	Concentração de HNO_3 (mmol L^{-1})	10,0	100,0
C	Concentração de H_2O_2 (mmol L^{-1})	2,0	20,0
D	Concentração de luminol (mmol L^{-1})	1,0	2,5

A influência de cada fator, bem como suas interações, foram calculados por meio de equações matriciais conforme descrito na literatura (BRUNS, SCARMÍNIO, *et al.*, 2006). Os intervalos de confiança para cada efeito são apresentados na **Tabela 4.3**. São considerados significativos os efeitos cujos intervalos de confiança não contem o zero (BRUNS, SCARMÍNIO, *et al.*, 2006).

Conforme a **Tabela 4.3**, praticamente todos os efeitos exercem influência positiva e significativa sobre a resposta analítica. Como esperado, os efeitos primários dos quatro fatores são significantes e positivos. De fato, o aumento na concentração de H_2O_2 (C) e de luminol (D) aumentam a intensidade da quimiluminescência e, conseqüentemente, a quantidade de fótons que atinge o detector. A massa da nanopartícula magnética (A) aumenta a quantidade adsorvida de íons Cu^{2+} , aumentando o efeito catalítico sobre a reação. Por fim, o aumento da concentração de HNO_3 evita uma eventual hidrólise dos íons Cu^{2+} deixando-os livres para a reação.

Tabela 4.3 Intervalo de confiança dos efeitos do planejamento fatorial 2⁴.

Efeito	Intervalo de confiança	Significado
Média	71,49 ± 1,5	Significativo
Efeitos primários		
A	19,24 ± 3,0	Significativo
B	76,16 ± 3,0	Significativo
C	32,51 ± 3,0	Significativo
D	44,46 ± 3,0	Significativo
Efeitos secundários		
AB	4,26 ± 3,0	Significativo
AC	4,41 ± 3,0	Significativo
AD	4,41 ± 3,0	Significativo
BC	29,84 ± 3,0	Significativo
BD	31,99 ± 3,0	Significativo
CD	-1,01 ± 3,0	Não significativo
Efeitos terciários		
ABC	4,59 ± 3,0	Significativo
ABD	1,09 ± 3,0	Não significativo
ACD	3,59 ± 3,0	Significativo
BCD	-1,34 ± 3,0	Não significativo
Efeito quaternário		
ABCD	-0,59 ± 3,0	Não significativo

A: Massa da nanopartícula magnética (mg); **B:** Concentração de HNO₃ (mmol L⁻¹); **C:** Concentração de H₂O₂ (mmol L⁻¹); **D:** Concentração de luminol (mmol L⁻¹)

Entre os efeitos de interação dos fatores, vale a pena destacar os efeitos secundários BC e BD cuja magnitude da influência é comparável aos efeitos primários. Uma vez que o pH reacional é extremamente crítico para a reação entre H_2O_2 e luminol seria razoável esperar uma influência negativa. Entretanto a quantidade de HNO_3 utilizada é tão pequena que o sistema H_2O_2 -luminol em meio tamponado resiste a essa adição de tal modo que não há perda na resposta analítica.

A partir dos dados do planejamento fatorial 2^4 , foi construída a superfície de resposta para determinação do máximo absoluto da resposta analítica. A representação da superfície de resposta é possível até 2 fatores. De acordo com a mesma, a configuração definitiva do método foi: massa da nano partícula magnética = 408,0 mg, concentração de HNO_3 = 100,0 mmol L^{-1} , concentração de H_2O_2 = 20,0 mmol L^{-1} e concentração de luminol = 2,5 mmol L^{-1} .

4.3. Parâmetros do sistema automático em fluxo-batelada

4.3.1. Precisão das válvulas solenoides

Como apontado na **Seção 3.5**, após a montagem do sistema automático é necessário a realização do estudo da vazão das válvulas solenoides. Assim, foram construídas curvas de calibração correlacionando o volume do fluido inseridos na câmara de mistura em função do tempo de acionamento de cada válvula. Com relação a válvula solenoide utilizada na adição das amostras, foi empregado a densidade média das amostras como parâmetro para ajustar a vazão, isso foi pertinente devido a viscosidade inerente das matrizes trabalhadas.

As vazões médias encontradas para os canais individuais das soluções empregadas durante a determinação de íons cobre (II) em cachaça são apresentadas na **Tabela 4.4**.

Tabela 4.4 Vazões médias dos canais individuais das soluções.

Válvula	Solução	Vazão (mL s ⁻¹)
V ₁	Amostra/padrão	0,2942 ± 0,0065
V ₂	Nanopartícula magnética	0,2907 ± 0,0089
V ₃	HNO₃/H₂O₂	0,3495 ± 0,0058
V ₄	Luminol	0,3482 ± 0,0052

Rotação da bomba peristáltica: 160 RPM

Durante o decorrer dos experimentos foi observado que o campo magnético, gerado a partir do acionamento da válvula solenoide, atrai as NPMs ocasionando a obstrução do fluxo na válvula solenoide. Dessa forma, válvulas tipo pinça foram utilizadas nos canais das NPMs e no descarte. A calibração desse tipo de válvula seguiu o mesmo procedimento das válvulas solenoides.

4.3.2. Obtenção da curva analítica baseada nos valores da norma

O modelo matemático proposto por Lyra (2008), baseado no sistema de cores RGB e no conceito de norma de vetores, foi adotado para definir resposta analítica, usada na construção das curvas analíticas, uma vez que este modelo considera o caso geral, em que a variação pode envolver qualquer dos componentes individuais ou também envolver dois ou três componentes de forma simultânea (LIMA, 2014).

Para efetuar o cálculo da norma do vetor v , é necessário subtrair dos valores de $\bar{R}_S$, $\bar{G}_S$ e $\bar{B}_S$ (valores médios de R, G e B das soluções padrão e amostras) dos valores $\bar{R}_B$, $\bar{G}_B$ e $\bar{B}$ do branco.

A norma $\|v\|$ do vetor v é então determinada pela **Equação 9**.

$$\|v\| = \sqrt{\bar{R}_{S-B}^2 + \bar{G}_{S-B}^2 + \bar{B}_{S-B}^2} \quad (9)$$

Onde os valores $\bar{R}_{S-B}^2 + \bar{G}_{S-B}^2 + \bar{B}_{S-B}^2$ são valores líquidos obtidos após subtrair a contribuição do branco.

Através da área selecionada (30 x 30 pixels) no programa desenvolvido, foi possível extrair e expressar um valor matemático usado para elaborar a curva analítica a partir da aquisição dos valores médios das componentes R, G e B, empregados no cálculo da norma do vetor. Na **Figura 4.7** é mostrada um sinal analítico gerado, baseado em filmagens digitais e decomposição de vídeo digital usando o valor médio da norma (V) e valores médios de R, G e B.

