



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

Dissertação de Mestrado

Analizador *micro-flow-batch* usando uma micro-coluna de cádmio esponjoso em linha para a determinação fotométrica de nitrato e de nitrito em laticínios

Eduardo Antonio de Lima

João Pessoa – PB - Brasil

Agosto/2013



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

Dissertação de Mestrado

**Analizador *micro-flow-batch* usando uma micro-coluna de
cádmio esponjoso em linha para a determinação
fotométrica de nitrato e de nitrito em laticínios**

Eduardo Antonio de Lima*

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 em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida

Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcante Lima

*** Bolsista CAPES**

João Pessoa – PB - Brasil

Agosto/2013

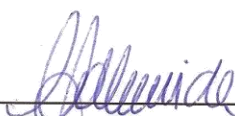
*L732a Lima, Eduardo Antonio de.
 Analisador micro-flow-batch usando uma micro-coluna de
 cádmio esponjoso em linha para a determinação fotométrica de
 nitrato e de nitrito em laticínios / Eduardo Antonio de Lima. -
 João Pessoa, 2013.
 82f. : il.
 Orientador: Luciano Farias de Almeida
 Coorientador: Ricardo Alexandre Cavalcante Lima
 Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN
 1. Química. 2. Micro flow-batch. 3. Uretana-acrilato.
 4. Coluna redutora de cádmio. 5. Nitrato e nitrito. 6. Laticínios.*

UFPB/BC

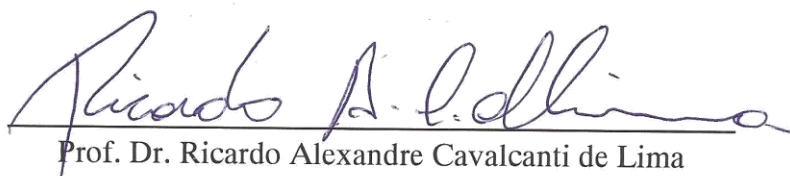
CDU: 54(043)

“Um Analisador micro-flow-batch usando uma micro-coluna de cádmio esponjoso em linha para a determinação fotométrica de nitrato e nitrito em laticínios”.

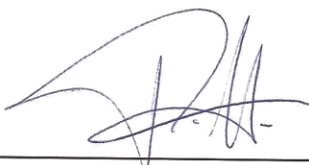
Dissertação de Mestrado de Eduardo Antonio de Lima aprovada pela banca examinadora em 29 de agosto de 2013:



Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida
Orientador/Presidente



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



Prof. Dr. Pablo Nogueira Teles Moreira
Examinador



Profa. Dra. Cláudia de Oliveira Cunha
Examinadora

“Você não sabe
O quanto eu caminhei
Pra chegar até aqui
Percorri milhas e milhas
Antes de dormir
Eu nem cochilei...”

A estrada

Tony Garrido – Cidade Negra

A minha mãe Edilsa Ferreira de Lima, todos familiares e amigos
sempre presentes em minha vida.
Dedico.

Agradecimentos

- À Deus por tudo.
- A minha mãe, Edilsa Ferreira de Lima e todos os familiares por todo companheirismo, incentivo e carinho.
- Ao professor Luciano Farias de Almeida pela valiosa orientação, ensinamentos e ajuda ao longo dos dois anos de mestrado.
- Ao professor Ricardo Alexandre pela disponibilidade, co-orientação e valiosas discussões para a elaboração deste trabalho.
- Ao professor Mário César Ugulino de Araújo por ceder gentilmente às instalações do LAQA.
- A Wellington da Silva Lyra por toda disponibilidade e conhecimento na elaboração deste trabalho.
- Aos companheiros do grupo de microfabricação Marcelo Lima, Inakã Barreto, Márcio Rennam e Stéfani Iury, pela amizade e auxílio significativo prestado na elaboração desse trabalho.
- Aos Companheiros do LAQA Ivson Nino (Barbosa), Dayvson Ribeiro (Loran), Cleison Eloi, Sófacles Figueredo, Danielle Nascimento, Karla Daniele, Valéria Visani, Adenilton Camilo, Israel Filho, Maurício Monteiro, Flaviano, Willy Castro e Urijatan por toda amizade, ajuda e momentos de descontração.
- A todos os demais membros do LAQA.
- A CAPES pela bolsa concedida para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Sumário

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Siglas e Abreviaturas	xii
Resumo	xiv
Abstract	xv
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 - Caracterização da Problemática	2
1.2 - Objetivos	3
1.2.1 - Geral	3
1.2.2 - Específicos	3
1.3 - Sistemas automáticos de análise	4
1.4 - Analisadores <i>flow-batch</i>	7
1.5 - Miniaturização de sistemas automáticos	9
1.5.1 - Microfabricação em uretana-acrilato	11
1.5.2 - <i>Micro-flow-batch</i>	14
1.7 - Nitrato e nitrito em laticínios	16
1.7.1 - Determinação de nitrato e nitrito	17
1.8 - Espectrofotometria UV-Vis	19
1.8.1 - Fotometria	20
Capítulo 2 - Experimental	23
2.1 - Reagentes, amostras e soluções	24
2.1.1 - Preparação dos reagentes e soluções	24
2.1.2 - Preparação das amostras	25
2.1.3 - Preparação da micro-coluna	26
2.2 - Miniaturização da câmara do <i>Flow-Batch</i> (μ FBA)	27
2.3 - Microssistema de análise	30
2.3.1 - Montagem do microssistema	30
2.5 - O diagrama e procedimentos do μ FBA	33
2.6 - Programa de gerenciamento do (μ FBA)	35

2.7 – Determinação direta de nitrito	36
2.8 - Determinação de nitrato	37
2.9 – Método de referência	37
2.10 - Procedimentos para avaliação da performance analítica	39
2.7.1 – Teste de recuperação aparente	43
Capítulo 3 - Resultados e Discussão	44
3.1 - Otimização dos parâmetros do μ FBA	45
3.2 - Determinação de nitrato e nitrito	48
3.3 - Teste de recuperação	54
3.4 - Comparação do μ FBA proposto com outros sistemas	55
Capítulo 4 – Considerações finais e perspectivas	57
4.1 - Conclusão	58
4.1 - Perspectivas	59
Capítulo 5 - Referências	60

Lista de Figuras

Figura 1.1	Diagrama esquemático de um sistema de análise em fluxo simples. (a) exemplos de sistemas para propulsão dos fluidos, (b) exemplos de sistemas de injeção, (c) exemplos de sistemas de mistura e (d) exemplos de detectores. (Adaptada de McKelvie, 2008)	6
Figura 1.2	Esquema simplificado com os componentes principais de um sistema FBA. (a) câmara de mistura; (b) agitador magnético; (c) válvulas solenoides de três vias; (d) bomba peristáltica; (e) acionador de válvulas; (f) detector; (g) computador.	9
Figura 1.3	fórmula estrutural de um oligômero uretana-acrilato.	11
Figura 1.4	Esquema geral simplificado para microfabricação em uretana-acrilato. (a) montagem do molde, (b) molde, (c) deposição da resina, (d) fixação da resina, (e) polimerização, (f) sistema polimerizado, (g) selagem e (h) microsistema selado.	12
Figura 1.5	Mecanismo da reação usada no método de Griess.	18
Figura 1.6	Representação esquemática de um feixe de radiação P_0 sendo atenuado após interagir com a amostra resultando na radiação emergente P .	20
Figura 1.7	Representação típica dos espectros de emissão de LEDs comerciais.	22
Figura 2.1	Microcoluna de cádmio esponjoso.	27
Figura 2.2	Esquema da confecção do μ FBA. (a) montagem dos moldes, (b) moldes das camadas, (c) polimerização da resina nas camadas, (d) canais gravados, (e) selagem do sistema e (f) sistema μ FBA confeccionado.	29
Figura 2.3	Micro-câmara do μ FBA prototipado em uretana-acrilato.	29
Figura 2.4	Sistema μ FBA construído para análise de laticínios. (a) micro-câmara de mistura, (b) LED verde, (c) agitador, (d) fototransistor e (e) Motor Drive.	31

Figura 2.5	Representação do sistema automático micro flow-batch para a análise de nitratos e nitritos. (a) válvula solenoide, (b) interface USB, (c) acionador de válvulas, (d) frascos das soluções e (e) microbombas solenoides.	32
Figura 2.6	Diagrama do sistema automático do μ FBA. (a) microcâmara, (b) válvula solenoide de três vias, (c) microcoluna de cádmio, (d) motor drive e (f) fio de nylon. μ P1 a μ P5 são as microbombas, onde (A) amostra, (R) reagente cromogênico, (L) limpeza e (D) descarte.	33
Figura 2.7	Interface de controle automático do μ FBA para análise de nitritos e nitrato em amostras de leite e laticínios	35
Figura 2.8	(a) Coluna redutora montada sobre um suporte universal e (b) detalhe da coluna redutora de cádmio esponjoso.	38
Figura 2.9	Curvas de calibração e equações utilizadas nos cálculos de LOD (a) e LOQ (b).	41
Figura 3.1	Efeito das concentrações dos reagentes sobre o sinal analítico. (a) NED, (b) sulfanilamida e (c) ácido clorídrico.	46
Figura 3.2	Efeito das variações de volumes de amostra (a) e reagente (b) sobre o sinal analítico.	48
Figura 3.3	Efeito dos tempos de espera sobre o sinal analítico.	49
Figura 3.4	Curvas de calibração analítica μ FBA (linha cheia azul) e HP (linha preta tracejada).	49
Figura 3.5	Gráfico dos resíduos dos modelos de calibração HP e μ FBA, respectivamente, para os dois analitos analisados.	50

Lista de Tabelas

Tabela 2.1	Acionamento das microbombas para determinação de nitrito e nitrato.	34
Tabela 2.2	ANOVA para o ajuste de um modelo pelo MMQ	42
Tabela 3.1	Parâmetros selecionados do μ FBA proposto para a determinação de NO_3^- e NO_2^- em amostras de laticínios.	45
Tabela 3.2	Tabela ANOVA para o modelo linear das curvas de calibração de nitrito e nitrato.	51
Tabela 3.3	Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos pelos métodos μ FBA e HP.	52
Tabela 3.4	Valores médios e incertezas das concentrações das amostras de laticínios ($n=5$) para a determinação de nitrito e nitrato ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) usando o μ FBA proposto e o método de referência.	53
Tabela 3.5	Comparação entre LOD e LOQ (em $\mu\text{g L}^{-1}$) para a determinação de nitrato e nitrito no instrumento proposto (μ FBA) e referência (HP), a 95% de confiança estatística.	54
Tabela 3.6	Teste de recuperação de nitrato e nitrito em amostras de laticínios ($n = 3$).	55
Tabela 3.7	Comparação das características analíticas do μ FBA proposto e outros sistemas automáticos recentemente propostos para determinação de NO_3^- e NO_2^- em amostras de laticínios.	56

Lista de Siglas e Abreviaturas

μ-TAS	<i>Miniaturized total chemical analysis system</i> – sistema miniaturizado de análise química total
μFBA	<i>Micro flow-batch analyser</i> – microsistema de análise em fluxo-batelada
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> – análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
dpi	<i>Dots per inch</i> – pontos por polegada
FBA	<i>Flow-batch analyser</i> – análise em fluxo-batelada
FIA	<i>Flow injection analyser</i> – análise por injeção em fluxo
LED	<i>Light emitting diode</i> – diodo emissor de luz
LIGA	<i>Lithography, galvo and abformung</i> – litografia, eletroformação e moldagem
LOD	<i>Limit of detection</i> – limite de detecção
LOQ	<i>Limit of quantitation</i> – limite de quantificação
MFA	<i>Multicommutation in flow analysis</i> – análise em fluxo multicomutado
MSFA	<i>Monosegmented flow analysis</i> – análise em fluxo monossegmentado
PDMS	Polidimetilsiloxano
PE	Poliestireno
PMMA	Polimetilmetacrilato
PTFE	Politrifluoroetileno

PVC	Policloreto de vinila
REM	Radiação eletromagnética
SFA	<i>Segmented flow analysis – análise em fluxo segmentado</i>
TAS	<i>Total chemical analysis system</i> – sistema de análise química total
UA	Uretana-acrilato
UV-Vis	Ultravioleta-visível

Resumo

Título: Analisador *micro-flow-batch* usando uma micro-coluna de cádmio esponjoso em linha para a determinação fotométrica de nitrato e de nitrito em laticínios

Neste estudo, um analisador *micro-flow-batch* (μ FBA) utilizando uma micro-coluna redutora de cádmio em linha foi desenvolvido para a determinação fotométrica de íons nitrato e nitrito em amostras de laticínios. O método empregado baseia-se na reação de Griess-Llosvay e a medição da absorbância foi realizada a 540 nm, utilizando um LED verde integrado na micro-câmara construída em resina fotopolimerizável uretano-acrilato. Inicialmente, o teor de íons nitritos natural da amostra de laticínio é determinado na micro-câmara de mistura, enquanto que o nitrato é reduzido a nitrito na micro-coluna de cádmio esponjoso acoplada ao microssistema e posteriormente determinado na micro-câmara como nitrito. O teor de íons nitrato foi estimado a partir da diferença entre a segunda e a primeira determinação. A curva analítica para nitrato e para nitrito foi linear na faixa de trabalho de 10,0 a 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, com um coeficiente de correlação (r^2) de 0,992 e 0,998, respectivamente. O limite de detecção e o desvio padrão relativo foi calculado em 0,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ e <1,7% ($n = 5$) para o nitrito, e 0,41 $\mu\text{g L}^{-1}$ e <1,3% ($n = 5$) para o nitrato. Comparando-se com os métodos de referência, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando se aplica o teste t pareado com nível de confiança de 95%. A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação (97,7 a 102,9%). O microssistema proposto empregando a micro-coluna de cádmio esponjoso em linha apresentou portabilidade satisfatória, robustez, flexibilidade, aparelhagem simples e consumo reduzido de produtos químicos em relação aos métodos automáticos mais recentes.

Palavras-chave: Micro *flow-batch*; Uretano-acrilato; Coluna redutora de cádmio; Nitrato e nitrito; Laticínios.

Abstract

Title: **Micro-flow-batch analyzer using an in-line cadmium sponge microcolumn for the photometric determination of nitrate and nitrite in dairy samples**

In this study, a micro-flow-batch analyzer (μ FBA) using an in-line cadmium reduction microcolumn for the photometric determination of nitrate and nitrite in dairy samples was developed. The method is based on the Griess-Llosvay reaction and measuring of the absorbance at 540 nm using a green LED integrated into the μ FBA built in the urethane-acrylate resin. Initially, the natural nitrite ion content of natural dairy sample product is determined in the micro-mixing chamber, while the nitrate is reduced to nitrite in the micro-column coupled to the micro cadmium sponge and then determined as in the micro-chamber nitrite. content of nitrate ions was estimated from the difference between the first and second determination. The analytical curve for nitrate and nitrite was linear in the work range of 10.0 – 100.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ with a correlation coefficient of 0.992 and 0.998, respectively. The limit of detection and relative standard deviation were estimated at 0.39 $\mu\text{g L}^{-1}$ and < 1.7 % ($n = 5$) for nitrite and, 0.41 $\mu\text{g L}^{-1}$ and < 1.3 % ($n = 5$) for nitrate. Comparing with the reference methods, no statistically significant differences were observed when applying the paired t-test at a 95% confidence level. The accuracy was assessed through recovery test (97.7 to 102.9 %). The proposed microsystem employed in-line cadmium sponge microcolumn presented satisfactory portability, robustness, flexibility, low-cost device and reduced chemicals consumption compared to recent methods.

Keywords: Micro-flow-batch analyzer; Urethane-acrylate resin; Cadmium reduction column; Nitrate and nitrite; Dairy samples.



Capítulo 1 – Introdução

1.1 - Caracterização da Problemática

A exposição humana a compostos que apresentam íons nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) como aditivos conservantes deve ser feita com cautela, pois existe uma alta possibilidade desses íons formarem compostos precursores para o câncer, como as nitrosaminas (DUARTE; MÍDIO, 1996; LIJINSKI, 1984; WHO, 1978). A presença de nitrosaminas em alimentos, especialmente em laticínios deve-se à adição de NO_3^- e/ou NO_2^- durante o processo de fabricação, para auxiliar na conservação dos mesmos (DUTRA *et al.*, 2007). Um outro problema ocorre quando o nitrito pode agir sobre a hemoglobina e originar a metahemoglobinemia, impedindo que ela exerça a função normal de transportar oxigênio. Dessa forma, o controle desses compostos em matrizes de laticínios faz-se conveniente, pois mesmo em concentrações reduzidas podem acarretar problemas à saúde.

Para a determinação da concentração de NO_3^- e NO_2^- em amostras de laticínios nas indústrias de alimentos geralmente é empregado o método de Griess na amostra pré-tratada, livre de proteínas (AOAC, 1997). Entretanto, esse método de rotina é dispendioso e laborioso apresentando vários inconvenientes, a exemplo da: baixa frequência analítica (cerca de 2 amostras por hora), utilizando grandes quantidades de cádmio para construção da coluna redutora, exigindo ainda habilidades do analista nas várias etapas do processo (LIMA *et al.*, 2006).

Devido a essas desvantagens e à crescente demanda por análises mais rápidas e reprodutíveis, sistemas automáticos de análise química vem sendo propostos, como por exemplo, a análise por injeção em fluxo (*Flow Injection Analysis*, FIA) (CALATAYUD *et al.*, 1998) e análise por injeção sequencial (*Sequential Injection Analysis*, SIA) (WHO, 1978; PISTÓN *et al.*, 2011). No entanto, esses sistemas em fluxo apresentam algumas desvantagens, como a homogeneização ineficiente e a utilização de fluído carregador, o que gera grande volume de resíduos e promove a dispersão da amostra, acarretando perda significativa de sensibilidade nas medidas, além da necessidade de calibração e ajuste manual regular.

Dentre os sistemas automáticos de análise recentemente propostos, destaca-se o sistema automático *micro-flow-batch* (μ FBA) (MONTE FILHO, 2010), que alia as características vantajosas dos sistemas em fluxo à dos sistemas em batelada com um reduzido consumo de reagentes e amostras gerando um microvolumes de resíduos por análise. Todavia, esse sistema ainda não foi utilizado com etapas de pré-tratamento da amostra acoplado em linha, o que favoreceria o desenvolvimento de novas estratégias de automação para a determinação, por exemplo, dos íons nitrato em amostras de laticínios utilizando microcoluna de cádmio.

Neste trabalho de pesquisa é proposto um analisador automático μ FBA com uma micro-coluna de cádmio esponjoso acoplada em linha para determinação fotométrica sequencial de nitrato e nitrito em amostras de laticínios. Tal microssistema permite uma abordagem mais simples, sensível, precisa e de menor consumo de reagentes e amostras, gerando um baixo volume de resíduos. Além de se apresentar como um exemplo satisfatório para outras possíveis implementações de etapas de pré-tratamentos acoplados a esse novo tipo de sistema miniaturizado.

1.2 Objetivos

1.2.1 - Geral

Desenvolver um analisador *micro-flow-batch* (μ FBA) empregando uma micro-coluna de cádmio esponjoso acoplado em linha para a determinação fotométrica sequencial de íons nitrato e de nitrito em amostras de laticínios.

1.2.2 - Específicos

- Construir a micro-câmara de mistura;
- Construir e avaliar as características da micro-coluna de cádmio esponjoso;
- Montar um microssistema flow-batch com micro-coluna de cádmio acoplada.

- Desenvolver o *software* de controle para do (μ FBA);
- Aplicar o microssistema desenvolvido à determinação de nitrato e nitrito;
- Avaliar o desempenho analítico do sistema proposto;
- Aplicar o microssistema em amostras reais de laticínios.

1.3 - Sistemas automáticos de análise

Os sistemas automáticos de análise têm por objetivo simplificar os procedimentos analíticos convencionais de forma a maximizar a frequência analítica, minimizar os erros pela manipulação de amostras e reagentes e reduzir os custos para grandes demandas de análise. Com esse desenvolvimento, a manipulação de substâncias instáveis, tóxicas, explosivas ou até mesmo radioativas, é realizada com riscos reduzidos ao operador além de possibilitarem um monitoramento contínuo de um processo qualquer e redução de volumes de análise, gerando resultados reprodutíveis e controle dos equipamentos com a mínima intervenção do analista. O uso dos analisadores também é possível em procedimentos que são mais longos e mais complicados do que aqueles realizados manualmente (VALCÁRCEL; CÁRDENAS, 2000).

