

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

MARCOS AUGUSTO STOLF BRASIL

**Desenvolvimento de uma câmara *flow-batch* com aquecimento
direto e de procedimentos analíticos para determinação fotométrica
de açúcares redutores em vinhos e de manganês em
amostras vegetais**

**Piracicaba
2016**

MARCOS AUGUSTO STOLF BRASIL

**Desenvolvimento de uma câmara *flow-batch* com aquecimento
direto e de procedimentos analíticos para determinação fotométrica
de açúcares redutores em vinhos e de manganês em
amostras vegetais**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Dissertação apresentada ao Centro de
Energia Nuclear na Agricultura da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Química na
Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Boaventura Freire dos
Reis**

**Piracicaba
2016**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca – CENA/USP

Brasil, Marcos Augusto Stolf

Desenvolvimento de uma câmara *flow-batch* com aquecimento direto e de procedimentos analíticos para determinação fotométrica de açúcares redutores em vinhos e de manganês em amostras vegetais / Marcos Augusto Stolf Brasil; orientador Boaventura Freire dos Reis. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

96 f. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Açúcar redutor 2. Análise por injeção em fluxo 3. Espectrofotometria 4. Manganês 5. Química analítica instrumental I. Título

CDU 543.068.3 : 66.021.4

Só existem dois dias no ano
que nada pode ser feito.
Um se chama ontem
e o outro se chama amanhã,
portanto hoje é o dia certo para amar,
acreditar, fazer e principalmente viver.

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Agradeço tudo que me permitiu chegar até aqui.

A Família que sempre apoiou e colaborou desde a preparação para o exame de seleção e em todos os momentos em que houve necessidade.

Aos professores de Graduação e orientadores na Iniciação Científica Prof. Dr. Nelson Nepomuceno, Profa. Dra. Fátima Nepomuceno, Profa. Dra. Ana Célia Ruggiero, pelos conselhos, orientação e incentivo.

Aqui, a maravilhosa pessoa que é o Professor Dr. Boaventura, que com seu exemplo de vida e conduta, transmite muito mais do que apenas conhecimentos científicos.

Ao CENA e programa de Pós-graduação, pela oportunidade e infra-estrutura oferecida.

A Secretaria da Pós-graduação Cláudia, Daiane, Fábio, Neuda, Sonia atenciosamente sempre a disposição.

A Seção de Biblioteca do CENA.

Aos professores Dr. Fábio Rocha, Dr. Elias Zagatto, Dra. Maria Fernanda, Dr. Francisco Krug, Dr. José Roberto Ferreira, pelos conhecimentos, conselhos, oportunidades, apoio, conversas ao café.

A Sheila Roberta, nossa amiga e suporte para todas questões, ocasiões e necessidades.

Aos técnicos Fátima, Milão (Valdemir) e Tatinha (Iolanda), sempre a disposição para ajudar.

Aos amigos Alex Batista, Ana Clara Vida, Andréia Pereira, Andressa Adame, Carina Nascimento, Carla Kamogawa, Claudinéia Silva, Diogo Silva, Diogo Rocha, Diogo Santos Silva, Felisberto Junior, Gabriel Carvalho, Glaucia Pessin, Jeová Miranda, Lidiane Nunes, Marcelo Guerra, Maria Amália, Mário Feres, Marcos Gomes, Milton Sasaki, Rejane Frizzarin, Taciana Gomes, Ticiane Magalhães, Tuanne Dias.

A todos

“Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, pois **cada pessoa é única
e nenhuma substitui outra.**

Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, mas não vai só
nem nos deixa sós.

Leva um pouco de nós mesmos,
deixa um pouco de si mesmo.

Há os que levam muito,
mas há os que não levam nada.

Essa é a maior responsabilidade de nossa vida,
e a prova de que duas almas
não se encontram ao acaso.”^a

“As pessoas têm estrelas que não são as mesmas. Para uns, que viajam, as estrelas são guias. Para outros, elas não passam de pequenas luzes. Para outros, os sábios, são problemas. Mas todas essas estrelas se calam. Tu, porém, terás estrelas como ninguém... Quero dizer: quando olhares o céu de noite, (porque habitarei uma delas e estarei rindo), então será como se todas as estrelas te rissem! E tu terás estrelas que sabem sorrir! Assim, tu te sentirás contente por me teres conhecido. Tu serás sempre meu amigo (basta olhar para o céu e estarei lá). Terás vontade de rir comigo. E abrirá, às vezes, a janela à toa, por gosto... e teus amigos ficarão espantados de ouvir-te rir olhando o céu.”^b