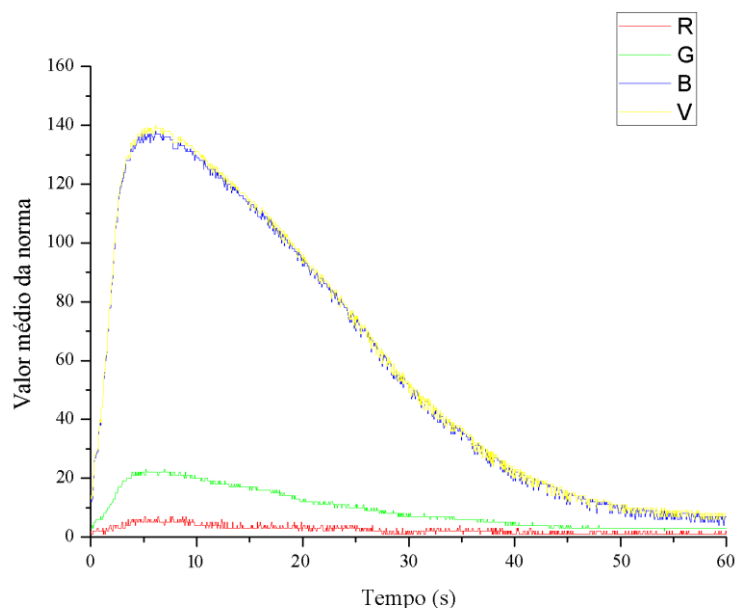


Figura 4.7 Progresso da reação quimiluminescente para solução de íons cobre (II) com $850 \mu\text{g L}^{-1}$ usando o modelo proposto por Lyra 2008.

A curva analítica foi construída assumindo-se uma relação linear entre a resposta analítica e a concentração do analito e assim calcular a concentração de cobre nas amostras de cachaça. Vale salientar que, para construção da curva analítica, foram considerados apenas os

resultados com máximo intensidade de emissão quimiluminescente (GARCÍA-CAMPAÑA *et al.*, 2001). Na **Figura 4.8** mostra o gráfico dos valores médios de cada componente R, G e B, a qual corresponde as imagens digitais extraídas mediante a filmagem para as soluções de íons cobre (II).

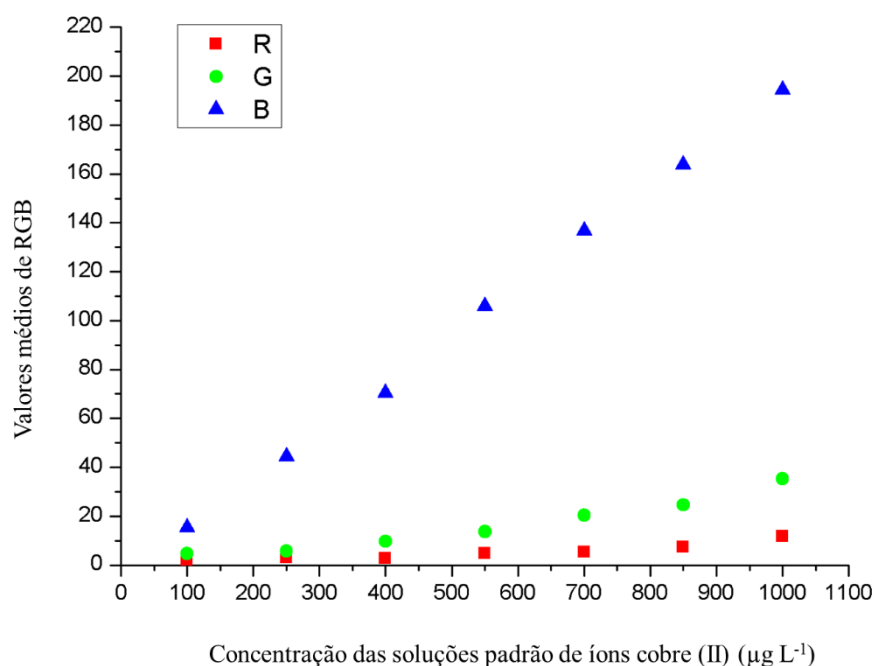


Figura 4.8 Gráfico dos valores médios individuais das componentes R, G e B das imagens digitais obtidas após as filmagens para as soluções de calibração de Cu (II).

Através do gráfico, é possível observar que a componente B apresenta um aumento linear de intensidade proporcional ao aumento das concentrações padrão de cobre, enquanto que a componente G apresenta uma contribuição pouco significativa para toda a faixa de trabalho e que a resposta da componente R é praticamente desprezível quando comparada à do componente B. Embora a componente B predomine sobre as demais componentes R e G, para realizar o cálculo da resposta analítica e construir a curva analítica foram empregadas as contribuições das três componentes (R, G e B).

4.3.3. Validação da curva analítica

Tendo investigado a faixa linear, construiu-se a curva analítica para a faixa de concentrações de 100 a 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, em triplicatas autênticas de íons cobre (II), a partir da série de imagens obtidas pelas filmagens empregando as NPMs na etapa de extração seguido pelo método quimiluminescente automático proposto. A curva analítica construída a partir dos valores da norma dos vetores R, G e B do método proposto é mostrado na **Figura 4.9**.

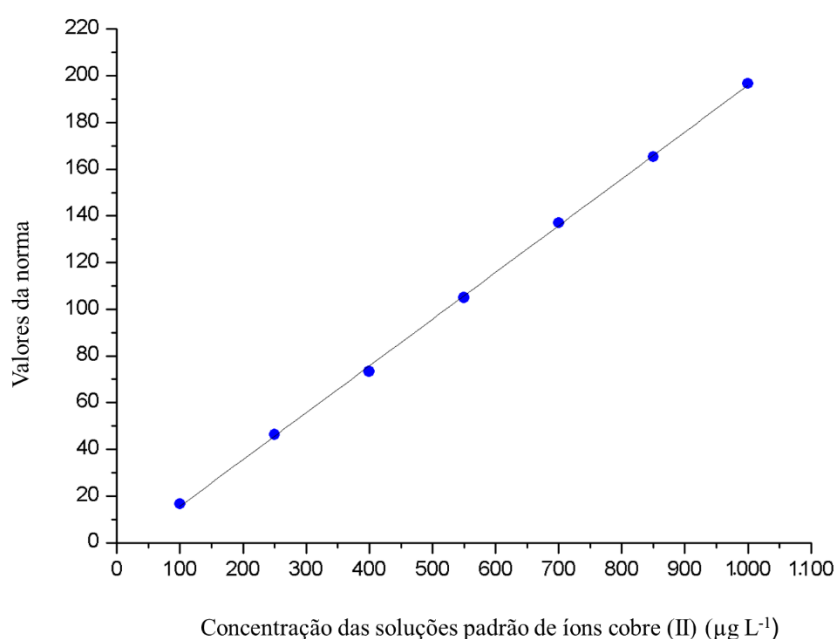


Figura 4.9 Curva analítica para a determinação de íons cobre (II) em amostras de cachaça.

A curva analítica obtida, foi construída a partir dos níveis de concentração 100, 250, 400, 550, 700, 850 e 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre (II). A **Figura 4.9** mostra que a curva analítica apresenta um comportamento linear entre o valor de norma obtida pela reação quimiluminescente e a concentração de íons cobre das soluções padrão. Essa inferência baseada, inicialmente, em uma inspeção visual, pode ser, confirmada pela análise do gráfico dos resíduos deixado pelo modelo, apresentado na **Figura 4.10**, e corroborada pelos resultados da ANOVA apresentados em seguida.