Os analisadores automáticos de análise podem ser divididos em três grandes grupos como segue:

- Analisadores automáticos discretos ou em batelada;
- Analisadores automáticos robotizados;
- Analisadores automáticos em fluxo.

Os analisadores automáticos discretos são bem conhecidos e empreendidos desde o início do século XX (ZIEGEL, 1914). A principal característica desses sistemas de análise é o uso de aparatos mecânicos para transportar a mistura reacional até o detector. Cada amostra é armazenada em um recipiente próprio e a adição de reagentes é feita empregando uma bureta ou seringa automática para posterior agitação. De maneira geral, a detecção é feita após o estabelecimento do equilíbrio químico e físico da reação, para alcançar uma maior sensibilidade analítica

favorecendo assim as reações de cinética lenta, que necessitam de um tempo maior de residência (FACCHIN, 1996).

Os analisadores automáticos robotizados têm por principal característica apresentar partes mecânicas controladas por computador, como por exemplo, um braço mecânico para executar as operações analíticas requeridas, minimizando assim os procedimentos executados pelo analista. São sistemas que apresentam características interessantes, pois podem ser empregadas para a manipulação de substâncias perigosas como explosivos e/ou radioativos. Todavia, sua mecânica complexa, seu elevado custo de aquisição e manutenção são fatores que inviabilizam a sua utilização em muitos laboratórios de rotina (FACCHIN, 1996).

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

De maneira geral, estes sistemas em fluxo apresentam uma configuração comum de componentes, como representado na [Figura 1.1](#).

Os fluídos são geralmente impulsionados por uma bomba peristáltica, embora vários outros mecanismos sejam destinados para este fim, tais como as bombas pistão ([Figura 1.1\(a\)](#)). O volume adequado de reagentes e amostras adicionados ao sistema é normalmente, feito por válvulas solenoides, rotatórias, ou por injetor proporcional ([Figura 1.2\(b\)](#)).

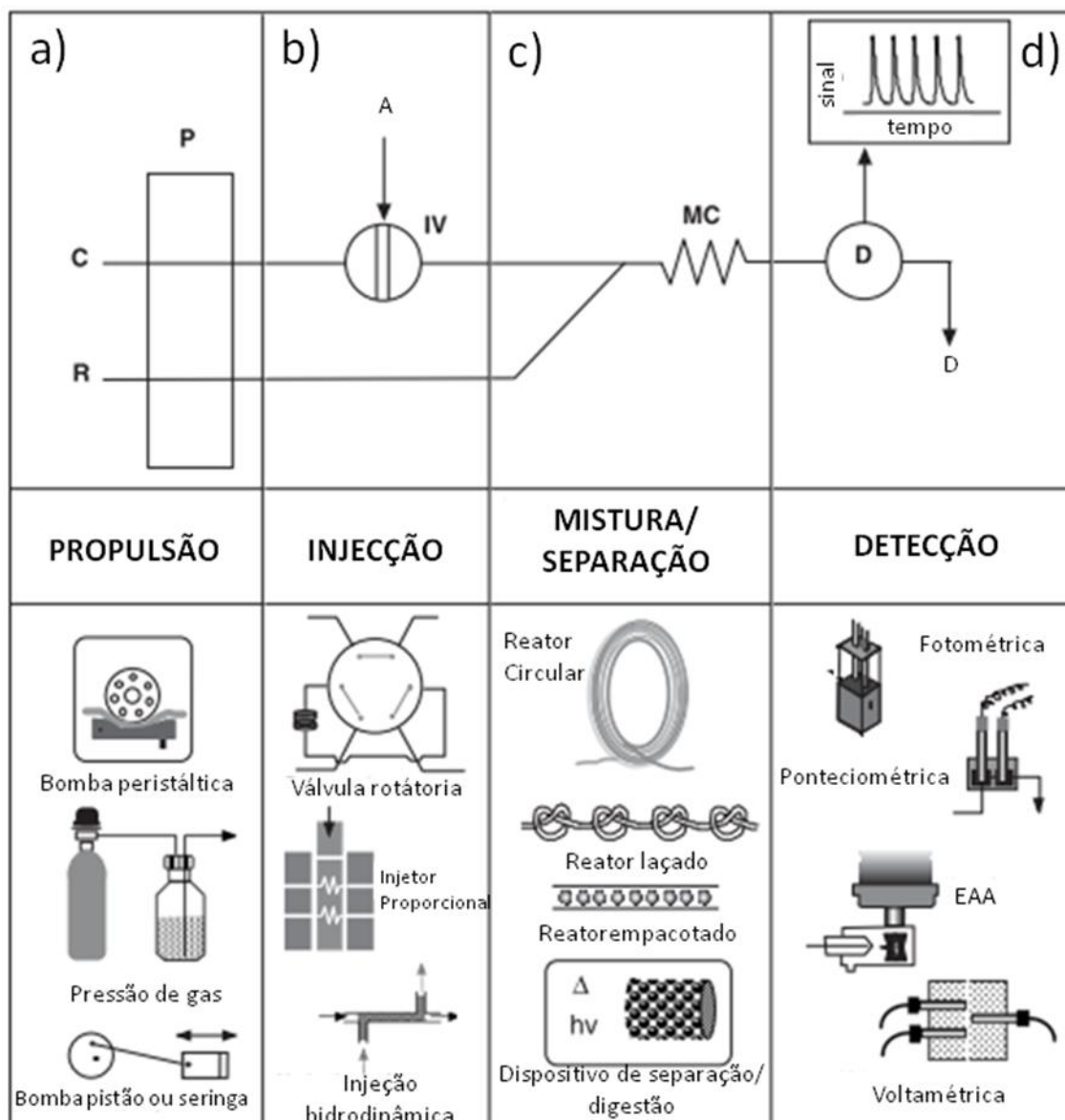


Figura 1.1 - Diagrama esquemático de um sistema de análise em fluxo simples. (a) exemplos de sistemas para propulsão dos fluidos, (b) exemplos de sistemas de injeção, (c) exemplos de sistemas de mistura e (d) exemplos de detectores. (Adaptada de McKelvie, 2008)

Para proporcionar a mistura, digestões ou separações entre amostras e reagentes, são utilizadas bobinas de reação, que podem ser modificadas conforme seja o interesse do processo (Figura 1.2(c)). O sistema de detecção pode ser realizado das mais diversas maneiras conforme a necessidade do método desenvolvido (Figura 1.2(d)).

Os principais analisadores automáticos em fluxo compreendem os analisadores em fluxo segmentado (*Segmented Flow Analysis*, SFA); analisadores por injeção em fluxo (*Flow Injection Analysis*, FIA);

analísadores em fluxo monosegmentado (*Monosegmented Flow Analysis*, MSFA); analisadores por injeção sequencial (do inglês: Sequential Injection Analyser, SIA) e analisadores em fluxo multicomutado (*multicommutation in flow analysis*, MFA).

1.4 - Analísadores *flow-batch*

Os analisadores em fluxo-batelada (*flow-batch analysis*, FBA) foram desenvolvidos inicialmente por Honorato *et al.* (1999). Esse sistema automático foi concebido com o propósito de realizar titulações empregando o método de Fibonacci para detectar o ponto final desse processo. Nesse trabalho, a acidez de vinhos brancos foi estudada por titulação com NaOH, utilizando o púrpura de metacresol como indicador do final da reação de titulação.

Estes sistemas são caracterizados como um híbrido dos sistemas automáticos em fluxo e os em batelada, incorporando as características favoráveis dos dois analisadores. O transporte dos reagentes e da(s) amostra(s) e monitoramento do sinal analítico, este último pode ser feito na câmara de mistura, ocorrem de forma similar aos analisadores automáticos em fluxo, comentados anteriormente. Já o processamento da amostra é realizado em uma câmara de mistura antes de ser submetida à detecção. Por aliar as características intrínsecas dos analisadores em fluxo (alta velocidade analítica, baixo consumo de amostra e reagentes, baixo custo de montagem e facilidade de automatização) e dos analisadores em batelada (flexibilidade, robustez e versatilidade) fornece ao analisador *flow-batch*, figuras de mérito analítico, tais como: altas precisão e velocidade analítica, baixo custo por análise, baixo consumo, manipulação e contaminação de reagentes e amostras e geração de pouco resíduo para o meio ambiente.

Os analisadores fluxo-batelada apresentam as seguintes características (Diniz *et al.* 2012):

- Possuem uma câmara de mistura, principal componente, que se constitui de uma pequena peça cilíndrica, geralmente de

politetrafluoretileno (PTFE) ou acrílico, com volume interno variável de 0,5 a 2,0 mL. Nessa câmara, ocorrem geralmente a maior parte dos procedimentos analíticos, como adição, homogeneização, preparo de soluções de calibração, detecção do analito, dentre outros e sua mistura torna-se mais rápida e homogênea pela utilização de um agitador magnético;

- Podem usar válvulas solenoides de três vias para direcionar e adicionar os fluídos;
- A propulsão dos fluídos pode ser realizada através de uma bomba peristáltica;
- O controle do sistema de propulsão e adição dos fluídos é realizado por meio de um módulo de controle, geralmente *labmade*;
- O sistema de detecção pode ser ou não acoplado a câmara de mistura, conforme a necessidade ou configuração do sistema requerido;
- Todo o sistema automático geralmente é administrado via computador por meio de um software de controle, geralmente desenvolvido em ambiente gráfico LabView®;
- A análise é processada em batelada, assim, as medidas podem ser realizadas com grande sensibilidade, permitindo que atinjam os equilíbrios químicos e físicos inerentes ao processo analítico;
- A medida do sinal analítico pode ser feita em fluxo ou em fluxo interrompido (*stopped flow*), podendo ser feita diariamente na câmara aberta;
- Oferecem grande versatilidade e flexibilidade para automatização de métodos clássicos de análise.

Uma representação esquemática de um sistema de análise *flow-batch* (FBA) pode ser observada na [Figura 1.2](#), com todos os componentes estruturais comumente utilizados para várias operações unitárias no processo de análise.

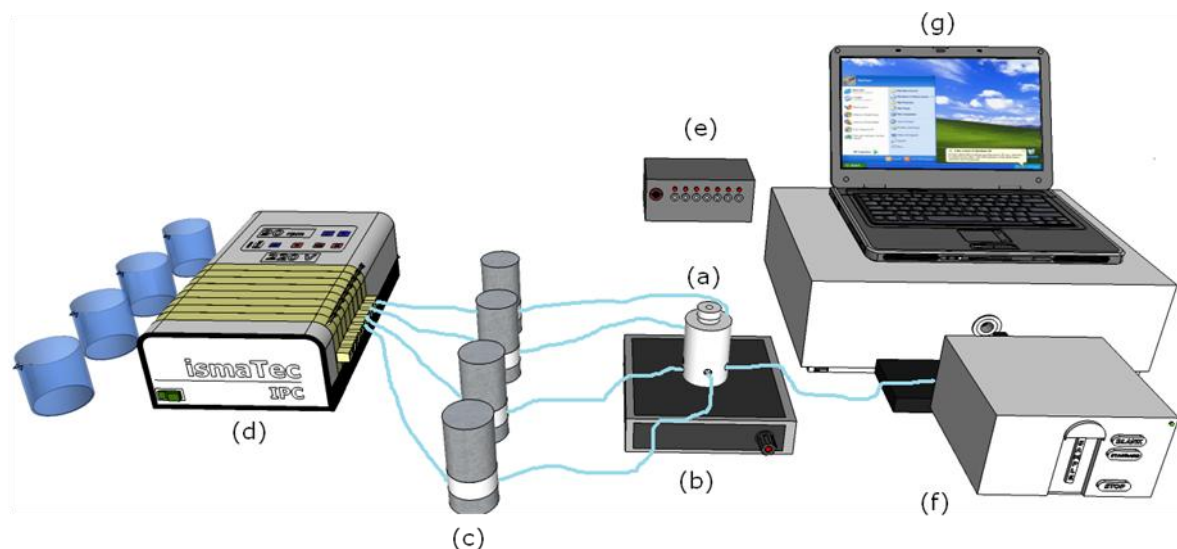


FIGURA 1.2. Esquema simplificado com os componentes principais de um sistema FBA. (a) câmara de mistura; (b) agitador magnético; (c) válvulas solenoides de três vias; (d) bomba peristáltica; (e) acionador de válvulas; (f) detector; (g) computador.

1.5 - Miniaturização de sistemas automáticos

A química analítica moderna vem apresentando uma tendência interessante dos sistemas automáticos de análise, a miniaturização. Fatores importantes como elevada frequência analítica (número de amostras processadas por tempo), a redução no consumo de reagentes e amostras e a mínima geração de resíduos, além da portabilidade são aspectos relevantes destes dispositivos que buscam atender às exigências da Química Verde (ARMENTA *et al.*, 2008). Nesse sentido, o conceito de microssistemas de análise total (*Miniaturized total chemical analysis system*, μ TAS) foi proposto no início dos anos 90 por Manz *et al.* (1990), onde um pequeno “chip” contendo estruturas micrométricas seria capaz de realizar todas as operações necessárias a um determinado procedimento analítico, desde o preparo da amostra até a detecção do analito. Para isto, tais dispositivos deveriam apresentar, de forma integrada, bombas, válvulas, reatores, unidades de separação e detectores que permitiriam uma automação eficiente de todo o processo analítico.

Os avanços na área da microeletrônica contribuíram significativamente para a microfabricação de microdispositivos analíticos. Materiais como quartzo, vidro e silício são utilizados normalmente para a fabricação desses circuitos integrados (CI), como a corrosão por via úmida ou por via seca (MADOU, 1997), onde regiões específicas do substrato são atacadas por um banho químico ou por ação de um plasma, respectivamente. E por fim, a selagem é efetuada juntando-se a placa que contém os canais com outra placa de substrato aplicando-se altas temperatura e pressões (SILVA, 2012). Estes processos resultam em canais bem definidos sobre materiais inertes a ataques químicos. Entretanto, o acesso a estas tecnologias exige condições especiais de trabalho como sala com alto controle de limpeza e reagentes em altas concentrações, além do uso de equipamentos de alto custo, tornando esses processos restritos aos grandes centros e/ou laboratórios de pesquisa com maior concentração de recursos financeiros disponíveis.

Em contrapartida, diversas estratégias de microfabricação que utilizam polímeros relativamente baratos como substrato têm sido bastante exploradas recentemente (FONSECA, 2008; WHITESIDES, 2006). O uso destes materiais apresenta vantagens do ponto de vista da resistência química e mecânica, bem como da relativa facilidade no desenvolvimento de dispositivos microfluídicos a custos reduzidos.

De maneira geral, as técnicas alternativas de microfabricação utilizam polímeros elastômeros como o PDMS (polidimetilsiloxisano), PVC (policloreto de vinila) e PE (poliestireno), pois são materiais mais baratos, resistentes a ataques químicos e não necessitam de grandes aparatos tecnológicos para serem trabalhados. Dessa forma, os trabalhos com tais polímeros, devido as suas propriedades particulares em relação aos substratos tradicionalmente (vidro, quartzo, silício), permitem pesquisas cada vez mais inovadoras em instrumentação analítica (WHITESIDES, 2006).

1.5.1 - Microfabricação em uretana-acrilato

Fernandes e Ferreira (2006) demonstraram que uma resina fotopolimerizável composta por poliuretana-acrilato, bastante empregada para a confecção de carimbos, poderia ser utilizada no desenvolvimento de microestruturas fluídicas a partir de um processo simples e de baixo custo (tal qual a produção de carimbos). Essa técnica permite construir canais de até 0,25 mm de diâmetro com boa resolução, além de uma resistência física e química adequada a determinações analíticas (FONSECA, 2008; MONTE FILHO, 2010). Vários produtos comerciais estão disponíveis como oligômeros, que é um número finito de unidades de monômeros, sensíveis ao UV. A Figura 1.3 apresenta a fórmula estrutural provável de um desses produtos segundo a empresa belga Cytec®.

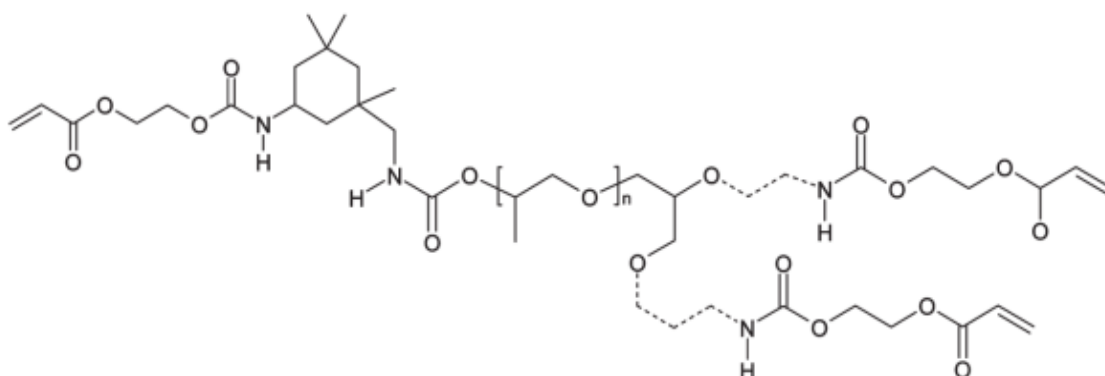


Figura 1.3 – fórmula estrutural de um oligômero uretana-acrilato.

As propriedades dessa resina são bastante complexas e sua estrutura microscópica ainda é estudada. Essas propriedades seriam em parte explicadas por aglomerações de poliacrilato dispersas sobre um mar de cadeias de poliuretano fixadas por ligações cruzadas, conferindo-lhe assim resistência à tração e certa elasticidade. O uretano-acrilato é classificado como material termorrígido, pois não amolece com o aquecimento, e caso o aquecimento continue pode vir a se decompor, fato este que indica a intensidade das ligações cruzadas de sua cadeia carbônica. Os mesmos autores demonstraram também que este substrato

é inerte a diversos solventes orgânicos e à soluções concentradas de ácidos e bases, o que o torna essa resina é atrativa para muitas aplicações em Química.

A Figura 1.4 ilustra as etapas básicas do processo de microfabricação em uretana-acrilato.

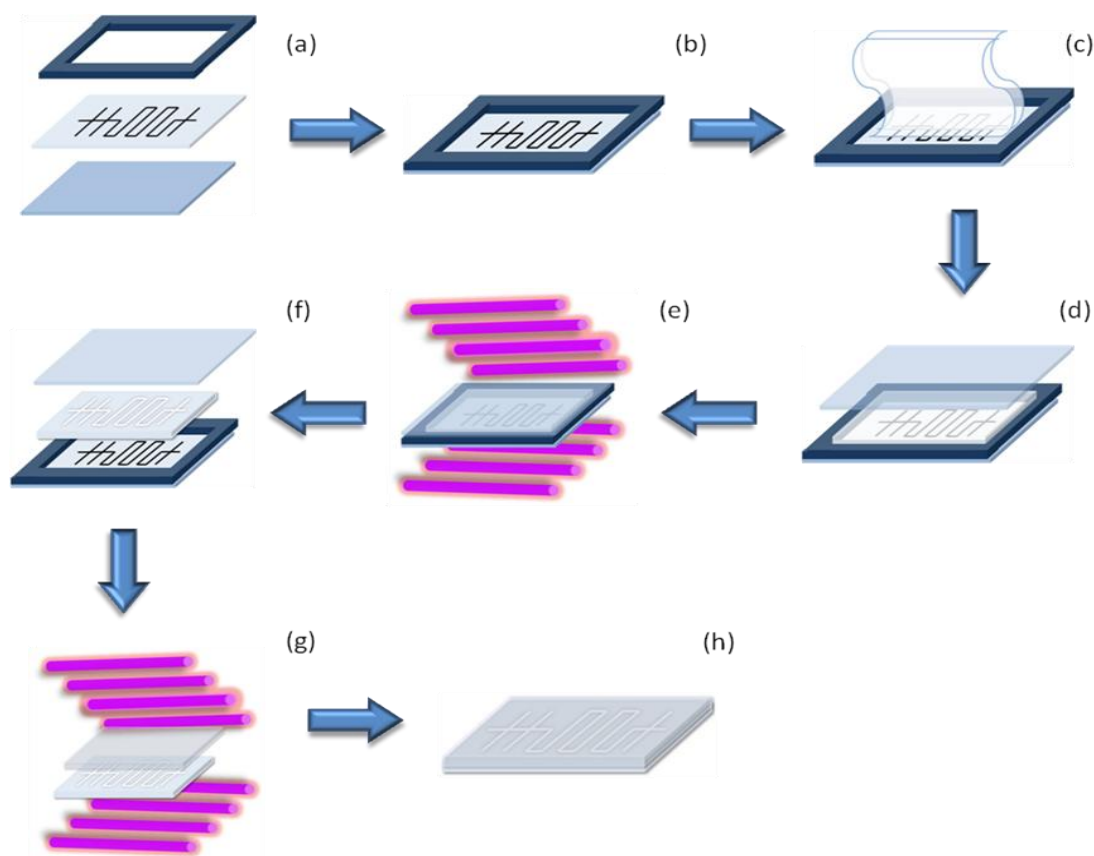


Figura 1.4 - Esquema geral simplificado para microfabricação em uretana-acrilato. (a) montagem do molde, (b) molde, (c) deposição da resina, (d) fixação da resina, (e) polimerização, (f) sistema polimerizado, (g) selagem e (h) microsistema selado.