^{a, b} Antoine De Saint-Exupery

RESUMO

BRASIL, M. A. S. **Desenvolvimento de uma câmara *flow-batch* com aquecimento direto e de procedimentos analíticos para determinação fotométrica de açúcares redutores em vinhos e de manganês em amostras vegetais.** 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema analítico tendo como elemento central uma câmara *flow-batch* com aquecimento direto e fotômetro acoplado, empregado para a determinação de açúcares redutores em vinhos e de manganês em amostras vegetais. A instrumentação foi implementada utilizando o conceito *flow-batch* e o processo de multicomutação em fluxo. A proposta da câmara com aquecimento direto foi concebida para viabilizar procedimentos analíticos baseados em reações lentas. Adicionalmente, foi realizada a instalação do sistema de detecção fotométrica no próprio corpo da câmara, eliminando a necessidade de resfriamento e transporte da solução para outro componente para monitoramento. Esta estratégia possibilitou a redução das dimensões do sistema e o incremento na frequência de amostragem. O controle do sistema é realizado usando aplicativo desenvolvido na linguagem Visual Basic®, o qual aciona seus componentes e realiza a leitura do sinal analítico através de uma interface. Para propulsão dos fluidos é utilizada uma bomba peristáltica multicanal. A placa de interface e a bomba peristáltica foram desenvolvidos dentro do presente trabalho. Para a determinação de açúcares redutores em vinho, o método analítico adotado utiliza como reagente cromogênico o hexacianoferrato (III) de potássio em meio alcalino sob aquecimento (50 °C) e leitura em 420 nm. O sistema apresentou uma faixa de resposta linear entre 0,75 e 6% (m/v) de frutose ($R^2 = 0,999$), limite de detecção de 0,14% (m/v; $n = 11$), desvio padrão relativo menor que 4%, e frequência analítica de 75 determinações por hora. O procedimento para a determinação de manganês foi baseado na reação de oxidação à permanganato, utilizando como agente oxidante periodato de sódio em meio ácido, aquecimento a 55 °C, e leitura em 530 nm. Após estabelecer as variáveis de controle, o sistema apresentou faixa de resposta linear entre 5 e 30 mg.L^{-1} ($R^2 = 0,997$), limite de detecção de 2 mg.L^{-1} ($n = 11$) de Mn^{2+} , desvio padrão relativo de 5%, e frequência analítica de 40 determinações por hora. A exatidão dos resultados foi avaliada aplicando o teste *t-Student*, no qual foram comparados os resultados obtidos com os procedimentos propostos com aqueles obtidos com métodos de referência, e não foram observadas diferenças significativas ao nível de confiança de 95 %.

Palavras chave: Instrumentação analítica. Análise por injeção em fluxo. *Flow-batch*. Açúcares redutores. Manganês. Vinho. Amostras vegetais.

ABSTRACT

BRASIL, M. A. S. **Development of a flow- batch chamber with direct heating and analytical procedures for photometric determination of reducing sugars in wine and manganese in plant samples.** 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

In this work was developed an analytical system, employing a flow-batch chamber with direct heating coupled to a LED based photometer, which was tailored for the determination of reducing sugars in wine and manganese in plant samples. The instrumentation was implemented using the flow-batch concept and multicommutation flow analysis process. The proposed camera with direct heating was designed to enable analytical procedures based on slow reactions. The photometer coupling to the flow-batch chamber body, eliminated the need for a cooling step and as well as solution transportation for another component, where signal would be monitored. This strategy allowed the reduction of the system dimensions, and enabling an increase in sampling frequency. The system control was performed using software developed in Visual Basic ® language, which drove the active components of the system. For fluid propulsion was used a multichannel peristaltic pump, which was also developed in the present work. For the determination of reducing sugars in wine, the analytical procedure was based on the reaction of potassium hexacyanoferrate (III) in an alkaline medium under heating at 50 ° C, which was monitored at 420 nm. The procedure provided a linear response ranging from 0.75 to 6.00 % (w / v) fructose ($R^2 = 0.999$), a 0.14% limit of detection (w/v, $n = 11$), a relative standard deviation less than 4.0 %, and an analytical frequency of 75 determination per hour. The procedure for the determination of manganese was based on the permanganate oxidation reaction in acid medium, using sodium periodate solution as an oxidizing reagent. The flow-batch was maintained at 55 ° C, and signal was monitored at 530 nm. After establishing the control variables, the procedure provided a linear response ranging from 5.0 to 30.0 mg L⁻¹ ($R^2 = 0.997$), a detection of limit 2.0 mg L⁻¹ ($n = 11$) Mn²⁺, a relative standard deviation of 5.0 % ($n = 8$) and an analytical frequency of 40 determination per hour. The accuracy of the results was assessed by applying the Student t-test between results obtained employing the proposed procedures and a reference method, and not significant difference at 95 % confidence level was observed.

