



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

Dissertação de Mestrado

**ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE FERRO EM TOMATES
UTILIZANDO UM ANALISADOR AUTOMÁTICO FBA E IMAGENS
DIGITAIS**

Andreia Rufino Rodrigues

SAPIENTIA ÆDIFICAT

JOÃO PESSOA – PB – BRASIL

Agosto/2018



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

Dissertação de Mestrado

**ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE FERRO EM TOMATES
UTILIZANDO UM ANALISADOR AUTOMÁTICO FBA E IMAGENS
DIGITAIS**

Andreia Rufino Rodrigues *

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Em Química da Universidade Federal da Paraíba como
Parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre
em Química, área de concentração Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima

Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a Amália Geiza Gama Pessoa

*** Bolsista da Capes**

JOÃO PESSOA – PB – BRASIL

Agosto/2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R696e Rodrigues, Andreia Rufino.

ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE FERRO EM TOMATES UTILIZANDO UM ANALISADOR AUTOMÁTICO FBA E IMAGENS DIGITAIS / Andreia Rufino Rodrigues. - João Pessoa, 2018.

85f. : il.

Orientação: Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima.

Coorientação: Amália Geiza Gama Pessoa.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. FBA. 2. imagem digital. 3. sistema de cor RGB. 4. especiação de ferro. 5. tomates. I. Lima, Ricardo Alexandre Cavalcanti de. II. Pessoa, Amália Geiza Gama. III. Título.

UFPB/CCEN

Ao meu filho Ruan, razão de tudo.....

Gostaria de dizer que lembro-me de você em todos os momentos, seu sorriso lindo vem a minha cabeça e logo sou acometida pela garra e a coragem de seguir em frente, porque tudo que faço é por ti, por você eu enfrentaria o mundo inteiro.

Ao meu amado Peteco, por ser tudo que eu precisava que fosse, por me apoiar em todas as etapas e por estar ao meu lado sempre.

Com amor, dedico

Agradecimentos

- ❖ Primeiramente agradeço a Deus por me dar forças para seguir nessa jornada.
- ❖ Ao meu esposo, Arley Filgueiras que em cada etapa esteve comigo, me motivando, apoiando e dando-me suporte para a realização de todas as atividades.
- ❖ A minha querida mãe, que sempre me apoiou e acreditou em mim. Ao meu pai, que sempre me motivou nessa jornada. Aos meus irmãos que sempre pude contar, mesmo estando tão longe.
- ❖ Ao meu filho, Ruan Di Lucca, fruto de um grande amor, pois foi por ele que encontrei o maior motivo para continuar lutando e vencendo.
- ❖ A minha querida sogra, Vânia que sempre me ajudou com meu filho e em todos os momentos.
- ❖ A Rayane Neves, que foi uma tia muito especial para meu filhote que cuidou e se dedicou muito a ele durante minha ausência.
- ❖ Ao meu Orientador, Ricardo Alexandre por me orientar em cada etapa e pela motivação de todos os dias, por entender as minhas falhas e principalmente por acreditar em mim.
- ❖ A minha coorientadora, Professora Amália Gama, pelas orientações e conselhos.
- ❖ Aos amigos Laqueanos Lucas, Iara, Stéfani pela grande ajuda na realização deste trabalho.
- ❖ Aos colegas Laqueanos, Ana Rosa, Flaviano, Wallis pela ajuda de todos os dias.
- ❖ Ao professor, Anderson Simões que me ajudou muito e foi fundamental no processo de entrada ao programa.
- ❖ A todos os colegas Laqueanos pelo convívio de todos os dias.
- ❖ A Capes pelo apoio financeiro.
- ❖ A UFPB, pela oportunidade de ingresso.
- ❖ A PPGQ, pela oportunidade de integração ao programa.
- ❖ A todos que de algum modo contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xi
Lista de siglas e abreviaturas	xii
Capítulo 1- Introdução	1
1 Caracterização da problemática	2
1.1 Tomates	4
1.2 Ferro.....	7
1.3 Preparo de amostras.....	9
1.4- Especificação química.....	12
1.5Técnicas para determinação de ferro	15
1.6- Analisadores em fluxo batelada.....	18
1.6.1-Analisadores : Detecção por imagem digital	20
1.7 Modelo de cor RGB	22
Capítulo 2-Objetivos	25
2- Objetivos	26
2.1.1Objetivo geral	26
2.1.2 Objetivos específicos	26
Capítulo 3- Experimental	27
3.Experimental	28
3.1 Reagentes e soluções.....	28
3.2 Equipamentos	29
3.3 Amostras	30
3.3.1 Material de referência certificado.....	31
3.4 Descontaminação dos materiais.....	31
3.5 Procedimentos para preparo das amostras.....	31

3.5.1 Preparo de amostra para determinação de ferro total.....	32
3.5.2 Preparo de amostra para determinação de ferro (II).....	33
3.6 Analisador em FBA proposto	33
3.6.1 Câmara de mistura	34
3.6.2 Bomba peristáltica	35
3.6.3 Válvulas solenoides	35
3.6.4 Sistema de detecção	36
3.6.5 Acionador de válvulas	36
3.6.6 Programa de controle do FBA.....	37
3.6.7 tratamento e análise das imagens digitais.....	38
3.7 Procedimento analítico realizado pelo FBA proposto.....	38
3.7.1 Estudo da vazão dos canais das válvulas solenoides	39
3.7.2 Escolha da região para obtenção dos valores de RGB	40
3.7.3 Etapas do procedimento de análise no FBA proposto.....	40
3.7.3.1 Preenchimento dos canais	41
3.7.3.2 Obtenção da curva analítica.....	41
3.7.3.3 Determinação de ferro (II)	42
3.7.3.4 Determinação de ferro total.....	42
3.8 Procedimento analítico para determinação de ferro total pelo método de referência.....	44
3.8.1 Procedimento analítico para especificação de ferro (II) pelo método de referência.....	44
3.8.2 Determinação de ferro (III)	45
3.9 Parâmetros de desempenho	45
3.9.1 Limite de detecção e Limite de quantificação	45
Capítulo 4 RESULTADOS e DISCUSSÃO	47
4.1 Otimização do FBA proposto	48
4.1.1 Estudo da vazão dos canais de bombeamento	48

4.1.2 Tratamento das imagens digitais	49
4.2 Escolha da região para aquisição das imagens digitais	50
4.3 Determinação analítica pelo FBA.....	52
4.3.1 Curva analítica para o FBA.....	52
4.4 Método de referência para ferro(II)	55
4.5 Método de referência para ferro total	55
4.6. Resultados obtidos pelo FBA proposto	56
4.7 Concentração do ferro pelo tipo de cultivo.....	58
Capítulo 5 CONCLUSÕES.....	60
Referências Bibliográficas	63

Lista de figuras

Figura 1.1- Reação de complexação entre 1,10-fenantrolina e o ferro (II).....	14
Figura 1.2- Principais componentes de um analisador automático do tipo FBA.....	17
Figura 1.3- Modelo de cor RGB.....	21
Figura 3.1- Amostras de tomates: (a) antes de serem secas, (b) depois de secas em estufa	29
Figura 3.2- (a) amostras no início da digestão ácida, (b) amostras no final da digestão ácida com HNO ₃ e H ₂ O ₂	30
Figura 3.3- Fotografia da disposição física dos componentes do analisador em FBA proposto para especiação química	31
Figura 3.4- Câmara de mistura utilizada no FBA proposto.....	32
Figura 3.5 - Webcam utilizada como detector no FBA proposto.....	33
Figura3.6- Programa utilizado na realização das análises.....	34
Figura 3.7- Diagrama esquemático do FBA proposto.....	36
Figura 3.8- Regiões estudadas para escolha da melhor área para realização das análises.....	36
Figura 4.1- Estudo de calibração para a válvula 1 utilizada no FBA proposto.....	45
Figura 4.2 - Contribuições individuais dos componentes R, G e B em função da concentração do complexo Fe(II)-1,10 -fenantrolina (0 a 1 mg L ⁻¹).....	46
Figura 4.3- Curvas analíticas obtidas em diferentes regiões das imagens digitais pelo FBA proposto	47
Figura 4.4- Imagens obtidas pelo FBA com a área selecionada (171x127).....	49
Figura 4.5- Curva de calibração obtida pelo FBA proposto.....	50
Figura 4.6 - Gráfico das análises de resíduo no espectrofotômetro de absorção molecular e o FBA proposto.....	51

Figura 4.7 -Comparação entre concentração de ferro pelo tipo de cultivo de tomates.....55

Lista de tabelas

Tabela 1.1- Composição nutricional do tomate (em 100 grama).....	3
Tabela 1.2 - Quantidade produzida de tomate por unidade da federação safra de 2016.....	4
Tabela 1.3- Diferentes procedimentos de digestão para a determinação de ferro em diferentes amostras.....	10
Tabela 1.4- Diferentes procedimentos para especiação química.....	13
Tabela 1.3- Quantidade produzida de tomate por unidade da federação safra de 2016.	10
Tabela 3.1- Características e parâmetros nas determinações por ICP OES....	27
Tabela 3.2- Amostras utilizadas nesta pesquisa.....	28
Tabela 3.3- Tempos de acionamento das válvulas solenoides para a realização das análises das amostras de tomate para a determinação de Fe (II) no FBA proposto.....	39
Tabela 3.4- Tempos de acionamento das válvulas solenoides para a realização das análises das amostras de tomate para a determinação de ferro total no FBA proposto.....	40
Tabela4.1- ANOVA.....	51
Tabela 4.2- Valores de LOD e LOQ, em $\mu\text{g L}^{-1}$, para determinação de ferro II em tomates.....	53
Tabela 4.3- Comparação do teor de ferro, em $\mu\text{g g}^{-1}$, determinados por ICP-OES, com o valor certificado para o material de referência NIST 1547 (n = 3).....	53
Tabela 4.4.- LOQ e LOD para procedimento realizado para determinação de ferro total por ICP-OES.....	54

Lista de siglas e abreviaturas

ANOVA – Analysis of variance (análise de variância)

CCD -Charge-coupled devices (dispositivo de carga acoplada)

ETAAS-Electrothermal atomic absorption spectrometry(Espectrometria de absorção atômica eletrotérmica)

FAAS-Flame atomic absorption spectrometry (Espectrometria de absorção atômica chama)

FBA – Flow-batch analyzer (Analisador em fluxo-batelada)

GC – Gas chromatography (Cromatografia gasosa)

GF-AAS – Graphite furnace atomic absorption spectrometry (espectrometria de absorção atômica em forno de grafite)

HPLC – High-performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)

ICP-MS – Inductively coupled plasma mass spectrometry (espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado)

ICP-OES – Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy(espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado)

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

LOD – Limit of detection (limite de detecção)

LOQ – Limit of quantitation (limite de quantificação)

PTFE- Politetrafluoretileno

PVC-Policloroeteno

RGB – Red, green and blue (vermelho, verde e azul)

WHO - Organização Mundial da Saúde (do inglês World Health Organization)

RESUMO

Título: Especiação química de ferro em tomates utilizando um analisador automático FBA e imagens digitais.

Esse estudo propõe uma nova metodologia automática para a especiação química de ferro em amostras de tomates utilizando um analisador automático em fluxo batelada. O analisador automático foi equipado com uma webcam como sensor para aquisição de imagens digitais de acordo com o sistema de cor RGB. O método para determinação de ferro (II) baseia-se na reação de ferro com a 1,10-fenantrolina que forma um complexo de coloração alaranjada com máxima absorção de energia em 510 nm. A determinação de ferro total foi realizada pela redução do ferro (III) para ferro (II) pelo ácido ascórbico e, por diferença, foi realizada a determinação de ferro (III). Para validar a metodologia foram feitas análises utilizando material de referência certificada (NIST 1547). Os modelos lineares das curvas analíticas foram validados por intermédio de ANOVA, e da análise gráfica dos resíduos deixados pelos modelos. A frequência analítica foi de 94 h⁻¹, com erros relativos entre 1,1% e 2,5% e desvios entre 0,1% e 0,41%. O tempo de análise de cada amostra foi estimado em 38 s tanto para determinação de ferro (II) quanto para ferro total. O consumo de amostra e reagente combinados em cada análise ficaram em torno de 0,54 mL e 0,66 mL respectivamente. Os valores de LOD e LOQ foram 2,33 e 7,72 µ L⁻¹ respectivamente. Os teores de ferro encontrado nas amostras variaram de 0,54 e 2,53 mg L⁻¹. A determinação de ferro (II) e ferro total foram corroborados pelos métodos de referência, respectivamente, absorção molecular no UV/Vis e ICP-OES. Foi observado que não existe diferença estatisticamente significativa entre os resultados, aplicando o teste *t*-pareado ao nível de confiança de 95%. O sistema FBA proposto se mostrou uma ótima ferramenta para a determinação dos analitos estudados.

Palavras-chave: FBA, imagem digital; sistema de cor RGB; especiação de ferro; tomate.

ABSTRACT

Title: Chemical speciation of iron in tomatoes using an FBA automatic analyzer and digital images

This study proposes a new automatic methodology for the chemical speciation of iron in tomato samples using an automatic batch flow analyzer. The automatic analyzer was equipped with a webcam as a sensor for acquisition of digital images according to the RGB color system. The method for the determination of iron (II) is based on the reaction of iron with 1,10-phenanthroline which forms an orange complex with maximum energy absorption at 510 nm. Total iron is determined by reducing iron (III) to iron (II) with ascorbic acid, and then iron (III) is quantified by the difference between total iron and iron (II) amounts. To validate the methodology, analyzes were done using certified reference material (NIST 1547). The linear models of the analytical curves were validated by means of ANOVA, and the graphic analysis of the residuals left by the models. The analytical frequency was 94 h⁻¹, with relative errors between 1.1% and 2.5% and deviations between 0.1% and 0.41%. The analysis time of each sample was estimated at 38 s for both iron (II) and total iron determination. The combined sample and reagent consumption in each analysis were around 0.54 mL and 0.66 mL respectively. The LOD and LOQ values were 2.33 and 7.72 μ L⁻¹ respectively. The iron contents found in the samples ranged from 0.54 and 2.53 mg L⁻¹. The determination of iron (II) and total iron were corroborated by reference methods, respectively, molecular absorption in UV / Vis and ICP-OES. It was observed that there was no statistically significant difference between the results, applying the t-paired test at the 95% confidence level. The proposed FBA system proved to be a useful tool for the determination of the analytes studied.

Keywords: FBA, digital image; RGB color system; iron speciation; tomato.

Capítulo 1

Introdução

1 Caracterização da problemática

O tomate é um dos frutos mais cultivados e consumidos em todo mundo e um grande atrativo. É que o mesmo pode ser consumido tanto na forma in natura quanto na forma industrializada como molhos, por exemplo. Um dos desafios da agricultura é a sua produção, pois esse cultivo é suscetível ao ataque de pragas e para garantir uma alta produtividade os produtores acabam fazendo uso de produtos agroquímicos que podem acabar prejudicando seu valor nutricional, sendo necessário o monitoramento dos elementos essenciais e potencialmente tóxicos que podem estar presentes como contaminantes nestes tipos de amostras (BRESSY,2011).

Nos dias de hoje, sabe-se que a determinação da concentração total de um elemento químico não fornece informações suficientes para avaliar os impactos que estes têm na saúde humana e no meio ambiente. Estas informações só podem ser obtidas através de uma análise de especiação química, que consiste em um estudo sobre a quantificação das diferentes espécies químicas de um mesmo elemento que compõe a amostra. Conhecer a forma química na qual um elemento se encontra no alimento é necessário tanto do ponto de vista nutricional quanto no ponto de vista toxicológico, pois ambas as propriedades estão relacionadas à suas diferentes espécies químicas (KOTAS E STASICKA, 2000). Por isso, é importante conhecer o teor de ferro no organismo, pois sua deficiência está relacionada a doenças, a mais conhecida é anemia, e seu excesso no organismo pode acarretar aumento da produção de radicais livres do oxigênio, responsáveis por doenças degenerativas e pelo processo de envelhecimento (SCHUARTSMAN, 1985)

Na literatura existem diversos métodos para a especiação de ferro (VERMA et al., 2016; ROCHA, 2000; LIN et al.,2018), na maioria deles, lentos e/ou onerosos, e por essa razão pretende-se utilizar um analisador em fluxo batelada para realizar essa quantificação, esses analisadores foram propostos em 1999 e vem sendo utilizados para realização de diferentes procedimentos analíticos.

O objeto de estudo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para especiação química de ferro em amostras de tomates. Para isso, foi necessária

uma etapa de preparo de amostra por digestão para posterior quantificação de Fe(II) e Fe(III) presente nas amostras de tomate utilizadas neste trabalho, a partir desses dados, realizar a especiação química com a utilização de um analisador fluxo batelada e imagens digitais.

1.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1.1 Tomates

O tomate, originário da América Central, onde crescia espontaneamente com o tamanho de pequenos berlindes, tinha o nome de “tomatl ou tumati” (TEUBNER, 2006), sendo fruto da planta *Solanum Lycopersicum* (ou *Lycopersicum esculentum*) (MARTINS et al., 2006).

A cultura do tomate foi sendo incluída em quase todos os países, em maior ou menor escala (FONTES;2002). No Brasil, seu consumo foi introduzido por imigrantes europeus no final do século XIX (BRESSY,2011). A importância dessa cultura no cenário mundial passou a ter destaque a partir de 1900 e, atualmente é o segundo produto olerícola mais cultivado no mundo, sendo a quantidade produzida superada apenas pela batata, que juntamente com a cebola e o alho são os alimentos mais industrializados (FILGUEIRA, 2008). Na Tabela 1.1.é listada a composição nutricional de um tomate.