A Figura 1.4 (a) e (b) ilustram a montagem do molde onde a resina será depositada, o diâmetro do sistema será indicado pela espessura da moldura de borracha empregada, uma fina placa de acrílico a qual forma a base do molde e não interage com a radiação ultravioleta, que é utilizada para polimerizar a resina (FONSECA, 2007).

O layout (máscara) do microsistema pode ser feito em programas computacionais como *Corel Draw* ou *AutoCad*, o qual posteriormente é

impresso em um filme de poliéster (transparência de retroprojeto) em uma impressora a laser de preferência de melhor resolução possível, está que é dada em dpi (do inglês *dots per inch*, que significa pontos por polegadas).

Posteriormente, coloca-se a resina cuidadosamente sobre o molde de forma a preenchê-lo evitando a formação de bolhas de ar, mostrado na [Figura 1.4 \(c\)](#). Uma segunda placa de acrílico é fixada sobre o molde contendo a resina a fim de garantir a uniformidade da mesma, mostrado na [Figura 1.4 \(d\)](#). Logo em seguida, este molde é levado para uma expositora fotolitográfica ultravioleta, em geral a mesma fotoexpositora comercial empregada para a fabricação de carimbos, na qual o microssistema é polimerizado [Figura 1.4 \(e\)](#). A intensidade da radiação, a área e espessura do molde, são fatores que definem o tempo para a polimerização, quanto menor a piscina mais eficiente e mais rápida será a polimerização (MONTE FILHO, 2010).

A incidência da radiação ultravioleta cura o uretana-acrilato que está exposto, polimerizando-o, o toner do *layout* impede que o mesmo aconteça com a parte que esta coberta (parte escura), fabricando-se assim os canais do microdispositivo (FONSECA, 2008).

Para conhecer os melhores tempos de exposição da resina a radiação ultravioleta, um estudo deste período de exposição se faz necessário a fim de aperfeiçoar o processo. Para evitar o rompimento dos canais, [Figura 1.4 \(f\)](#), o microssistema polimerizado deve ser cuidadosamente removido do molde. As partes que não são polimerizadas são removidas com auxílio de um banho de ultrassom com solução detergente (10% v/v). Para selar o sistema, a etapa mais crítica de todo o processo, geralmente, utiliza-se o mesmo substrato, todavia nada impede que outros materiais sejam utilizados nessa etapa (FONSECA, 2008).

Para minimizar os riscos de uma selagem ineficiente, ou seja, adequadamente resistente, deve-se empiricamente observar os melhores tempos para a polimerização. Para isso, a polimerização tanto da camada do fotolito quanto da camada selante deve ser parcial, pois dessa maneira

será possível um contato mais efetivo entre ambas as camadas no momento da selagem. Um sistema adequado deve ser transparente, bem selado, sem bolhas de ar entre ou nos canais e pouco pegajoso, como representado na Figura 1.4 (h).

1.5.2 - *Micro-flow-batch*

O analisador *micro-flow-batch* (μ FBA) é um novo sistema de análise miniaturizado, recentemente desenvolvido no grupo de pesquisa do LAQA (O Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica e Quimiometria), por Monte-Filho (2010) que permitiu aperfeiçoar as características do *flow-batch* convencional já estabelecido na literatura. O μ FBA compreende um sistema automático de análise, o qual possui como principal componente uma microcâmara de mistura, com o volume total de alguns microlitros. A microcâmara funciona como um pequeno reservatório onde as soluções reagentes e amostra são adicionadas, misturadas e o produto resultante detectado. Os fluidos podem ser impulsionados por bomba peristáltica e comutados por mini-válvulas solenoides, ou mais adequadamente, por micro-bombas solenoides que executam essas duas funções. A detecção, acoplada a microcâmara, pode ser realizada por qualquer técnica analítica desde que seja adequada ao analito requerido, a exemplo da espectrofotometria, fluorescência, potenciometria e voltametria.

Tal sistema permite análises com elevada velocidade analítica bem como um consumo muito baixo de amostras e reagentes. Por não se tratar de um sistema com detecção em fluxo, o μ FBA não apresenta formação de gradientes de concentração, bem como dispensa fluido carregador e bombinas reacionais para gerar os produtos. Todo o processo de análise é feito a um volume fixo, o que agrega melhor robustez e versatilidade a microcâmara sendo esta capaz de ser utilizada em diversas análises sem alterações estruturais (LIMA, 2010).

Os μ FBA são desenvolvidos pelo processo de microfabricação por impressão direta utilizando a fotolitografia no ultravioleta, empregando

como substrato a resina comercial uretana-acrilato, a qual apresenta boa resistência físico-química e mecânica (FERNANDES; FERREIRA, 2006). Tal processo permite prototipagem de microssistemas *flow-batch* de maneira rápida, robusta e com um mínimo custo de implementação, excelente para estudos de pesquisa acadêmica.

O μ FBA foi aplicado para à determinação de Fe(II) em suplementos à base de ferro (soluções orais), utilizando o método da 1,10-fenantrolina, e foi possível reduzir em 30 vezes o consumo de reagentes. Esse microssistema apresentou resultados estatisticamente aceitáveis quando comparado com os do flow-batch convencional e os do método de referência. Aproximadamente 120 amostras puderam ser analisadas por hora (MONTE-FILHO, 2010).

Lima (2010) utilizou esse microssistema para a determinar a quantidade de taninos totais no chá verde e preto utilizando o método fotométrico (tartarato ferroso) e turbidimétrico (cobre (II) em meio tamponado). Resultados precisos e exatos foram observados, além de uma alta velocidade analítica para ambos os métodos ópticos, sendo capaz de executar até 300 análises por hora, no método fotométrico e 200 análises por hora pelo método turbidimétrico. Cada análise efetuada gerou resíduo cujos volumes foram inferiores a 70 μ L.

O μ FBA também foi empregado para a determinação do fósforo no biodiesel, utilizando o método do azul de molibdênio. As medidas de absorvância foram feitas a 850 nm utilizando um LED infravermelho integrado à micro-câmara de mistura. Apresentou frequência analítica de cerca de 190 amostras por hora e baixo consumo de reagente por análise (32 μ L) (LIMA *et al.* 2012 a).

O microssistema foi aplicado também na determinação de iodato em sal de cozinha, utilizando N,N-dietil-p-fenilenodiamina (DPD) como reagente cromogênico. O sistema apresentou uma detecção fotométrica onde as medidas de absorvância foram feitas em 520nm utilizando um LED verde integrado à micro-câmara. 170 amostras puderam ser analisadas por hora (LIMA *et al.* 2012 b).

1.7 - Nitrato e nitrito em laticínios

Nitratos (NO_3^-) e nitritos (NO_2^-) são íons que naturalmente estão presentes no solo, em decorrência do uso de fertilizantes na agricultura, na água e nos vegetais e, portanto, estão distribuídos em alimentos de origem vegetal e animal. São também, utilizados como aditivos intencionais de alimentos, nas formas de seus sais de potássio e/ou sódio, para conservar produtos cárneos e queijos, inibindo o desenvolvimento de alguns microorganismos, como a bactéria *Clostridium botulinum*, produtora da toxina botulínica (BAIRD, 2002; TOVAR *et al.*, 2002).

No organismo humano, o nitrato pode ser convertido a nitrito no trato gastrointestinal pela ação de bactérias redutoras. O íon nitrito pode reagir, em pH ótimo encontrado no estômago, com aminas secundárias e/ou terciárias originando as nitrosaminas, que são compostos carcinogênicos. Esta redução pode ocorrer também no próprio alimento, dependendo das condições de conservação em que esse se encontre (DUARTE; MÍDIO, 1996; LEVALLOIS; PHANEUF, 1994).

No leite “*in natura*”, os teores de nitrato e nitrito podem variar de acordo com o local de origem da amostra e pela estação do ano (ZBIKOWSKI *et al.*, 2000). A presença de nitrosaminas em laticínios deve-se à adição de nitratos e/ou nitritos durante o processo de fabricação dos produtos, principalmente de queijos, a fim de evitar o chamado estufamento tardio, causado, na sua grande maioria, pelo *Clostridium tyrobutiricum* (DUTRA *et al.*, 2007).

No processo de produção do queijo tem-se a formação de soro lácteo amplamente utilizado como ingrediente na produção de alimentos industrializados, como bebidas lácteas e de leite em pó, entre outros. Segundo o Ministério da Saúde (1988) nitrato de potássio ou de sódio podem ser adicionados na fabricação de queijos (exceto em queijos frescos) num nível de 0,02 % sobre o peso do leite, com limite máximo de 5 mg 100g^{-1} no produto final. Segundo estudos efetuados pela Organização Mundial de Saúde na avaliação dos efeitos causados pelo nitrito e pelo nitrato, estabeleceu que a dose diária aceitável está entre 0

e $3,7 \text{ mg Kg}^{-1}$ de peso corporal por dia de NO_3^- e, 0 a $0,06 \text{ mg Kg}^{-1}$ de peso corporal por dia de NO_2^- (WHO, 2010).

1.7.1 - Determinação de nitrato e nitrito

Grande parte dos procedimentos para a determinação do nitrato geralmente envolve a detecção de nitrito (MOORCROFT *et al.*, 2001). As técnicas que utilizam o nitrito como suporte para a determinação de nitrato são quimiluminescência (AOKI *et al.*, 1997), eletroforese capilar (ALONSO; PREGO, 2000), espectrofotometria UV/Vis (PASQUALI *et al.*, 2010), eletrocapilar de zona (ASOPURU *et al.*, 1999), absorção atômica (NOROOZIFAR *et al.*, 2007) e fluorimetria (LEE; FIELD, 1984).

A determinação indireta do nitrato apresenta vantagens, tais como: maior sensibilidade, precisão e seletividade, ou seja, sofre menor interferência de outros íons, como cloreto (SANTOS, 2007).

A determinação de nitrato e nitrito em leite, carnes e demais alimentos, segue o método oficial estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1999). A metodologia consiste na redução do nitrato a nitrito em meio alcalino pela passagem do extrato em coluna contendo cádmio metálico na forma esponjosa, com posterior quantificação do nitrogênio na forma de nitrito (NO_2^-) por espectrofotometria.

O método oficial para determinação do nitrito e nitrato envolve os procedimentos espectrofotométricos baseados na reação de Griess, na qual o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido. O diazo composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil)-di-hidroclorato de etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração vermelha, **Figura 1.5**. A absorção máxima para o produto colorido é de 540 nm (SANTOS, 2007). Para análise do nitrato presente na amostra, este é reduzido a nitrito em coluna de cádmio esponjoso, apresentando uma taxa de redução de (aproximadamente) 99%. Sendo este um procedimento de determinação sequencial em duas aliquotas da mesma amostra, em que primeiramente se determina o nitrito originalmente presente na amostra.

Em seguida reduz-se o nitrato originalmente presente na amostra e determina-o na forma de nitrito. Por diferença entre a primeira e a segunda determinação obtêm-se a concentração de nitrato presente na amostra.

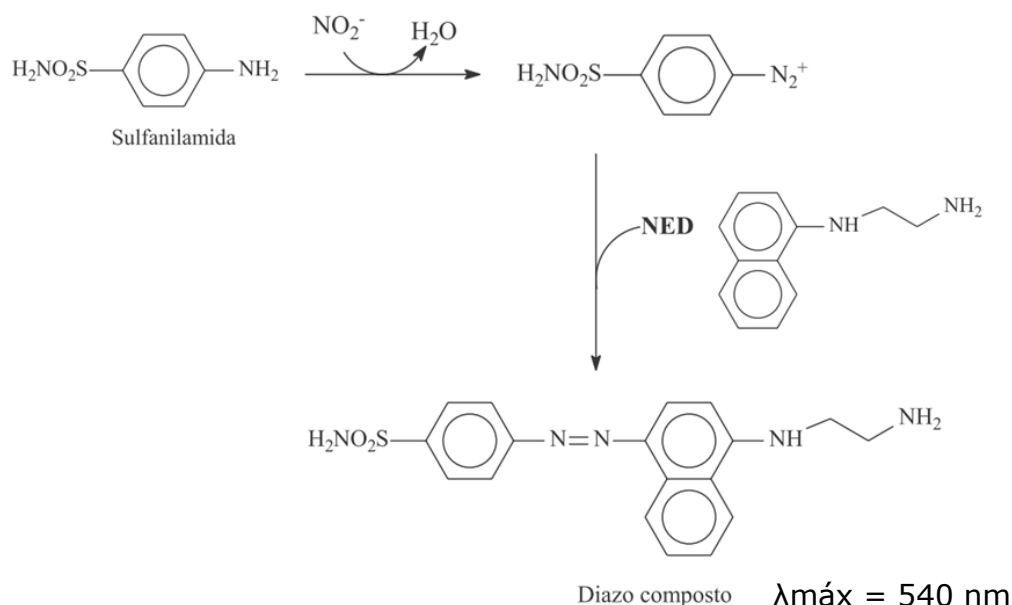


Figura 1.5 – Mecanismo da reação usada no método de Griess.

Diversos fatores como concentração de amostras e reagentes, temperatura e pH do meio, por exemplo, podem influenciar diretamente na porcentagem da conversão nessa redução. Segundo Fanning (2000) a redução pode ser feita por agentes químicos como metais ativos em soluções básicas, amônia, borohidreto, hidrazina e cobre(II) como catalisador, ferro(II) e por fontes energéticas como em processos eletroquímicos, fotoquímicos (radiação ultravioleta) e fontes térmicas.

Por apresentar melhor eficiência, os redutores químicos de cádmio em várias apresentações (pó, esponja, fio e colunas ativadas) e cloreto de vanádio (VCl_3 ou $\text{VCl}_3/\text{VCl}_4$) são mais empregados. O processo de redução empregando cádmio pode ser realizado em condições ácidas (ácido clorídrico ou fosfórico) e condições alcalinas (tampão de cloreto de amônio, em pH maiores que 8,0). Colunas de cádmio recobertas por cobre

(Cd/Cu) também têm mostrado bons resultados de conversão (LIMA *et al.*, 2006; GAPPER, *et al.*, 2004; KAZEMZADEH; ENSAFI, 2001).

1.8 - Espectrofotometria UV-Vis

A espectrofotometria de absorção molecular ultravioleta-visível (UV-Vis) é fundamentada na absorção da radiação eletromagnética por grupos cromóforos de espécies moleculares, sendo uma poderosa ferramenta analítica para determinação e quantificação de espécies inorgânicas e orgânicas (PATNAIK, 2004). A precisão e a exatidão adequadas e o custo significativamente menor que o de outras técnicas são alguns fatores que contribuem para o seu sucesso, principalmente em análises de rotina (FONSECA, 2004).

A técnica utiliza a faixa de radiação eletromagnética de comprimentos de onda (λ) de aproximadamente 190 a 780 nm. Os espectrofotômetros e os fotômetros são instrumentos ópticos utilizados em grande escala em todo o mundo para medidas quantitativas nessa região espectral (HOLLER *et al.*, 2009).

A molécula do composto pode sofrer transições eletrônicas quando estimulada com intervalo de radiação específica por ocasião da absorção de energia quantizada, ocasionando uma resposta instrumental referente ao processo. Tal resposta pode ser representada como medidas de transmitância (T) ou de absorbância (A) em soluções contidas em células (cubetas) transparentes com um determinado caminho ótico b , conforme representado na [Figura 1.6](#), onde P_0 representa o feixe de radiação incidente sobre a amostra e P o feixe de radiação emergente.

A concentração de uma espécie em estudo numa amostra, ou seja, o analito, que absorve radiação está relacionado linearmente com a absorbância A , como demonstra a lei de Lambert-Beer, [Equação 1.1](#). Onde ε representa a absorvidade molar que corresponde a um parâmetro que é característico da espécie absorvente em um determinado meio a um determinado comprimento de onda.

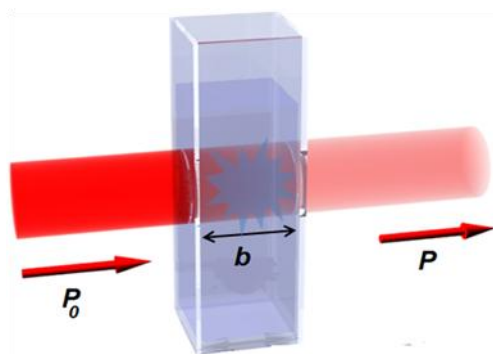


Figura 1.6 - Representação esquemática de um feixe de radiação P_0 sendo atenuado após interagir com a amostra resultando na radiação emergente P .

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \varepsilon b c \quad (1.1)$$

A detecção espectrofotométrica é um método bastante consolidado na literatura científica, em laboratórios nas análises de rotina e indústrias por mundo, sendo fortemente aplicado nas detecções por análise em fluxo. Entretanto, com o crescente desenvolvimento de novos fotômetros, uma variedade de possibilidades se abre para os métodos de detecção mais simples, econômicos e analiticamente satisfatórios. Tal forma de detecção permite a construção de instrumentos mais compactos e versáteis sendo mais adequados para análises em sistemas em fluxo e miniaturização analítica (FRENZEL *et al.*, 2008).

1.8.1 - Fotometria

Diversas determinações realizadas em laboratório clínico, indústrias e centros de pesquisas são baseadas em medições de energia radiante transmitida, absorvida, dispersa ou refletida mediante condições controladas. O termo fotometria está associado diretamente a medidas realizadas em instrumentos ópticos simples para análises quantitativas em regiões discretas do espectro ultravioleta-visível e infravermelho próximo, denominados fotômetros. A absorção molecular dessas medidas abrange uma faixa espectral entre 190 a 1000 nm aproximadamente. Medidas

realizadas por fotômetros, quando se utiliza filtro de interferência, envolvem geralmente uma estreita faixa de comprimentos de onda específica (FRENZEL *et al.*, 2008). Aqueles instrumentos que utilizam toda a faixa do espectro eletromagnético são denominados de espectrofotômetros.

Basicamente, um fotômetro é constituído normalmente por uma fonte estável de energia radiante, um filtro de absorção de interferência, um recipiente de amostra, um detector de radiação e um processador de sinal. Devido à simplicidade relativa dessa instrumentação, é um dos métodos normalmente empregado em análise de soluções aquosas em diversos laboratórios (HOLLER *et al.*, 2009; UGUCIONE; CARDOSO, 2007).

Como fonte estável de energia radiante, uso de diodos emissores de luz (LEDs, do inglês *light-emitting diode*) têm se mostrado uma excelente alternativa ao uso de lâmpadas de tungstênio, filtros e lentes ópticas. Apresentam baixo consumo de energia e custo de aquisição, boa estabilidade e elevada vida útil (UGUCIONE *et al.*, 2007). Os LEDs não requerem o uso de circuitos eletrônicos sofisticados para o seu controle, podendo trabalhar de modo pulsado ou contínuo. São utilizados como fonte de radiação semi-monocromática ou unido a filtros de interferência para se obter uma faixa de radiação mais estreita (DASGUPTA, *et al.*, 2003; HOLLER, *et al.*, 2009). Eles produzem um estreito espectro contínuo em uma faixa de comprimento de onda, normalmente com largura de cerca de 20 a 100nm, conforme representado na [Figura 1.7](#).