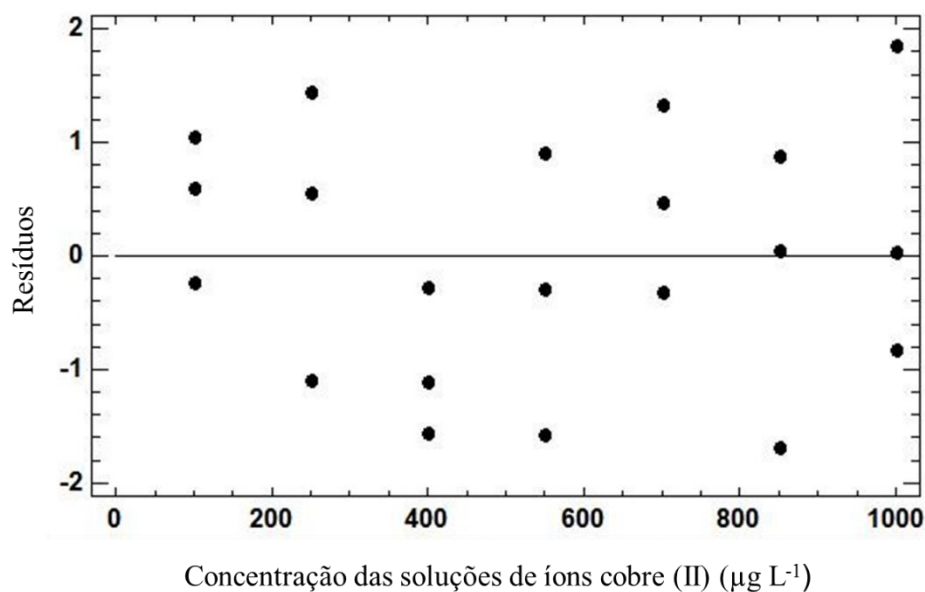


Figura 4.10 Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo do método proposto.

Ao se observar o gráfico dos resíduos, pode-se notar que estes são distribuídos aleatoriamente ao longo da faixa estudada, significando que não há nenhuma estrutura sistemática que evidencie uma eventual falta de ajuste. No entanto, a análise do gráfico do resíduo constitui um critério qualitativo, onde este, não pode ser um único procedimento para concluir que os modelos não apresentam falta de ajuste. Para isso, recorreu-se à ANOVA (Análise de Variância) para verificar se existe falta de ajuste e avaliar a significância estatística da regressão linear.

Definidos os graus de liberdade, as médias quadráticas foram calculadas a partir das somas quadráticas de acordo com equações da **Tabela 3.2 (Seção 3.7.7)** e os resultados da aplicação da ANOVA, puderam ser empregados para validação do método de calibração, utilizando o método quimiluminescente automático, como ilustra os resultados apresentados na **Tabela 4.5**.

Tabela 4.5 Análise de variância (ANOVA) para o modelo linear obtido pelo método proposto.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Test F	
Regressão (R)	75.900,3	1	75.900,3	Significância de R	
Resíduos (r)	121,51	19	6,39	MQ_R/MQ_r	11.868,02
Falta de ajuste (faj)	30,17	5	6,03	Falta de ajuste	
Erro puro (ep)	91,33	14	6,52	MQ_{faj}/MQ_{ep}	0,93

Antes de avaliar a significância estatística da regressão, é necessário verificar se o modelo postulado não apresenta falta de ajuste. Ao se comparar o valor da relação MQ_{faj}/MQ_{ep} com o valor de $F_{5,14}$ (ponto de distribuição F para 5 e 14 graus de liberdade ao nível de confiança de 95%) que é igual a 2,96 é possível observar que valor de MQ_{faj}/MQ_{ep} , são menores que o ponto da distribuição F a um nível de 95% de confiança, o que indica não haver evidência de falta de ajuste para o modelo linear ajustado aos dados experimentais. A **Tabela 4.5** revela também que as regressões lineares são significativas. De fato, ao comparar os valores de MQ_R/MQ_r , cujo valor obtido é 11.868,02, com o valor de distribuição $F_{1,19}$ que é igual a 4,38, os valores de MQ_R/MQ_r , mostraram-se maiores que o ponto da distribuição F considerando os mesmos graus de liberdade e o nível de 95% de confiança. Portanto, a curva analítica pode ser usada para fins de quantificação.

Os parâmetros do modelo de calibração para o método proposto, obtidos por regressão linear pelo modelo dos mínimos quadrados, são apresentados na **Tabela 4.6**. Haja visto, que os modelos não apresentam falta de ajuste e descrevem adequadamente a relação linear entre o sinal analítico e a concentração de íons cobre (II) na faixa da calibração, foram estimados os erros padrão dos coeficientes de regressão, b_0 e b_1 . Para isso, foi utilizado o valor da média quadrática residual (MQ_r) como estimativa da variância populacional dos erros aleatórios ao longo da reta de regressão.

Tabela 4.6 Coeficientes de regressão e intervalos de confiança para os valores populacionais (β_0 e β_1) do modelo linear obtido para o método proposto.

$y = b_0 + b_1 x$	
$b_0 \pm t_{19} \times \text{erro padrão } (b_0)$	$b_1 \pm t_{19} \times \text{erro padrão } (b_1)$
$4,4563 \pm 4,1778$	$0,2004 \pm 0,0067$

A partir dos estimadores e erros padrão de b_0 e b_1 , obteve-se o intervalo de 95% de confiança para os parâmetros populacionais (β_0 e β_1) do modelo. Os limites obtidos mostram que os intervalos de confiança não contêm o valor zero. Assim, ambos os coeficientes estimados para o modelo linear são estatisticamente significativos e devem ser mantidos na respectiva equação.

Uma vez que as curvas analíticas foram validadas, foram estimados para o método proposto os valores do limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e sensibilidade. Os valores estimados para esses parâmetros de desempenho são mostrados na **Tabela 4.7**.

Tabela 4.7 Parâmetros obtidos pelo método proposto para determinação de cobre em cachaça.

LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6,73
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	22,44
Sensibilidade ($\text{V L } \mu\text{g}^{-1}$)	$0,2004 \pm 0,0067$
Frequência analítica (h^{-1})	12

Como pode ser observado na tabela anterior, os parâmetros obtidos foram satisfatórios, quando comparados a outros trabalhos descritos na literatura (MIRANDA; DIONÍSIO; PEREIRA-FILHO, 2010), (SOUZA; PEZZA; PEZZA, 2016) e (SOUZA *et al.*, 2016), tornando o método apropriado para a determinação de cobre em cachaça.

4.3.4. Análise das amostras

Com base no exposto nas seções anteriores, o método se encontra adequado para a determinação do teor de cobre nas amostras de cachaça. Os resultados obtidos estão expressos em mg L^{-1} e encontram-se na **Tabela 4.8**, sendo comparado ao método de referência por absorção atômica em forno de grafite.

Tabela 4.8 Resultados obtidos para a determinação de cobre (II) em amostras de cachaça em mg L^{-1} utilizando o sistema quimiluminescente automático com detecção por imagens digitais a partir das filmagens e o método de referência por absorção atômica em forno de grafite ($n=3$).