Tabela 1.1: Composição nutricional do tomate (em 100 grama)

Fibra (%)	1,1
Calorias	0
Água (%)	93,76
Vitamina A (µg)	60
Vitamina B (µg)	80
Vitamina B2(µg)	113
Vitamina B5	0,450
Vitamina E	0,536
Vitamina K	1,3
Cobre	0,074
Fósforo	24
Magnésio	11
Manganês	0,150
Potássio	222,00
Ferro	0,45
Cálcio	5
Sódio	9

Fonte: EMBRAPA,2011

O tomate é um dos frutos de maior importância em todo o mundo e apresenta diferentes espécies para atender às mais diversas demandas desse importante mercado (MELO, 1989; SILVA; GIORDANO, 2000). A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza a ingestão de frutas e hortaliças como prioridade nas políticas nutricionais, alimentares e agrícolas, no caso de hortaliças é recomendado o consumo mínimo de 400 gramas por dia, o que equivale a cinco porções desses alimentos (WHO, 2002).

O Brasil se apresenta como um dos maiores produtores desse fruto, sendo que em 2016 o estado de Goiás detinha a maior participação na produção nacional (21,3%), seguido por São Paulo (21,2%) e Minas Gerais (20%), que juntos concentram cerca de 62,5% do total produzido no país, como apresentado na Tabela 1.2.

Tabela 1.2: Quantidade produzida de tomate por unidade da federação safra de 2016.

Estado	Área(há)	Produção(ton)	%Produção	Rend.(kg/ha)
Goiás	8.797	754.258	21,3	85.740
São Paulo	11.259	753.283	21,2	66.905
Minas Gerais	10.291	701.780	20	68.194
Paraná	4.354	249.139	7	57.221
Rio de Janeiro	2.567	189.307	5,3	73.746
Santa Catarina	2.778	183.939	5,2	66.213
Bahia	4.055	175.170	4,9	43.199
Espirito Santo	2.511	150.074	4,2	59.767
Ceará	2.541	137.961	3,9	54.294
Rio Grande do Sul	2.317	112.563	3,2	48.581
Pernambuco	1.731	59.821	1,7	34.559
Distrito Federal	307	21.620	,6	70.423
Paraíba	430	13.105	,4	30.477
Alagoas	104	7.522	,2	72.327
Pará	254	6.580	,19	25.906
Mato Grosso	243	6.037	,17	24.844
Rio Grande do Norte	148	4.696	,132	31.730
Roraima	264	4.689	,132	17.761
Maranhão	196	3.897	,110	19.883
Sergipe	154	2.565	,072	16.656
Rondônia	154	2.542	,072	16.506
Piauí	132	2.498	,070	18.924
Mato Grosso do Sul	69	2.465	,070	35.725
Amazonas	20	249	,01	12.450
Total	55.676	3.545,7	100	63.686

Fonte: IBGE 2017

De acordo com os dados do IBGE (2017), a área brasileira no cultivo de tomate na safra 2016 foi de 55,6 mil hectares, com uma produção estimada de 3,54 milhões de toneladas.

Há dois tipos de cultivo para o tomate: o manejo convencional e o manejo orgânico, (AGRIANUAL, 2009). O tomateiro é cultivado no Brasil durante todo o ano tanto no plantio “estaqueado”, também chamado de tomate para mesa ou para salada, onde as variedades de crescimento indeterminado necessitam ser estaqueadas (presas por estacas), diferente das variedades de tomate “rasteiro”, em que não se colocam estacas em sua condução. Este último também é chamado de industrial, pois sua produção é destinada às indústrias de processamento de tomate (ARAÚJO et al., 2000), porém exige elevados investimentos fitossanitários chegando a se fazer, normalmente, pulverizações a cada três dias, desde a emergência das plantas até a colheita (PAZINI et al., 1989; NAKANO, 1999).

O controle de pragas através do uso intensivo e indiscriminado de pesticidas químicos, de largo espectro de ação e grandes períodos de carência, representa um componente significativo na formação do custo de produção, além de oferecer riscos de contaminação aos trabalhadores, consumidores e meio ambiente em geral.

O manejo orgânico, segundo Souza e Alcântara (2003) surge como alternativa à contaminação dos alimentos por resíduos químicos ou sintéticos, pois busca oferecer produtos de qualidade, livre de contaminantes de natureza química, física ou biológica. A agricultura orgânica vem ganhando cada vez mais reconhecimento social, político e científico em todo o mundo por estar fundamentada na aplicação de estratégias agroecológicas, mediante o uso de insumos locais (MELO et al., 2009)

Devido a sua riqueza em nutrientes, é considerado um dos frutos mais consumidos devido a suas características organolépticas. Além disso, é considerado um alimento funcional devido a seu alto valor nutritivo e a presença de compostos com propriedades antioxidantes (FERRARI,2008).

Esses frutos vêm sendo amplamente estudados, tanto pelos aspectos positivos relacionados com as características de alimento funcional e também pelos aspectos negativos, ligados ao sistema intensivo de produção baseado no uso de agroquímicos (FERRARI,2008).

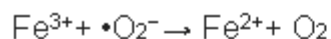
1.2 Ferro

O ferro é um dos elementos químicos mais abundantes na crosta terrestre, considerado um elemento essencial para a vida humana, pois está ligado a processos para a manutenção da vida como, por exemplo, o transporte de oxigênio, síntese da hemoglobina e ainda está relacionado a processos enzimáticos (OKADA,2003). No corpo humano, o ferro é encontrado em dois principais reservatórios, são eles: 1) ferro funcional: encontrado na hemoglobina, mioglobina e enzimas; 2) ferro não funcional: armazenado no fígado, no baço e na medula óssea. Também é possível classificá-lo em ferro heme e ferro não - heme. O ferro heme é o encontrado na hemoglobina, mioglobina e algumas enzimas, já o ferro não-heme é aquele que é proveniente predominantemente dos alimentos de origem vegetal, em alguns alimentos de origem animal e nas enzimas não heme (PLANTIER,2010). O ferro presente na hemoglobina está na sua forma ferrosa e se liga ao oxigênio efetuando o seu transporte para todos os tecidos corporais (SOUSA, 2004).

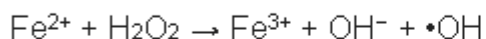
A deficiência nutricional de ferro é amplamente distribuída no mundo, afetando tanto as populações dos países desenvolvidos como aquelas dos países em desenvolvimento (TIRAPGUI, 2002). Devido à participação do ferro em vários processos e funções no organismo humano, sua deficiência gera desordens e disfunções como, por exemplo, anemias e processos similares que já aparecem como o problema nutricional mais frequente do mundo, afetando em torno de 24% da população (RÍOS-CASTILLO et al., 2014).

O ferro é essencial a manutenção da vida nos seres vivos, entretanto ele é um elemento potencialmente tóxico quando em excesso, podendo causar danos aos tecidos ao catalisar a produção de radicais livres (BRIDGES, 1992).É interessante elencar que o potencial tóxico do ferro está relacionado a sua principal propriedade biológica, a capacidade de existir em dois estados de

oxidação: ferroso (Fe^{2+}) e férrico (Fe^{3+}), o que faz com que possa participar como co-fator de enzimas envolvendo reações de oxidação-redução e tornando-o ainda promotor de reações de radicais livres como a de Fenton e de Haber-Weiss, as quais resultam fenômenos de estresse oxidativo (ANDREWS, 1998; SIQUEIRA et al., 2006).



Reação de Fenton



Reação de Haber-Weiss



A formação de tais espécies de radicais livres pode promover a oxidação de diversas moléculas e organelas, produzindo danos celulares (SIQUEIRA et al., 2006).

Uma das principais fontes de ferro são alimentos de origem animal tais como: carnes vermelhas (especialmente fígado), gema de ovo, carne de frango e de peru e alguns alimentos de origem vegetal sendo eles: batata, vegetais verde-escuros e frutas secas (TOWNSEND, 1994).

Embora menos comum, o excesso de ferro pode causar alguns problemas na saúde humana, como: intoxicação principalmente em crianças, podendo ocorrer a morte por colapso respiratório (WARDLAW e KESSEL, 2002).

Com a presença deste elemento em diversas matrizes, tanto alimentícias, ambientais e biológicas, se faz necessário o conhecimento do papel que cada estado de oxidação do ferro exerce na saúde humana. Assim, se torna necessário o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de realizar a especiação química, porque assim pode descrever a mobilidade, essencialidade, toxicidade e biodisponibilidade de um determinado elemento, ressaltando suas implicações principalmente na saúde humana.

Tendo em vista a complexidade das amostras de tomate e das diversas dificuldades que podem surgir no processo analítico em termos de perda de analito ou contaminação, faz-se necessário a utilização de métodos de preparo

de amostras adequados para determinação elementar e/ou especiação química.

1.3 Preparo de amostras

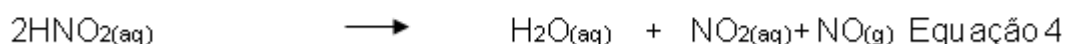
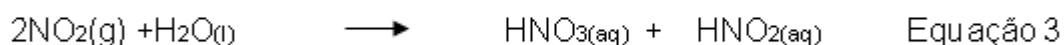
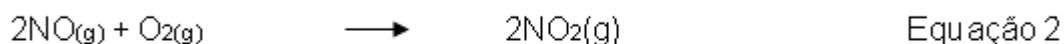
O preparo de amostra é uma etapa crucial em uma sequência analítica, e depende da natureza das amostras, da concentração dos analitos, da técnica que será utilizada para a determinação para que no final sejam alcançadas uma boa precisão e exatidão nos resultados.

Como várias técnicas analíticas permitem apenas a introdução de amostras na forma de solução, torna-se necessária a solubilização de amostras sólidas para posterior determinação elementar empregando técnicas espectrométricas. Esta conversão pode ser dividida em procedimentos de tratamento por via úmida e por via seca (KRUG,2008).

A decomposição das amostras por via úmida é denominada digestão ou simplesmente, decomposição (SOUSA et al.,2015). Nos procedimentos de tratamento de amostra por via úmida costuma-se dissolver ou decompor uma amostra sólida utilizando-se ácidos minerais diluídos ou concentrados ou ainda misturas de ácidos em sistemas abertos ou fechados, com ou sem aquecimento (PERONICO,2014). ’

Um dos ácidos mais utilizados é o ácido nítrico (HNO_3), por ser um ácido mineral oxidante, e por seus produtos de reação serem nitratos solúveis. Seu poder oxidante é moderado e este ácido pode ser utilizado em temperaturas um pouco acima do seu ponto de ebulição que é de $121\text{ }^\circ\text{C}$ (quando sob refluxo ou sistema fechado) (SOUSA et al.,2015).

Uma mistura bastante empregada é aquela entre HNO_3 e H_2O_2 devido ao caráter oxidante do peróxido de hidrogênio, que em uma digestão acaba fornecendo O_2 para a reação, aumentando a eficiência da digestão. Este processo se baseia no ciclo de regeneração do ácido nítrico, como pode ser visto nas reações abaixo (CASTRO,2009):



O processo se baseia na reação entre o ácido nítrico diluído e a matéria orgânica na amostra utilizada, na qual gera o óxido nítrico (Equação 1), o qual reage com o oxigênio presente na fase gasosa gerando dióxido de nitrogênio (Equação 2). O dióxido de nitrogênio sofre reação de desproporcionamento em meio aquoso gerando ácido nítrico e ácido nitroso (Equação 3). Após esta etapa, o ácido nitroso se decompõe em óxido nítrico (equação 4), reage com o oxigênio da fase gasosa (Equação 2), deste modo ocorre o ciclo de regeneração do ácido nítrico que acaba aumentando a eficiência da digestão. (DIONISIO,2013).

As amostras de tomate possuem muita água e uma grande quantidade de matéria orgânica em sua composição, sendo necessário um preparo de amostra eficiente e posterior determinação do analito de interesse. Assim, faz-se necessário investigar o preparo da amostra, que é a etapa mais crítica, demorada e laboriosa, na qual os analitos presentes nas amostras devem estar em uma forma adequada para posterior determinação (PRIEGO-CAPOTE; CASTRO, 2004, BRESSY,2011).

Fraga (2013) propôs uma metodologia analítica para determinação de As, Cd, Pb em amostras de arroz. Para isso foi utilizado o trapeamento criogênico associado com HG-AAS. As amostras foram moídas em moinho criogênico e posteriormente peneiradas, após esta etapa foi realizada a decomposição das amostras onde foram pesados cerca de 0,125 g e transferida para frascos de PTFE (politetrafluoretileno) e adicionada 1,25 mL de HNO_3 (14 mol L^{-1}) e 2 mL de H_2O_2 ($30\% \text{ m m}^{-1}$) e levados a bloco de aquecimento por 5 horas a 160°C . Os autores concluíram que este preparo foi eficiente para determinação dos analitos estudados e as concentrações destes encontradas nas amostras de arroz, estão de acordo com a legislação brasileira (FRAGA,2013).

Teixeira (2014) realizou um estudo para determinação da concentração de ferro total em diferentes matrizes tais como feijão, espinafre, brócolis, beterraba, melado, fígado bovino, cupuaçu e açaí. O preparo de amostra foi realizado utilizando 500 mg de amostras, adição de 7 mL de HNO_3 (14 molL^{-1}) e 1 mL de H_2O_2 30%(m m⁻¹), em seguida a mistura foi colocada em um bloco digestor, as concentrações de ferro foram determinadas por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) (TEIXEIRA,2014).

Em 2012, Vila Nova et al. realizaram um estudo para determinação de Fe, Mn, Ni, Cu, Co, Mg, Zn, Ca, Mo e Se em amostras secas de tomates orgânicos por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) com o intuito de investigar o efeito da digestão de minerais. Foram avaliados três procedimentos de preparo de amostra: (1) digestão via úmida com $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$, (2) digestão via seca e (3) digestão via úmida com HCl. Os resultados mostraram que o método de digestão com $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ foi eficiente para a determinação de Ca, Mg, Se e Zn. A digestão com ácido clorídrico foi similar à digestão com $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ e por calcinação para o Mn. A digestão dos conteúdos minerais utilizando HCl mostrou ser a mais promissora, pela rapidez e simplicidade, aliados ao baixo nível de risco no manuseio e contaminação ambiental (VILA NOVA et al.,2012).

Na **Tabela 1.3** são listados alguns trabalhos, que se encontram na literatura, para diferentes formas de digestão para diferentes amostras e analitos.

Tabela 1.3: Diferentes procedimentos de digestão para a determinação de ferro em diferentes amostras

Amostra	Preparo de Amostra	Elemento Determinado	Técnica	Referência
Banana, batata, cenoura e soja.	Digestão com HClO ₄ 60% (mm ⁻¹) e HNO ₃ 14 mol L ⁻¹	Ferro total	Espectrofotometria UV/Vis	Peng et al., 2014
Feijão mungo (<i>Phaseolusaureus</i>) e grama (<i>Cicerarietinum</i>)	Digestão com HNO ₃ 14 mol L ⁻¹ + HClO ₄ 60% (mm ⁻¹)	Ferro(III) total	Espectrofotometria de nanodropo (NDS)	Verma et al., 2016
Solos	Digestão com HF 3 mol L ⁻¹ e HClO ₄ 60% (mm ⁻¹)	Ferro(II) total	Espectrofotometria UV/Vis	Kassem e Amin 2013
Café solúvel	Digestão com HNO ₃ 14 mol L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 30% (m m ⁻¹).	Ca, Fe, Mg e Mn.	FAAS	Pohlet al., 2014
Moluscos bivalves	Digestão em bloco digestor com HNO ₃ a 65% (m m ⁻¹) e H ₂ O ₂ 30% (v / v).	Ca, K, Mg, Na, P, S, Fe e Zn.	Fluorescência de raios X dispersiva de comprimento de onda (WDXRF).	Costa et al., 2017
Pães	Digestão usando HNO ₃ (65% (m m ⁻¹)) e H ₂ O ₂ 30% (m m ⁻¹).	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn.	Espectrometria de emissão atômica com plasma de microondas (MIP-AES).	Ozbek e Akman, 2016

1.4 Especificação química

A especificação química é definida pela IUPAC (do inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*) como sendo a “atividade analítica capaz de identificar e ou quantificar as espécies químicas de um elemento químico presente em uma amostra”. Algumas características químicas dos metais como sua toxicidade, biodisponibilidade e essencialidade dependem da forma química que esse metal se encontra presente na amostra (IUPAC, 2000).

De acordo com Ure (1991) especificação química é definida como "o processo de identificação e quantificação das diferentes formas ou fases em que um elemento está presente em um material" ou como "a descrição das

quantidades, tipos de espécies, formas ou fases presentes em um material". Dessa forma, a especiação química assume uma grande importância ambiental e nutricional (BISINOTI e JARDIM, 2004; PIRES et al., 2011).

Através de uma análise de especiação química, pode-se obter importantes informações, tais como:

- i. Diferenciar os estados de oxidação;
- ii. Diferenciar a coordenação entre íons, formas catiônicas, neutras, protonadas e desprotonadas;
- iii. Diferenciar espécies monoméricas e poliméricas;
- iv. Avaliar a estabilidade entre as espécies;
- v. Avaliar a biodisponibilidade da espécie;
- vi. Avaliar a toxicidade de cada espécie;
- vii. Caracterizar os diferentes graus de associações homogêneas e heterogêneas dos metais com componentes naturais (KOTAS e STASICKA, 2000, IUPAC,2000).

Em alimentos a questão da biodisponibilidade é de grande importância. No caso do ferro, o efeito da solubilidade em água, estado de oxidação e a extensão de formação de complexos afetam sua biodisponibilidade. É bem conhecido que o Fe (II) é mais acessível do que o Fe (III), devido a baixa solubilidade do último no intestino (QUINTEROS, 2001)

Mantovani, 1989, realizou análise de especiação química de ferro em amostras de concentrado de tomate. Para a determinação de ferro (II), a amostra foi tratada com 5 mL de HCl 2% ($m\ m^{-1}$) e aquecida em forno micro-ondas, e a determinação dessa espécie foi realizada utilizando como agente complexante a 2-2dipiridila e a quantificação foi feita em espectrofotômetro de absorção molecular no UV/Vis no comprimento de onda observado de 510nm (MANTOVANI,1989).