Vários sistemas que utilizam LEDs na parte óptica vêm sendo relatados na literatura científica desde meados da década de 1970, devido às características de fácil operação dos LEDs serem combinados com detectores de luz de forma simples e econômica na confecção de instrumentos fotométricos ou espectrofotométricos. Por não ser o objetivo deste trabalho em aprofundar-se no funcionamento dos LEDs, o leitor interessado pode consultar livros de instrumentação analítica (HOLLER, *et al.*, 2009) e de eletrônica (FLOYD, 1996) para maiores esclarecimentos.

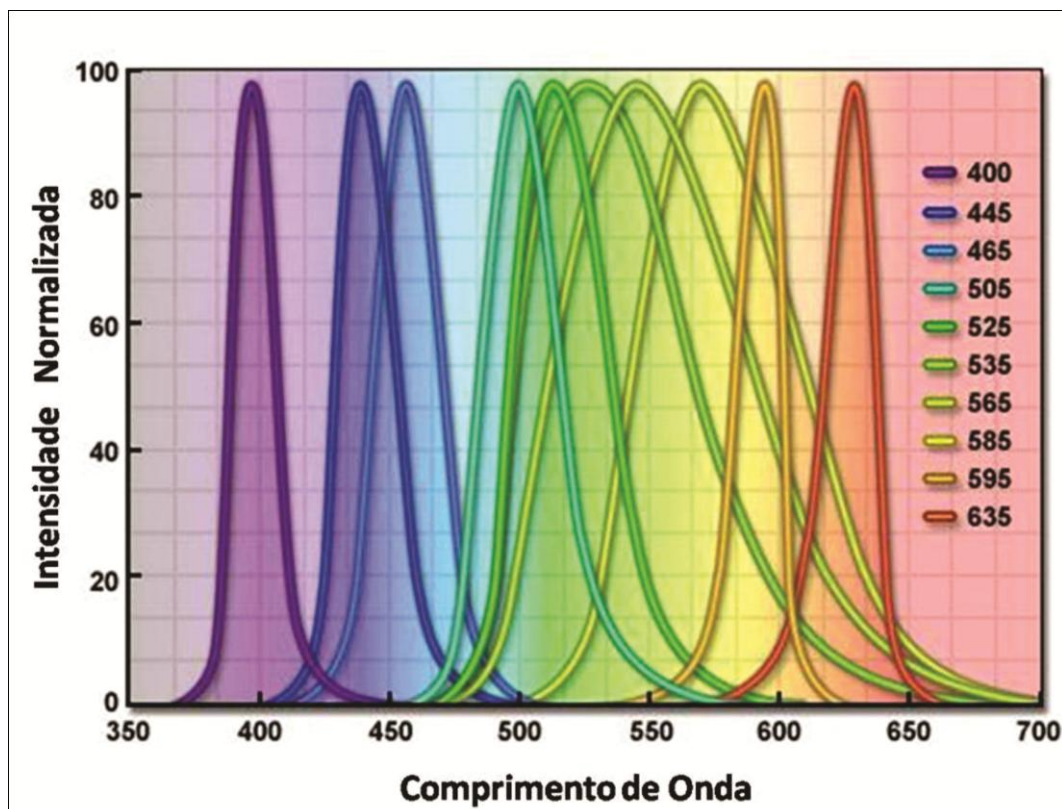


Figura 1.7 - Representação típica dos espectros de emissão de LEDs comerciais.

Diferentes configurações de sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) utilizam detecção fotométrica baseadas em LEDs. Estes sistemas foram propostos para aplicação em processos de separação, pré-concentração e detecção fotométrica para a determinação de uma grande variedade de compostos em matrizes de amostras diferentes conforme pode ser encontrado em maiores detalhes em FRENZEL (2008).



Capítulo 2 - Experimental

2.1 - Reagentes, amostras e soluções

Para realização de todo o processo analítico utilizou-se água previamente destilada e deionizada, apresentando condutividade menor ou igual a $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ (sistema de deionização Milli-Q Plus Ultra-Pure Water System–Millipore). Os reagentes usados foram todos de grau analítico. As soluções, incluindo as amostras e padrões, foram preparadas e armazenadas em frascos âmbar, sendo mantidas sob refrigeração.

2.1.1 – Preparação de soluções

Utilizaram-se duas soluções estoque de nitrato e nitrito cada uma com concentração de $100,0 \text{ mg L}^{-1}$, preparadas a partir nitrato de sódio (Synth) e do nitrito de potássio (Synth), respectivamente.

Para o método de referência (método clássico), as soluções padrão de concentrações entre $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ a $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato e nitrito, foram obtidas a partir de diluições adequadas da solução estoque. Para o método fotométrico proposto no presente trabalho, as soluções padrão foram preparadas dentro da câmara de mistura, a partir de uma solução de trabalho de $10,00 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrito por diluição apropriada da solução estoque.

O reagente cromogênico consistiu-se de uma solução de 40 g de sulfanilamida (Sigma), 1 g de N-(1-naftil)-di-hidrocloreto de etilenodiamina (NED) (Sigma) e 67 mL de HCl concentrado (37% v/v) devidamente aferida com água recém deionizada a 1000 mL.

Uma solução tampão amoniacal/EDTA com pH 9,4-9,6 foi utilizada na preparação de todas as soluções-padrão e das amostras. Preparou-se essa solução pois melhores reduções ocorrem em pH básico, onde a solução alcalina estabiliza o nitrito formado, sendo esta faixa escolhida (Ganhão, 2010). O ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) desempenha a função de agente quelante, ligando-se ao íon cádmio formando um complexo estável. Na ausência de EDTA seria precipitado o hidróxido de cádmio no interior da coluna, impedindo o fluxo da amostra. Esta solução

é obtida dissolvendo-se 0,4 g de EDTA (titriplex III) e 70 g de cloreto de amônio (Sigma), completou-se o volume para 1000 mL com água deionizada ajustando o pH com NH_4OH .

Uma solução de tetraborato de sódio (bórax) (Sigma) foi preparada com concentração de $0,130 \text{ mol L}^{-1}$ e um volume de 100 mL para precipitação das proteínas (AOAC, 1997) das amostras de laticínios.

Preparou-se duas soluções para clarificação do extrato das amostras de laticínios, a solução de Carrez I e II. A primeira foi preparada com concentração de $0,270 \text{ mol.L}^{-1}$ de ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) (Sigma) e a segunda com $1,00 \text{ mol.L}^{-1}$ de acetato de zinco $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}.2\text{H}_2\text{O}]$ (Sigma) (AOAC, 1997).

2.1.2 – Preparação das amostras

Foram utilizadas 17 amostras de laticínios, sendo de 3 amostras de leite em pó desnatado, 3 de leite em pó integral, 3 de leite “in natura”, 3 de coalhada e 5 de queijo coalho. Estas amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de João Pessoa-PB.

Para as amostras de leite em pó desnatado e integral, leite “in natura” e coalhada foram pesadas 10g de cada uma e dissolvidas em 50 mL de água deionizada quente (50°C) em recipientes separados, seguido de adição de 5 mL de solução de bórax a 5% (m/v).

As amostras de queijo foram trituradas individualmente de forma homogênea em um triturador convencional. Posteriormente pesou-se 10g de cada amostra e seguiu-se o mesmo procedimento empregado nas amostras de leite e coalhada.

Na sequência, cada mistura foi deixada em banho-maria por 15 minutos sob agitação. Após serem resfriadas à temperatura ambiente, adicionou-se 5,0 mL de solução $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,270 \text{ mol.L}^{-1}$, e 5,0 mL de ZnSO_4 $1,00 \text{ mol L}^{-1}$, então as amostras foram submetidas ao agitador durante 5 min. Em seguida, foram transferidas cada uma para balão de 100 mL permanecendo em repouso por 30 minutos. Após esse tempo, completou-se o volume de cada amostra com água deionizada, seguido de

15 minutos de agitação. Após a precipitação de um sólido alaranjado foi feito uma filtração, em papel filtro qualitativo, de cada amostra. O filtrado foi utilizado nas determinações de nitrato e nitrito no μ FBA e no procedimento de referência (AOAC, 1997).

2.1.3 – Preparação da microcoluna

O cádmio esponjoso para a microcoluna foi preparado segundo Davison e Woof (1978). Barras de zinco metálico com dimensões de 100 mm de comprimento, 0,3 mm de espessura e 2,5 mm largura foram utilizadas para precipitação do cádmio esponjoso. Elas foram mergulhadas em 500 mL de solução de CdSO_4 a $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, por aproximadamente 15 minutos. À medida que o cádmio esponjoso se depositava nas barras, era removido com auxílio de uma espátula e transferido para um béquer contendo água. Com o auxílio da espátula, o material foi homogeneizado ao fazê-lo passar por peneira granulométrica 60 mesh, com o cuidado de mantê-lo sempre imerso em água, pois ele é facilmente oxidado quando exposto ao ar. O cádmio esponjoso formado foi colocado para decantar e a água sobrenadante foi removida. Ele foi, então, sobrenadado por HCl 2 mol L^{-1} e deixado em repouso por 2 minutos. Decorrido este período, o sobrenadante ácido foi removido e o metal foi lavado com água destilada até pH neutro. Após lavagem, o cádmio foi sobrenadado com ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e, após repouso de 15 minutos, o sobrenadante foi removido e o cádmio foi novamente lavado com água destilada até pH neutro (AOAC, 1997). O cádmio esponjoso formado foi armazenado em recipiente escuro imerso em solução tampão amoniacal (pH 9,4-9,6) diluída 1:9.

A microcoluna de redução foi confeccionada em tubo de vidro (70 mm de comprimento x 2 mm de diâmetro interno). Em uma extremidade colocou-se lã de vidro devidamente conectada a um tubo de teflon para passagem dos fluídos, e preencheu o tubo de vidro com o cádmio esponjoso, tomando cuidado para deixá-lo sempre imerso na solução tampão amoniacal e não compactar (LAPA *et al.*, 2000). A outra

extremidade foi fechada com lã de vidro. A microcoluna de cádmio esponjoso é mostrada na Figura 2.1.



Figura 2.1 – Microcoluna de cádmio esponjoso

Antes de utilizar a microcoluna no microssistema proposto, foi realizada uma avaliação de sua eficiência de redução. Para isso, prepararam-se duas soluções de mesma concentração, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, de nitrato e nitrito. Misturou-se $40 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de nitrito a $40 \text{ }\mu\text{L}$ do reagente cromogênico e registrou-se a intensidade da absorbância. Em seguida, passou-se $40 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de nitrato pela microcoluna de cádmio, aguardou-se 29 segundos, e seguiu-se o procedimento do determinação do nitrito. Com base na diferença entre as intensidades de absorbância (entre cinco replicatas), foi avaliada a eficiência de capacidade redutora da microcoluna. Esta apresentou capacidade redutora sempre acima de 99% de eficiência.

2.2 - Miniaturização da câmara do Flow-Batch (μFBA)

A confecção da micro-câmara baseou-se através do método de impressão direta utilizando *tonner* de impressora *laser* em um substrato de uretana-acrilato. O substrato polimérico, resina uretana-acrilato, foi adquirido comercialmente da Indústria de Carimbos Medeiros Ltda (MacDermid, flex-light trademark M050). A foto-expositora empregada para a fotolitografia no ultravioleta, também foi adquirida pela Carimbos Medeiros, modelo fotolight MD2 A4. As lâmpadas negras utilizadas para polimerização foram as da marca SCT, modelo T8 BLB de 15 Watts.

O programa CorelDRAW® X5 foi utilizado para desenvolvimento da máscara do *layout* dos canais da microcâmara. A impressão dos *layouts*

requeridos foram feitas empregando uma impressora HP LaserJet P2014 onde os canais foram impressos em filmes de poliéster (transparência para impressora a laser). Após a polimerização do sistema, através da fotoexpositora, a remoção da resina não-polimerizada, a qual forma os canais, foi realizada utilizando um banho de ultra-som, Unique USC 800A.

A Figura 2.2 representa o esquema simplificado do processo experimental realizado na confecção do μ FBA proposto. No molde para deposição da resina foram utilizados duas transparências com o *layout* do sistema proposto impresso (Figura 2.2(a) e (b)). Os tempos de polimerização utilizados foram otimizados para a lâmpada negra utilizada (SCT), sendo de 150 segundos o melhor tempo para polimerização da parte superior de ambas as peças e 350 segundos para a parte inferior das mesmas (Figura 2.2(c) e (d)). O tempo de selagem utilizado foi de 900 segundos para ambos os lados, o que garante uma selagem irreversível e satisfatória (Figura 2.2(e)) (FONSECA, 2007).

Tubos de teflon e de vidro foram fixados na micro-câmara já selada mediante uma segunda etapa de exposição a radiação ultravioleta-visível. Um pouco da resina citada deve ser adicionada na superfície de contato dos materiais com auxílio de um pincel, para permitir a adesão irreversível dos tubos de teflon e de vidro ao microssistema. Nesse procedimento final o tempo de selagem adequado é o mesmo utilizado na primeira selagem de 900 segundos para os dois lados (Figura 2.2(f)).

O acoplamento desses pequenos tubos cilíndricos de vidro fechados em uma das extremidades permite uma significativa versatilidade para o acoplamento de diferentes fontes de energia radiante e detectores ópticos. A primeira versão dos micro *Flow-batch* apresentavam o sistema de detecção fixo, LED e fototransistor diretamente polimerizados na peça, o que não viabilizava tal possibilidade de diferentes acoplamentos (LIMA, 2010).

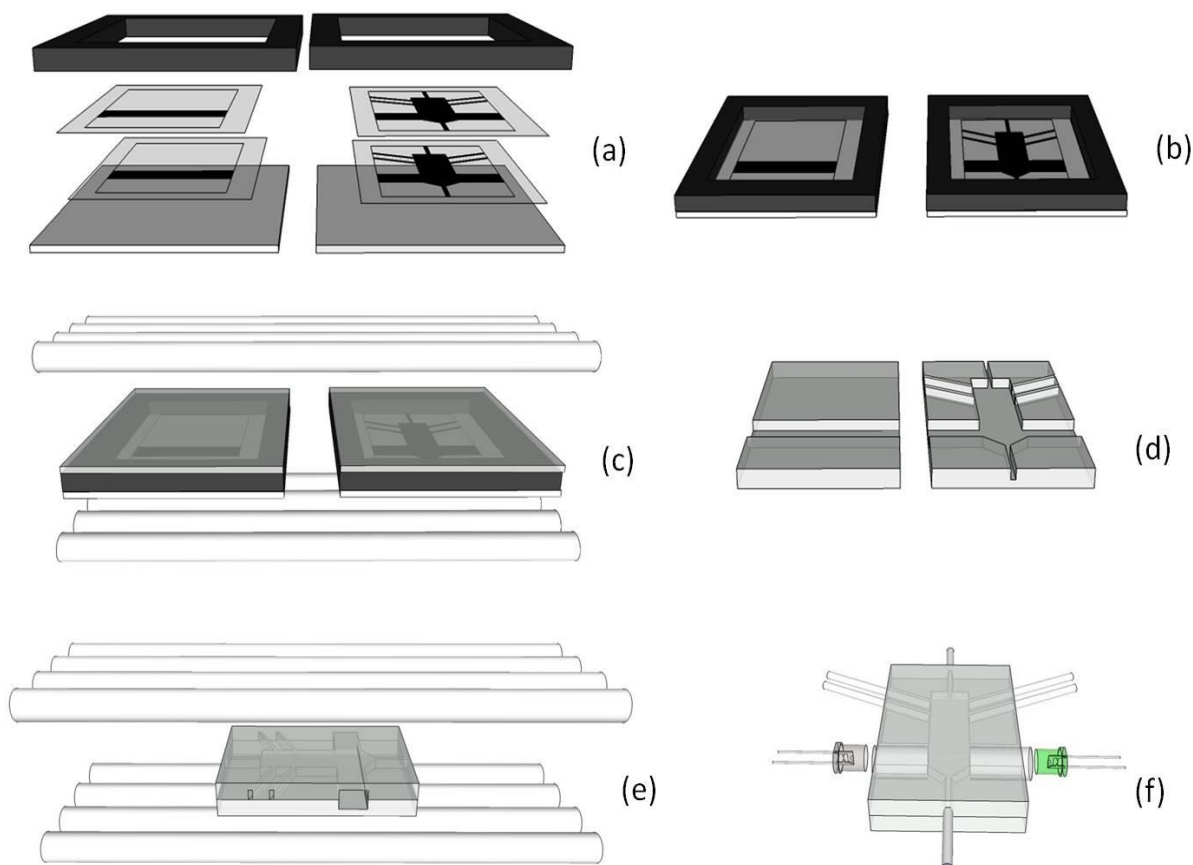


Figura 2.2 - Esquema da confecção do μ FBA. (a) montagem dos moldes, (b) moldes das camadas, (c) polimerização da resina nas camadas, (d) canais gravados, (e) selagem do sistema e (f) sistema μ FBA confeccionado.

A Figura 2.3 representa o sistema μ FBA desenvolvido com tubos de vidro de 2,0 mm de diâmetro interno acoplado na câmara de mistura ou reacional, bem como os tubos de teflon de 0,50 mm de diâmetro interno.

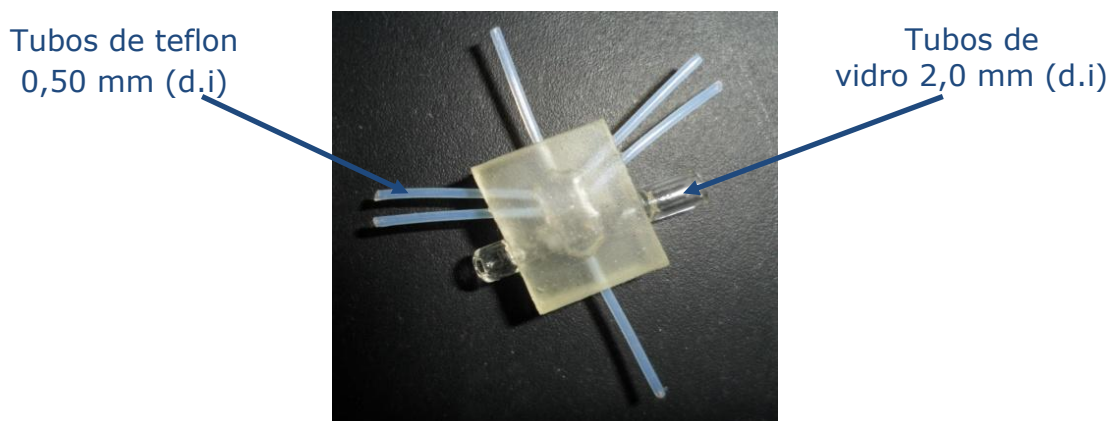


Figura 2.3 – Micro-câmara do μ FBA prototipada em uretana-acrilato.

O microsistema *flow-batch* confeccionado apresenta as seguintes dimensões: 7,0 mm de altura câmara reacional, com uma largura 5,0 mm, sendo este o comprimento do seu caminho óptico. Para a finalidade das análises requeridas no presente trabalho tais dimensões empregadas foram consideradas satisfatórias. O volume interno máximo da câmara corresponde a aproximadamente 100 μL , sendo necessários apenas cerca de 50 μL para completar o volume do caminho óptico.

2.3 - Microsistema de análise

Para automatizar o sistema proposto utilizou-se cinco microbombas solenoides, para propulsão e controle da adição dos fluidos e uma válvula solenoíde de três vias para permitir uma melhor precisão na tomada do volume da micro-coluna e também facilitar a limpeza e ativação.

O software de controle de equipamentos foi utilizado para executar um programa adequado às necessidades de controle do microsistema automático desenvolvido. Tal programa permite ao usuário administrar o acionamento das válvulas e a agitação apropriada dos fluídos por tempo, além de adquirir e salvar o sinal analítico instrumental obtido na análise.