Amostras	Método proposto	Método referência ^a
1	$6,84 \pm 0,82$	$6,76 \pm 0,63$
2	$3,40 \pm 0,60$	$3,43 \pm 1,51$
3	$7,63 \pm 1,82$	$7,76 \pm 3,25$
4	$10,2 \pm 1,60$	$10,05 \pm 2,30$
5	$2,54 \pm 2,11$	$2,62 \pm 1,09$
6	$4,72 \pm 1,55$	$4,57 \pm 2,28$
7	$13,54 \pm 2,61$	$13,67 \pm 2,21$
8	$7,07 \pm 1,98$	$7,19 \pm 2,52$
9	$2,73 \pm 3,07$	$2,67 \pm 2,58$
10	$1,00 \pm 0,42$	$1,04 \pm 1,43$
RSD conjunto (%)	3,4	3,8

a: GF-ASS

A partir dos resultados da **Tabela 4.8**, é possível observar uma concordância entre os valores do método proposto e o de referência por absorção atômica em forno de grafite. Para corroborar essa inferência, o teste t emparelhado foi aplicado empregando a metodologia descrita na **Seção 3.7.7**. De fato, ao aplicar essa ferramenta baseada no teste de hipóteses, foi

possível constatar que não existe diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados ao nível de 95% de confiança. Essa inferência pode ser ratificada pelo teste t emparelhado baseado no intervalo de confiança construído para a diferença média verdadeira (Δ). Para o nível de 95% de confiança, os limites desse intervalo são:

$$\Delta = [0,0834; -0,0781]$$

Como se pode observar, o intervalo contém o valor zero, evidenciando que não existe diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados ao nível de confiança de 95%. Portanto, a hipótese nula de $\Delta = 0$ é aceita (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

4.3.5. Teste de recuperação

Para avaliar a exatidão do método aplicado à determinação de cobre em cachaça, todas as dez amostras foram submetidas ao teste de recuperação. A metodologia para realizar o teste de recuperação foi seguida de acordo com Ribani (2004) (RIBANI *et al.*, 2004) e Burns, Danzer e Townshend (2002) (BURNS; DANZER; TOWNSHEND, 2002). Os testes foram realizados em três níveis de concentração padrão de $200 \mu\text{g L}^{-1}$, $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e $900 \mu\text{g L}^{-1}$ e realizado os devidos testes de emissão quimiluminescente. A **Tabela 4.9** apresenta os resultados obtidos através do teste de recuperação.

Tabela 4.9 Teste de recuperação para íons cobre (II) nas amostras de cachaça (n = 3)

Amostras	Recuperação (%)		
	200 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	500 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	900 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	106,5 $\pm$ 2,3	105,6 $\pm$ 2,9	99,8 $\pm$ 2,7
2	104,8 $\pm$ 3,1	104,0 $\pm$ 2,2	94,8 $\pm$ 1,5
3	99,4 $\pm$ 1,0	98,1 $\pm$ 2,2	103,1 $\pm$ 3,1
4	96,1 $\pm$ 1,5	105,1 $\pm$ 1,0	95,6 $\pm$ 2,1
5	101,0 $\pm$ 2,7	104,4 $\pm$ 3,2	102,3 $\pm$ 1,5
6	96,9 $\pm$ 1,2	105,6 $\pm$ 2,9	100,6 $\pm$ 1,8
7	100,6 $\pm$ 1,5	96,9 $\pm$ 3,1	96,5 $\pm$ 2,1
8	101,9 $\pm$ 1,8	99,6 $\pm$ 1,5	97,3 $\pm$ 2,3
9	102,7 $\pm$ 1,6	99,0 $\pm$ 0,8	101,5 $\pm$ 2,0
10	106,0 $\pm$ 1,5	99,8 $\pm$ 1,0	99,0 $\pm$ 1,7

Os resultados apresentados na **Tabela 4.9**, podemos observar que os valores das recuperações para as amostras, após a adição dos padrões de cobre (II), variaram entre 95,6 e 106,5% (n = 3). Logo, para o método proposto, as percentagens de recuperação indicam que não há evidência de erro sistemático nos resultados. Sendo assim, o método proposto é adequado para a quantificação de cobre em cachaça e que os possíveis interferentes presentes na amostra não intervêm na determinação proposta.

5

CONCLUSÕES

5.1. Conclusões

Neste trabalho de pesquisa foi desenvolvido um método analítico automático empregando a extração em fase sólida magnética (MSPE) e imagens digitais para a determinação quimiluminescente de íons cobre (II) em amostras de cachaça, utilizando um sistema em fluxo-batelada com extração *on-line*. A radiação quimiluminescente resultante registradas através de uma *webcam* e as imagens digitais convertidas para valores de RGB usados na obtenção da resposta analítica foram satisfatórias para o método proposto.

No cumprimento das metas desse trabalho de pesquisa, a primeira etapa estipulada e prontamente realizada foi a síntese das nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro (Fe_3O_4), recobertas com alumina e funcionalizadas com dodecil sulfato de sódio (SDS) e 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), que foram aplicadas como sorbente magnético. A técnica de microscopia eletrônica de varredura mostrou que as partículas sintetizadas se encontravam ligeiramente agregadas devido ao elevado momento magnético. Isso não foi um impedimento para aplicação dessas partículas como adsorvente magnético no método proposto. A análise de difratometria de raios X, confirmou o tamanho nanométrico das partículas, assim como o difratograma do núcleo magnético e de seu recobrimento se encontram próximos ao difratograma padrão da magnetita de acordo com a base de dados JCPDS e com o reportado na literatura.

Para a segunda etapa desse trabalho, que consistiu no desenvolvimento do sistema automático para executar a extração em fase sólida magnética, a câmara de mistura confeccionada em teflon com janela lateral de quartzo e minimotor DC acoplado na parte superior para auxiliar na homogeneização, proporcionou, de forma eficiente e reprodutível a aquisição das imagens digitais das medidas quimiluminescentes *on-line* sem a necessidade de qualquer aparato auxiliar para imobilizar o sorbente. O módulo de análise para o sistema automático trabalhado, inserido em uma caixa negra, e a própria *webcam* utilizada, com sensor

CMOS com captura de vídeo em alta qualidade, contribuíram significativamente para o desenvolvimento satisfatório das medidas analíticas requeridas. Para geração do campo magnético na câmara de mistura, o dispositivo mecânico-magnético foi desenvolvido e empregado com êxito.

A determinação de íons cobre (II) nas amostras de cachaça foi satisfatória graças ao método eficiente e simples para o pré-tratamento da amostra, o qual envolveu a adsorção das NPMs ao analito, em seguida do processo de dessorção utilizando o HNO_3 , proporcionando a disponibilidade dos íons de cobre ao meio reacional para em sequência ocorrer a emissão quimiluminescente do luminol oxidado pelo peróxido de hidrogênio, de forma proporcional à concentração de íons cobre (II) nas amostras.

Fatores que afetam a extração em fase sólida magnético e o sinal quimiluminescente tais como quantidade de sorbente, a concentração do eluente e a concentração de peróxido e luminol e foram investigados. De acordo com os resultados obtidos, nas melhores condições experimentais, o método apresentou limite de detecção de $6,73 \mu\text{g L}^{-1}$ e limite de quantificação de $22,44 \mu\text{g L}^{-1}$ compatíveis com outros métodos descritos na literatura e uma frequência analítica de 12 amostras h^{-1} .