Abreu et al., em 2010, realizaram um estudo de especiação química de ferro em extratos aquosos obtidos na peroxidação de carvões brasileiros tratados com H_2O_2 10% ($m\ m^{-1}$) e H_2O . A especiação de ferro foi realizada utilizando o método da 1,10- fenantrolina, onde o complexo formado foi medido no comprimento de onda de 510 nm. (ABREU et al.2010).

Soares et al.,2010, realizaram um procedimento de especiação química de cromo em amostras de pães. O procedimento para especiação de Cr VI foi realizado utilizando 1,0 g de amostra seca e uma solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹, em seguida a mistura foi colocada em agitação oscilante por 7 h. Após esse período, foi adicionado 1 mL de solução de NH₄NO₃ 1 mol L⁻¹, e a amostra foi agitada brevemente e depois centrifugada por 30 min a 12500 rpm e posterior determinação por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) (SOARES et al.,2010).

Pelizaro et al. (2007) especiarão química de ferro em amostras de sangue usando análise em injeção em fluxo, para tal as amostras tiveram as proteínas precipitadas com ácido tricloroacético na proporção 1:1(amostra/ácido) depois foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm o sobrenadante foi recolhido e inserido em sistema em fluxo. Uma solução de 1,10 fenantrolina que é agente complexante foi utilizada para determinação espectrofotométrica em 512 nm (PELIZARO et al.2007).

Na **Tabela 1.4** lista-se alguns trabalhos realizados para especiação química de diferentes espécies em diferentes amostras.

Tabela 1.4: Diferentes procedimentos de extração para especiação química

Amostra	Preparo de Amostra	Analito	Técnica	Referência
Água do mar	HCl 0,1mol L ⁻¹	Fe(II)	Espectrofotometria UV/Vis	Lin et al.,2018
Vinhos	Extração com Br-PADAP*.	Fe(II)	Espectrofotometria UV/Vis	Ferreira et al.,2007
Água da torneira	Extração com tolueno(C ₇ H ₈).	Pt (IV)	GFAAS	Rastislav et al.,2017
Cogumelos	Extração com HCl.	As(III)	Espectroscopia de absorção atômica de geração de hidreto (HGAAS).	Gonzalvez et al.,2009

* 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol

Analisando a Tabela1.4 observa-se que existem diferentes trabalhos realizados com o tema da especiação química, pois a determinação dessas diferentes espécies nos fornece maiores conhecimentos sobre as diferentes

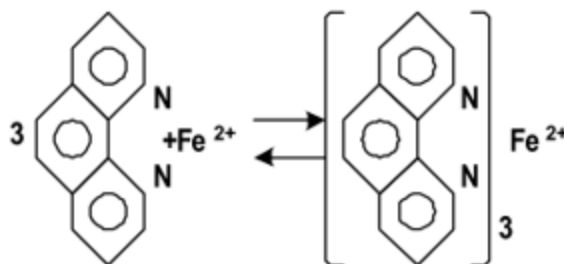
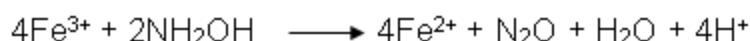
propriedades como: toxicidade, biodisponibilidade e sua essencialidade, pois estas dependem da forma química que o metal se encontra presente na amostra.

1.5 Técnicas para especiação química de ferro

Na literatura, existe uma variedade de técnicas analíticas que são comumente empregadas para a determinação de ferro em diferentes tipos de amostras, tais como: espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (BRESSY,2011), espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) e em forno de grafite (GFAAS), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (FREITAS,2014), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), quimiluminescência (Rose e Waite,2002), voltametria (Ghoneim,2010) e espectrofotometria UV/Vis (Peng et al., 2014).Existem então várias técnicas que podem ser usados para a determinação de ferro , o método da espectrofotometria na região UV-VIS é muito utilizado nas técnicas analíticas, devido o custo relativamente baixo, sensibilidade e precisão nos resultados (ROCHA et al.,2004).

A metodologia utilizada comumente na espectrofotometria na região UV-Vis consiste na aplicação do método colorimétrico que se baseia na reação da complexação do Fe (II) com a 1,10-fenantrolina, quando se utiliza um agente redutor nesse caso o cloridrato de hidroxilamina levando a redução de Fe (III) para Fe (II), como pode ser vista através da reação apresentada na Figura 1.1 (Breitkreitz et al.,2014).

Figura 1.1-Reação de complexação entre a 1,10-fenantrolina e o ferro (II)

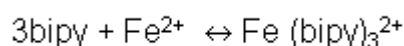


Fonte: Breitreitz et al.,2014

O ferro é solubilizado, reduzido ao estado ferroso Fe (II) por ebulição com ácido e hidroxilamina (H_3NO) e tratado com 1,10 fenantrolina. Cada três moléculas de 1,10-fenantrolina complexam um íon ferroso para formar um complexo vermelho-alaranjado. A solução colorida obedece a lei de Lambert-Beer; sua intensidade independe do pH se ele estiver na faixa de 3,0 a 9,0. Um pH entre 2,9 e 3,5 garante um rápido desenvolvimento da cor na presença de um excesso de fenantrolina (SKOOG et al., 2004).

Borges em 2016 propôs um estudo para determinação quantitativa de Fe (II) em farinhas enriquecidas de trigo. As amostras foram preparadas com adição de 3 mL de HCl ($37\% \text{ m m}^{-1}$), seguida da adição de 2 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina ($\text{HONH}_2\cdot\text{HCl}$) $5\% \text{ (m m}^{-1}\text{)}$, 2 mL de solução de acetato de sódio (CH_3COONa) 2 mol L^{-1} e 4 mL de solução de 1,10-fenantrolina a $0,25\% \text{ (m/v)}$. Em seguida realizou-se a leitura no comprimento de onda de 505 nm. Os autores concluíram que está sendo realizado o enriquecimento das farinhas, entretanto os valores encontrados para algumas amostras apresentam valores abaixo do esperado e determinado pela Legislação Brasileira.

Outro método descrito na literatura para a determinação colorimétrica do ferro é baseado na reação de complexação com a 2,2'-bipiridina e o Fe (II), com posterior determinação espectrofotométrica na região do visível (AOAC,1995). A reação característica do método é representada pela equação:



Teixeira 2006 realizou um estudo de determinação de ferro em etanol. Cerca de 100 mL de cada amostra foram aquecidos até secar. O resíduo obtido foi dissolvido com 1 mL de HCl 12 mol L⁻¹ posteriormente diluído para 50 mL com água em balão volumétrico. Foi determinado por espectrofotometria no comprimento de onda de 523 nm. Os resultados mostraram que a 2,2'-bipiridina pode ser usada para a determinação com limite de detecção de 11 µg L⁻¹ e coeficiente de variação de 1,9 % na determinação de ferro neste tipo de amostra.

Em 2011, Kramer e Falcão realizaram a determinação de ferro em farinhas fortificadas de trigo com o objetivo de realizar a determinação de ferro. Para isso foi utilizada a α-α'-dipiridila e a determinação por espectrofotometria no comprimento de onda de 510 nm. Foram analisadas amostras de dez marcas diferentes, e o resultado obtido em todas as amostras apresentou conformidade com a legislação por obterem valores acima de 4,2 mg de ferro.

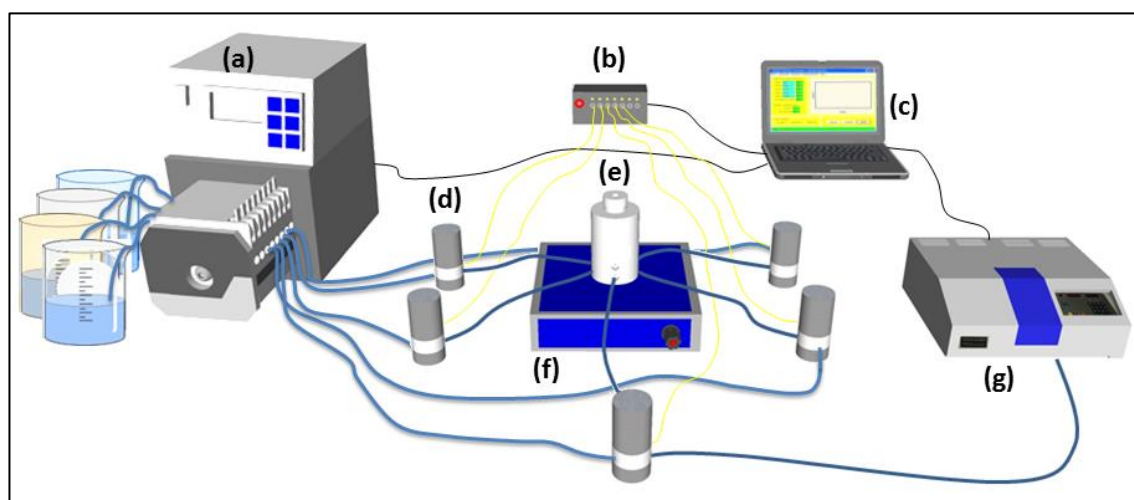
Faustino et al. em 2013 realizaram a determinação de ferro em amostras de solo com o reagente 2,2'-bipiridina. As amostras de solos foram secas em estufa a 80° C por 30 minutos. O preparo de amostra consistiu em pesar 500 mg de amostra que foram digeridos em um sistema de refluxo com H₂SO₄ 8 mol L⁻¹, sob agitação e aquecimento de 80°C durante 60 min. A determinação foi realizada no comprimento de onda de 522 nm, e a concentração de ferro variou de 1 a 12 mg L⁻¹. Os resultados da quantificação realizada encontram-se em concordância com o que reporta a literatura científica: as cores dos solos são predominantemente reflexo dos teores de ferro presentes em sua constituição química e os aumentos desses teores ocasionam o aumento na intensidade das colorações (FAUSTINO et al., 2013). Visto que os métodos de especiação química de ferro descritos na literatura são procedimentos lentos e que ocasionam grandes despesas, os analisadores em fluxo-batelada (HONORATO, 1999) surgem como uma nova alternativa, combinando características favoráveis dos analisadores em fluxo com a precisão e a exatidão dos procedimentos em batelada, análises rápidas, precisas e exatas com baixo custo e redução do consumo de reagentes.

1.6- Analisadores em fluxo batelada

Os analisadores automáticos em fluxo batelada foram propostos em 1999 por Honorato et al e possuem características inerentes aos sistemas em fluxo e em batelada. Como nos analisadores automáticos em fluxo a aspiração, bombeamento, transporte dos reagentes e das amostras e o monitoramento do sinal analítico, ocorrem em fluxo, porém a amostra é processada em uma câmara, como nos analisadores em batelada, antes de ser aspirada em direção ao detector. Por terem as características favoráveis dos analisadores em fluxo e em batelada, esses analisadores apresentam boa precisão e exatidão, alta velocidade analítica, baixo custo por análise, baixo consumo, manipulação e contaminação de reagentes e amostras e geração de pouco resíduo para o meio ambiente. (HONORATO, 1999, LIMA, 2004).

Uma das principais características desses analisadores é a câmara de mistura onde ocorrem as reações químicas do processo e também a homogeneização das soluções. Na Figura 1.2 descreve-se os principais componentes de um analisador em fluxo batelada.

Figura 1.2: Principais componentes de um analisador automático do tipo FBA.



Fonte: Araújo et al.,2012

(a) Bomba peristáltica; (b) acionador de válvula; (c) computador; (d) válvulas solenoides de três vias; (e) câmara de mistura; (f) agitador magnético; (g) detector.

A bomba peristáltica (**Figura 1(a)**) serve para fazer a propulsão dos fluídos (reagentes e amostras) até a câmara de mistura para que ocorra as reações pertinentes à análise. O acionador de válvula (**Figura 1(b)**) controla as válvulas solenóides. O computador (**Figura 1 (c)**) serve para o controle do procedimento analítico, aquisição e tratamento dos dados, garantindo a reprodutibilidade e velocidade nas aplicações. As válvulas solenóides (**Figura 1(d)**) são utilizadas para direcionar os fluidos que são levados para a câmara de mistura e também realizar o direcionamento dos fluidos para o descarte. Na câmara de mistura (**Figura 1(e)**) ocorre a maioria dos procedimentos analíticos, como por exemplo, a adição, homogeneização, reações e acondicionamento dos fluidos, preparo de soluções de calibração (ANDRADE 2012). O agitador magnético (**Figura 1(f)**) a finalidade de realizar a homogeneização das soluções que se encontram na câmara de mistura. O sistema de detecção (**Figura 1(g)**) pode ou não ser acoplado à câmara de mistura, conforme a necessidade ou configuração requerida do sistema.

Uma das vantagens destes sistemas é que permite a adaptação de uma webcam para a aquisição de imagens ou vídeos digitais na própria câmara de mistura e reação como resposta do sinal analítico (LIMA, 2016).

Os analisadores em fluxo-batelada têm sido utilizados em diversos procedimentos experimentais tais como: titulação (OLIVEIRA,2006), análise screening (LIMA,2004), adição de padrão (SILVA,2006), extração líquido-líquido (LIMA,2012), análise nefelométrica (ACEBAL,2010), turbidimétrica (LIMA,2011), quimiluminescente (GRÜNHUT,2011), fluorescente (ANDRADE,2016) e fotométrica (SILVA,2010).

Nóbrega, em 2013, desenvolveu um analisador em fluxo-batelada para a determinação de Fe (III) em óleos comestíveis sem pré-tratamento de amostra. A reação ocorre entre os íons Fe (III) e o tiocianato solubilizado em meio orgânico. O complexo vermelho formado foi monitorado utilizando um diodo emissor de luz e um fototransistor acoplado ao interior da câmara de mistura por meio de fibras ópticas. As soluções-padrão foram preparadas em linha. Os resultados obtidos foram comparados com o método de referência, e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ao se aplicar o teste t pareado com nível de confiança de 95%. A frequência analítica foi de 95 h⁻¹, o

limite de detecção foi $0,004 \text{ mg kg}^{-1}$ e o limite de quantificação foi de $0,013 \text{ mg kg}^{-1}$.

1.6.1-Analisadores: Detecção por imagem digital

O conceito de imagem remete ao comportamento primitivo do ser humano, associando sempre a aspectos relativos à percepção e sensação visual (LAND, 1977). Uma imagem é uma representação da interação e reflexão entre luz e matéria e pode ser reproduzida levando como parâmetro principal a simulação da visão humana (LAND, 1983).

Os sistemas automáticos em fluxo e em batelada, empregando métodos baseados em imagem digital, apresentam-se como uma recente estratégia com grande potencial, especialmente em química analítica quantitativa (ANDRADE et al. 2013). A possibilidade de monitoramento *in line*, a capacidade de avaliar parâmetros como intensidade de cor, distribuição na superfície contribuem para essa grande aplicabilidade.

Ao selecionar uma determinada área na imagem é possível obter e expressar um valor matemático que pode ser utilizado para construir uma curva analítica assumindo uma relação linear entre a resposta analítica e a concentração do analito e posteriormente realizar a determinação da concentração do analito nas amostras (LIMA et al., 2013; LIMA et al., 2014).

Gaião e colaboradores em 2006 propuseram pela primeira vez o uso de imagem digital, usando o sistema de cor RGB, para realizar uma titulação. A estratégia foi aplicada à determinação de alcalinidade total em água mineral e água de torneira. Nesse método, utilizou-se uma webcam como detector para determinação do ponto final em titulações de neutralização. Os resultados das determinações foram similares aos obtidos por titulação espectrofotométrica.

Em 2013 Andrade et al., realizaram um estudo para a determinação de Cr(VI) e Al(III) utilizando uma análise por imagens digitais. Para isso, os autores utilizaram uma webcam para aquisição das imagens digitais, estas foram analisadas através de um programa *ImageJ* que realiza uma varredura

de todos os pixels (coluna por coluna) para extrair as componentes RGB de cada pixel. Os valores obtidos foram todos estatisticamente satisfatórios, com 95% de confiança.

Em 2017, Siqueira et al. propuseram um titulador em fluxo-batelada utilizando uma webcam que gravava um filme digital durante a adição do titulante em uma câmara de mistura, registrando as variações de cor decorrentes das reações químicas entre o titulante e amostra no interior de câmara. O método foi aplicado na análise de águas minerais e os resultados foram comparados com a titulação clássica, não apresentando diferenças estatisticamente significativas com aplicação do teste t pareado a 95% de confiança. O método proposto foi capaz de processar até 71 amostras por hora e a sua precisão foi confirmada pelos valores de desvio padrão relativos (DPR), sempre inferiores a 2,4% para dureza total e 1,4% para alcalinidade total (SIQUEIRA et al.,2017).

Lima e colaboradores em 2014 desenvolveram 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. O método analítico proposto inclui uma nova estratégia de pré-tratamento da amostra que consiste na disponibilização on-line do ferro total por meio de extração ácida em fase única. 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. A robustez do método foi avaliada por comparação intra- e interdia dos resultados obtidos e empregando o método de referência com detecção por absorção atômica em forno de grafite em um nível de 95% de confiança estatística.