2.3.1 - Montagem do microsistema

O μFBA é composto por cinco microbombas solenoides, modelo Takasago Fluidic System, model MLP-200TF, as quais tiveram seus volumes especificadamente calibrados para cada pulso operacional. As microbomas um a três (μP_1 – μP_3), foram ajustadas para operar com 20 μL de volume por pulso. A quarta e a quinta microbomba (μP_4 e μP_5) foram ajustadas para operarem com 80 μL e 150 μL , respectivamente. E também, uma válvula solenoíde (VS) de três vias, modelo Cole-Parmer, model EW-01540-13, para permitir a limpeza “on line” da coluna assim como, permitir a inserção de um volume mais preciso na microcâmara de mistura.

Tubos de Teflon[®] com 0,5 mm de diâmetro interno foram usados para conduzir os fluidos. A agitação no minissistema foi promovida com a

inclusão de uma haste de nylon com uma das extremidades achatadas (Figura 2.4 (c)), de 0,4 mm de diâmetro, acoplado a um motor de drive de DVD, modelo MDN3GT3CPAC, 2000 rpm, 5 Vdc (Figura 2.4 (e)). Uma caixa de montagem universal escura de tampa em U (10,0 x 8,0 x 4,0 cm) foi utilizada para acomodação do μ FBA juntamente com alguns componentes do sistema, para permitir a sua utilização em análises automáticas. O microssistema (Figura 2.4) apresenta uma fonte de alimentação de corrente alternada (tomada comum) para o LED e fototransistor acoplado.

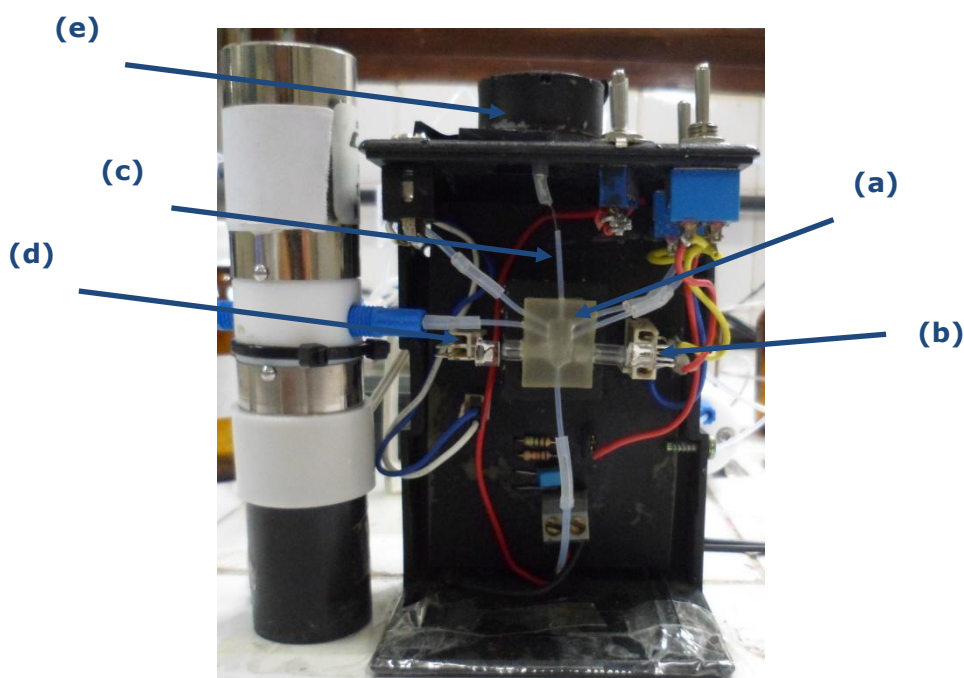


Figura 2.4 – Sistema μ FBA construído para análise de laticínios. (a) micro-câmara de mistura, (b) LED verde, (c) agitador, (d) fototransistor e (e) Motor Drive.

Para realização das análises químicas, um LED verde (540 nm) foi utilizado como fonte de radiação (Figura 2.4 (b)) e um fototransistor como detector (Figura 2.4 (d)), ambos acoplados na microcâmara, sendo portanto uma detecção integrada ao microssistema. Tanto o LED e o fototransistor possuem 5 mm de diâmetro e foram montados firmemente no interior da microcâmara (Figura 2.4 (a)).

Tanto as microbombas solenoides (Figura 2.5 (e)), a válvula solenoide (Figura 2.5 (a)) como o agitador alternativo são acionados por meio de um controlador de válvulas (Figura 2.5 (c)). O interfaciamento deste componente com o microcomputador é realizado por meio de uma interface USB da National Instruments®, modelo USB6009 (Figura 2.5 (b)). O software para controle dos equipamentos citados foi desenvolvido em ambiente LabVIEW® 7.1.

A imagem apresentada na Figura 2.5 representa o sistema automático desenvolvido para a avaliação do desempenho do sistema micro *flow-batch* pela determinação da concentração nitrato e nitrito em amostras sintéticas desses íons. As medidas foram realizadas na caixa escura, isentando o detector de interferência da radiação expuria do ambiente.

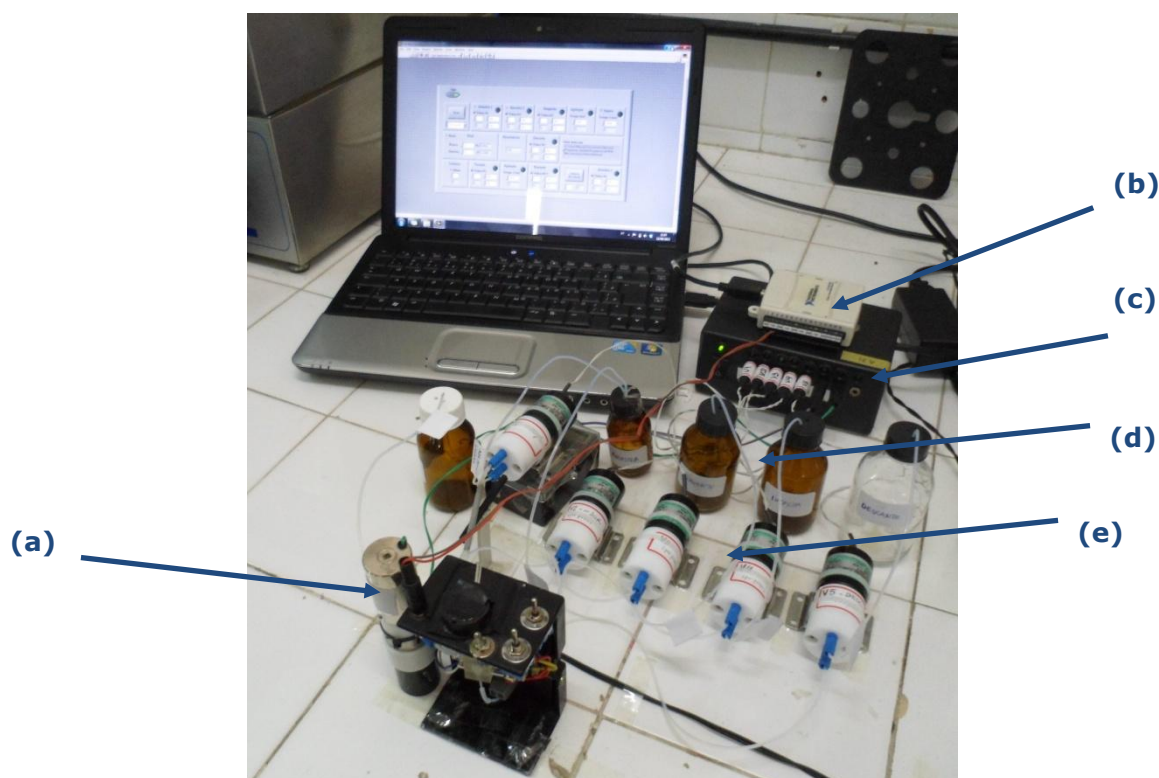


Figura 2.5 - Representação do sistema automático micro *flow-batch* para a análise de nitratos e nitritos. (a) válvula solenoide, (b) interface USB, (c) acionador de válvulas, (d) frascos das soluções e (e) microbombas solenoides

2.5 - O diagrama e procedimentos do μ FBA

O diagrama do sistema automático para determinação fotométrica de nitrato e nitrito em amostras de laticínios é mostrado na Figura 2.6.

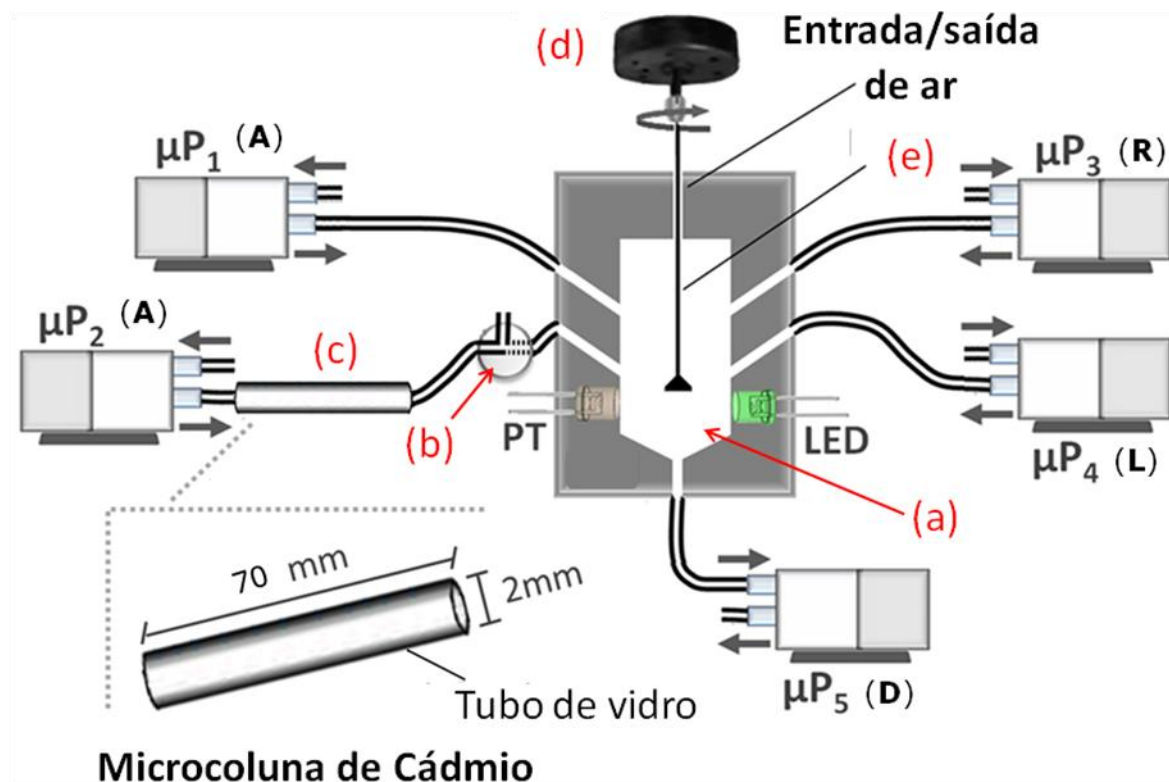


Figura 2.6 – Diagrama do sistema automático do μ FBA. (a) microcâmara, (b) válvula solenoide de três vias, (c) microcoluna de cádmio, (d) motor drive e (f) fio de nylon. μ P₁ a μ P₅ são as microbombas, onde (A) amostra, (R) reagente cromogênico, (L) limpeza e (D) descarte.

O analisador foi operado conforme descrito na Tabela 2.1. As microbombas solenoides foram acionadas a 5 Hz, e cada microbomba foi ajustada para um determinado volume, conforme o fluido a ser impulsionado. As microbombas um, dois e três, quando acionadas permitem a amostragem para determinação de nitrito, determinação de nitrato e adição de reagente de cromogênico, respectivamente. Elas foram calibradas para uma vazão de $40 \mu\text{L s}^{-1}$. A microbomba quatro é acionada para etapa de limpeza, a qual adiciona água a uma vazão de $80 \mu\text{L s}^{-1}$ e a microbomba cinco é acionada para o descarte a uma vazão de $150 \mu\text{L s}^{-1}$.

Tabela 2.1 – Acionamento das microbombas para determinação de nitrito e nitrato^a.

Etapa	Descrição	μP_1	μP_2	μP_3	μP_4	μP_5	Pulsos	Tempo (s)
1	Adição da amostra (ou solução padrão) e reagente de cor na microcâmara ^{b,c}	1/0	0	1/0	0	0	2	0,8
2	Adição da amostra (ou solução padrão) na microcoluna de cádmio ^c	0	1/0	0	0	0	2	0,8
3	Homogeneização utilizando o motor drive na microcâmara	0	0	0	0	0	0	2,0
4	Tempo de espera da reação	0	0	0	0	0	0	20,0
6	Leitura do sinal analítico	0	0	0	0	0	0	1,0
7	Descarte da microcâmara	0	0	0	0	1/0	1	0,4
8	Limpeza com solução tampão ^d	0	0	0	1/0	0	1	0,4
9	Homogeneização utilizando o motor drive na microcâmara (DM) ^d	0	0	0	0	0	0	2,0
10	Descarte e limpeza (W) ^d	0	0	0	0	1/0	1	0,4
11	Adição de volume de amostra na microcoluna de cádmio e reagente de cor na microcâmara ^b	0	1/0	1/0	0	0	2	0,8
12	Homogeneização utilizando o motor drive na microcâmara	0	0	0	0	0	0	2,0
13	Tempo de espera da reação	0	0	0	0	0	0	20,0
14	Leitura do sinal analítico	0	0	0	0	0	0	1,0
15	Descarte da micro-câmara	0	0	0	0	1/0	1	0,4
16	Limpeza com solução tampão ^e	0	0	0	1/0	0	1	0,4
17	Homogeneização utilizando o motor drive na microcâmara (DM) ^e	0	0	0	0	0	0	2,0
18	Descarte e limpeza (W) ^e	0	0	0	0	1/0	1	0,4

^a Código 1/0 e 0 indicam a ativação e inativação das microbombas solenoídes, respectivamente.

^b 2 pulsos para cada atuação da microbomba.

^c As etapas 1 e 2 ocorrem simultaneamente.

^d As etapas 8, 9 e 10 são repetidas duas vezes para cada amostra.

^e As etapas 16, 17 e 18 são repetidas duas vezes para cada amostra.

2.6 - Programa de gerenciamento do sistema

O programa desenvolvido para o controle e gerenciamento automático das micro-bombas solenóides, da válvula solenóide, da agitação e da leitura do sinal analítico está representada pela [Figura 2.7](#), o qual apresenta a sua interface gráfica para administração do usuário, desenvolvida em ambiente de programação LabView. O gerenciamento desse programa de controle é bastante simplificado, e encontra-se dividido conforme os procedimentos a ele atribuídos para adição e registro do sinal, limpeza da câmara e descarte do produto.



Figura 2.7 - Interface de controle automático do μ FBA para análise de nitritos e nitrato em amostras de leite e laticínios

O acionamento dos componentes é administrado de acordo com a necessidade da análise e é dependente do tempo, que deve ser inserido em milissegundos pelo usuário. O sistema permite o controle da leitura do branco, limpeza e descartes efetivos, garantindo adições precisas, além de simultâneas, possibilitando uma ótima frequência analítica e reprodutibilidade das análises.

A interface de controle para usuário do μ FBA, foi desenvolvida exclusivamente para este trabalho de pesquisa, análise de nitrito e nitrato

em amostras de leite e laticínios, podendo ser utilizadas para a realização de outras análises de interesse conforme a necessidade.

2.7 - Determinação direta de nitrito

Para realizar a determinação do íons nitrito, aciona-se simultaneamente a primeira micro-bomba (μP_1) e a terceira (μP_3), onde cada micro-bomba recebe 2 pulsos e adicionam 40 μL da amostra ou a solução padrão e 40 μL do reagente cromogênico à microcâmara. Logo em seguida, é feita a homogeneização pelo fio de nylon ligado ao motor drive por 2 segundos. O tempo de espera para tomada do sinal analítico foi de 20 segundos após o término da agitação, pois dessa maneira obtêm-se uma melhor razão entre o sinal/ruído.

Após essas etapas, a absorbância é medida e a microcâmara é esvaziada por ação da quinta micro-bomba (μP_5), que após receber um pulso remove um volume de 80 μL do interior da microcâmara. Não foi observado efeito elástico do ar no interior da microcâmara que influenciasse na reprodutibilidade dos volumes adicionados ou retirados. As soluções são adicionadas ou retiradas e o ar pode entrar ou sair da microcâmara pela passagem que é utilizada pelo fio de nylon.

Posteriormente, procede-se a limpeza da microcâmara pela quarta micro-bomba (μP_4), que ao receber um pulso adiciona 80 μL de água para a limpeza do microssistema e aciona-se o motor drive por 2s para promover a agitação. Então, a μP_5 é acionada por um pulso para realizar o descarte do resíduo resultante da limpeza. Esse procedimento é repetido duas vezes para melhorar a limpeza e evitar contaminação entre as amostras.

A solução do branco foi preparada no próprio microssistema similarmente ao procedimento descrito para a análise das amostras. Entretanto, μP_4 é acionada ao invés de μP_1 , e simultaneamente μP_3 por 2 pulsos cada uma, adicionando a micro-câmara 40 μL de água deionizada e 40 μL de reagente cromogênico.

2.8 - Determinação de nitrato

No início da determinação de nitrito, é acionada também, durante 0.8 s, a μP_2 para que um volume de 40 μL da amostra preencha a microcoluna de cádmio esponjoso. Após esse tempo, a micro-bomba é desativada e amostra permanece na coluna por 29 segundos. Assim os íons nitrato nela presente são reduzidos a nitrito e posteriormente serão analisados na microcâmara.

Logo em seguida, realiza-se a determinação do nitrito formado análogo ao tópico anterior. A solução do branco difere com relação ao acionamento da μP_2 , ao invés da μP_1 , preenchendo a microcoluna com amostra para ser reduzida prosseguindo com a determinação do nitrito. As etapas de descarte e limpeza seguem também o mesmo intervalo de tempo da determinação de nitrito.

2.9 - Método de referência

Para comparação, o desempenho do μFBA proposto foi avaliado a partir dos métodos oficiais de análise (AOAC, 1997).

A coluna redutora de cádmio esponjoso foi preparada com lã de vidro e areia na extremidade. O cádmio esponjoso foi transferido em pequenas porções com o auxílio de água, para um tubo de vidro com 13 cm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro interno, até atingir uma altura de 10 cm (coluna). No topo da coluna foi adaptado um funil de separação de 100 mL, com haste de 10 mm de diâmetro e 25 cm de comprimento ([Figura 2.8 \(a\)](#)). Na extremidade da haste, foi adaptada uma rolha de silicone, capaz de encaixar-se perfeitamente à coluna, e prevenir a entrada de ar, como pode ser observado na [Figura 2.8 \(b\)](#).

Para a determinação dos íons nitrato, foram eluídos pela coluna redutora de cádmio 50 mL do extrato filtrado das amostras em meio tampão amoniacal (pH 9,4- 9,6) e descartou-se os primeiros 10 mL do eluado. Dos 40 mL restantes, utilizou-se 10 mL para reação com mesmo volume de reagente cromogênico (sulfanilamida e NED).

Da outra parte do filtrado (40 mL) também tamponado nas mesmas condições, retirou-se 10 mL para determinação direta de nitrito seguindo o mesmo procedimento reacional relatado anteriormente. Nas duas etapas, o aparecimento da coloração é devido a interação entre o reagente cromogênico (sulfanilamida e NED) e o nitrito, cuja a absorbância foi medida em 540 nm. A concentração de nitrito foi estimada diretamente, e a de nitrato foi calculada a partir da diferença entre as duas medidas de absorbância.

Para o branco utilizou-se água deionizada, como mesmos volumes, ao invés da amostra, tanto nos procedimentos de redução na coluna de cádmio esponjoso quanto na determinação direta.