A utilização da *webcam* como detector para medidas quimiluminescentes, por sua vez, demonstrou a viabilidade e a confiabilidade de se empregar imagens digitais para a determinação analítica quantitativa através de um simples processamento dos dados RGB pela norma do vetor. Vale ressaltar, ainda, que o novo programa desenvolvido para o gerenciamento e tratamento das imagens digitais tem como principal característica ser totalmente interativo com o usuário, dando todas as opções necessárias à análise, além de permitir um trabalho efetivamente automático, sem qualquer necessidade de tratamento de imagens posteriores, permitindo a quantificação do analito após as análises, através da decomposição do filme digital

em uma série de imagens digitais, 30 frames/segundo, o que pode ser um considerável ganho para o processo automático empregando imagens digitais.

O desempenho da metodologia proposta foi avaliado por meio da determinação de cobre (II) em dez amostras de cachaça adquiridas mercado local das cidades de João Pessoa e Areia na Paraíba e Natal no Rio Grande do Norte. Os resultados das análises foram estatisticamente similares aos obtidos pelo método de referência. Cinco amostras apresentaram valores de concentração estimados acima do limite máximo tolerável pela legislação vigente que é de 5 mg L⁻¹.

Deste modo, vale salientar que, por meio da união sinérgica da extração em fase sólida magnética, quimiluminescência, imagens digitais e automação analítica pode-se vislumbrar o desenvolvimento efetivo novas metodologias com aplicações direcionadas, sensíveis e seletivas. Além do mais, que a implementação de técnicas quimiluminescentes com as imagens digitais através da decomposição dos filmes digitais pode se tornar uma tendência ainda mais valiosa, pois permitem realizar análises com uma apreciável praticidade, com o desenvolvimento de novos sistemas automáticos ao mesmo tempo simples, robustos e dedicados, com potencial para aplicações nas mais diversas áreas do conhecimento científico e tecnológico como as engenharias, as ciências naturais e as ciências da saúde.

5.2. Perspectivas

Uma das expectativas de continuidade deste trabalho é investigar a partir do método desenvolvido outros componentes traço em matrizes alcoólicas. Esses estudos podem fornecer informações relevantes para o desenvolvimento de novas metodologias analíticas baseadas no trinômio quimiluminescência-MSPE-filmes digitais e consequentemente, a expansão dos seus campos de aplicação frente a matrizes de maior complexidade, exemplo da investigação e determinação de substâncias traço em alimentos, medicamentos e combustíveis.

6

REFERÊNCIAS

1. ABDOLMOHAMMAD-ZADEH, H.; TALLEB, Z. Speciation of As (III)/As (V) in water samples by a magnetic solid phase extraction based on Fe₃O₄/Mg–Al layered double hydroxide nano-hybrid followed by chemiluminescence detection. **Talanta**, v. 128, p. 147–155, 2014.
2. ALAHMAD, W. et al. A miniaturized chemiluminescence detection system for a microfluidic paper-based analytical device and its application to the determination of chromium (III). **Analytical Methods**, v. 8, n. 27, p. 5414–5420, 2016.
3. ALMEIDA, L. F. DE. **Analizador fluxo-batelada com bomba-pistão aplicado à preparação de soluções de calibração e microemulsões: determinação de metais em água mineral e gasolina por GF AAS**. Tese (Doutorado em Química)—Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2007.
4. ALMEIDA, J. B. S. **Um método quimiluminescente baseado em imagens digitais para determinação de Cr (VI) em águas usando um sistema fluxo batelada**. Dissertação (Mestrado em Química)—João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2012.
5. ALVES, A. M. R. **Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas para tratamento de cancro: estudo da síntese e estabilização das soluções coloidais de Fe₃O₄**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)—Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2012.
6. ANDRADE, R. A. et al. A flow–batch luminometer. **Microchemical Journal**, v. 108, p. 151–155, 2013a.
7. ANDRADE, R. A. N. **Um Luminômetro Fluxo-Batelada para Determinação de Vitamina B12 em Medicamentos**. Dissertação (Mestrado em Química)—João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2011.

8. ANDRADE, S. I. E. et al. A digital image-based flow-batch analyzer for determining Al (III) and Cr (VI) in water. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 106–111, 2013b.
9. ANDRADE, S. I. E. **Pontos quânticos de carbono aplicado à determinação fluorimétrica de cobre(II) em óleos usando um sistema em fluxo-batelada com extração em fase única**. Tese—João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, fev. 2016.
10. ASLAN, K.; GEDDES, C. D. Metal-enhanced chemiluminescence: advanced chemiluminescence concepts for the 21st century. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 9, p. 2556, 2009.
11. BAGHERI, H. et al. Preparation and characterization of magnetic nanocomposite of Schiff base/silica/magnetite as a preconcentration phase for the trace determination of heavy metal ions in water, food and biological samples using atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 97, p. 87–95, 2012.
12. BARRETO, I. S. **Um método automático para extração em fase sólida magnética de Cd e Pb em águas e de Cd em óleo comestível e detecção por GF AAS**. Tese (Doutorado em Química)—João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2016.
13. BATISTA, A. D. et al. Flow analysis in Brazil: contributions over the last four decades. **Analyst**, v. 139, n. 15, p. 3666–3682, 2014.
14. BATLLE, X.; LABARTA, A. LCAR. Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties. **JOURNAL OF PHYSICS-LONDON-D APPLIED PHYSICS**, v. 35, n. 6, p. R15–R42, 2002.
15. BERNIS, R. S. **Billmeyer and Saltzman's principles of color technology**. [s.l.] Wiley New York, 2000.

16. BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. Assessment of chemical quality of Brazilian sugar cane spirits and cachaças. **Food Control**, v. 54, p. 1–6, 2015.
17. BOWIE, A. R.; SANDERS, M. G.; WORSFOLD, P. J. Analytical applications of liquid phase chemiluminescence reactions—a review. **Luminescence**, v. 11, n. 2, p. 61–90, 1996.
18. BRANCO, R. M. **Nanopartículas magnéticas obtidas por coprecipitação homogênea sonoquimicamente assistida**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)—Poços de Caldas: Universidade Federal de Alfenas, 2013.
19. BURNS, D. T.; DANZER, K.; TOWNSHEND, A. Use of the term " recovery" and " apparent recovery" in analytical procedures (IUPAC Recommendations 2002). **Pure and applied chemistry**, v. 74, n. 11, p. 2201–2205, 2002.
20. BYRNE, L. et al. Digital imaging as a detector for generic analytical measurements. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 8, p. 517–522, 2000.
21. CALDAS, N. M.; OLIVEIRA, S. R.; NETO, J. A. G. Feasibility of internal standardization in the direct and simultaneous determination of As, Cu and Pb in sugar-cane spirits by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 636, n. 1, p. 1–5, 2009.
22. CHEN, G. et al. A review of enhancers for chemiluminescence enzyme immunoassay. **Food and Agricultural Immunology**, v. 28, n. 2, p. 315–327, 4 mar. 2017.
23. DANTAS, K. C. F. **Desenvolvimento de método quimiométrico baseado em análise de imagens digitais para a quantificação dos corantes amarelo crepúsculo e tartrazina em bebidas**. Dissertação (Mestrado em Química)—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