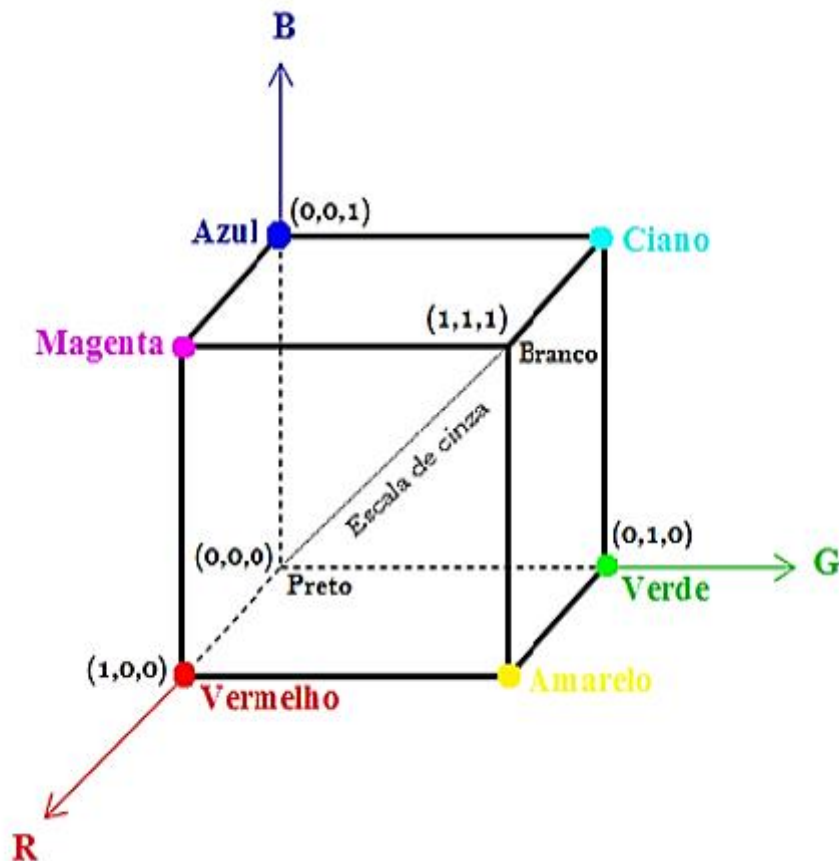
Em 2014, Tavares et al. propuseram um micro analisador em fluxo batelada (μ FBA) para determinação fotométrica de sulfitos em bebidas. A microcâmara do μ FBA foi construída a partir da resina comercial uretana-acrilato e polimerizada em foto expositora de radiação ultravioleta. Os resultados obtidos pelo μ FBA proposto comparado ao método convencional, não apresentou diferenças estatisticamente significativas (TAVARES et al.,2014).

1.7. Modelo de cor RGB

A cor é uma das principais características de uma imagem digital e, por esta razão, é uma propriedade de suma importância no processamento e na análise de imagens digitais (LIU,2003). O modelo de cor RGB baseia-se na tricromaticidade do sistema visual humano, em que todas as cores do espectro visível percebidas pelo olho humano ocorrem pela combinação, em diferentes proporções, dos comprimentos de onda em torno do vermelho, verde e azul (BATISTA,2014).

Azevedo e Conci (2003) definem que o modelo de cor RGB é formado pelas cores vermelho (R), verde (G) e azul (B) é baseado em coordenadas cartesianas e pode ser representado por um cubo (Figura 1.3). Representando a escala de cinza, a diagonal principal do cubo, possui quantidades iguais de cores primárias que vão do preto ao branco. Dentro dos limites deste cubo, cada ponto colorido é representado por (R, G, B), onde os valores variam de zero a um valor máximo (BERTOLINI,2010). Cada ponto do sistema de coordenadas tridimensional corresponde a uma determinada cor do espectro visível, por exemplo, no modelo de cores RGB, o branco é formado pela combinação das componentes R, G e B em máxima intensidade, (255, 255, 255), já o preto é a ausência de cor, portanto (0, 0, 0)(AZEVEDO et al.,2003,ALBUQUERQUE,2002).

Figura 1.3: Representação gráfica do modelo de cor RGB



Fonte: <http://imgarcade.com/1/rgbcolor-cube/>.

Benedett,2013 afirma que “a maioria dos métodos analíticos baseados no uso de imagens digitais emprega o modelo de cores RGB”.O modelo de cor RGB pode ser representado pelo subespaço de um sistema de coordenadas cartesianas tridimensional, onde cada eixo de coordenada representa a cor vermelha, verde ou azul.

Em uma imagem digital, cada pixel carrega uma informação de cor chamada de profundidade de cor. Comumente, no modelo de cor RGB, a profundidade de cor de um pixel é de 24 bits, sendo 8 bits para cada componente R, G e B, que corresponde a 256 diferentes tonalidades para o vermelho (R), verde (G) e azul (B), gerando aproximadamente 16,7 milhões de possibilidades de tons diferentes de cor.

Os métodos analíticos baseados em imagem digital geralmente utilizam o sistema de cor RGB (LYRA ,2008), que utiliza as diferentes combinações dos valores individuais das cores primárias (vermelho, verde e azul), variando de 0

a 255 (8 bits), para simular todas as cores existentes no espectro da região do visível.

Em 2016, Siqueira desenvolveu um analisador FBA para a determinação de dureza e alcalinidade total em águas minerais usando o modelo de cor RGB, nesse caso a componente R foi escolhida, pois apresentou um comportamento menos ruidoso e com perfil condizente com uma curva de titulação e com nitidez apropriada para quantificação, a metodologia proposta demonstrou ser uma ferramenta bastante útil (SIQUEIRA, 2016).

Em 2013, Almeida propôs um método quimiluminescente baseado em imagem digital que utiliza um analisador FBA para determinação de Cr(VI) em águas. O sistema FBA proposto utilizava uma webcam com sensor CCD (dispositivo de carga acoplada) para aquisição das imagens digitais geradas de acordo com o sistema de cor RGB. Os resultados obtidos pelo método proposto não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ao nível de confiança de 95% em comparação com o método de referência (ALMEIDA, 2013).

Maleki, et al. propuseram o uso de imagem digital para a determinação simultânea de Al(III) e Fe(III) em açós usando cromo azurol S como reagente cromogênico. Para isso utilizaram uma câmera digital como sistema de detecção e para captura das imagens digitais. Os valores individuais de R, G e B, obtidos das imagens digitais, foram correlacionados às concentrações de Al(III) e Fe(III), utilizando um modelo baseado em redes neurais artificiais. (MALEKI et al., 2004).

Recentemente, Pessoa et al. desenvolveram uma metodologia analítica para determinação do teor de cobre e de etanol em amostras comerciais de cachaça. O método foi baseado na análise de imagens digitais de spot test realizado com os analitos, as quais foram capturadas por uma câmera fotográfica, em um sistema construído para esta finalidade. O princípio do método é baseado na medida das tonalidades obtidas após a ocorrência da reação colorimétrica, empregando o modelo de cor RGB, cuja componente R variou proporcionalmente com a concentração do analito (PESSOA et al., 2017).

Capítulo 2

Objetivos

2 Objetivos

2.1.1 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia para a especiação de ferro em amostras de tomates utilizando um analisador em fluxo-batelada com o auxílio de uma webcam como detector.

2.1.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o procedimento de preparo de amostra para decomposição de tomates;
2. Utilizar um analisador em fluxo-batelada com detecção através do uso de uma webcam, para a especiação química de ferro;
3. Desenvolver um programa para o controle das válvulas, leitura do sinal analítico e procedimentos analíticos;
4. Avaliar os parâmetros ótimos de fluxo do FBA proposto como: Vazão dos canais de bombeamento das válvulas solenoides, rotação da bomba peristáltica
5. Validar o método proposto e testar o nível de confiabilidade da metodologia proposta com base nos parâmetros de desempenho usuais na química analítica;
6. Comparar os teores de Ferro (II) e Ferro (III) nas amostras de tomates advindas do manejo convencional e orgânico;
7. Aplicar a metodologia

Capítulo 3

Experimental

3.Experimental

3.1 Reagentes e Soluções

Todas as soluções e amostras foram preparadas empregando reagentes de grau analítico e água recém deionizada com um sistema Milli-Q Plus® (Millipore). Após a deionização, a água apresentava resistividade específica $>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$. Foram utilizados os seguintes reagentes:

- Ácido nítrico (Merck, Alemanha) 65% m m⁻¹

Foi preparada uma solução de ácido nítrico 7,0 mol L⁻¹ pela diluição apropriada da solução concentrada.

- Peróxido de hidrogênio 30% m m⁻¹ (Dinâmica, Diadema)
- Ácido ascórbico P.A. (Vetec química, Rio de Janeiro)
- Ácido clorídrico P.A. 37% m v⁻¹ (Neon)

Foi preparada uma solução de ácido clorídrico 6,0 mol L⁻¹ pela diluição da solução concentrada.

- Solução tampão acetato

A solução tampão acetato de concentração 0,10 mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 8,3 g de acetato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro) em água e adicionado 12 mL de ácido acético glacial P.A. (Neon). A solução foi então transferida para um balão volumétrico de 100 mL e seu volume completado com água ultrapura.

- Solução estoque de Fe (II)

Foi preparada uma solução estoque de 100,0 mg L⁻¹ de Fe (II), dissolvendo-se 350,8 mg de sulfato ferroso amoniacal hexahidratado (Synth, Diadema) em um béquer de 250 mL com água ultrapura contendo 10 mL de uma solução de ácido sulfúrico 50% (v v⁻¹) transferindo-se para um balão volumétrico de 500 mL e completando o volume com água ultrapura até aferição do menisco.

- 1,10 fenantrolina (Sigma-Aldrich, China)

A solução de 1,10 fenantrolina 0,1% (mv⁻¹) foi preparada pela adição de 100 mg do reagente em 100 mL de água ultrapura contendo 2 gotas de HCl concentrado para total dissolução da mistura.

Preparou-se uma solução estoque de 100,0 mg L⁻¹ de Fe (II), dissolvendo-se 350,8 mg de sulfato ferroso amoniacal hexahidratado em béquer de 250 mL com água ultrapura contendo 10 mL de uma solução de ácido sulfúrico 50% (v/v) e transferiu para balão volumétrico de 500 mL completando o volume com água deionizada até aferição do menisco.

3.2 Equipamentos

Para a secagem das amostras foi utilizada uma estufa digital com circulação de ar, da marca Sterilifer, modelo SX-300 DTME.

Uma balança analítica da marca Shimadzu modelo AY220 foi utilizada para pesagem das amostras, reagentes e para a calibração das válvulas solenoides usadas no FBA proposto.

Para as medidas das concentrações de ferro total nas amostras foi usado um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP- OES), com câmara de nebulização Sturman-Master e nebulizador V-Groove, com visão axial VISTA PRO (Varian, Mulgrave, Austrália), simultâneo, equipado com um detector de estado sólido com arranjo CCD, localizado na UFBA-BA

Na Tabela 3.1 encontram-se as características e parâmetros operacionais deste equipamento.

Tabela 3.1: Características e parâmetros do instrumento usado nas determinações por ICP-OES.

Parâmetros e características	
Rádio-freqüência do gerador (kHz)	1,5
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,70
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Tempo de integração (s)	2,0
Tempo de estabilização (min)	15
Tempo de leitura (min)	1
Replicatas	3
Nebulizador	V-Groove
Câmara de Nebulização	Sturman-Master
Detector	CCD
Linhas (nm)	Fe ^{II} 238,204

II – Linha iônica

Um espectrofotômetro UV-Vis Hewlett-Packard (HP) com arranjo de fotodiodos, modelo 8453, foi utilizado para as medidas de absorvância necessárias para a determinação pelo método de referência, e uma cubeta de quartzo com um volume interno de aproximadamente 4,0 mL e um caminho óptico de 1,0 cm.

3.3 Amostras

Foram adquiridas amostras de tomate em feiras livres e supermercados de João Pessoa. As amostras utilizadas neste trabalho foram as seguintes:

Tabela 3.2: Amostras utilizadas nesta pesquisa

Amostras	Variedade do tomate
A01	Tomate italiano orgânico
A02	Tomate rasteiro
A03	Tomate cereja orgânico
A04	Tomate cereja
A05	Tomate italiano
A06	Material de referência certificado*

*NIST 1547(folhas de pessegueiros)

3.3.1 Material de referência certificado

Para avaliar a metodologia do preparo de amostra proposta foi utilizado um material de referência certificado NIST 1547 (folhas de pessegueiro). Este material foi submetido ao mesmo preparo que amostra que foi empregado nas amostras de tomate.

3.4 Descontaminação dos materiais

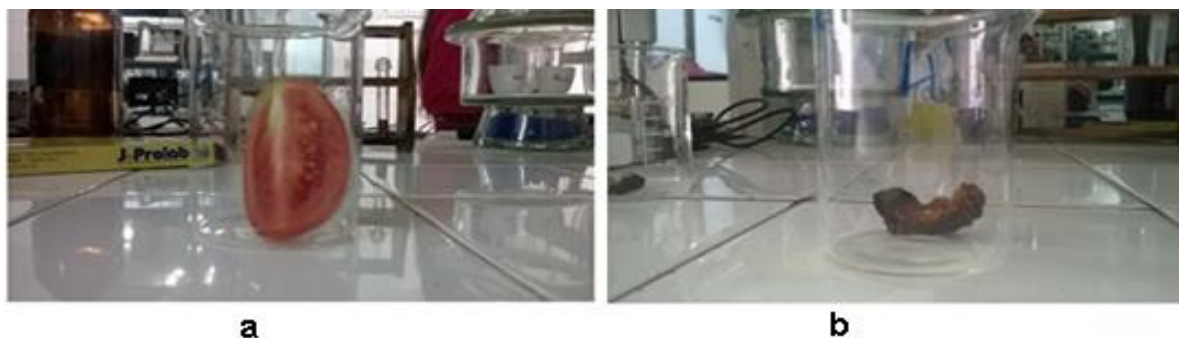
Todos as vidrarias utilizadas foram lavados com água corrente, e depois imersos por 24 h em um banho com solução de HNO₃10 % v/p₀posteriormente, esses materiais foram lavados com água ultrapura (Milli-Q) e secos em estufa de ventilação.

3.5 Pré-tratamento para preparo das amostras

O procedimento para o preparo de amostras consistiu em promover a digestão ácida da amostra, executado da seguinte maneira: inicialmente os tomates foram lavados com água corrente para retirar os resíduos; posteriormente, lavados com água ultrapura em abundância. As amostras foram cortadas em fatias com facas descartáveis transparentes, previamente descontaminadas e colocadas em copos de béquer e levadas à estufa com circulação de ar por 24 h, a 90°C. Em seguida, as amostras secas foram maceradas com auxílio de almofariz e pistilo ágata. O extrato seco de cada amostra, devidamente identificado, foi armazenado em um dessecador. Na

Figura 3.1 é mostrado a amostra antes e depois de seca em estufa com circulação de ar.

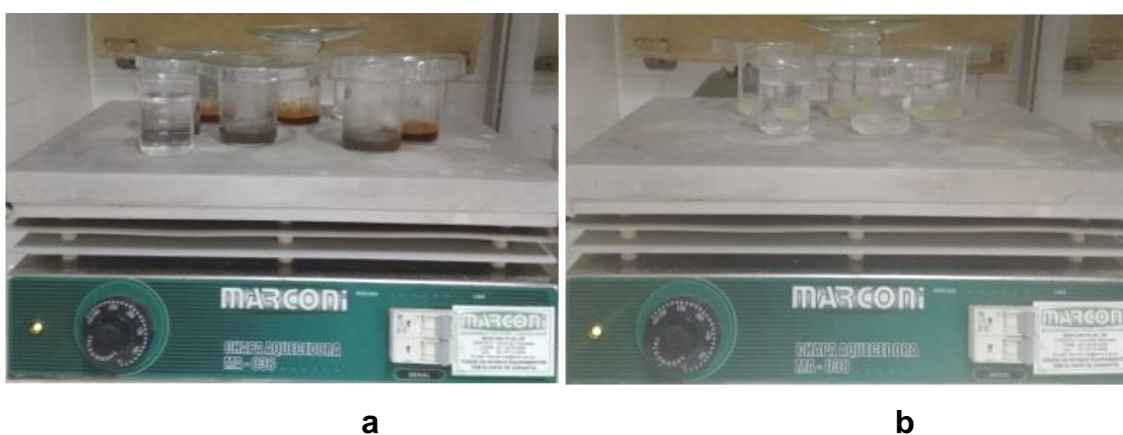
Figura 3.1: Amostras de tomates: (a) antes de serem secas, (b) depois de secas em estufa



3.5.1 Preparo de amostra para determinação de ferro total por ICP OES

A digestão foi conduzida segundo o método proposto por BRESSY (2011): foram pesados 250 mg das amostras de tomates secas em copos de béquer, em seguida foram adicionados ao recipiente 7,0 mL de ácido nítrico 7,0 mol L⁻¹ e 3,0 mL de H₂O₂ (30 % m m⁻¹). Os copos de béquer foram colocados em uma chapa de aquecimento, a 90°C (Figura 3.2), até a obtenção de solução límpida. Após o resfriamento das soluções, as amostras foram transferidas para tubos Falcon e diluídas para um volume final de 15 mL. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção do branco analítico (triplicatas autênticas)

Figura 3.2: Fotografias ilustrativas do aspecto visual das amostras no início da digestão ácida (a) e ao final (b).



3.5.2 Preparo de amostra para determinação de ferro II e ferro total pelo FBA

O preparo de amostra foi conduzido seguindo o método proposto: foram pesados 250 mg de amostras secas de tomate em copos de béquer, em seguida, foram adicionados 5 mL de solução aquosa de HCl a 50% (v v⁻¹), cobrindo-os a seguir com filme de PVC e deixando-os em repouso durante a noite. As amostras e os brancos analíticos foram, então, aquecidos sobre placa aquecedora por 3 horas a 75°C, com agitação ocasional. Após resfriamento a temperatura ambiente, a solução foi filtrada em papel filtro quantitativo e transferida para um tubo Falcon de 15 mL, completando o volume com água ultrapura.

3.6 Analisador FBA proposto

O sistema apresentado nesta pesquisa foi desenvolvido para realizar a especiação química de ferro em diferentes amostras de tomates. Para a realização das determinações analíticas com o analisador em fluxo-batelada (FBA), com detecção por imagens digitais, faz-se necessário o uso de alguns equipamentos fundamentais para o funcionamento do sistema, como um computador, uma bomba peristáltica, válvulas solenoides de 3 vias, uma câmara de mistura, agitador magnético, recipientes para amostras, uma webcam e um controlador/acionador de válvulas conectado a uma placa arduino, como mostrado na Figura 3.3.