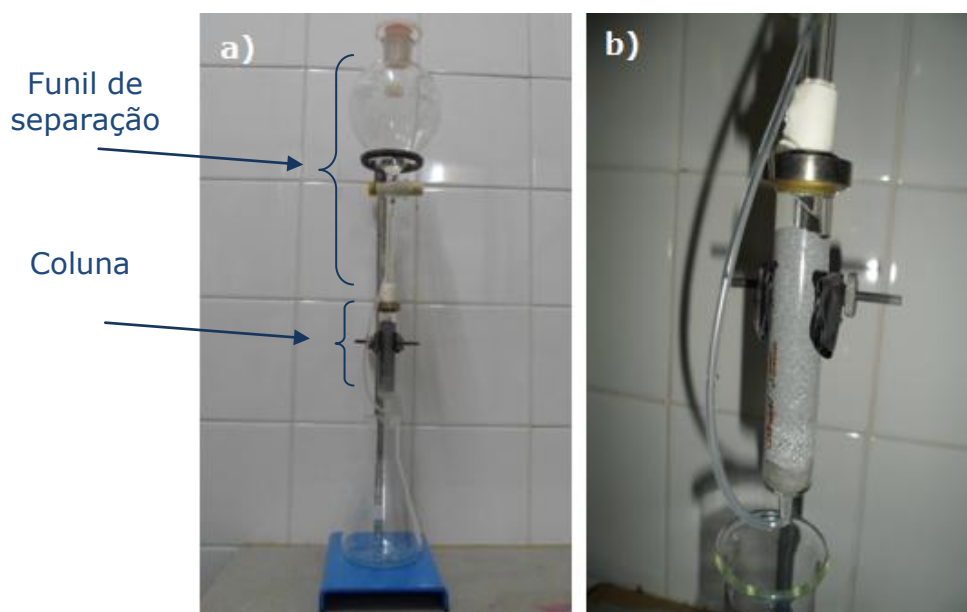


Figura 2.8 – (a) Coluna redutora montada sobre um suporte universal e (b) detalhe da coluna redutora de cádmio esponjoso.

A análise de cada amostra foi realizada em quintuplicata e as concentrações foram estimadas a partir da equação obtida da curva analítica, estatisticamente validada.

2.10 – Método de avaliação da performance analítica

Nos próximos parágrafos, os procedimentos estatísticos empregados para a validação e estimativa das figuras de mérito dos modelos de calibração utilizados neste trabalho serão discutidos.

A avaliação estatística do desempenho do sistema proposto (μ FBA), em termos da sensibilidade, faixa dinâmica e dos valores de LOD e LOQ, foi realizada envolvendo a determinação do teor de nitrato e de nitrito em laticínios. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos por intermédio de um espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis comercial HP com arranjo de fotodiodos modelo 8453, segundo o 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). Em seguida, foram construídas as curvas analíticas 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. Além disso, foram obtidos os intervalos de confiança em relação aos parâmetros do modelo que foram estimados.

Segundo a IUPAC, a sensibilidade de calibração de um método instrumental é dada pela inclinação da curva analítica, expressando a capacidade de um instrumento ou de um método, discriminar concentrações de analito com pequenas diferenças na concentração do analito (HOLLER *et al.*, 2009).

Os limites de detecção (limit of detection - LOD) e limites de quantificação (limit of quantification - LOQ) são definidos como segue. O LOD corresponde à menor concentração da espécie de interesse (analito) que pode ser detectada pela técnica instrumental utilizada, enquanto o LOQ corresponde à mínima concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de reprodutibilidade das medidas pelo método empregado.

De maneira geral, a literatura relata que existem duas formas de se estimar LOD e LOQ e as suas escolhas geralmente devem levar em consideração a técnica analítica utilizada, bem como o grau de

confiabilidade estatística necessária. São eles, o método da relação sinal-ruído e o método pelos parâmetros da curva analítica (RIBEIRO *et al.*, 2008).

O método da relação sinal ruído, que utiliza de 20 a 30 medidas do sinal do branco, é amplamente utilizado devido a sua rapidez e simplicidade dos cálculos estatísticos. O método da estimativa do limite de detecção e quantificação baseado em parâmetros da curva analítica apresenta maior confiabilidade estatística e robustez, pois leva em consideração o intervalo de confiança da regressão. Neste caso, o LOD e o LOQ são calculados a partir do intervalo de confiança pode ser medida a 95% de confiança estatística. Tais estimativas foram realizadas através de uma planilha eletrônica para validação de métodos analíticos univariados proposta na literatura e disponível na internet (FERREIRA, 2012).

Os parâmetros e equações utilizadas para a realização dos cálculos estatísticos para tal previsão de LOD e LOQ, são mostrados na [Figura 2.9](#). A estimativa do sinal analítico a partir da equação da regressão apresenta um erro padrão, o produto desse erro pelo valor da distribuição t de Student adequado, permite calcular o intervalo de confiança da curva de calibração ([Figura 2.9\(a\)](#)), que apresenta a forma de duas linhas hiperbólicas ao redor da curva. O intercepto do limite superior do intervalo de confiança é denominado y_c crítico (y_c) e a sua projeção no limite inferior é uma estimativa da concentração mínima que pode ser medida com um grau de confiança estatística evidenciado, sendo o limite de detecção do método (LOD). As equações apresentadas ([Figura 2.9\(a\)](#)) descrevem os cálculos de y_c crítico e do limite de detecção.

Pelo método dos parâmetros da curva de calibração, o limite de quantificação (LOQ) também é determinado da mesma forma de LOD. Como observado através da [Figura 2.11\(b\)](#) x_c é o valor da concentração, x , no ponto onde o valor de a_0 intercepta a reta de regressão e y_h é o valor da projeção de x_c no limite superior. Os cálculos estatísticos de y_h , x_c e LOQ podem ser efetuados pela utilização das equações apresentadas na [Figura 2.9\(b\)](#).

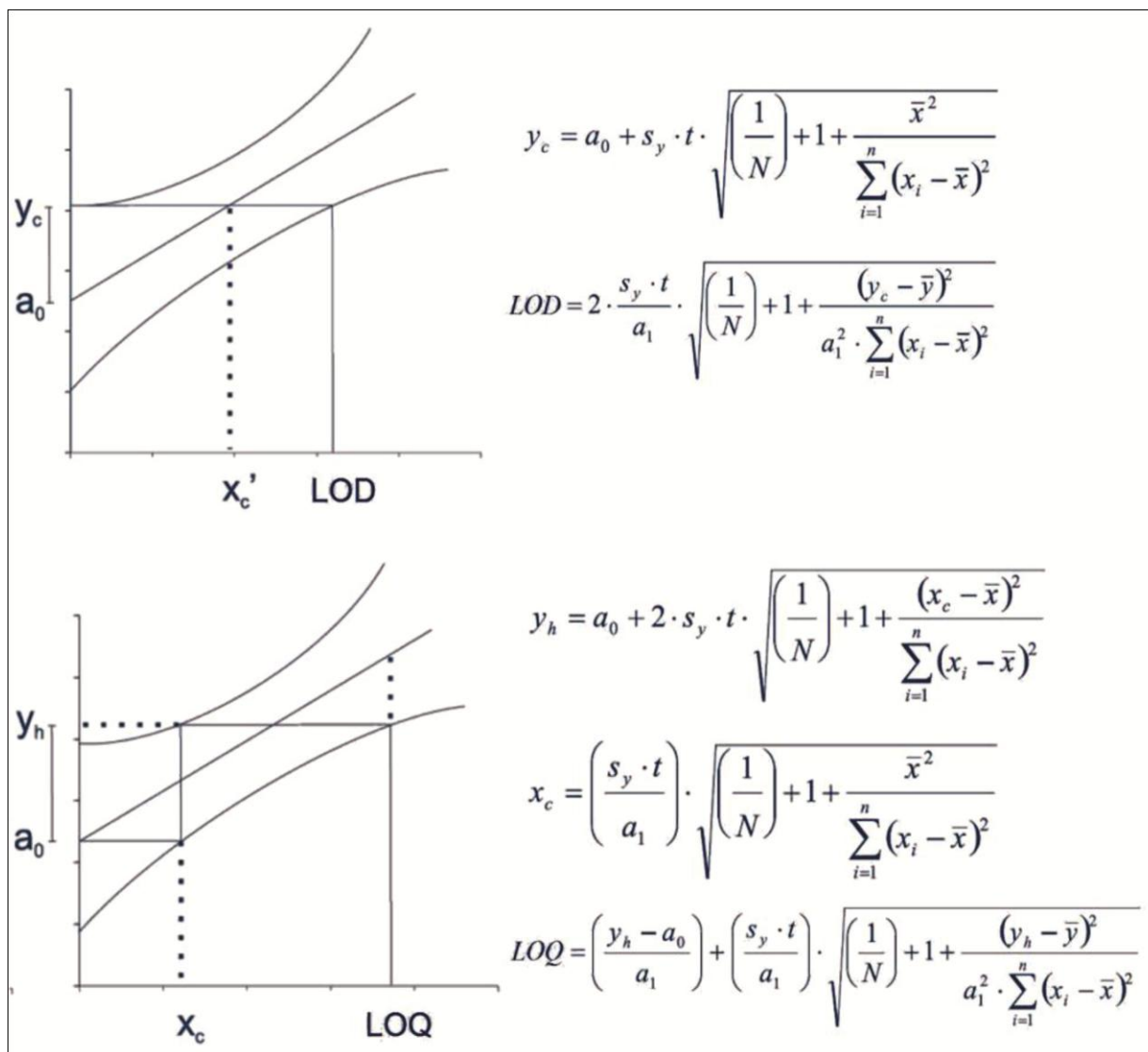


Figura 2.9 - Curvas de calibração e equações utilizadas nos cálculos de LOD (a) e LOQ (b).

Entretanto, para considerar o modelo de calibração é preciso que ele descreva com excelentes estimativas a concentração do verdadeira do analito. Portanto, o modelo predito não pode apresentar evidências de falta de ajuste e deve refletir uma significativa estatística da regressão. Desta forma, a validação do modelo de calibração geralmente é realizada por meio de uma análise de variância (PIMENTEL; NETO, 1996).

As equações para ANOVA de dados experimentais adaptados para modelos lineares pelo método dos mínimos quadrados (MMQ) são mostradas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - ANOVA para o ajuste de um modelo pelo MMQ.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (gl)	Média Quadrática (MQ)
Regressão	$\sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	$p - 1$	$SQ_{reg}/(p-1)$
Resíduo	$\sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	$n - p$	$SQ_r/(n-p)$
Falta de Ajuste	$\sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	$m - p$	$SQ_{faj}/(m-p)$
Erro Puro	$\sum \sum [y_{ij} - y_{im}]^2$	$n - m$	$SQ_{ep}/(n-m)$

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

A observação de fatores como análise dos resíduos, falta de ajuste do modelo e significância da regressão são essenciais para validação de modelos lineares pela aplicação da ANOVA. Ao analisar os resíduos deixados após a modelagem, verifica-se o comportamento dos erros de previsão em relação aos dados experimentais. No gráfico dos resíduos é possível identificar o tipo de erro associado aos dados. Dessa forma, se os resíduos apresentam algum perfil ou estrutura teremos uma evidência de um modelo com falta de ajuste. Entretanto, se os resíduos se distribuírem aleatoriamente em torno de zero teremos apenas erros aleatórios, evidenciando um modelo bem ajustado aos dados experimentais.

O teste de falta de ajuste compara os resíduos do modelo para determinações realizadas em vários níveis da variável x , média quadrática de falta de ajuste (MQ_{faj}) com os resíduos das análises das medidas autênticas nesses mesmos níveis, média quadrática do erro puro (MQ_{ep}). Desta maneira, se a razão $(MQ_{faj})/(MQ_{ep})$ for menor que o valor do ponto de distribuição F referentes aos graus de liberdade de MQ_{faj} e MQ_{ep} para um dado nível de confiança estatística, temos um modelo sem falta de ajuste. Assim sendo, as duas médias quadráticas refletirão apenas os erros aleatórios associados aos dados. Caso contrário, o modelo apresenta

falta de ajuste e necessita ser reestimado e revalidado (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 1996).

No teste de significância estatística da regressão, compara-se a razão entre a média quadrática devido à regressão (MQ_{reg}) e a média quadrática residual (MQ_r) com o valor do ponto da distribuição F referente aos graus de liberdade de MQ_{reg} e MQ_r a um certo nível de confiança estatística. Em geral, emprega-se um nível de 95% de confiança. Se a referida razão for maior que o valor de F (de pelo menos cinco vezes), conclui-se que a regressão é estatisticamente significativa. Do contrário, não se pode admitir a existência de uma relação funcional (linear, quadrática, etc) entre as variáveis que possa ser descrita pelo modelo (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 1996).

2.7.1 - Teste de recuperação aparente

Um teste de recuperação (DOQ-CGCRE-008, 2003) foi aplicado como método para determinar o teor de interferência e para avaliar a exatidão do método proposto. Esse procedimento foi estimado usando ensaios em triplicatas de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do analito. A taxa de recuperação (R) é calculada empregando a expressão mostrada a seguir:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (1.2)$$

onde C_1 é a concentração total do analito na amostra após adição de uma quantidade conhecida do mesmo analito; C_2 é a concentração original do analito determinada na amostra; C_3 é a concentração do analito adicionado na amostra.



Capítulo 3 - Resultados e Discussão

3.1 - Otimização dos parâmetros do μ FBA

Para o método utilizado, a concentração e o volume, dos reagentes e amostras, além do tempo de residência da mistura dentro da microcâmara foram avaliados, a fim de melhorar a sensibilidade e a reprodutibilidade do sinal analítico. A seleção de tais valores para o sistema desenvolvido foi feito de modo univariado e realizado em conformidade com estudos estabelecidos anteriormente (GAPPER et al., 2004; PISTÓN et al., 2011). Todos esses estudos de otimização foram realizados automaticamente no μ FBA proposto. Na [Tabela 3.1](#) são apresentados os parâmetros avaliados e os seus respectivos valores selecionados.

Tabela 3.1 - Parâmetros selecionados do μ FBA proposto para a determinação de NO_3^- e NO_2^- em amostras de laticínios.

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
N-(1-naftil)-di-hidrocloreto de etilenodiamina (NED) (g L^{-1})	0,2 – 2,0	1,0
Sulfanilamida (g L^{-1})	5,0 – 50,0	40,0
Ácido clorídrico (mol L^{-1})	0,5 – 2,0	0,8
Tempo de espera da reação na microcâmara (s)	0 – 60,0	20,0
Volume de amostra (μL)	10,0 – 50,0	40,0
Volume de reagente (μL)	30,0 – 50,0	40,0
Total volume (μL)	40,0 – 100,0	80,0

Os parâmetros apresentados na [Tabela 3.1](#) foram sempre avaliados no sentido de minimizar o consumo de reagentes, amostras e geração de resíduos, bem como maximizar o sinal analítico.

No estudo da variação das concentrações dos reagentes cromogênicos foram empregados os valores utilizados por Lapa et al. (2000) os quais foram de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ para o N-(1-naftil)-di-hidrocloreto de

etilenodiamina (NED), $10,0 \text{ g L}^{-1}$ para sulfanilamida e $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ para o ácido clorídrico. A Figura 3.1 representa os gráficos do efeito das concentrações avaliadas na intensidade do sinal analítico. Para todas as análises de otimização o padrão empregado foi de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrito.

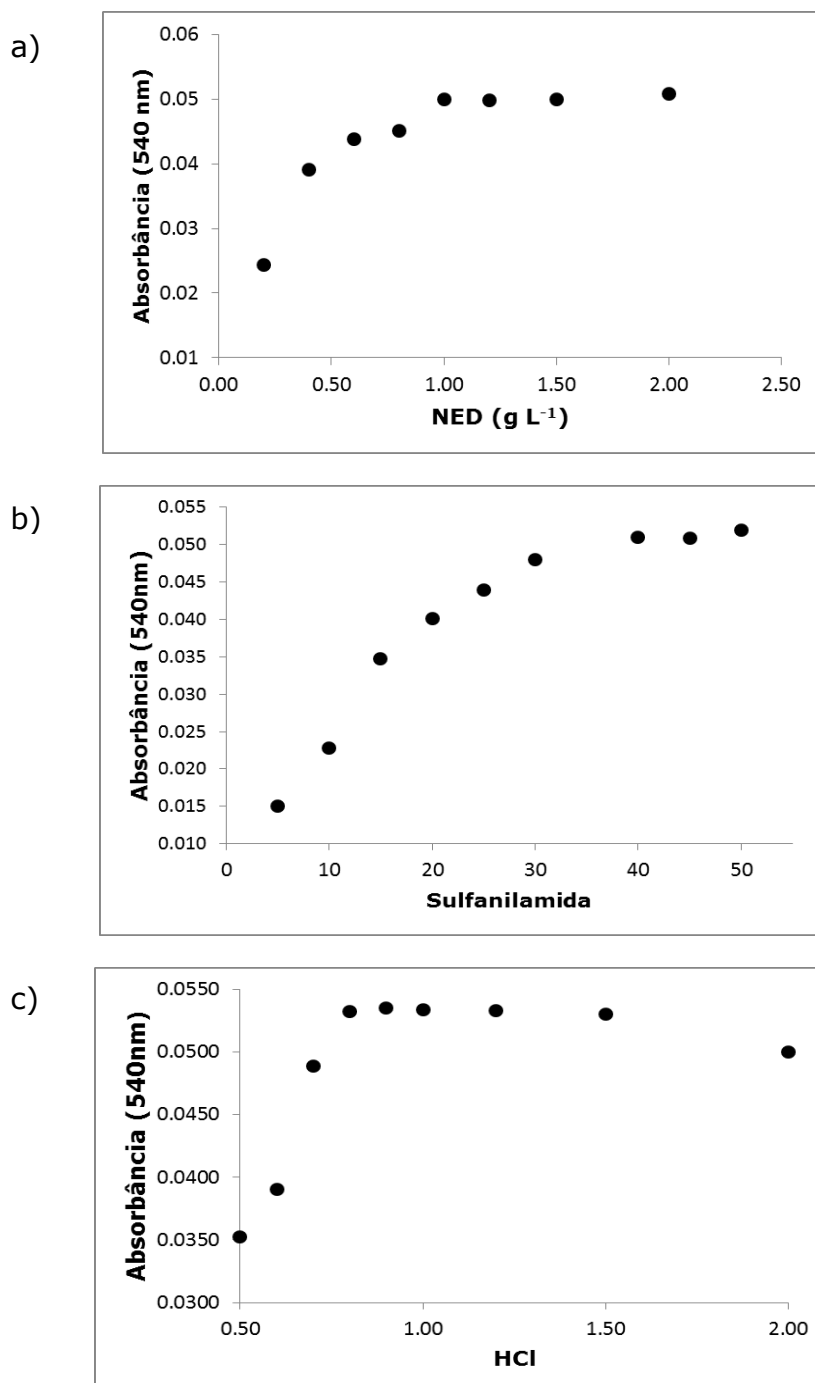


Figura 3.1. Efeito das concentrações dos reagentes sobre o sinal analítico. (a) NED, (b) sulfanilamida e (c) ácido clorídrico.

Com relação ao NED, foi verificado, [Figura 3.1\(a\)](#) que a sensibilidade do método aumentou consideravelmente até a concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$, e que valores maiores que este aumentavam muito pouco o sinal analítico, não demonstrando diferenças estatisticamente significantes entre esses valores. Portanto, o valor de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ foi selecionado como ótimo para o estudo proposto.

No estudo da variação da concentração de sulfanilamida, dentre os valores avaliados, não houve melhora do sinal analítico em valores de concentração maiores do que $40,0 \text{ g L}^{-1}$, sendo essa a concentração escolhida ([Figura 3.1\(b\)](#)). No que diz respeito à concentração de ácido clorídrico, foi percebido que a sensibilidade aumentou até $0,8 \text{ mol L}^{-1}$, e que valores acima deste diminuíam a sensibilidade do método devido provavelmente a mudança no pH ótimo requerido para esta reação (LIMA, 2006). Sendo este valor selecionado para a preparação da solução do reagente cromogênico ([Figura 3.1\(c\)](#)).