24. DE OLIVEIRA, H. J. S. et al. A handheld smartphone-controlled spectrophotometer based on hue to wavelength conversion for molecular absorption and emission measurements. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 238, p. 1084–1091, 2017.
25. DE SOUZA, A. M. **Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação de cobre em cachaça usando FAAS e aplicação no estudo de remoção de cobre em amostras da bebida utilizando bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Química)—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.
26. DENG, J. et al. Magnetic and conductive Fe₃O₄-polyaniline nanoparticles with core-shell structure. **Synthetic Metals**, v. 139, n. 2, p. 295–301, 2003.
27. DI, Y. et al. A high-performance liquid chromatography: chemiluminescence method for potential determination of vardenafil in dietary supplement. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2011, 2011.
28. DINIZ, P. H. et al. Using a simple digital camera and SPA-LDA modeling to screen teas. **Analytical Methods**, v. 4, n. 9, p. 2648–2652, 2012a.
29. DINIZ, P. H. G. D. et al. Flow-batch analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 39–49, 2012b.
30. DO NASCIMENTO ROCHA, S. A. et al. Spectrofotometric determination of copper in sugar cane spirit using biquinoline in the presence of ethanol and Triton X-100. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, n. 4, p. 1414–1418, 2008.
31. DOS SANTOS BENEDETTI, L. P. et al. A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks. **Analytical Methods**, v. 7, n. 10, p. 4138–4144, 2015.

32. ECONOMOU, A. et al. Sensitive determination of captopril by flow injection analysis with chemiluminescence detection based on the enhancement of the luminol reaction. **Analytica Chimica Acta**, v. 463, n. 2, p. 249–255, 2002.
33. EZODDIN, M. et al. Application of modified nano-alumina as a solid phase extraction sorbent for the preconcentration of Cd and Pb in water and herbal samples prior to flame atomic absorption spectrometry determination. **Journal of hazardous materials**, v. 178, n. 1, p. 900–905, 2010.
34. FACCHIN, I. **Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo monossegmentado**. Tese (Doutorado em Química)—Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1996.
35. FARAJI, M. Recent analytical applications of magnetic nanoparticles. **Nanochemistry Research**, v. 1, n. 2, p. 264–290, 2016.
36. FÉLIX, L. L. **Síntese e Caracterização de nanopartículas de Fe₃O₄ recobertas com ouro**. Dissertação (Mestrado em Física)—Brasília: Universidade de Brasília, 2013.
37. FEREJA, T. H.; HYMETE, A.; GUNASEKARAN, T. A recent review on chemiluminescence reaction, principle and application on pharmaceutical analysis. **ISRN Spectroscopy**, v. 2013, 2013.
38. FERREIRA, E. C.; ROSSI, A. V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. **Química nova**, 2002.
39. FERREIRA, R. V. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com núcleo magnético de magnetita**. Dissertação (Mestrado em Química)—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

40. FRANCISQUINE, E.; SCHOENMAKER, J.; SOUZA, J. A. Nanopartículas Magnéticas e suas Aplicações. **Química Supramolecular e Nanotecnologia**, p. 269, 2014.
41. FRANCO, M. DE O. K.; SUAREZ, W. T.; DOS SANTOS, V. B. Digital Image Method Smartphone-Based for Furfural Determination in Sugarcane Spirits. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 2, p. 508–515, 2017.
42. GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. et al. Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo. 2001.
43. GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. **Chemiluminescence in analytical chemistry**. [s.l.] CRC Press, 2001.
44. GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; BAEYENS, W. R. G. Principles and recent analytical applications of chemiluminescence. **Analisis**, v. 28, n. 8, p. 686–698, 2000.
45. GIAKISIKLI, G.; ANTHEMIDIS, A. N. Magnetic materials as sorbents for metal/metalloid preconcentration and/or separation. A review. **Analytica chimica acta**, v. 789, p. 1–16, 2013.
46. GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Processamento de imagens digitais**. [s.l.] Edgard Blucher, 2000.
47. GRIBAS, A. V.; ZHAO, S.; SAKHAROV, I. Y. Improved method for chemiluminescent determination of peroxidase-mimicking DNAzyme activity. **Analytical biochemistry**, v. 466, p. 19–23, 2014.
48. GRÜNHUT, M. et al. Flow-batch analyzer for the chemiluminescence determination of catecholamines in pharmaceutical preparations. **Analytical Letters**, v. 44, n. 1–3, p. 67–81, 2011.

49. GUBIN, S. P. et al. Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. **Russian Chemical Reviews**, v. 74, n. 6, p. 489–520, 2005.
50. HASANIN, T. H. et al. A Flow Method for Chemiluminescence Determination of Antimony (III) and Antimony (V) Using a Rhodamine B-Cetyltrimethylammonium Chloride Reversed Micelle System Following On-Line Extraction. **Analytical Sciences**, v. 32, n. 2, p. 245–250, 2016.
51. HEDAYATNASAB, Z.; ABNISA, F.; DAUD, W. M. A. W. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. **Materials & Design**, v. 123, p. 174–196, 2017.
52. HERRERO-LATORRE, C. et al. Magnetic solid-phase extraction using carbon nanotubes as sorbents: a review. **Analytica chimica acta**, v. 892, p. 10–26, 2015.
53. HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. Tradução Celio Pasquini. Porto Alegre: Bookman, 2009.
54. HONORATO, F. A. et al. Analytical curve or standard addition method: how to elect and design—a strategy applied to copper determination in sugarcane spirits using AAS. **Analyst**, v. 127, n. 11, p. 1520–1525, 2002.
55. HONORATO, R. S. et al. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. **Analytica Chimica Acta**, v. 396, n. 1, p. 91–97, 1999.
56. HUANG, B. et al. On-line chemiluminescence detection for capillary ion analysis. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 14, p. 2366–2369, 1996.
57. IBRAC, I. B. DA C. **Instituto Brasileiro da Cachaça - IBRAC**. Disponível em: <<http://www.ibrac.net/>>. Acesso em: 18 ago. 2017.

58. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio, DOQ-CGCRE-008**, 2010.
59. IRANIFAM, M. Analytical applications of chemiluminescence-detection systems assisted by magnetic microparticles and nanoparticles. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 51, p. 51–70, 2013.
60. JAMSHAD, T. et al. Magnetic particles: From preparation to lab-on-a-chip, biosensors, microsystems and microfluidics applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 344–362, 2016.
61. JAMSHIDI, M. et al. Determination of some metal ions by flame-AAS after their preconcentration using sodium dodecyl sulfate coated alumina modified with 2-hydroxy-(3-((1-H-indol 3-yl) phenyl) methyl) 1-H-indol (2-HIYPMI). **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1229–1234, 2011.
62. KANG, Y. S. et al. Synthesis and Characterization of Nanometer-Size Fe_3O_4 and $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Particles. **Chemistry of Materials**, v. 8, n. 9, p. 2209–2211, jan. 1996.
63. KARIMI, M. A.; KAFI, M. Removal, preconcentration and determination of Ni (II) from different environmental samples using modified magnetite nanoparticles prior to flame atomic absorption spectrometry. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 812–820, 2015.
64. KENNY, F.; KURTZ, R. B. Luminol as Chemiluminescent Indicator in Acid-Base Titrations with Dark-Chamber Titrimeter. **Analytical Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 339–341, 1951a.
65. KHAJVAND, T.; CHAICHI, M. J.; COLAGAR, A. H. Sensitive assay of hexythiazox residue in citrus fruits using gold nanoparticles-catalysed luminol- H_2O_2 chemiluminescence. **Food chemistry**, v. 173, p. 514–520, 2015.