Figura 3.3. Fotografia da disposição física dos componentes do analisador em FBA proposto para especiação química de ferro.



(A) notebook; (B) bomba peristáltica; (C) válvulas solenoides; (D) acionador de válvulas; (E) webcam; (F) câmara de mistura; (G) agitador magnético; (H) arduíno.

Em seguida serão detalhados os componentes do analisador proposto.

3.6.1 Câmara de mistura

A câmara de mistura utilizada neste trabalho foi confeccionada em Teflon® e possui um volume interno de 6.000µL. Na Figura 3.4 é mostrada a imagem da câmara utilizada neste trabalho. A câmara utilizada possui seis entradas de fluidos e uma saída, e para garantir uma melhor homogeneização das soluções; no interior da câmara encontra-se uma pequena barra magnética revestida em Teflon®, e um agitador magnético da Ika Lab Disc modelo 3907500.

Figura 3.4: Câmara de mistura utilizada no FBA proposto



3.6.2 Bomba peristáltica

As soluções foram bombeadas empregando uma bomba peristáltica da Ismatec, modelo 78002-00, com capacidade de bombeamento de até oito canais. Como tubos de bombeamento foram utilizados sempre tubos de Tygon® e os tubos das linhas de transmissão dos fluidos foram sempre de Teflon®.

3.6.3 Válvulas solenoides

Os reagentes e amostras foram direcionados para a câmara de mistura com o auxílio de cinco válvulas solenoides de três vias da Cole Parmer (modelo EW-01540-13). Uma sexta válvula foi utilizada para o descarte das soluções. As válvulas foram acionadas por meio de um acionador de válvulas projetado e confeccionado no próprio laboratório de pesquisa descrito na secção 3.6.5.

3.6.4 Sistema de detecção de imagem digital

Como sistema de detecção colorimétrico, foi utilizada uma webcam (WC) Philips, modelo SPC900NC VGA, para capturar as imagens digitais obtidas durante as análises pelo FBA proposto.

Figura 3.5: Webcam utilizada como detector no FBA proposto



3.6.5 Acionador de válvulas

Para o controle das válvulas solenoides foi utilizado um acionador de válvulas desenvolvido no nosso laboratório de pesquisa. O acionador de válvulas possui um circuito eletrônico para controlar a abertura das válvulas solenoides utilizados no FBA. Este acionador é capaz de controlar diferentes canais de forma independente e simultânea, permitindo que uma ou mais válvulas sejam acionadas separadamente ou ao mesmo tempo, em intervalos de tempos diferentes, o que permite que sua abertura e conseqüentemente volume enviado à câmara de mistura não seja afetado por fatores externos ou internos.

Para que cumpra sua função, o acionador de válvulas deve ser conectado ao notebook via USB através de uma interface arduíno UNO R3.

O arduíno UNO R3 é uma placa de microcontrolador baseado no ATmega328. Este, possui 14 pinos de entrada ou saída digital (dos quais 6

podem ser usados como saídas PWM), 6 entradas analógicas, um cristal oscilador de 16MHz, uma conexão USB, uma entrada (de alimentação) uma conexão ICSP e um botão de reset.

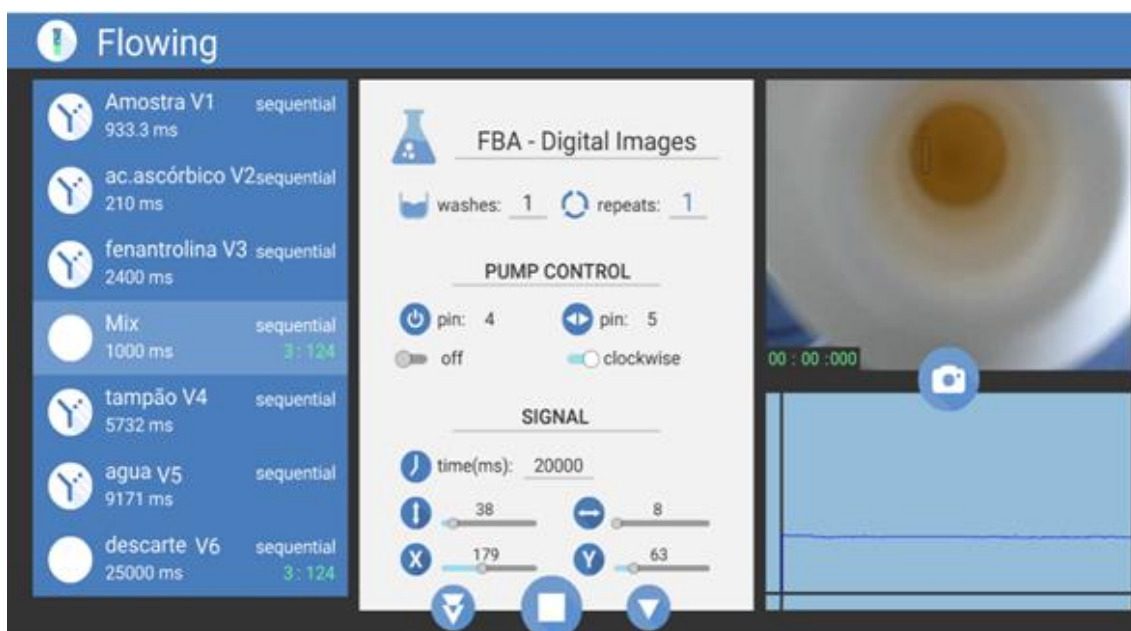
O Arduino Uno é uma plataforma open-hardware e possui seu próprio ambiente de desenvolvimento baseado na linguagem C e pode ser programado com o software Arduino

O arduíno Uno difere de todas as placas antecessoras no sentido de não utilizar o chip FTDI para conversão do sinal serial, no seu lugar utiliza um Atmega8U2 programado como conversor de USB para serial, possuindo sua alimentação de forma automática. O ATmega328 fornece comunicação serial UART TTL (5V) que está disponível nos pinos digitais 0 (RX) e 1 (TX). Um ATmega8U2 na placa canaliza esta comunicação para a USB e aparece como uma porta virtual para o software no computador.

3.6.6 Programa de controle do FBA

O programa utilizado para o gerenciamento do FBA proposto neste trabalho foi escrito na plataforma Adobe AIR for desktop, programado em ActionScript 3.0, cuja interface é apresentada na Figura 3.6.

Figura 3.6: Interface do programa utilizado na realização das análises



O programa apresenta várias funções de gerenciamento de controle, o que o torna fácil sua utilização pelo usuário, tais como:

- **Controle do tempo de acionamento das válvulas solenoides** – O programa permite que o usuário selecione os tempos que vão ser utilizados em cada etapa do processo. Esses valores de tempo possibilitam a entrada precisa dos volumes das amostras, reagentes na câmara de mistura.
- **Leitura do sinal analítico** – O programa permite o monitoramento do sinal proveniente do sistema de detecção, com uma webcam, o qual relaciona os valores de cor RGB com a concentração do analito.
- **Procedimentos analíticos** – O programa permite executar as operações necessárias para o procedimento analítico, onde é possível selecionar o número de replicatas, limpeza e o tempo de agitação na câmara de mistura.

Durante a realização das análises pelo FBA proposto, o usuário pode acompanhar, em tempo real, alguns processos realizados durante a execução da análise, observando pelo computador a imagem exibida pelo programa de gerenciamento, inclusive a adição dos volumes na câmara de mistura e a formação dos complexos metálicos para a determinação.

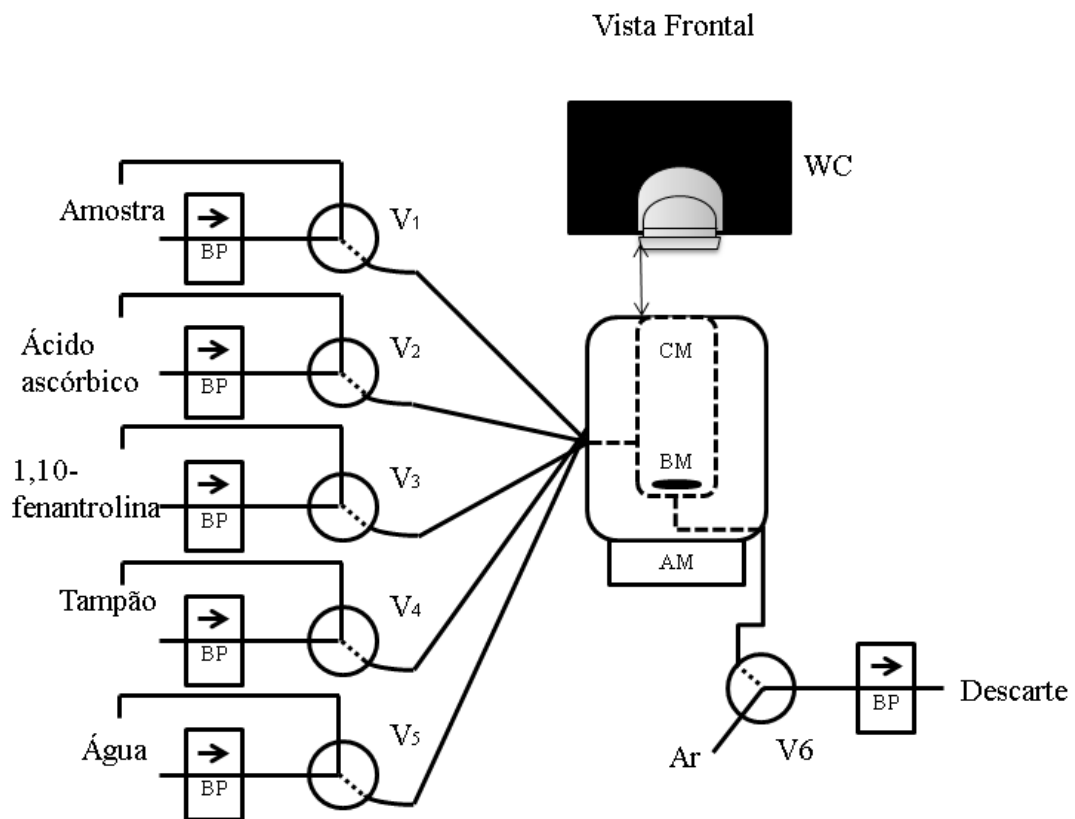
3.6.7 tratamento e análise das imagens digitais

A partir da região de interesse selecionada pelo usuário, o programa faz a leitura de cada pixel da imagem e armazena as coordenadas dos pixels delimitadores da região selecionada. Após o armazenamento das coordenadas o usuário trata esses dados em função da concentração das soluções padrão e calcula as concentrações das espécies pela equação da reta, obtidas através dos valores da componente B do RGB.

3.7 Procedimento analítico realizado pelo FBA proposto

Na Figura 3.7 é mostrado o diagrama esquemático do FBA proposto.

Figura 3.7: Diagrama esquemático do FBA proposto.



Câmara de mistura (CM), bomba peristáltica (BP), barra magnética (BM), agitador magnético (AM), webcam (WC) e válvulas solenóides (V₁, V₂, V₃, V₄, V₅ e V₆).

Antes de dar início à especificação de ferro pelo FBA proposto, é necessário realizar as seguintes etapas:

- Estudo da vazão dos canais das válvulas solenóides;
- Escolha da região para obtenção dos valores de RGB;

3.7.1 Estudo da vazão dos canais das válvulas solenóides

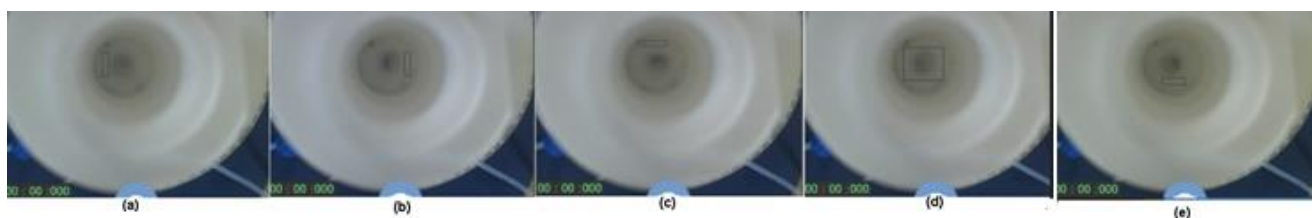
Os tempos de acionamento das válvulas solenóides são proporcionais aos volumes adicionados na câmara de mistura. Assim, um estudo preliminar de calibração de cada canal foi necessário para obter com precisão a medida dos volumes adicionados à câmara de mistura. A vazão em cada linha de fluxo foi determinada pelos volumes de água coletados e medidos em massa numa balança analítica (Shimadzu modelo AY220) segundo os tempos de abertura das válvulas de 1 a 10 s. O programa de gerenciamento do FBA proposto

apresenta uma interface que possibilita que este procedimento seja realizado com maior facilidade.

3.7.2 Escolha da região para obtenção dos valores de RGB

Para a escolha da região para aquisição dos valores das componentes RGB, foram estudadas cinco diferentes áreas com o auxílio do mouse e o programa de controle. Depois de selecionada a região, o programa usa as mesmas coordenadas que o usuário selecionou para todas as análises subsequentes. As cinco áreas estudadas estão expostas na Figura 3.8.

Figura 3.8: Regiões estudadas para escolha da melhor área para realização das análises.



Regiões de interesse das imagens digitais investigadas para realização das análises.

3.7.3 Etapas do procedimento de análise no FBA proposto

O procedimento analítico para a especiação química de ferro compreende as seguintes etapas:

- I. Preenchimento dos canais;
- II. Obtenção da curva analítica
- III. Determinação de ferro (II);
- IV. Determinação de ferro total;
- V. Limpeza da câmara de mistura.

Antes de realizar cada uma destas etapas, todas as soluções são bombeadas e ficam recirculando em direção aos seus recipientes. Após o término de cada uma destas etapas, é sempre realizada uma limpeza e drenagem da câmara de mistura, usando o procedimento descrito na Seção 3.7.3.4.

3.7.3.1 Preenchimento dos canais

Antes de iniciar qualquer análise é necessário o preenchimento dos canais entre as válvulas (V_1 , V_2 , V_3 , V_4 e V_5) e a câmara de mistura. Para esta etapa, é realizado o seguinte procedimento:

- As válvulas V_1 , V_2 , V_3 , V_4 e V_5 são acionadas e as soluções são bombeadas em direção à câmara de mistura durante um intervalo de tempo de 5 s. Em seguida, a válvula V_6 é acionada e o conteúdo da câmara de mistura é descartado.

A etapa de preenchimento de canais deve ser realizada sempre que uma nova amostra for analisada ou quando os reagentes ou a água forem trocados.

3.7.3.2 Obtenção da curva analítica

Para a construção da curva analítica que será utilizada nas etapas de determinação de ferro (II) e ferro total, segue o procedimento utilizado:

Medida RGB do branco: Para este procedimento, as válvulas V_5 (água ultrapura), V_3 (1,10 fenantrolina 0,1%) e V_4 (solução tampão) são acionadas durante 1,2 s, 2,4s e 2,6s, respectivamente, e a câmara de mistura é preenchida com cerca de 1000 μL . As imagens do branco são capturadas por 15 s e armazenadas no programa de controle.

Medida RGB para a curva analítica: para a preparação automática das soluções analíticas usadas na construção da curva analítica, os tempos de acionamento das válvulas V_3 e V_4 são fixados em $t_3 = 2,4\text{s}$ e $t_4 = 2,6\text{s}$, mas o tempo de acionamento da válvula V_5 (t_5) é decrescente dentro da faixa de 1,12 s a 0s, enquanto que o tempo de acionamento da válvula V_1 (t_1) é crescente no intervalo de 0s a 1,2s. Desta forma, o volume total na CM é mantido constante para obtenção de todos os pontos da curva. Após a adição das

soluções, as imagens digitais são capturadas e salvas em um intervalo de 15 s. A variação dos tempos de abertura de V_1 e V_5 foram calculados de forma a se obter uma curva analítica com concentrações de 0,10, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 mgL^{-1} . A curva analítica teve seu modelo obtido através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

3.7.3.2 Determinação de ferro (II)

O procedimento para a análise da amostra na câmara de mistura é semelhante à preparação das soluções de calibração. A solução padrão é substituída pela solução amostra (a primeira medida é descartada pois a troca de soluções requer uma etapa de limpeza da CM). Os intervalos de tempo empregados para o acionamento das válvulas, captura das imagens e procedimento de limpeza para a análise das amostras são mostrados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Tempos de acionamento das válvulas solenoides para a determinação de ferro (II) nas amostras de tomate no FBA proposto.

Válvula	Evento	Tempo de Acionamento (s)
V_1	Adição da amostra	1,2
V_3	Adição da 1,10-fenantrolina	2,4
V_4	Adição da solução tampão	2,6
V_5	Adição da água	4,5
WC	Captura de imagem	15
V_6	Descarte	5

Para a realização das análises de ferro (II) nas amostras de tomate a válvula V_2 não foi utilizada.

3.7.3.3 Determinação de ferro total

Para a determinação de ferro total nas amostras de tomate utilizando o FBA proposto foi usado o método proposto por BITTENCOURT (1989), o procedimento de determinação de ferro total é feito de maneira semelhante ao descrito na seção 3.7.3.2, acrescentando no canal correspondente a válvula V₂, uma solução de ácido ascórbico (1% m/v) para a redução de todo ferro (III) a ferro (II) presente na amostra.

Os intervalos de tempo empregados para o acionamento das válvulas, captura das imagens e procedimento de limpeza para esta etapa, estão mostrados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Tempos de acionamento das válvulas solenoides para a realização das análises das amostras de tomate para a determinação de Ferro total no FBA proposto.