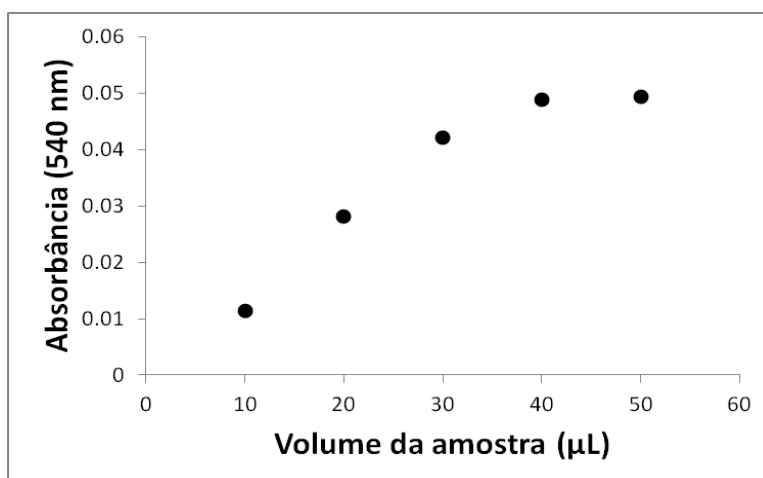
Com o comprimento da micro-coluna estabelecido de acordo com a literatura (LAPA et al., 2000), estudou-se o seu diâmetro interno entre 1 e 3 mm. Respostas analíticas para comprimentos de 1 mm não mostraram boas eficiência no rendimento das reduções. O melhor rendimento observado foi obtido com 2 mm, e com diâmetros internos maiores não houve aumento significativo na resposta analítica. Logo, foi preferido trabalhar com 2 mm de diâmetro, pois é possível a utilização de menos cádmio havendo a promoção de reduções estatisticamente eficientes.

A microcâmara fabricada possui um volume total de $100 \text{ }\mu\text{L}$. No entanto, devido às dimensões da micro-coluna de cádmio esponjoso, foi avaliado a precisão e a reprodutibilidade do sinal analítico da adição de padrão (ou amostra) e de reagente cromogênico ([Figura 3.2](#)).

Logo, é necessário trabalhar com um volume de $40 \text{ }\mu\text{L}$ por amostra, sendo este o volume que preenche completamente a coluna. E, para uma uniformidade operacional do sistema, tanto a amostra que vai ser reduzida na coluna como a que é enviada diretamente para a microcâmara deve ter o mesmo volume. Logo, para esta configuração o

mesmo volume de reagente colorimétrico produz uma resposta analítica reprodutível.

a)



b)

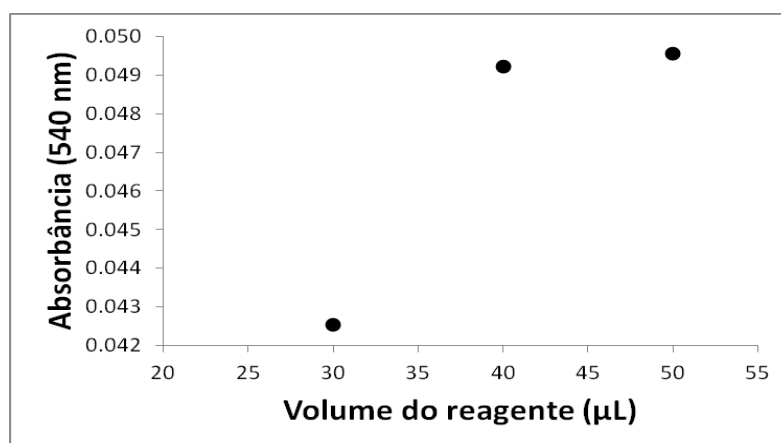


Figura 3.2. Efeito das variações de volumes de amostra (a) e reagente (b) sobre o sinal analítico.

Para o volume total de operação da microcâmara (80 µL), o tempo necessário para o desenvolvimento da reação colorimétrica foi avaliado conforme os valores apresentados na Tabela 3.1. Verificou-se que até 20 segundos houve aumento considerável do sinal analítico, e que tempos maiores que este não proporcionou aumento desse sinal (Figura 3.3). Logo, este tempo foi escolhido como tempo necessário para o registro da resposta analítica.

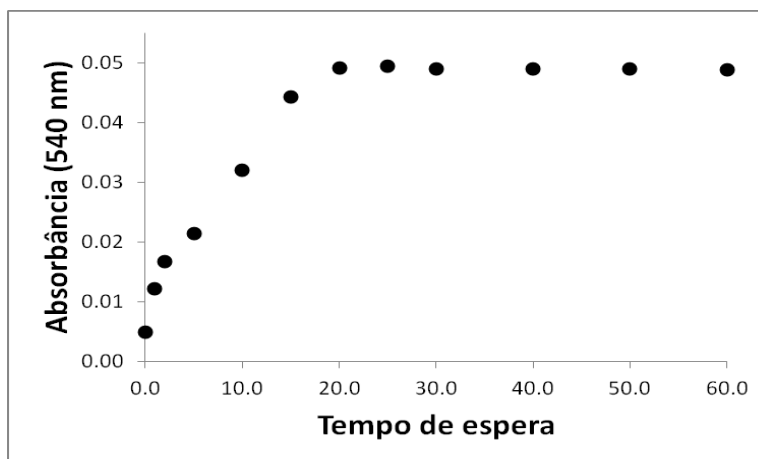


Figura 3.3. Efeito dos tempos de espera sobre o sinal analítico.

3.2 - Determinação de nitrato e nitrito

As curvas de calibração analítica foram construídas com base nos níveis de concentração distribuídos segundo os valores 0,01; 0,03; 0,05; 0,07 e 0,10 mg L⁻¹. É mostrado na [Figura 3.1](#) que as curvas analíticas obtidas por ambos os instrumentos, exibem um comportamento linear entre a resposta analítica e a concentração dos analitos em suas soluções de calibração. Essa inferência, baseada inicialmente em uma inspeção visual, é confirmada mediante a análise gráfica dos resíduos deixados pelos modelos e, principalmente, pela aplicação da Análise de Variância, apresentada na sequência.

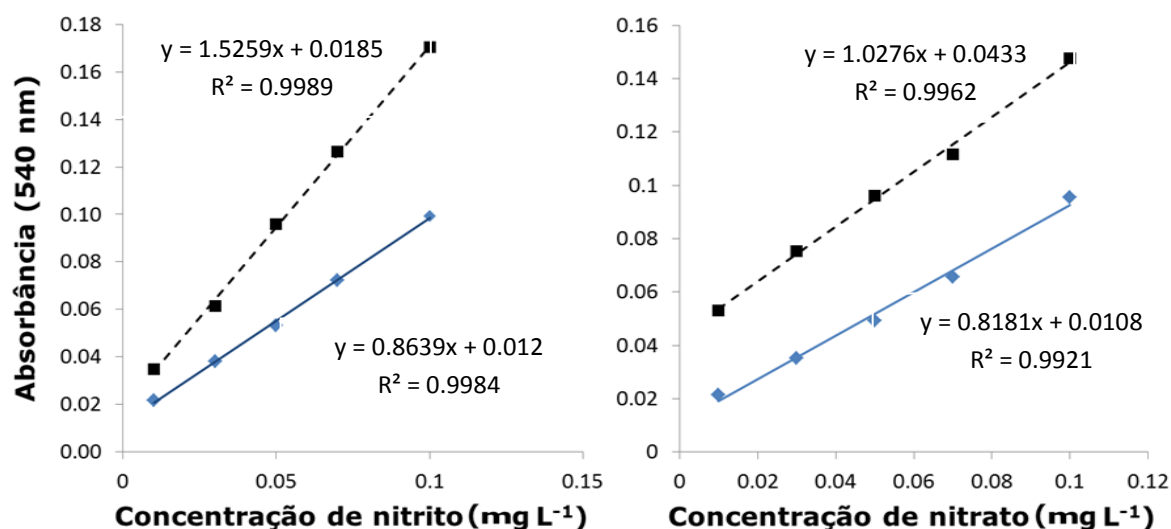


Figura 3.4 - Curvas de calibração µFBA (linha cheia) e HP (linha tracejada).

Na Figura 3.4 é apresentado o gráfico dos resíduos deixados pelos modelos de calibração. Observa-se que, os resíduos se distribuem de maneira aleatória, variância aleatória constante, isto é, não exibem nenhuma estrutura sistemática, que evidencie uma eventual falta de ajuste. Entretanto, a análise dos gráficos dos resíduos constitui um critério subjetivo e, por isso, esse procedimento pode não ser suficiente para concluir que os modelos não apresentam falta de ajuste. Para isso, recorreu-se à ANOVA e aplicou-se o teste F para verificar se existe falta de ajuste e avaliar a significância estatística da regressão.

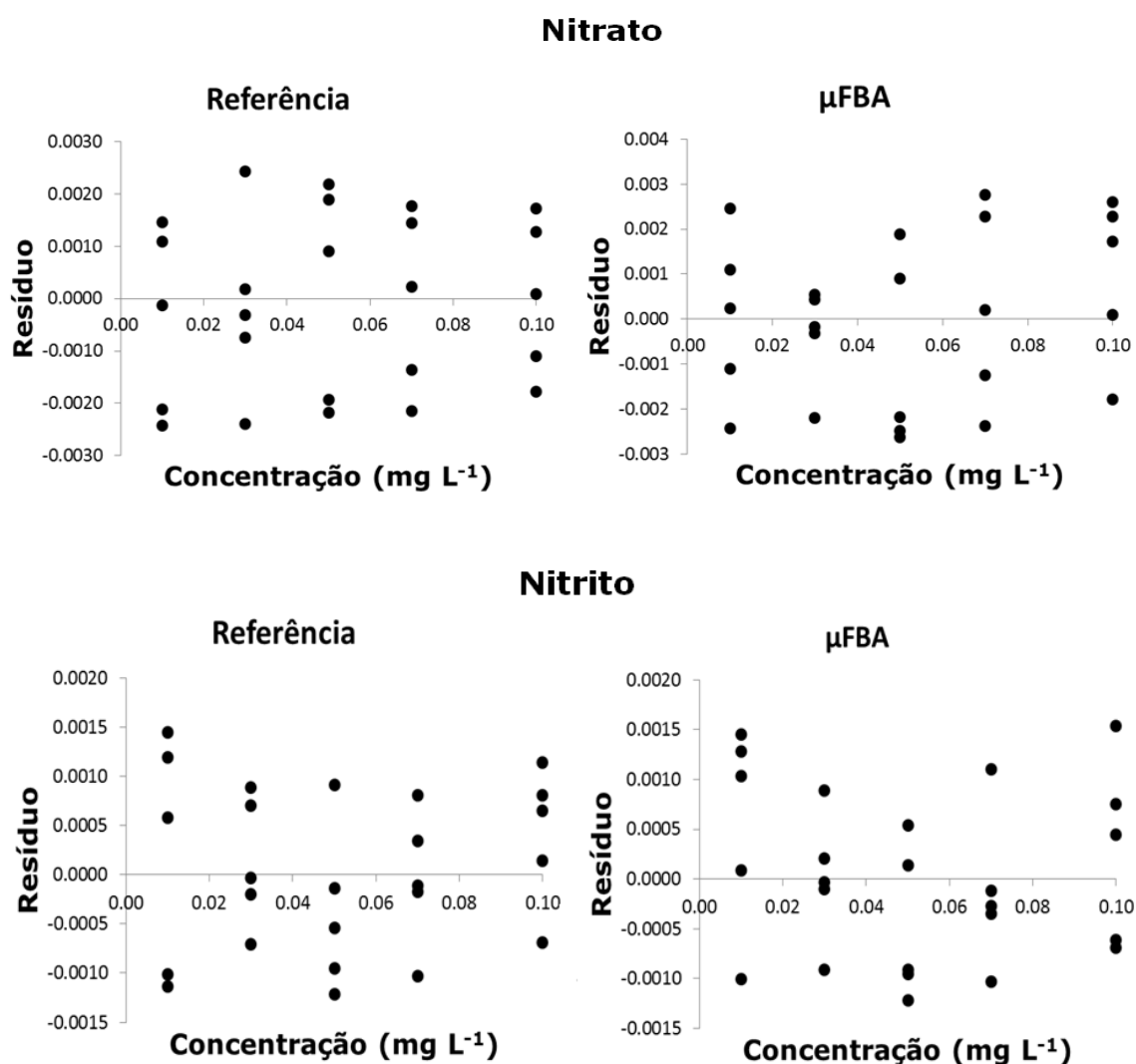


Figura 3.5 - Gráficos dos resíduos para os modelos de calibração de nitrato e nitrito para o método de referência e para o μ FBA, respectivamente.

Foi realizado um teste de análise de variância (ANOVA) para validar os modelos lineares baseados no método dos mínimos quadrados (MMQ), posteriormente a plotagem das curvas de calibração e gráficos de resíduos. Testes F para falta de ajuste e de significância estatística da regressão foram aplicados aos modelos lineares com base nos resultados de variância, bem como os intervalos de confiança em relação aos parâmetros do modelo foram encontrados.

Na [Tabela 3.2](#) são apresentados os resultados da Análise de Variância, ANOVA, utilizada para a validação dos modelos de calibração baseados nas medições realizadas no μ FBA e HP.

Para todos os casos, os valores de MQ_{faj}/MQ_{ep} são menores que o ponto da distribuição F , ao nível de 95% confiança, considerando os mesmos graus de liberdade. Assim, não há evidência de falta de ajuste para um modelo linear. Além disso, a [Tabela 3.2](#) revela que as regressões lineares são altamente significativas. De fato, os valores de MQ_{reg}/MQ_r são muito maiores que o ponto da distribuição F , considerando-se os mesmos graus de liberdade e o nível de 95% de confiança.

Tabela 3.2 - Tabela ANOVA para o modelo linear das curvas de calibração de nitrito e nitrato.

Analito		Nitrato	Nitrito
MQ_{faj}/MQ_{ep}	HP	1,06	0,671
	μ FBA	2,98	1,329
MQ_{reg}/MQ_r	HP	$1,93 \times 10^4$	$8,42 \times 10^4$
	μ FBA	$1,85 \times 10^4$	$3,75 \times 10^4$
gl	Falta de Ajuste	4 e 12 respectivamente	
	Signifi. da Regres.	1 e 16 respectivamente	
$F_{v1/v2}$ a 95%	Falta de Ajuste	3,26	
	Signif.da Regres.	4,49	

Os parâmetros dos modelos obtidos por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados que descrevem as curvas analíticas mostradas na [Figura 3.2](#) estão representados na [Tabela 3.3](#). Nesta tabela,

também são apresentados os limites dos intervalos de confiança para os valores populacionais dos parâmetros dos modelos, os quais foram obtidos considerando o nível de 95% de confiança. Como os intervalos de confiança não contêm o valor zero, os parâmetros estimados para todos os modelos de calibração são considerados estatisticamente significativos.

Tabela 3.3 - Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos pelos métodos μ FBA e HP.

Analito	Modelo: $\hat{y} = \alpha + \beta x$			
	$\alpha \pm t_{13} \times \text{erro padrão}(\alpha)$		$\beta \pm t_{13} \times \text{erro padrão}(\beta)$	
	HP	μ FBA	HP	μ FBA
NO_3^-	0,0433 $\pm$ 0,0004	0,0108 $\pm$ 0,0005	1,0276 $\pm$ 0,0019	0,8181 $\pm$ 0,0021
NO_2^-	0,0185 $\pm$ 0,0002	0,012 $\pm$ 0,0003	1,5259 $\pm$ 0,0012	0,8639 $\pm$ 0,0017

Conforme feita a validação dos modelos de calibração, as curvas analíticas do μ FBA e HP foram usadas para a determinação de nitrato e nitrito em amostras reais. A Tabela 3.4 mostra tais resultados com os valores médios de cinco repetições para o μ FBA proposto juntamente com o método de referência para determinação espectrofotométrica de NO_3^- e NO_2^- em amostras de laticínios.

Um teste *t-pareado* foi aplicado e mostrou que não existe diferença significativa entre os resultados da Tabela 3.4 ao nível de 95% de confiança estatística. O desvio-padrão relativo (RSD%) foi inferior a 1,3% e 1,7%, para NO_3^- e NO_2^- , respectivamente.

Além disso, observa-se uma satisfatória *precisão* dos resultados para o micro *Flow-batch*, como observado pelos valores dos intervalos de confiança e de desvio padrão relativo, DPR (SKOOG *et al.*, 2007).

Os resultados estatísticos obtidos para análise de nitrato e nitrito corroboram para a validação das figuras de mérito do instrumento proposto. Os resultados da avaliação da performance microssistema proposto, nas análises envolvendo calibração univariada apontam para a viabilidade prática e confiabilidade das medidas realizadas no micro *flow-batch*.

Tabela 3.4 – Valores médios e incertezas das concentrações das amostras de laticínios (n=5) para a determinação de nitrito e nitrato ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) usando o μFBA proposto e o método de referência.

Amostras	μFBA		Referência		μFBA		Referência	
	$\text{NO}_2^- \pm \text{SD}^a$	$\text{RSD } \%^b$	$\text{NO}_2^- \pm \text{SD}^a$	$\text{RSD } \%^b$	$\text{NO}_3^- \pm \text{SD}^a$	$\text{RSD } \%^b$	$\text{NO}_3^- \pm \text{SD}^a$	$\text{RSD } \%^b$
Leite desnatado em pó	$102,5 \pm 1,65$	1,61	$105,2 \pm 1,03$	0,98	$327,8 \pm 3,45$	1,05	$326,9 \pm 2,93$	0,90
	$310,2 \pm 3,03$	0,98	$313,6 \pm 2,25$	0,72	$586,7 \pm 4,11$	0,71	$588,4 \pm 3,78$	0,64
	$146,5 \pm 1,54$	1,05	$144,8 \pm 1,41$	0,96	$402,1 \pm 3,98$	0,99	$402,1 \pm 3,85$	0,96
Leite integral em pó	$120,9 \pm 1,42$	1,19	$123,5 \pm 1,16$	0,94	$195,5 \pm 2,32$	1,20	$193,3 \pm 1,43$	0,74
	$155,3 \pm 2,55$	1,64	$158,6 \pm 2,05$	1,29	$202,4 \pm 2,54$	1,25	$200,9 \pm 1,76$	0,88
	$243,6 \pm 3,30$	1,35	$240,1 \pm 2,53$	1,05	$445,2 \pm 4,89$	1,13	$447,6 \pm 4,38$	0,98
Leite in natura	$810,6 \pm 5,65$	0,71	$812,9 \pm 4,12$	0,51	$1627,8 \pm 6,75$	0,41	$1630,0 \pm 6,52$	0,41
	$607,3 \pm 4,22$	0,69	$609,4 \pm 3,08$	0,55	$1105,4 \pm 5,39$	0,49	$1102,0 \pm 5,09$	0,46
	$406,6 \pm 2,31$	0,57	$403,8 \pm 2,17$	0,54	$835,8 \pm 5,85$	0,70	$836,5 \pm 4,99$	0,62
Coalhada	$302,9 \pm 3,61$	1,19	$302,5 \pm 2,66$	0,88	$588,1 \pm 6,22$	1,18	$589,6 \pm 6,15$	1,04
	$242,6 \pm 1,75$	0,73	$244,1 \pm 1,08$	0,46	$522,9 \pm 6,73$	1,27	$521,3 \pm 5,86$	1,12
	$201,5 \pm 1,99$	0,98	$203,9 \pm 2,15$	1,05	$437,4 \pm 3,96$	0,91	$435,5 \pm 3,44$	0,79
Queijos	$607,1 \pm 3,47$	0,56	$610,3 \pm 2,85$	0,47	$1223,5 \pm 6,22$	0,51	$1225,1 \pm 6,51$	0,53
	$511,3 \pm 3,98$	0,78	$512,6 \pm 2,43$	0,49	$1039,2 \pm 5,87$	0,58	$1033,0 \pm 4,93$	0,48
	$840,3 \pm 5,66$	0,67	$841,8 \pm 5,91$	0,71	$1549,7 \pm 6,15$	0,40	$1547,8 \pm 5,91$	0,39
	$585,6 \pm 3,81$	0,65	$582,3 \pm 6,22$	1,06	$1348,2 \pm 6,73$	0,51	$1351,2 \pm 6,22$	0,46
	$920,8 \pm 4,54$	0,49	$923,5 \pm 3,82$	0,41	$1794,5 \pm 6,49$	0,36	$1793,4 \pm 5,96$	0,35

O μ FBA proposto teve seu desempenho avaliado estatisticamente em termos de sensibilidade, envolvendo os valores limite de detecção (LOD), de quantificação (LOQ) e faixa de trabalho, para determinação de cada um dos analitos estudados. Os parâmetros foram comparados com os resultados obtidos em um instrumento comercial de referência, espectrofotômetro HP.