66. KHATAEE, A. et al. Flow-injection chemiluminescence determination of cloxacillin in water samples and pharmaceutical preparation by using CuO nanosheets-enhanced luminol–hydrogen peroxide system. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 134, p. 210–217, 2015.
67. KIM, K. M. et al. A chelate complex-enhanced luminol system for selective determination of Co (II), Fe (II) and Cr (III). **Luminescence**, v. 28, n. 3, p. 372–377, 2013.
68. KOLEV, S. D.; MCKELVIE, I. D. **Advances in flow injection analysis and related techniques**. [s.l.] Elsevier, 2008. v. 54
69. LAMPEN, P. et al. Spectroscopic and photometric evaluation of images from the Mars Pathfinder camera. **Analytica chimica acta**, v. 420, n. 2, p. 229–237, 2000.
70. LATIMER, G. W. **Official methods of analysis of AOAC International**. [s.l.] AOAC international, 2012.
71. LEITE, F. C. **Um estudo para titulação quimiluminescente em fluxo-batelada com detecção por imagem digital**. Dissertação (Mestrado em Química)—João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2016.
72. LEITE, O. D. **Desenvolvimento e aplicação de procedimentos envolvendo reações quimiluminescentes em fluxo para a determinação de analitos de interesse alimentício, farmacêutico e bioquímico**. Tese (Doutorado em Química)—São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2005.
73. LI, B. et al. Flow-injection chemiluminescence simultaneous determination of cobalt (II) and copper (II) using partial least squares calibration. **Talanta**, v. 69, n. 1, p. 160–165, 2006.

74. LIMA, M. B. DE. **Determinação quimiluminescente de ferro em óleos baseado em pontos quânticos de CdTe usando um sistema fluxo-batelada com extração em fase única e imagens digitais.** Tese (Doutorado em Química)—João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2014.
75. LIMA, M. B. et al. A digital image-based micro-flow-batch analyzer. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 238–243, 2013.
76. LIMA, R. A. C. et al. Digital movie-based on automatic titrations. **Talanta**, v. 147, p. 226–232, 2016.
77. LIU, Y. M.; LIU, Z. L. Chemiluminescence determination of 20 amino acids and the mechanism study. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, n. 7, p. 856–859, 2010.
78. LU, A.-H.; SALABAS, E. EMSP14L; SCHÜTH, F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222–1244, 2007.
79. LUTZ, I. A. Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos. **São Paulo: Instituto Adolfo Lutz**, v. 1, 1985.
80. LYRA, W. DA S. **Espectrometria de Emissão em Chama Baseada em Imagens Digitais.** Dissertação (Mestrado em Química)—João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2008.
81. LYRA, W. DA S. **Um método espectrométrico de emissão em chama baseado em imagens digitais para determinação indireta de fármacos e determinação simultânea de sódio e cálcio.** Tese (Doutorado em Química)—João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2012.

82. MAPA, M. DA A. P. E A. **Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Disponível em: <<http://www.ibrac.net/index.php/servicos/legislacao/192-instrucao-normativa-n-13-de-29-de-junho-de-2005-do-ministerio-da-agricultura-pecuaria-e-abastecimento>>. Acesso em: 18 ago. 2017.
83. MARLEY, N. A. et al. Fast gas chromatography with luminol chemiluminescence detection for the simultaneous determination of nitrogen dioxide and peroxyacetyl nitrate in the atmosphere. **Review of scientific instruments**, v. 75, n. 11, p. 4595–4605, 2004.
84. MILANEZ, K. D. T. DE M. **Classificação de óleos vegetais comestíveis usando imagens digitais e técnicas de reconhecimento de padrões.** Dissertação (Mestrado em Química)—João Pessoa: Universidade Federal da, 2013.
85. MIRANDA, K.; DIONÍSIO, A. G. G.; PEREIRA-FILHO, E. R. Copper determination in sugar cane spirits by fast sequential flame atomic absorption spectrometry using internal standardization. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 99–101, set. 2010.
86. MISHRA, S. P. Adsorption–desorption of heavy metal ions. **Curr. Sci**, v. 107, n. 4, p. 601–612, 2014.
87. MOHAMMED, L. et al. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. **Particuology**, v. 30, p. 1–14, 2017.
88. MOMENI, N. et al. CCD-camera based capillary chemiluminescent detection of retinol binding protein. **Analytica chimica acta**, v. 387, n. 1, p. 21–27, 1999.
89. MONTE-FILHO, S. S. et al. Flow–batch miniaturization. **Talanta**, v. 86, p. 208–213, 2011.

90. MOREIRA, P. N. T. **Planejamento e otimização de um método quimiluminescente para determinação de vitamina B12 usando um sistema fluxo-batelada**. Tese (Doutorado em Química)—João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2009.
91. MOURA, H. DE S. R. P. Uso de imagens digitais para detecção de luminescência em sistemas microfluídicos de análise. 2016.
92. NALEWAJKO, E.; RAMÍREZ, R. B.; KOJLO, A. Determination of dopamine by flow-injection analysis coupled with luminol-hexacyanoferrate (III) chemiluminescence detection. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 36, n. 1, p. 219–223, 2004.
93. NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos-: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. [s.l.] Bookman Editora, 2010.
94. NEVES, E. A. et al. Simple and efficient elimination of copper (II) in sugar-cane spirits. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 33–36, 2007.
95. OCAÑA-GONZÁLEZ, J. A. et al. Application of chemiluminescence in the analysis of wastewaters—a review. **Talanta**, v. 122, p. 214–222, 2014.
96. OLIVEIRA, P. R. et al. Electrochemical determination of copper ions in spirit drinks using carbon paste electrode modified with biochar. **Food chemistry**, v. 171, p. 426–431, 2015.
97. OOI, S.; CARTER, D.; FERNANDO, Q. The structure of a chelate of copper (II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. **Chemical Communications** (London), n. 24, p. 1301–1302, 1967.
98. PASQUINI, C.; DE OLIVEIRA, W. A. Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium (VI), ammonia and phosphorus. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 13, p. 2575–2579, 1985.

99. PASSI, N. et al. Effect of luminol and bleaching agent on the serological and DNA analysis from bloodstain. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, v. 2, n. 2, p. 54–61, 2012.
100. PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268–277, 1996.
101. PRADEEP, T. **Nano: the essentials**. [s.l.] Tata McGraw-Hill Education, 2007.
102. QUEIROZ, Z. F. et al. Flow system with in-line separation/preconcentration coupled to graphite furnace atomic absorption spectrometry with W–Rh permanent modifier for copper determination in seawater. **Analytica Chimica Acta**, v. 463, n. 2, p. 275–282, 2002.
103. REIS, B. F. et al. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 293, n. 1–2, p. 129–138, 1994.
104. RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, 2004.
105. ROBARDS, K.; WORSFOLD, P. J. Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence. **Analytica Chimica Acta**, v. 266, n. 2, p. 147–173, 1992.
106. RUENGSIAGOON, W.; LIAWRUANGRATH, S.; TOWNSHEND, A. Flow injection chemiluminescence determination of paracetamol. **Talanta**, v. 69, n. 4, p. 976–983, 2006.
107. ŘUŽIČKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, n. 1, p. 145–157, 1975.
108. ŘUŽIČKA, J.; MARSHALL, G. D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 237, p. 329–343, 1990.