Válvula	Evento	Tempo de Acionamento(s)
V ₁	Adição da amostra	1,2
V ₂	Adição de ácido ascórbico	1,1
V ₃	Adição da 1,10-fenantrolina	2,4
V ₄	Adição da solução tampão	2,6
V ₅	Adição da água	4,5
WC	Captura de imagens	15
V ₆	Descarte	5

3.7.3.4 Limpeza da câmara de mistura

Uma etapa de limpeza foi realizada após cada procedimento analítico, a qual compreende os seguintes passos:

- A válvula V₆ é acionada durante 5s, tempo necessário para aspirar todo o fluido presente na câmara de mistura para descarte. Em seguida, a válvula V₅ é acionada e a água ultrapura é bombeada para dentro da câmara durante 4,5 s. Logo em seguida, a válvula V₆ é acionada novamente e o conteúdo da câmara FBA é drenado para o descarte durante 5s.

Verificou-se neste trabalho que uma única etapa de limpeza é suficiente, pois não foi observada mudança significativa nos resultados utilizando mais etapas de limpeza, indicando que não houve intercontaminação após a análise de várias amostras.

3.8 Procedimento Analítico para determinação de ferro total pelo método de referência

Para a determinação de ferro total pelo método de referência seguiu-se o procedimento de preparo de amostra descrito na seção 3.2.2 e as amostras foram analisadas utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. Para isso, foi construída uma curva analítica com nove pontos: 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mgL⁻¹ e realizada posterior quantificação na linha de emissão 238,204 nm.

As análises foram realizadas no Instituto de Química na Universidade Federal da Bahia.

3.8.1 Procedimento Analítico para especiação de Ferro (II) pelo método de referência

Logo após o procedimento de digestão das amostras descrito na seção 3.5.1, as amostras de tomates foram tratadas para a determinação de ferro (II) pelo método da 1,10 fenantrolina (SABESPNTS 010,2001).

As soluções padrão de Fe (II) foram obtidas a partir de diluições apropriadas da solução estoque, preparou-se cinco soluções padrão através da diluição apropriada da solução estoque de ferro com as seguintes concentrações: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹. Para o estabelecimento da curva analítica realizou-se o seguinte procedimento: foi transferido 1,0 mL de cada uma das soluções do padrão para balão volumétrico de 25 mL já com 10,0 mL de água deionizada logo após foi adicionado 2,0 mL da solução de 1,10 fenantrolina (0,25% m^v-1) a solução tampão de acetato de amônio foi

adicionada logo em seguida a fim de elevar o pH da solução a 3,5-4,0 e o volume foi completado até aferição do menisco com água deionizada.

Para a leitura em espectrofotômetro de absorção molecular no UV-Vis foi necessário esperar cerca de 30 minutos para estabilização da solução e posterior leitura no comprimento de onda de 510 nm.

3.8.3 Determinação de ferro (III)

A determinação da espécie Fe (III) foi realizada por diferença entre as quantidades de ferro total e a quantidade de Fe (II) tanto no método de referência quanto no método proposto.

3.9 Parâmetros de desempenho

O sistema foi avaliado em termos de precisão e exatidão, onde a precisão é a concordância entre os valores experimentais obtidos para repetidas análises de uma mesma amostra, a exatidão reflete a proximidade entre o valor medido e um valor de referência considerando verdadeiro, e relaciona-se com o erro relativo de uma medida (SIQUEIRA et al., 2016). Também foi aplicado o teste t pareado, para verificar se não existe diferença sistemática estatisticamente entre o método proposto e método de referência.

Para as determinações foram realizados testes de análise de variância (ANOVA) para validar os modelos lineares baseados no método dos mínimos quadrados (MMQ) e os testes *F* para falta de ajuste e de significância estatística da regressão foram aplicados aos modelos lineares com base nos resultados da ANOVA.

3.9.2 Limite de detecção e Limite de quantificação

O limite de detecção do método (LOD) é definido como a concentração mínima de uma substância identificada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero (INMETRO, 2003). O limite de detecção foi determinado medindo-se 10 vezes o branco, e o desvio padrão

obtido foi multiplicado por 3 e o valor obtido foi dividido pela inclinação da curva analítica.

O limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão (INMETRO, 2007). Neste estudo, os limites de quantificação do método foram calculados usando o valor do desvio padrão de 10 medidas da concentração correspondente ao branco e multiplicado por 10 e o valor obtido foi dividido pelo valor da inclinação da curva analítica. (EURACHEM, 2003; INMETRO, 2007).

Capítulo 4

RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Otimização do FBA proposto

Existem várias etapas de calibração e otimização do FBA proposto antes de iniciar as análises aqui apresentadas com confiabilidade. Antes o sistema passou por vários estudos descritos abaixo.

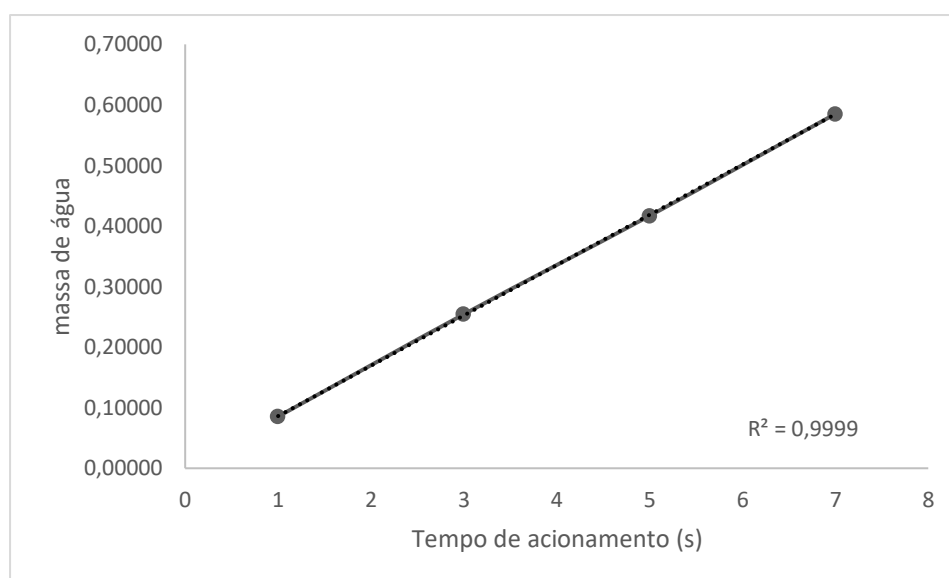
4.1.1 Estudo da vazão dos canais de bombeamento

Cada válvula solenoide permite que uma quantidade de fluido diferente, passe entre seu caminho de entrada e saída, conseqüentemente, cada uma dessas válvulas envia um volume de líquido diferente para a câmara de mistura durante um dado intervalo de tempo. Devido a isso, faz-se necessário o estudo das suas vazões. Para a calibração das válvulas solenoides, foram estudadas três diferentes rotações para a bomba peristáltica: 15, 30 e 45 rpm. Como resultado desse estudo, concluiu-se que a melhor rotação a ser trabalhada foi a de 30 rpm, a rotação de 45 rpm obteve imprecisão nas medidas e a rotação de 15 rpm demonstrou ser lenta para realizar a análise.

Cada válvula solenoide foi acionada 10 vezes para os tempos de 1, 3, 5 e 7 segundos. Em seguida, foi realizada uma média aritmética das massas pesadas na balança, e calculado o desvio padrão. A partir destes valores foi plotado um gráfico para cada canal, média (m) x tempo (s), e encontrada a equação da reta e o valor de R^2 . Com a massa obtida e a densidade da água tabelada, foi calculado então o volume correspondente a cada tempo de acionamento para cada válvula.

Para exemplificar o que foi mencionado acima, na Figura 4.1 tem-se o estudo de calibração para a válvula solenoide 1 usada no FBA proposto.

Figura 4.1. Estudo de calibração da vazão do canal de bombeamento para a válvula 1 utilizada no FBA proposto.

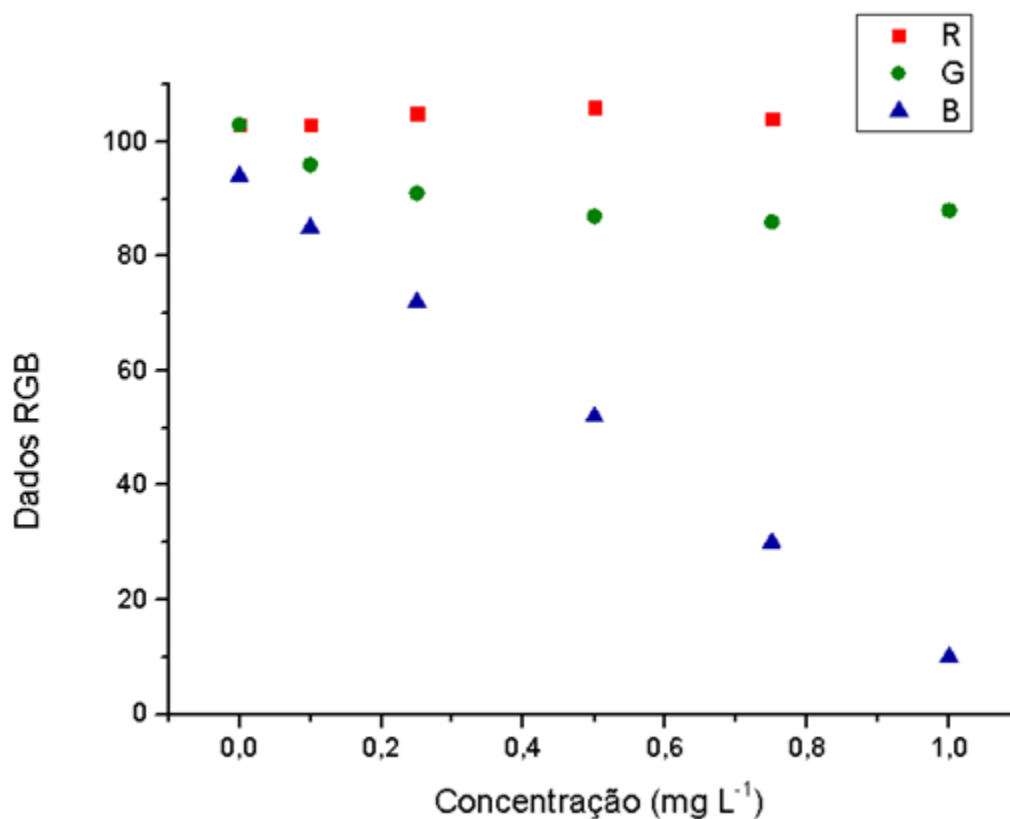


Assim, pode-se determinar os volumes de cada válvula em um determinado tempo, e calcular suas respectivas vazões.

4.1.2 Tratamento das Imagens Digitais

Para estudar qual das componentes R (red), G (green) ou B (blue), do sistema de cor RGB, se utilizaria para o especiação de ferro neste trabalho, fez-se necessário um estudo relacionando a concentração das soluções padrão, com concentrações de $0,1\text{mg L}^{-1}$, $0,25\text{ mg L}^{-1}$, $0,5\text{mg L}^{-1}$, $0,75\text{mg L}^{-1}$ e 1mg L^{-1} , e as componentes R, G e B. Na Figura 4.2 está apresentada uma curva de calibração obtida nas condições acima, e pode-se observar, uma diminuição no valor da componente B com o aumento da concentração das soluções de calibração do complexo ferro (II) – 1,10 - fenantrolina de cor alaranjada, enquanto os valores das componentes R e G permanecem sem linearidade quanto ao aumento ou diminuição da concentração dos padrões estudados.

Figura 4.2 – Contribuições individuais dos componentes R, G e B em função da concentração do complexo Fe(II)-1,10 -fenantrolina (0 a 1 mg L⁻¹).



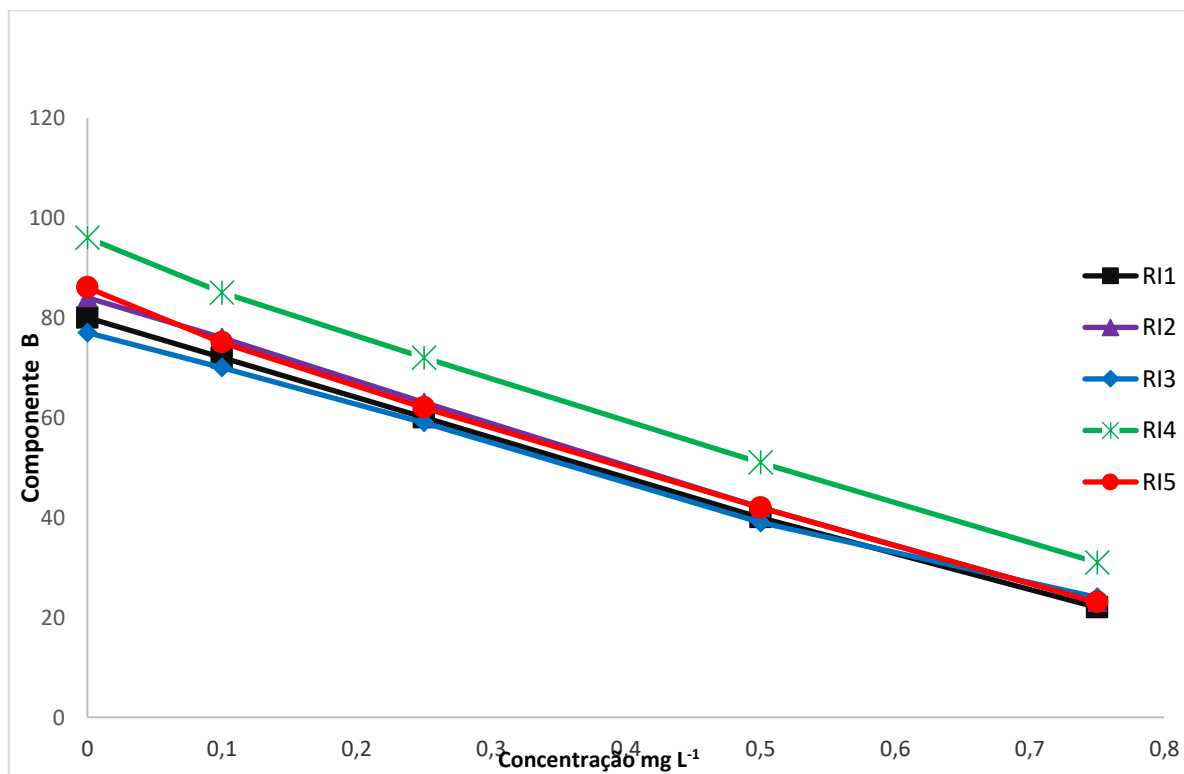
A resposta analítica foi obtida assumindo uma relação linear entre a concentração das soluções de calibração e o sinal da componente B do FBA proposto.

4.2 Escolha da região para aquisição das imagens digitais

Para a escolha da região adequada para aquisição das imagens digitais, foi realizado um estudo com cinco áreas diferentes, como descrito em 3.4.1.

Para analisar todas as regiões estudadas foram feitas cinco curvas de calibração com as soluções padrões de ferro (II), e a escolha foi dada pelo melhor R² obtido pelas curvas estudadas. A Figura 4.3, mostra as curvas de calibração obtidas para diferentes regiões (esquerda, direita, central, baixo e cima).

Figura 4.3: Curvas analíticas obtidas em diferentes regiões das imagens digitais pelo FBA proposto



RI1 Região de interesse de baixo $R^2=0,9995$; RI2 Região de interesse central $R^2=0,9994$; RI3 Região de interesse de baixo $R^2=0,9975$; RI4 Região de interesse da direita; $R^2=0,9981$; RI5 Região de interesse da esquerda $R^2=0,9970$.

Para a escolha da região de trabalho, foi levado em consideração:

- A reprodutibilidade da medida;
- Melhor coeficiente de determinação associado à curva analítica

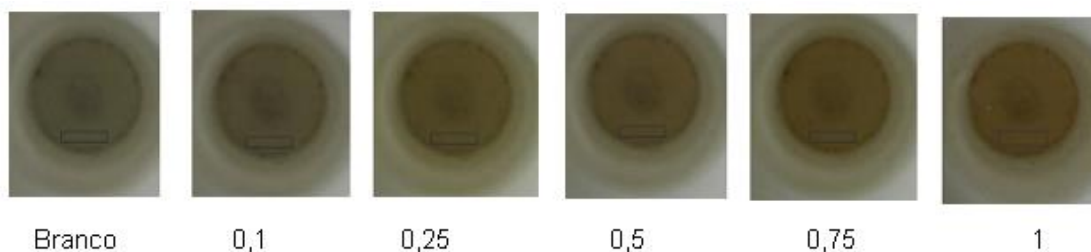
Pelas análises dos gráficos optou-se por utilizar a região de baixo que obteve o melhor desempenho. É importante ressaltar que as demais regiões poderiam ser utilizadas já que os valores de R^2 de todas as curvas obtidas pelo FBA proposto foram superiores a 0,9970 e que tiveram desempenho semelhante à da região escolhida.

4.3 Determinação analítica pelo FBA

O processo de determinação dos analitos estudados é feito pela captura de imagem de uma webcam Philco, numa área selecionada pelo usuário.

Na Figura 4.3 são mostradas as imagens dos complexos obtidas pelo FBA, provenientes de cinco soluções de calibração com concentrações de $0,10\text{mg L}^{-1}$; $0,25\text{mg L}^{-1}$; $0,50\text{mg L}^{-1}$; $0,75\text{mg L}^{-1}$ e $1,00\text{mg L}^{-1}$ (preparadas por diluição de uma única solução estoque na própria câmara de mistura). A primeira imagem da sequência é referente à solução do branco. Em todas as imagens, selecionou-se uma região homogênea para o tratamento, com 171×127 pixels de resolução espacial, escolhida previamente e já descrita na seção 3.6.7.