Os resultados da investigação da faixa dinâmica para a determinação de nitrato e nitrito são mostrados na [Tabela 3.5](#). Para isso, foram preparadas soluções desses analitos, em quintuplicatas autênticas, com concentrações na faixa de 0,01 a 0,1 mg L⁻¹.

Tabela 3.5 - Comparação entre LOD e LOQ (em $\mu\text{g L}^{-1}$) para a determinação de nitrato e nitrito no instrumento proposto (μ FBA) e referência (HP), a 95% de confiança estatística.

Analito	HP		μ FBA	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
NO_3^-	0,19	0,61	0,41	1,36
NO_2^-	0,17	0,58	0,39	1,29

Analisando os valores apresentados na [Tabela 3.5](#) observa-se que instrumento proposto apresenta uma faixa linear semelhante e valores de LOD e LOQ maiores do que os obtidos com o equipamento de referência. Tais diferenças estão diretamente relacionadas ao sistema de detecção dos instrumentos. Enquanto no μ FBA proposto, a detecção é feita por um LED e um fototransistor com caminho ótico de aproximadamente 0,5 mm, no espectrofômetro um arranjo de fotodiodos e caminho ótico de 1,0 cm lhe conferem melhor sensibilidade de detecção para a análise realizada.

3.3 - Teste de recuperação

Para avaliar a exatidão do método aplicado à determinação de NO_3^- e NO_2^- em três amostras de laticínios foram utilizadas. Um volume de 1,0 mL de solução padrão com concentrações conhecidas de 0,01; 0,05 e 0,10 mg L⁻¹ foram adicionadas a 9,0 mL de amostra de laticínios (200,9;

521,3 e 1225,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de NO_3^- ; e 105,2; 302,5 e 610,3 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ NO_2^-). As medidas dessas soluções foram realizadas empregando o sistema proposto. Na Tabela 3.6 são apresentados os resultados obtidos para essas análises em porcentagem de recuperação.

Tabela 3.6 - Teste de recuperação de nitrato e nitrito em amostras de laticínios (n = 3).

Amostra	Recuperação %		
	0,01 (mg L^{-1})	0,05 (mg L^{-1})	0,10 (mg L^{-1})
Nitrato (NO_3^-)			
1	98,3 $\pm$ 2,2	97,9 $\pm$ 2,1	102,9 $\pm$ 2,1
2	97,7 $\pm$ 2,0	102,3 $\pm$ 2,1	102,5 $\pm$ 2,3
3	100,4 $\pm$ 2,1	101,8 $\pm$ 2,3	99,6 $\pm$ 1,9
Nitrito (NO_2^-)			
1	101,5 $\pm$ 2,2	100,4 $\pm$ 2,1	97,7 $\pm$ 2,1
2	100,8 $\pm$ 2,1	99,9 $\pm$ 2,3	102,3 $\pm$ 2,2
3	98,3 $\pm$ 2,3	97,9 $\pm$ 2,0	98,6 $\pm$ 2,3

Os resultados obtidos pelo teste de recuperação para cada uma das amostras de laticínios estavam dentro da faixa de 97,7% a 102,9%.

3.4 - Comparação do μFBA proposto com outros sistemas

As Características do μFBA proposto, com outros trabalhos utilizando análise por injeção sequencial, SIA (PISTÓN *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2006) para determinação de NO_3^- e NO_2^- em amostras de laticínios são apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Comparação das características analíticas do μ FBA proposto e outros sistemas automáticos recentemente propostos para determinação de NO_3^- e NO_2^- em amostras de laticínios.

Parâmetros	μ FBA		SIA [2] ^a		SIA [3] ^a	
	NO_3^-	NO_2^-	NO_3^-	NO_2^-	NO_3^-	NO_2^-
Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$4,1 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-1}$	$5,0 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-1}$	-
Desvio padrão relativo (%)	< 1,3 (n = 5)	< 1,7 (n = 5)	< 3,0 (n = 5)	< 1,6 (n = 5)	< 3,4 (n = 10)	-
Faixa de trabalho (mg L^{-1})	0,01 – 0,10	0,01 – 0,10	0,55 – 15,0	0,084 – 1,01	-	-
Frequência analítica (h^{-1})	60	60	30	80	24	-
Consumo de amostra (μL)	40	40	123	123	128	128
Deteção integrada	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Fluído carregador	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente

^a Analisador por injeção sequencial.

O analisador proposto apresentou uma frequência analítica de 60 amostras por hora para o método utilizado (determinação sequencial NO_3^- e NO_2^-), com uma produção de resíduos de 240 μL por análise. Apresentando parâmetros satisfatórios, tais como: o limite de detecção, frequência analítica e ausência de fluido transportador.



Capítulo 4 – Considerações finais

4.1 - Conclusão

Neste trabalho de pesquisa em automação analítica foi proposto o desenvolvimento de um novo procedimento miniaturizado para a determinação sequencial de íons nitrato e nitrito em amostras de laticínios. Para isso, foi desenvolvido um analisador *micro-flow-batch* em substrato de poliuretano-acrilato com uma micro-coluna de cádmio esponjoso acoplado em linha, para a redução dos íons nitrato a nitrito nas amostras de laticínios.

A determinação de nitrato e nitrito envolveu o bem conhecido método de Griess modificado conforme a literatura (LAPA *et al.*, 2000) e adaptado ao microssistema proposto, onde as concentrações de cádmio utilizado para a construção da micro-coluna redutora foram minimizadas sem perda significativa no rendimento da redução, bem como na reprodutibilidade das análises em comparação ao mesmo método convencional em batelada.

Todos os resultados das análises mostraram-se estatisticamente satisfatórios e foram devidamente validados. Tanto os testes *t*-pareado, a 95% de confiança estatística, quanto às análises de variância para falta de ajuste do modelo, além do teste de recuperação, não confirmaram desvios significativos creditando os resultados obtidos pelo microssistema em relação ao método de referência.

Dessa forma, o sistema automático proposto empregando a coluna redutora de cádmio esponjoso permitiu a determinação de forma estatisticamente satisfatória dos teores de nitrato e nitrito nas amostras de laticínios, apresentando um consumo muito reduzido de reagentes (especial referência ao cádmio empregado) e amostras, gerando um volume mínimo de resíduos ao meio ambiente, além de apresentar reprodutibilidade e robustez satisfatórias. O *micro-flow-batch* permitiu ainda análises muito rápidas, apresentando frequência analítica de 60 amostras por hora (cerca de uma análise de amostra, determinação de nitrito e nitrato, sequencialmente por minuto). Convém ainda salientar

que o uso de uma válvula solenoide para adição da amostra a partir da micro-coluna permite uma troca de amostra e/ou limpeza de forma mais rápida e eficiente, enquanto a mesma é analisada dentro da micro-câmara de mistura.

Portanto, o microssistema *flow-batch* proposto apresenta-se como uma nova estratégia para implementar procedimentos analíticos automáticos que precisem de etapas de pré-tratamento da amostra em linha. Assim, as boas características analíticas desse sistema aplicado para a determinação de nitrato e nitrito em amostras de laticínios o qualifica como potencialmente útil para novas abordagens envolvendo o uso de micro-colunas.

4.2 - Perspectivas

Este trabalho de pesquisa tem como perspectivas novas aplicações do sistema automático *micro-flow-batch* para outras determinações envolvendo técnicas espectrofluorimétricas e quimioluminescentes com o uso de nanocristais semicondutores, corantes orgânicos, pontos quânticos, dentre outros materiais fluorescentes, aplicadas em: análises de alimentos, bebidas, pesticidas, fármacos, análises clínicas, amostras ambientais e de fluidos biológicos.

Planeja-se, ainda, para as próximas pesquisas, uma melhoria no *micro-flow-batch*, utilizando novas etapas de pré-tratamento, empregando micro-colunas, processos de fotodegradação UV-vis, além do uso de imagens digitais como forma de detecção, sobretudo quimioluminescente, permitindo assim, uma redução ainda maior na geração de resíduos, com maior integração de dispositivos, portabilidade e simplicidade operacional.



Capítulo 5 - Referências

- ALMEIDA, L. F. Um analisador fluxo-batelada com bomba pistão aplicado à preparação de soluções de calibração e microemulsões: determinação de metais em água mineral e gasolina por GF AAS. Recife, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPE, Tese de doutorado, 154p, **2007**.
- ALONSO, M. C. B.; PREGO, R. Determination of silicate, simultaneously with other nutrients (nitrite, nitrate and phosphate), in river waters by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, **416: 1, 2000**.
- ANDRADE, R.A.N. Um Luminômetro Fluxo-Batelada para Determinação Quimiluminescente de Vitamina B 12 em Medicamentos. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, Dissertação de Mestrado, 112p, **2011**.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Official methods of analysis, 14th ed, Arlington, **2: 284, 1997**.
- AOAC. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 40. **1984**.
- AOKI, T.; FUKUDA, S.; HOSOI, Y.; MUKAI, H. Rapid flow injection analysis method for successive determination of ammonia, nitrite, and nitrate in water by gas-phase chemiluminescence *Analytica Chimica Acta*, **349: 3, 1997**.
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M.; Green Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, **6: 27, 2008**.
- ASOPURU, A. O.; HERBERT, H. H.; WILLIAM, F. S.; STEVEN, G. M. Reverse Polarity Capillary Zone Electrophoretic Analysis of Nitrate and Nitrite in Natural Water Samples. *Analytical chemistry*, **71: 14, 1999**.
- BAIRD, C. Química Ambiental. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, , p. 223-224, 459-463. **2002**.
- BARRETO, I.S. Determinação Espectrofotométrica de Boro em Plantas. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, Dissertação de Mestrado, 101p, **2012**.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Oficializa os métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes. Instrução Normativa n. 20, de 21 de julho de 1999. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, 09 set. Seção 1, p.30, **1999**.

CALATAYUD, J.M.; MATEO, J.V.G.; DAVID, V. Multi-insertion of small controlled volumes of solutions in a flow assembly for determination of nitrate (photoreduction) and nitrite with proflavin sulfate, *Analyst* 123, 429-434, **1998**.

COLTRO, W. K. T. et al. Microssistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. *Quím. Nova*. 30, Vol. 8, **2007**.

DA SILVA, J. A. F.; LAGO, C. L. Módulo eletrônico de controle para válvulas solenoide. *Química Nova*. 25: 842, **2002**.

DASGUPTA, P. K.; Eom I.Y.; Morris, K.J.; Li.J. Light emitting diode-based detectors absorbance, fluorescence and spectroelectrochemical measurements in a planar flow-through cell. *Anal. Chim. Acta*. **500**, **2003**.

DAVISON, W.; WOOF, C.; Comparison of different forms of cadmium as reducing agents for the batch determination of nitrite, *Analyst*, **103: 403**, **1978**.

DINIZ, P. H. G. D. Determinação do Teor de NaCl, KCl e Glicose em Medicamentos Injetáveis por Fotometria Usando Exploração do Efeito Schlieren em Sistemas FIA e PLS1. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, Dissertação de Mestrado, 89p, **2010**.

Diniz, P.H.G.D; Almeida, L.F.; Harding, D.P.; Araújo, M.C.U. Flow-batch analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, **35**, **2012**.

DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. INMETRO, **2003**.

DUARTE, G. R. M.; PRICE, C. W.; AUGUSTINE, B. H.; CARRILHO, E.; LANDERS, J. P.; Analytical Chemistry, **83:5182, 2011**.

DUARTE, M.; MÍDIO, A.F. Nitratos e nitritos em alimentos. Cadernos de Nutrição, v.12, p.19-30, **1996**.

DUTRA, C. B.; RATH, S.; REYES, F. G. Nitrosaminas voláteis em alimentos. Alim. Nutr., Araraquara, **18: 111, 2007**.

ELIAS, E.M. Determinação do teor de nitrato em fórmula infantil por sistema FIA e estimativa da sua exposição pelos lactentes. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, UNICAMP, Dissertação de Mestrado, **2007**.

FACCHIN, I. Extração Líquido-Líquido em Sistema de Fluxo Monossegmentado Campinas, Programa de Pós-Graduação em Química, UNICAMP, tese de Doutorado, 188p, **1996**.

FANNING, J.C.; The chemical reduction of nitrate in aqueous solution. Coordination Chemistry Reviews, **199:159, 2000**.

FERNANDES, J.C.B E FERREIRA, L. O. S. Manufacturing of miniature fluidic modules for lab on a chip using UA photoresin from flexographic platemaking process. J. Braz. Chem, **17: 6, 2006**.

FERREIRA, M.M.C. Planilha Eletrônica para Validação de Métodos Analíticos Univariados, disponível em: <<http://lqta.iqm.unicamp.br/portugues/downloads/validar.xls>>. Acessado em **20/09/2012**.

FLOYD T.L.; Eletronic Devices, Prentice Hall, New Jersey, **1996**.

FONSECA, A. Construção e avaliação de microssistemas para análise em fluxo. Campinas, Programa de pós-graduação em química, Unicamp, Tese de doutorado, **2008**.

FONSECA, A. Construction and evaluation of a flow injection micro-analyser based on urethane acrylate resin. Anal.Chim.Acta. **603, 2007**.

- FONSECA, A. Desenvolvimento de um fotômetro multicanal baseado em um arranjo de diodos emissores de luz. Campinas, Programa de pós-graduação em química, Unicamp, Dissertação de Mestrado, **2004**.
- FRENZEL, W.; MCKELVIE, I. D. PHOTOMETRY. IN: S. D. KOLEV E I. D. MCKELVIE. *Comprehensive analytical chemistry advances in flow injection analysis and related techniques*. Elsevier, **2008**.
- GANHÃO, F.M.C., Evolução do teor de nitritos e de nitratos e da concentração de pigmentos no fiambre e na mortadela ao longo do seu processo produtivo e do seu prazo de vida útil. Faculdade de Ciências e Tecnologia. UNL, Dissertação de Mestrado, 111p, **2010**.
- GAPPER, L.W.; FONG, B.Y.; OTTER, D.E.; INDYK, H.E.; WOOLLARD, D.C. Determination of nitrite and nitrate in dairy products by ion exchange LC with spectrophotometric detection. *International Dairy Journal*, **14: 881, 2004**.
- GUIDANCE FOR INDUSTRY. Q2B validation of analytical procedures: methodology. 1ª ed.: International Conference on Harmonisation, **1996**.
- HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. Princípios de análise instrumental, 6ª ed., Porto Alegre, Bookman, **2009**.
- HONORATO, R.S. et al. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. *Analytica Chimica Acta*, 396: 91, 1999.
- KAZEMZADEH, A.; ENSAFI, A.A. Sequential flow injection spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in various samples. *Analytica Chimica Acta*, **442: 319, 2001**.
- LAPA, R. A. S., LIMA, J. L. F. C., & PINTO, I. V. O. S. Sequential injection analysis based system for on-line monitoring of nitrite and nitrate in wastewater. *Analytical Sciences*, **16: 1157, 2000**.

LEE, S. H.; FIELD, L. R. Postcolumn fluorescence detection of nitrite, nitrate, thiosulfate, and iodide anions in high-performance liquid chromatography. *Analytical chemistry*, **56: 2647, 1984**.

LEVALLOIS, P.; PHANEUF, D. Contamination of drinking water by nitrates: analysis of health risks. *Canadian Journal of Public Health* , **85:192, 1994**.

LIJINSKI, W. Induction of tumours in rats by feeding nitrosatable amines together with sodium nitrite. *Food and Chemical Toxicology*, **22: 715, 1984**.

LIMA, M. B. Um micro flow-batch para determinação fotométrica e turbidimétrica de taninos em amostras de chás. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, Dissertação de Mestrado, 115p, **2010**.

LIMA, M.B.; BARRETO, I.S.; ANDRADE, S.I.; NETA, M.S.; ALMEIDA L.F.; ARAÚJO, M.C. Photometric determination of phosphorus in mineralized biodiesel using a micro-flow-batch analyzer with solenoid micro-pumps, *Talanta*. **98: 118, 2012 a**.

LIMA, M.B.; BARRETO, I.S.; ANDRADE, S.I.; NETA, M.S.; ALMEIDA L.F.; ARAÚJO, M.C. A micro-flow-batch analyzer with solenoid micro-pumps for the photometric determination of iodate in table salt, *TALANTA*, **100; 308, 2012 b**.

LIMA, M.J.R.; FERNANDES, S.M.V.; RANGEL, A.O.S.S. Determination of nitrate and nitrite in dairy samples by sequential injection using an in-line cadmium-reducing column, *Intern. Dairy J*. **16: 1442, 2006**.

MADOU, M. J., *Fundamentals of Microfabrication*, Boca Raton, 1st. Ed., CRC. Press, **1997**.

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M.; Miniaturized Total Chemical Analysis Systems: a Novel Concept for Chemical Sensing. *Sens. Actuators*, **1: 244, 1990**.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução CNS/MS nº04, de 24 de novembro de 1988. *Diário Oficial* ,Brasília, **19 de dezembro de 1988**.

- MONTE FILHO, S.S. Microfabricação de um analisador em Fluxo-Batelada (Micro Flow-Batch) à base de polímero fotocurável Uretano-Acrilato. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, Dissertação de Mestrado, 95p, **2010**.
- MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Detection e determination of nitrate and nitrite: a review. *Talanta*, **54: 785, 2001**.
- MOREIRA, P. N. T. Planejamento e otimização de um método quimiluminescente para determinação de vitamina B12 usando um sistema fluxo-batelada. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, Tese de doutorado, **2009**.
- NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; TAHERI, A.; HOMAYOONFARD, M.; Indirect Determination of Nitrite by Flame Atomic Absorption Spectrometry Using a Lead (IV) Dioxide Oxidant Microcolumn, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **27: 875, 2006**.
- PASQUALI ,C. E.L.; GALLEGO-PICÓ, A.; HERNANDO, P.F.; VELASCO, M.; ALEGRÍA, J.S.D. Two rapid and sensitive automated methods for the determination of nitrite and nitrate in soil samples. *Microchemical Journal* **94: 79, 2010**.
- PATNAIK, P. *Dean's analytical chemistry handbook*. 2. New York : McGraw-Hill, **2004**.
- PIMENTEL, M.F.; NETO, B.B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos, *Quim. Nova*. **19: 268, 1996**.
- PISTÓN, M.; MOLLO, A.; KNOCHEN, M. A simple automated method for the determination of nitrate and nitrite in infant formula and milk powder using sequential injection analysis, *J. Automat. Meth. Manager. Chemis*, **1, 2011**.
- RAMOS, L.A.; SHMITT, C.C.; CAVALHEIRO, E.T.G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. *Quim. Nova*, **29: 1114, 2006**.

RIBEIRO, F.A.L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados, *Quim. Nova.* **31: 164, 2008.**

SANTOS, J.S. Desenvolvimento e otimização de metodologias para a determinação de nitrogênio. Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, UFV, Dissertação de Mestrado, 102p, **2007.**

SILVA, J.C.B., Desenvolvimento e Avaliação de um Microsistema Fluídico com Unidade de Difusão Gasosa Integrada. Programa de Pós Graduação em Química. UNB, Dissertação de Mestrado, 82p, **2012.**

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. *Fundamentos de Química Analítica*. 8. s.l. : Thomson, **2007.**

TOVAR, A.; MORENO, C.; MANUEL-VEZ, M. P.; VARGA, M. G. A simple automated method for the speciation of dissolved inorganic nitrogen in seawater. *Analytica Chimica Acta*, **469: 235, 2002.**

UGUCIONE, C.; CARDOSO, A. A. Flow cell within an LED: a proposal for an optical absorption detector. *Anal. Bioanal. Chem.* **389, 2007.**

VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, M. S. Automatización y miniaturización en química analítica. Córdoba : Springer, **2000.**

WHITESIDES, G.M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, **442, 2006.**

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds. Genebra, 107. [Environmental Health Criteria, n. 5]. **1978.**

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010), Ingested nitrate and nitrite and cyanobacterial peptide toxins, IARC monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans, Lyon, France, **94: 462, 2010.**

ZBIKOWSKI, Z; ZBIKOWSKA, A.; BARANOWSKA, M. Content of nitrates and nitrites in raw milk in different regions of the country. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny* , **51: 29, 2000.**