109. ŠAFAŘÍKOVÁ, M.; ŠAFAŘÍK, I. Magnetic solid-phase extraction. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 194, n. 1, p. 108–112, 1999.
110. SAJEWICZ, W.; ZALEWSKA, M.; MILNEROWICZ, H. Comparative study on thiol drugs' effect on tert-butyl hydroperoxide induced luminol chemiluminescence in human erythrocyte lysate and hemoglobin oxidation. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 1, p. 148–154, 2015.
111. SARKER, K. C.; ULLAHA, RAFIQUE. Determination of Trace Amount Of Copper (Cu) Using Uv-Vis Spectrophotometric Method. International. **Journal of scientific research and management**, v. 1, n. 1, p. 23–44, 2013
112. SAMADI-MAYBODI, A.; BAKHTIAR, A.; FATEMI, M. H. Determination of Montelukast in Plasma Using β - Cyclodextrins Coated on CoFe₂O₄ Magnetic Nanoparticles in Luminol–H₂O₂ Chemiluminescence System Optimized by Doehlert Design. **Journal of fluorescence**, v. 26, n. 3, p. 925–935, 2016.
113. SANTOS, J. L. O. et al. Use of a digital image in flow analysis: Determination of nitrite and nitrate in natural waters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 1, p. 70–76, 2016.
114. SANTOS, L. H. M. L. M. **Desenvolvimento de Método Analítico para a Determinação de Gentamicina Baseado em Detecção por Quimiluminescência: Aplicação a produtos farmacêuticos**. Dissertação (Mestrado em Farmácia)—Porto: Universidade do Porto, 2008.
115. SHEMIRANI, F.; AKHAVI, B. T. S. Preconcentration and determination of trace cadmium using 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (pan) immobilized on surfactant-coated alumina. **Analytical Letters**, v. 34, n. 12, p. 2179–2188, 31 ago. 2001.

116. SILVA, A. K. DA et al. Extração em Fase Sólida Magnética (MSPE): Fundamentos e Aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 8, n. 4, p. 239–256, 2016.
117. SIQUEIRA, L. A. et al. Accurate automatic titration procedure for low sharpness and dichroism in end point detection using digital movies as detection technique. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 593–599, 2017.
118. SKEGGS, L. T. An automatic method for colorimetric analysis. **American journal of clinical pathology**, v. 28, p. 311–322, 1957.
119. SOARES, D. F. **Proposta de tratamento e disposição adequada de resíduos químicos gerados no Laboratório de Separação e Pré-concentração (LSPc) do IQ-UFU**. Dissertação (Mestrado em Química)—Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2006.
120. SOLOMOM, C.; BRECKON, T. **Fundamentals of Digital Image**. 1. ed. United States of America: John Wiley & Sons Ltd, 2011.
121. SOUSA, F. A. DE. **Extração em fase sólida de zinco (II) e cobre (II) em amostras aquosas e determinação por espectroscopia de reflectância difusa**. Dissertação (Mestrado em Química)—Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009.
122. SOUTO, U. T. DE C. P. et al. Screening for coffee adulteration using digital images and SPA-LDA. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 6, p. 1515–1521, 2015.
123. SOUZA, A. T. DE. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas—um estudo citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical humano (células HeLa)**. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular)—São José do Rio Preto: Universidade Federal Paulista, 2011.

124. SOUZA, J. C. DE. **Determinação de íons cobre (II) em aguardente de cana-de-açúcar utilizando a combinação spot test-espectroscopia de reflectância difusa.** Dissertação (Mestrado em Química)—Araraquara: Universidade Federal Paulista, 2015.
125. SOUZA, J. C. DE; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. A simple and green analytical method for determination of copper(II) in whisky and sugarcane spirit by diffuse reflectance spectroscopy. **Analytical Methods**, v. 8, n. 8, p. 1867–1875, 18 fev. 2016.
126. SOUZA, J. C. et al. Spectrophotometric Determination of Copper(II) in Sugarcane Spirit Using 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol and a Homogeneous Ternary Mixture of the Solvents Water, Ethanol and Methyl Isobutyl Ketone. **Revista Virtual de Química**, v. 8, 2016.
127. SOYLAK, M.; NARIN, I.; DOGAN, M. Trace Enrichment and Atomic Absorption Spectrometric Determination of Lead, Copper, Cadmium and Nickel in Drinking Water Samples by Use of an Activated Carbon Column. **Analytical Letters**, v. 30, n. 15, p. 2801–2810, dez. 1997.
128. TARTAJ, P. et al. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 290, p. 28–34, 2005.
129. TEKIYE, E.-S.; AGHAJANI, Z.; SHARIF, M. A. Synthesis and characterization of Fe₃O₄@Al₂O₃ nanoparticles and investigation its catalyst application. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 28, n. 7, p. 5360–5365, abr. 2017.
130. THOMPSON, M.; ELLISON, S. L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.
131. TÔRRES, A. R. et al. A digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid–base titration without indicator. **Talanta**, v. 84, n. 3, p. 601–606, 2011.

132. TOWLER, P. H.; SMITH, J. D.; DIXON, D. R. Magnetic recovery of radium, lead and polonium from seawater samples after preconcentration on a magnetic adsorbent of manganese dioxide coated magnetite. **Analytica chimica acta**, v. 328, n. 1, p. 53–59, 1996.
133. TRIPATHY, D.; ADEYEYE, A. O.; SHANNIGRAHI, S. Magnetic and tunneling magnetoresistive properties of an all-oxide $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Al}_2\text{O}_3$ granular system. **Physical Review B**, v. 76, n. 17, p. 174429, 2007.
134. TROJANOWICZ, M. **Advances in flow analysis**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008.
135. VLADIMIROV, Y. A.; PROSKURNINA, E. V. Free radicals and cell chemiluminescence. **Biochemistry (Moscow)**, v. 74, n. 13, p. 1545–1566, 2009.
136. WU, F.; LV, J. Flow injection chemiluminescence detection and solvent extraction for human skin ointment dexamethasone acetate absorption analysis and the reaction mechanism study. **Talanta**, Special Issue on China-Japan-Korea Environmental Analysis. v. 72, n. 5, p. 1811–1817, jul. 2007.
137. WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. **Nanoscale research letters**, v. 3, n. 11, p. 397, 2008.
138. XIAO, C. et al. Study of enhancement effects in the chemiluminescence method for Cr (III) in the ng l^{-1} range. **Analytica Chimica Acta**, v. 415, n. 1, p. 209–219, 2000.
139. YU, B. Y.; KWAK, S.-Y. Assembly of magnetite nanocrystals into spherical mesoporous aggregates with a 3-D wormhole-like pore structure. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 38, p. 8320–8328, 2010.
140. ZAGATTO, E. A. et al. Information essential for characterizing a flow-based analytical system (IUPAC Technical Report). **Pure and applied chemistry**, v. 74, n. 4, p. 585–592, 2002.

141. ZHOU, Z.-M. et al. Capillary electrophoresis-chemiluminescence detection for carcino-embryonic antigen based on aptamer/graphene oxide structure. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 64, p. 493–498, 2015.