Figura 4.3: Imagens obtidas pelo FBA com a área selecionada (171×127).



Os complexos formados entre o ferro II e a 1,10-fenatrolina para as soluções de calibração (mg L^{-1}) e a solução do branco.

A resposta analítica foi definida pela equação da reta realizada no FBA proposto e calculada a partir da componente B, cujo valor diminui com o aumento da concentração do analito, e foi baseada nos valores da componente B, a qual se mostrou proporcional à concentração do complexo nas soluções de calibração.

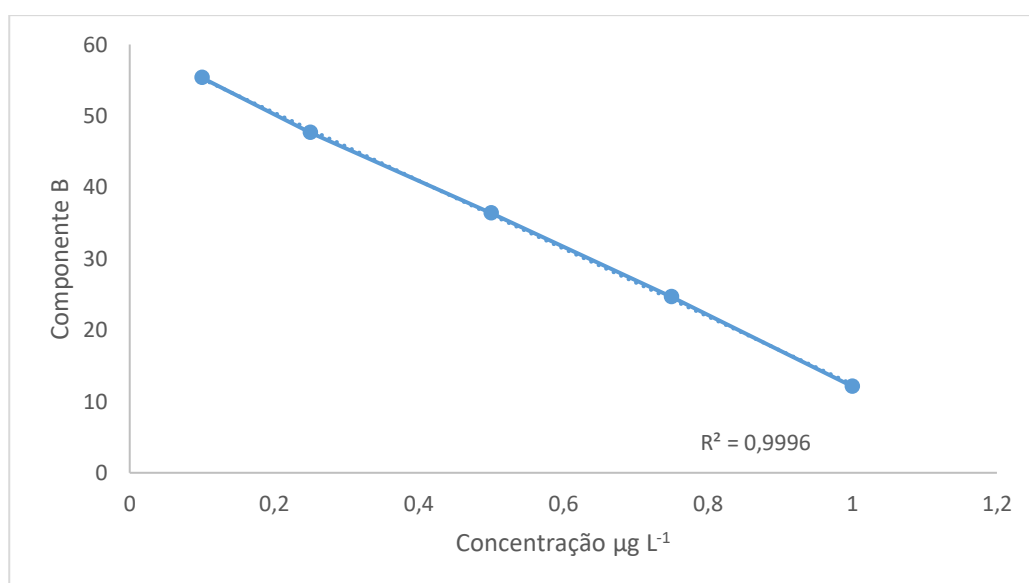
4.3.1 Curva Analítica para o FBA

Uma curva analítica foi construída para a faixa de concentrações de 100 a $1000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de ferro (II), a partir dos valores da componente B das imagens

obtidas empregando o FBA. A **Figura 4.5** mostra a curva analítica obtida a partir dos valores da componente B do sistema de cor RGB extraídos das imagens digitais capturadas em função da concentração das soluções padrão, assim foi observado que a curva analítica apresenta um comportamento linear entre o valor da componente B e a concentração de ferro das soluções padrão.

A curva analítica realizada com o ferro (II) serviu para a determinação dessa espécie e também para a determinação de ferro total, após a redução de ferro (III) a ferro (II) com ácido ascórbico 1% (m m^{-1}). A curva elaborada pelo sistema FBA proposto foi comparada com aquela obtida pelo método de referência.

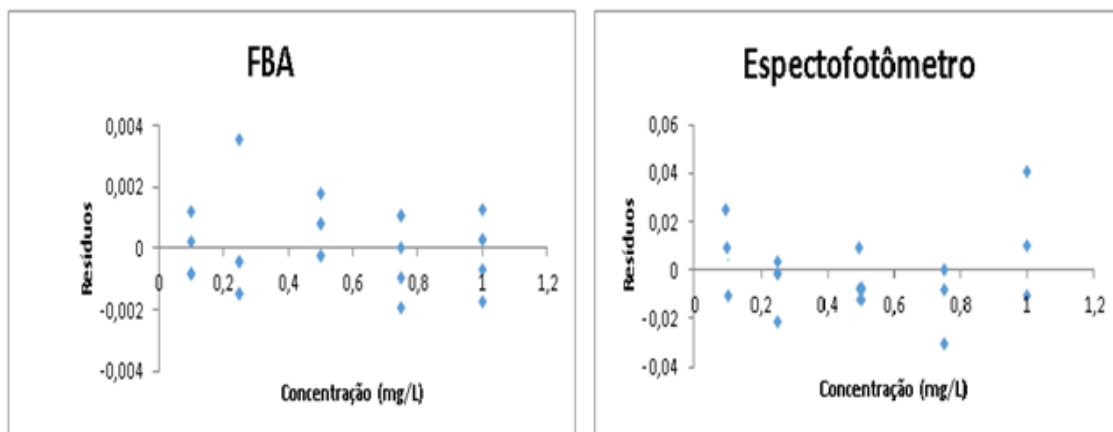
Figura 4.5: Curva de calibração obtida pelo FBA proposto



(n=5)

Foi realizada a análise de resíduos para as curvas analíticas obtidas pelo FBA proposto e pelo espectrofotômetro de absorção molecular. Os resultados estão expostos na **Figura 4.6**.

Figura 4.6: Gráfico das análises de resíduo deixadas pelos modelos obtidos através do espectrofotômetro de absorção molecular e o FBA proposto.



Pelos gráficos acima, pode-se observar que não há tendências nos resíduos advindos dos modelos de calibração da curva analítica. O que mostra que os erros se distribuem aleatoriamente em torno de zero mostrando que os erros que advém do modelo são apenas erros aleatórios (ANDRADE,2012). Dando confiabilidade a curva analítica obtida por ambos os sistemas. Essa inferência baseada, inicialmente, em uma inspeção visual, é corroborada pelos resultados da ANOVA apresentados em seguida.

Realizou-se então um teste de análise de variância (ANOVA) para avaliar a significância da regressão e corroborar com a validação do modelo de calibração entre o FBA proposto e o espectrofotômetro de absorção molecular. Os resultados estão organizados na **Tabela 4.1**.

Tabela4.1: Teste ANOVA.

	GI	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	4,277496377	4,277496377	54793,06	4,9786310E-20
Resíduo	10	0,000780664	7,80664E-05		
Total	11	4,278277041			

Nesse caso, o valor de MQ_{faj}/MQ_{ep} é menor que o ponto de distribuição F , considerando um nível de 95% de confiança e os mesmos graus de liberdade. Evidenciando assim, que não há evidências de falta de ajuste para os modelos.

Após o estudo de validação da curva analítica, os valores de LOD e LOQ foram calculados tanto para o FBA proposto quanto para o método de referência. Na Tabela **4.2** são apresentados os valores de LOQ e LOD.

Tabela 4.2: Valores de LOD e LOQ, em $\mu\text{g L}^{-1}$, para determinação de ferro (II) em tomates

	FBA proposto	Espectrofotômetro
LOD	2,33	1,76
LOQ	7,72	5,88

Os resultados, indicam que os valores obtidos para o método de referência são menores em relação ao FBA proposto. Estas diferenças podem ser atribuídas, principalmente, ao tipo de detector e ao caminho óptico empregado. Desta forma, os resultados mostram-se coerentes com as limitações encontradas no FBA proposto.

4.4 Método de referência para ferro (II)

As quantidades de ferro (II) presente nas amostras foram determinadas por meio da digestão com HCl das amostras e posteriormente as soluções resultantes foram analisadas por espectrofotômetro UV/Vis como descrito em 3.8.1.

4.5 Método de referência para ferro total

As quantidades totais de ferro presente nas amostras foram determinadas por meio da digestão ácida com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio das amostras, e para avaliar o método proposto foi utilizado um material de referência certificado. Posteriormente as soluções resultantes das digestões foram analisadas por ICP OES como descrito em 3.8.

Na Tabela 4.3 encontra-se a comparação do teor de ferro total determinado na amostra do material de referência certificado por ICP-OES.

Tabela 4.3: Comparação do teor de ferro total, em $\mu\text{g g}^{-1}$, determinados por ICP-OES, com o valor certificado para o material de referência NIST 1547 (n = 3).

Analito	Procedimento proposto	CRM	Recuperação
Ferro	$186,87 \pm 3,8$	$219,80 \pm 6,8$	85 %

Fonte: elaborado pelo autor

Avaliando os dados, verifica-se que, os valores de percentuais de recuperação estão dentro da faixa aceitável (80-110%), segundo a Association of Official Analytical Chemists (AOAC), para determinação de baixas concentrações entre (0,10 e 10 mg Kg^{-1}) são aceitos percentuais de recuperação entre 80 e 110% (AOAC, 2016).

Na **Tabela 4.4** podem ser vistos os valores de LOD e LOQ para a determinação de ferro total por ICP OES.

Tabela 4.4. Valores de LOQ e LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$ para procedimento realizado para determinação de ferro total por ICPOES.

	$\mu\text{g L}^{-1}$
LOD	0,1
LOQ	0,4

4.6. Resultados obtidos pelo FBA proposto

Na tabela 4.5 estão listados os resultados para a especiação de ferro em amostras de tomates. Para efeito de comparação, os resultados obtidos pelo sistema FBA foram avaliados com relação ao método de referência.

Tabela 4.5: Comparação dos resultados obtidos pelo FBA proposto e o método de referência (mg L⁻¹).

Amostras	Método de referência			Sistema FBA proposto		
	Fe (II) ¹	Fe (III)	ferro total ²	Fe(II)	Fe(III)	ferro total
Amostra 1	0,35 ± 0,28	0,70 ± 0,25	1,05 ± 0,11	0,34 ± 0,21	0,71 ± 0,25	1,06 ± 0,3
Amostra 2	0,23 ± 0,17	0,31 ± 0,20	0,55 ± 0,08	0,23 ± 0,16	0,30 ± 0,20	0,54 ± 0,25
Amostra 3	0,30 ± 0,18	0,40 ± 0,29	0,71 ± 0,21	0,29 ± 0,15	0,40 ± 0,30	0,70 ± 0,19
Amostra 4	0,24 ± 0,16	0,47 ± 0,18	0,71 ± 0,10	0,25 ± 0,18	0,47 ± 0,32	0,73 ± 0,26
Amostra 5	0,24 ± 0,16	0,42 ± 0,32	0,66 ± 0,17	0,24 ± 0,19	0,43 ± 0,27	0,67 ± 0,33
Amostra 6	0,80 ± 0,12	1,68 ± 0,23	2,49 ± 0,05	0,82 ± 0,45	1,71 ± 0,40	2,53 ± 0,30

¹UV-Vis ²ICPO-ES. (n=3)

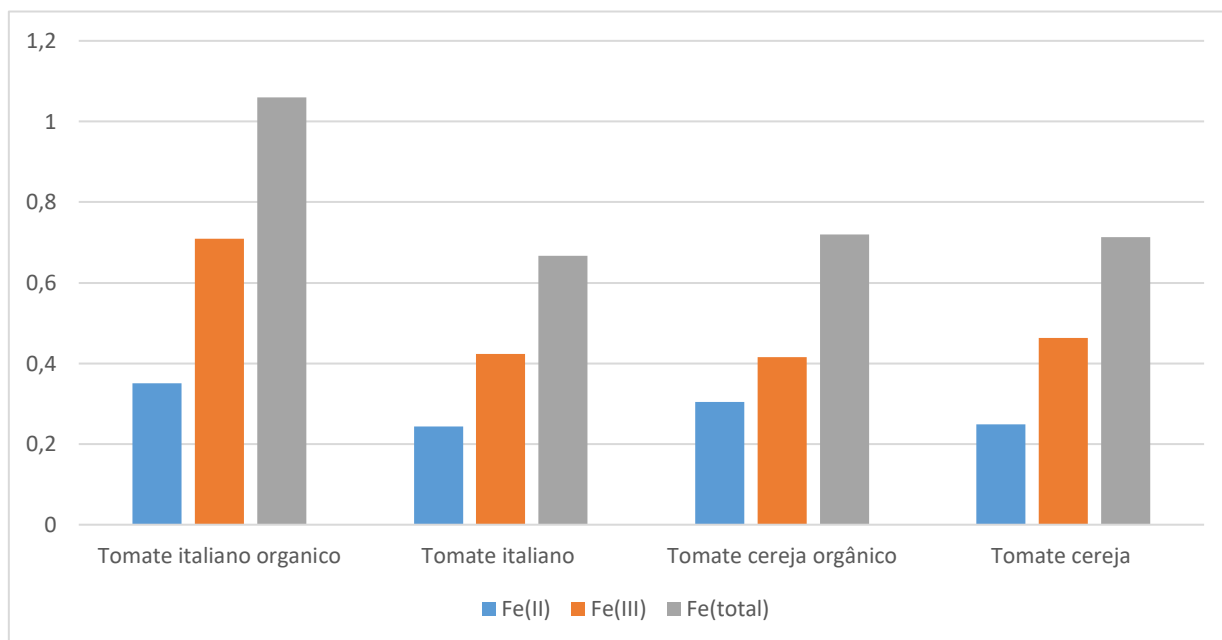
A partir dos resultados acima, e aplicando o teste t pareado às amostras não apresentaram diferenças estatisticamente significativas a um nível de 95% de confiança, evidenciando que os valores obtidos pelo método proposto estão de acordo com o método de referência. Assim, pode-se concluir que o método proposto tem aplicabilidade para análise de especiação química de ferro em amostras de tomates.

O tempo de análise de cada amostra foi estimado em 38 s tanto para determinação de ferro (II) quanto para ferro total, o que permitiu realizar em torno de 94 análises por hora. O consumo de amostra e reagente combinados em cada análise ficaram em torno de 0,66 mL respectivamente.

4.7 Concentração do ferro pelo tipo de cultivo

Realizou-se um estudo comparativo dos tomates cultivados de forma orgânica e de forma convencional, para isso foram utilizadas duas amostras de tomate da espécie italiano e cereja.

Figura 4.6 : Comparação entre concentração de ferro pelo tipo de cultivo de tomates (mg L^{-1})



Das amostras de tomates analisadas, como esperado as amostras que possuem a maior quantidade de ferro (II) são aquelas advindas do manejo orgânico. Os resultados com amostras da mesma espécie e diferentes tipos de cultivos constatou-se que o manejo orgânico se sobressai ao manejo convencional no que se refere a quantidade de ferro (II), fato esse observado também por Bressy (2011) em estudos realizados entre espécies de tomate advindas do manejo orgânico e convencional

Pela comparação feita o tipo de cultivo do tomate desempenha um papel importante na quantidade de ferro dessa matriz. Os resultados encontrados neste trabalho são concordantes com esta afirmativa, visto que os tomates orgânicos são mais ricos em micronutrientes (Bressy,2011). Observando os valores encontrados verificamos que a amostra de tomate italiano orgânica possui concentração maior de ferro inclusive a espécie ferrosa, que possuem propriedades nutricionais maiores no organismo.

O manejo orgânico emprega o mínimo possível de insumos agroquímicos e é uma alternativa ao emprego desenfreado de agrotóxicos nos alimentos, esse manejo se caracteriza por não utilizar agrotóxicos. No entanto, devido à contaminação ambiental, as práticas de agricultura orgânica não podem garantir a ausência total de resíduos, mas, é possível adotar métodos destinados a reduzir ao mínimo a contaminação do ar, do solo e da água (Borguini et al., 2006)

Os alimentos orgânicos apresentam uma clara vantagem sobre os convencionais (Pussemier et al. e Baker et al. apud Borguini et al., 2006, Bressy,2011). Os resultados encontrados nesta pesquisa são corroborados com esta afirmativa, pois os tomates orgânicos são mais ricos em micronutrientes e apresentam uma menor contaminação com elementos tóxicos.

Capítulo 5

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia automática, para a especiação química de ferro em amostras de tomates, baseada em imagens digitais. Para isso, foi utilizado um analisador automático flow-batch, acoplado a uma webcam com sensor CCD, para a captura das imagens digitais obtidas.

A determinação de Fe (II) foi baseada no método da 1,10-fenantrolina. As componentes do modelo de cor RGB das imagens capturadas durante a análise foram extraídas utilizando o programa de gerenciamento, e a componente B manteve uma relação linear satisfatória com a concentração do analito em estudo, possibilitando assim a construção de um modelo matemático linear para a quantificação de ferro.

A determinação de ferro total foi feita pela redução da espécie ferro (III) com o ácido ascórbico e após redução determinado da mesma maneira que o ferro (II). A determinação de Fe (III) foi obtida pela diferença entre as concentrações de ferro total e concentração de ferro (II).

OFBA proposto permitiu quantificar Fe (II) e ferro total com erros relativos variando entre 1,1% e 2,5% atestando assim uma boa concordância entre os valores obtidos por ambos os procedimentos, observou-se ainda que seu desempenho analítico foi satisfatório, pois os resultados do teste de validação evidenciaram que o FBA proposto é capaz de realizar as análises estudadas com um nível de confiabilidade de 95%. As frequências analíticas foram de 94 h⁻¹, e desvios médios entre 0,1% e 0,41%. O tempo de análise de cada amostra foi estimado em 38 s tanto para determinação de ferro (II) quanto para ferro total, o consumo de amostra e reagente combinados em cada análise ficaram em torno de 0,54 mL e 0,66 mL respectivamente.

Com relação ao tipo de cultivo, entende-se que há vantagens no consumo de tomates orgânicos, visto que as duas espécies estudadas apresentaram maiores valores de ferro (II) quando comparadas com aquelas oriundas do manejo convencional.

O sistema em FBA proposto pode servir para realizar outras análises colorimétricas, sendo que para isso há a necessidade de modificações de acordo com a determinação pretendida.

O método proposto é relevante para o desenvolvimento de metodologias analítica voltada para a especiação química de metais utilizando analisadores em fluxo batelada, visto que existem poucos trabalhos na literatura envolvendo automação para análises de especiação, e é necessário o estudo e pesquisa nessa área, dada a sua importância.

Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas

ABREU, C.S., INÁCIO, T.D., FALLAVENA V. L V., AZEVEDO ,C.M.N., MARÇAL J. R. P. **Especiação das formas de ferro em extratos aquosos obtidos na peroxidação de carvões brasileiros**. XI Salão de Iniciação Científica PUCRS agosto 2010.

ACEBAL, C.C. et al. A new automated approach to determine monosodium glutamate in dehydrated broths by using the flow-batch methodology, **Talanta**, 81:116, 2010.

AGRIBUS 2009. Tomate. **Anuário da Agricultura Brasileira**. FNP - Consultoria e Agroinformativo. São Paulo, 2008.

ANDRADE; S I E;LIMA, M B; ARAUJO, M C U; A digital image-based flow-batch analyzer for determining Al(III) and Cr(VI) in water **Microchem. J**, 109 (2013)106-111

AOAC. Disponível em: <http://www.aoac.org/AOAC_Prod_Imis/AOAC/SD/AOAC_Member/SDCF/SD_M.aspx?hkey=427f4f1e-562b-4b7b-b16b-51e24e77f7a2>. Acesso em: 30 de outubro de 2016. In: Barbosa, I.S. Avaliação da distribuição de metais e metalóides em sedimentos marinho superficiais coletados na baía de Aratu, Bahia, Brasil, (Tese de doutorado) UFBA, Salvador-BA, 133p. 2017.

ANDREWS NC, BRIDGES RK. Disorders of Iron Metabolism and Anemia Sideroblastic. In: Nathan DG, Orkin SH (eds.) **Hematology of Infancy and Childhood**. 5.ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998. p. 424-61

ARAÚJO ,M.C.U., DINIZ,P.H.G.A.D.,ALMEIDA,L.F.,HARDING,P.D., Flow-batch analysis, **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 35, 2012.

ARDUÍNO UNO R3.BAU DA ELETRONICA. Disponível em:< : <http://www.baudaeletronica.com.br/arduino-uno-r3.html>>.Acesso em :17 abr. 2018

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16th ed., v. 2. Arlington: **A.O.A.C.**, 1995, Chapter 32. p. 3-4. (method 944.02).

AZEVEDO, E. ; CONCI, Aura. **Computação gráfica: teoria e prática**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

BATISTA, L. **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 de Doutorado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 135p. 2014.

BENEDETTI, L. **Determinação in situ de analitos de interesse alimentício empregando tratamento de imagens digitais de spot tests**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 78p. 2013.

BERNDT H. & SCHALDACH G., J. Anal. At. **Spectrom**. 709-712 (1989).
BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F., O emprego de técnicas analíticas na especiação de metais pesados e a sua importância para o estudo do ambiente, Caderno Temático, v. 2, **UNICAMP**, 2004.

BITTENCOURT, V.C., 1989. O método colorimétrico de 1,10-fenantrolina na determinação do ferro. Tese de doutoramento. E.S.A. "Luiz de Queiroz", 78 pp.

BLUM, A., MONIR, M., WIRSANSKY, I., BEN-ARZI, S. "The beneficial effects of tomatoes" **European Journal of Internal Medicine**, 16 (2005) 402-404.

BOILEAU, T.W., LIAO, Z., KIM, S, LEMESHOW, S., ERDMAN, J.W., CLINTON, S.K. "Prostate carcinogenesis in N-methyl-Nnitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed with tomato powder, lycopene, or energyrestricted diets" **Journal of the National Cancer Institute**, 95, (2003) 1578-1586.

BORGUINI et al., Alimentos orgânicos: qualidade nutritiva e segurança do alimento. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 64-75, 2006.

BREITKREITZ, M.C.; SOUZA, de and POPPI, A. M. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Quím. Nova [online]**. 2014, vol.37, n.3, pp.564-573. ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140092>.

BRESSY,C.F. **Determinação de micronutrientes e contaminantes em amostras de tomates por técnicas espectroanalíticas**,(dissertação de mestrado),UFBA,Salvador-Ba,101p.2011.

BRIDGES KR. Iron metabolism and sideroblastic anemia. In: Nathan DG, Oski FA (eds.) **Hematology of infancy and childhood**. 4.ed. Philadelphia: Saunders Company, 1992. p.391-412.

CARELLI, B. P., GERALD, L. T. S., GRAZZIOTIN, F. G., ECHEVERRIGARAY, S., Genetic diversity among brazilian cultivars and landraces of tomato *lycopersicum esculentum* Mill. revealed by RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, n. 2, p. 395 – 400, 2006.

CASTRO, J.T.; SANTOS, E.C.; SANTOS, W.P.C; COSTA, L.M.; KORN, M.; NÓBREGA, J.A.; KORN, M.G. A, A critical evaluation of digestion of organic procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductivelycoupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**: 78:1378,2009.

COSTA, F.F., **Avaliação da composição em micronutrientes do tomate consoante a variedade e modo de colheita**,2009,98f. tese (mestrado em nutrição clínica) , 2009, faculdade de medicina ,universidade de Coimbra,2009.

COSTA, V.C., AMORIM, F.A.C., DE BABOS, D.V., PEREIRA FILHO, E.R., Direct determination of Ca, K, Mg, Na, P, S, Fe and Zn in bivalve mollusks by wavelength dispersive X-ray fluorescence (WDXRF) and laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), **Food Chemistry** (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.016>

DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de Métodos analíticos: documento orientativo. **INMETRO**, Revisão: 02,Jul.2007.

E.M. Ghoneim, Simultaneous determination of Mn(II), Cu(II) and Fe(III) as 2-(5'-bromo-2'-pyridylazo)-5-diethylaminophenol complexes by adsorptive cathodic stripping voltammetry at a carbon paste electrode, **Talanta** 82 (2010) 646-652

Faustino, R. ; Nascimento, J. ; Silva, N. ; Santos, N. ; Sousa, R. ; Coelho, A. Determinação espectrofotométrica de ferro em amostras de solos com o reagente 2,2'-bipiridina. **53º Congresso Brasileiro de Química**. Rio de Janeiro Outubro de 2013. ISBN: 978-85-85905-06-4

FERRARI, A.A. **Caracterização química do tomate (lycopersicon esculentum Mill) empregando análise por ativação neutrônica instrumental** ,2008, 151f.dissertação(mestrado em ciências),2008, Universidade de São Paulo, Cena,2008.

FERREIRA, S.L.C et al. Development of method for the speciation of inorganic iron in wine samples, **Anal. Chim. Acta**, 602 (2007), doi:10.1016/j.aca.2007.09.002.

FILGUEIRA, F. A. R., Novo Manual de Olericultura: **agrotecnologia moderna na produção de hortaliças**. Viçosa, MG : UFV, p.421, 2008.

FONTES, F. C. R., SILVA, D. J. H., **Produção de tomate de mesa**. Aprenda fácil. Viçosa, MG, p.196, 2002.

GAIÃO, E.N. et al. Digital image-based titrations, **Anal. Chim. Acta**, 570:283, 2006.

GOMES, M.S. et al. Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico, **Quim. Nova**, 31:1577, 2008.

GRÜNHUT, M. et al. Flow-batch analyzer for the chemiluminescence determination of catecholamines in pharmaceutical preparations, **Anal. Letter**, 44:67, 2011.

HONORATO, R.S; ARAÚJO, M.C.U; LIMA, R.A.C; ZAGATTO, E.A.G; LAPA, R.A.S; LIMA, J.L.F.C. 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.

ÍNDIA, Ministry Of Health And Family Welfare, Food Safety And Standards Authority Of India ,**Manual Of Methods Of Analysis Of Foods Metals** , New Delhi ,2015.

KATZ,S.A.; SALEM, H. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review, **J. Appl. Toxicol.** 13:217, 1993.

KOHL, S.K.; LANDMARK, J.D.; STICKLE, D.F. Demonstration of absorbance using digital color image analysis and colored solutions, **J.Chem. Educ.** 83:644, 2006.

KOTAS, J.; STASICKA, Z.. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 263-283, 2000.

KRAMER, G.R; FALCÃO, H.A.S Análise da fortificação de ferro em farinhas. v.4, n.1 p.25-28, Taguatinga-DF. 2011.

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras fundamentais sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Piracicaba: F. J. Krug, 2008. 340p.

LAND, E. H. Recent advances in retinex theory and some implications for cortical computations: color vision and the natural image. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, v. 80, n. 16, p. 5163-5169, 1983.

LAND, E. H. The retinex theory of color vision. **Scientific American**, v. 237, n. 6, p. 108- 128, 1977

LÍBERA, Beatriz Della; SOUZA, Gisele Gonçalves de; PADILHA, Patrícia de Carvalho; LEITE, Patrícia Martins; SAUNDERS, Cláudia; ACCIOLY, Elizabeth. Estratégias de combate às microdeficiências no grupo materno-infantil. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 23, n.3, jul.-set., p. 190 – 198, 2008.

LIMA M.B., ANDRADE S.I.E., BARRETO I.S., ALMEIDA L.F., ARAÚJO M.C.U., A digital image based micro-flow-batch analyzer. **Microchemical Journal** 106, 238-243, 2013.

LIMA M.B., ANDRADE S.I.E., NETA M.S.S., BARRETO I.S., ALMEIDA L.F., ARAÚJO M.C.U., A micro-flow-batch analyzer using *webcam* for spectrophotometric determination of orthophosphate and aluminium(III) in tap water, **Journal of the Brazilian Chemical Society. In Press**, 2014.

LIMA, M.B. et al. Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction, **Talanta**, 89:21, 2012.

LIMA, R. A. C, ALMEIDA, L. F, LYRA , W. S, SIQUEIRA , L. A, GAIÃO , E. N, PAIVA JUNIOR, S. S. L., LIMA, R. L. F. C, Digital movie-based on automatic titrations, **Talanta**, 147, 226-232, 2016.

LIMA, R.A.C. et al. Hardness screening of water using a flow-batch photometric system, **Anal. Chim. Acta**, 518:25,2004.

LIN, Mingyue, et al., Determination of iron in seawater: from the laboratory to in situ measurements, **Talanta**, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.071>.

LIU, Y.; ZHOU, X. "A Simple Texture Descriptor for Texture Retrieval", In: Proceedings of ICTT, p. 1662-1665, 2003

LYRA, W.S. **Espectrometria de emissão em chama baseada em imagens**. João Pessoa, Departamento de Química, UFPB, Dissertação de Mestrado, 103p, 2008.

MALEKI, N.; SAFAVI, A.; SEDAGHATPOUR, F. Single-step calibration prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera, **Talanta**, **64:830, 2004**

MANTOVANI, D.M.B. **Especiação de ferro em concentrado de tomate**. 1989. 94f. tese (mestrado em química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas ,1989.

MELO, PCT. Melhoramento genético do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Campinas: **Asgrow do Brasil Sementes Ltda**. p. 55, 1989.

MELO, P.C.T.; TAMISO, L.G.; AMBROSANO, E.J.; SCHAMMASS, E.; INOMOTO, M.M.; SASAKI, M.E.M.; ROSSI, F. Desempenho de cultivares de tomateiro em sistema orgânico sob cultivo protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.27, n.4, p.553-559, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362009000400025>

MENDES, R. R.; TIRAPGUI, J. Creatina: o suplemento nutricional para a atividade física - Conceitos básicos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 52, p. 117-127, 2002.

NÓBREGA, M. D. O. **Método automático para determinação fotométrica direta de Fe (III) em amostras de óleos comestíveis**. 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

Norma Técnica SABESP, **NTS 010: Determinação de ferro total: método da 1,10 fenantrolina**. São Paulo, Maio,p.10. 2001.

OKADA,I.A. **Determinação simultânea de nutrientes inorgânicos em alimentos: desenvolvimento de metodologia analítica e avaliação de seus níveis em amostras de arroz e feijão "in natura"**.Dissertação de mestrado SÃO PAULO 2003.

PENG, B., SHEN, Y., GAO, Z., ZHOU, M., MA, Y., ZHAO, S., Determination of total iron in water and foods by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with microvolume UV-Vis spectrophotometry, **Food Chemistry** (2014), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.084>

PELIZARO,C.B.; NOGUEIRA,A.R.A.; MENEZES, E.A.;BARROS,A.L.; **Especiação de ferro em sangue por análise de injeção em fluxo** .14° Encontro Nacional de Química Analítica. João Pessoa, Paraíba.7 a 11 de outubro de 2007

PERONICO, V.C.D. **Desenvolvimento de procedimentos para o preparo de amostra na determinação de macro- e micronutrientes em plantas oleaginosas por espectrometria de absorção**.Dissertação(mestrado em química),Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade De Ciências Exatas e Tecnologia,76f.2014.

PESSOA, K.D., SUAREZ W.T., FRANCO, M.O.K, REIS M.F, MOREIRA, R.P.L., SANTOS V.B., Development, optimization and validation of an analytical base based on spot test digital images for the determination of ethanol in cachaça , **The Journal of Engineering and Exact Sciences**,2527-1075,2017.

PIRES, N. R. X.; da SILVA, J. F.; HOLZ, F. P.; FILHO, P. J. S., Especiação química do cromo no sedimento da laguna dos patos – Saco do Laranjal – Pelotas/RS, **XX Congresso de Iniciação Científica – III Mostra Científica**, p. 1-4, 2011.

PLANTIER, Stéphanie Bragatto **Avaliação do teor de ferro em farinhas enriquecidas** / Stéphanie Bragatto Plantier. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis, 2010.46p

PRIEGO-CAPOTE, F.; CASTRO M.D. L. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 9, p.112-123, 2004.

RASTISLAV, S.; YAROSLAV, B.; SILVIA, R.; Speciation of platinum by gfaas using various possibilities of analytical signal enhancement, **Talanta**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.078>

RÍOS-CASTILLO, I.; OLIVARES, M.; BRITO, A.; ROMANA, D. L. D.; PIZARRO, F. One-month of calcium supplementation does not affect iron bioavailability: A randomized controlled trial. **Nutrition**, v. 30, n. 1, p. 44-48, 2014.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

ROSE, A.L.; WAITE, T.D.; Kinetic model for Fe(II) oxidation in seawater in the absence and presence of natural organic matter, **Environ. Sci. & Technol.** 36 (2002) 433-444.

RUZIK, L. Speciation of challenging elements in food by atomic spectrometry. **Talanta**, Netherlands, v. 93, p. 18-31, fev., 2012.

SANTOS, H. B.; MADRUGA, M. S.; BION, F. M.; ANTUNES, N. L. M.; MENDES, K.; ÀGUIDA, R. Estudos bioquímicos e hematológicos em ratos sobre biodisponibilidade de minerais numa dieta enriquecida com multimistura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 613-618, out./dez., 2004.

SCHOTEN, Theo. Course RT2: **image processing**. [S.l.], 2010. Disponível em: . Acesso em: 11 abr. 2018.

SILVA, J. B. C., GIORDANO, L. B. (Org), Tomate para Processamento Industrial, Brasília : EMBRAPA Comunicação e Transferência de Tecnologia. **EMBRAPA – CNPH**, 2000.

SILVA, J.E. et al. A flow-batch internal standard procedure for iron determination in hydrated ethanol fuel by flame atomic absorption spectrometry, **Talanta**, **70:522**, 2006.

SILVA, M.B.; CRISPINO, C.C.; REIS, B.F. Automatic photometric titration procedure based on multicommutation and flow-batch approaches employing a photometer based on twin leds, J. **Braz.Chem.Soc.** 21:1856, 2010.

SIQUEIRA, L. A. ; NUNES, I.S. ; ALMEIDA J., PEDRO L. ; A.NDRADE, R. A.N. ; ARAÚJO, M. C. U. ; A., L. F. ; LIMA, R. A. C. 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.

SIQUEIRA E., ALMEIDA S.G, ARRUDA S. Papel adverso do ferro. **Comun Ciênc Saúde** 2006;17(3):229- 36.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F.; WEST; CROUCH. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Thomson, 2005.

SOARES, M. E.,VIEIRA, E.,BASTOS, M.L. Chromium speciation analysis in bread samples, J. Agric. **Food Chem.** 2010, 58, 1366–1370.

SOUSA, R.A., CAMPOS, N.S., ORLANDO, R. **Preparação de amostras para análise elementar**. Juiz de Fora.2015 (Apostila de Apoio).

SOUZA, A. P. O., ALCANTARA R. L. C., **Alimentos orgânicos: estratégias para o desenvolvimento do mercado** In: NEVES, M. F.; CASTRO, L. T. (Orgs.). Marketing e estratégia em agronegócios e alimentos. São Paulo: Atlas, 2011.

TAVARES, M.R.S. **Um microanalisador em fluxo batelada para determinação fotométrica de sulfitos em bebidas**. 2014. 72 f. Dissertação

(Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

TEIXEIRA, L.S. G. et al. Determinação espectrofotométrica simultânea de cobre e ferro em álcool etílico combustível com reagentes derivados da ferroína. **Quím. Nova [online]**. 2006, vol.29, n.4, pp.741-745. ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000400020>.

TEUBNER, C. "Food - The World of Food" **Teubner Edition**, Munique, 2006.

VERMA, C., TAPADIA, K., BALA SONI, A., Determination of iron (III) in food, biological and environmental samples, **Food Chemistry** (2016), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.011>

VILA NOVA, P. C. C.; ARRUDA, E. J.; OLIVEIRA, L. C. S.; SANTOS, g.; ROEL, A. R.; Stropa, J. M. Avaliação de método convencional e digestão úmida para determinação de níveis de Fe, Mn, Ni, Cu, Co, Mg, Zn, Ca, Mo e Se em amostras secas de tomates orgânicos (*Solanum lycopersicum* L.) por Absorção Atômica de Chama (FAAS). **J. Biotec. Biodivers**, v. 3, n.4, p. 159-165, 2012

WARDLAW GM, KESSEL, M. (2002). **Perspective in nutrition** (5th ed). McGraw Hill, Boston. pp. 418-461.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva, 2002.