Keywords: Analytical instrumentation. Flow injection analysis. Flow-batch. Reducing sugars. Manganese. Wine. Plant materials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estruturas da Frutose e Glicose com destaque ao grupamento Cetônico e Aldeído	23
Figura 2 -	Estrutura básica de um sistema FIA em configuração em linha única	27
Figura 3 -	Representação mecânica de manobras ferroviárias através do dispositivo AMV (Aparelho de mudança de via)	29
Figura 4 -	Diagrama de um analisador fluxo batelada (FBA)	31
Figura 5 -	Etapas do processo peristáltico de bombeamento	33
Figura 6 -	Vista em corte da câmara <i>flow-batch</i>	40
Figura 7 -	Vista explodida da câmara <i>flow-batch</i>	40
Figura 8 -	Controlador de temperatura da câmara	41
Figura 9 -	Detector do fotômetro LED	41
Figura 10 -	Transferência de calor a 1 mL de água inserida na câmara	45
Figura 11 -	Diagrama eletrônico da Bomba Peristáltica	47
Figura 12 -	Diagrama eletrônico da placa de interface microprocessada PC - Sistema Analítico	48
Figura 13 -	Diagrama do módulo de determinação de AR	50
Figura 14 -	Diagrama de tempos de acionamento do sistema para determinação de AR	52
Figura 15 -	Imagem da tela principal do aplicativo em Visual Basic 6 para controle do Sistema Analítico	54
Figura 16 -	Espectros de emissão do LED 420 nm e absorção do complexo colorimétrico formado na determinação de açúcares redutores	55
Figura 17 -	Efeito da concentração do reagente hexacianoferrato (III) na derminação de soluções padrão de frutose	57
Figura 18 -	Efeito da temperatura no desenvolvimento da reação de determinação da concentração de frutose	59
Figura 19 -	Avaliação de possíveis espécies interferentes na determinação de frutose	60
Figura 20 -	Curva de calibração para determinação AR	61
Figura 21 -	Diagrama do sistema analítico para determinação de manganês	66
Figura 22 -	Espectros de emissão do LED 520 nm e absorção do complexo colorimétrico formado na determinação de manganês	69

Figura 23 - Figura da avaliação do efeito da concentração do reagente NaIO_4	70
Figura 24 - Estudo da autocatálise por permanganato realizado a temperatura de $26\text{ }^\circ\text{C}$	71
Figura 25 - Estudo do efeito da temperatura sobre o tempo de reação na determinação de manganês	72
Figura 26 - Efeito do tempo sobre o reagente armazenado	73
Figura 27 - Efeito do número de ciclos analíticos sobre o sinal de transmitância	74
Apêndice A	
Figura 28 - Imagem da câmara de aquecimento direto equipada com fotômetro, detector do fotômetro com conexão por fibra óptica, e bomba de aquário modificada para vácuo	91
Figura 29 - Imagem da Bomba Peristáltica Multicanal Microprocessada ...	92
Figura 30 - Imagem da Placa de Interface Microprocessada	92
Figura 31 - Imagem do sistema completo para análise de açúcares redutores em vinhos	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação de vinhos segundo o Regulamento Vitivinícola do Mercosul	23
Tabela 2 -	Níveis de Mn em folhas de soja em que é provável a manifestação de deficiência e toxidez do nutriente	25
Tabela 3 -	Temperaturas obtidas para determinação do calor específico da câmara	43
Tabela 4 -	Resultado obtido na determinação do calor específico da câmara	43
Tabela 5 -	Características da câmara aquecida com fotômetro acoplado	46
Tabela 6 -	Sequência de acionamento dos dispositivos do sistema para determinação de açúcares redutores	52
Tabela 7 -	Resultados do estudo da concentração do reagente	57
Tabela 8 -	Resultados da figura de avaliação de interferentes	60
Tabela 9 -	Concentrações de açúcar redutor em amostras de vinho, obtidas pela metodologia proposta e de referência	62
Tabela 10 -	Figuras de mérito do sistema analítico para açúcares redutores em vinho	63
Tabela 11 -	Comparação de métodos de análise por injeção em fluxo para determinação de açúcares redutores	64
Tabela 12 -	Sequência de acionamento dos componentes do sistema para determinação de manganês	67
Tabela 13 -	Dados da curvas do estudo de concentração de NaIO_4	70
Tabela 14 -	Avaliação da interferência de ferro na determinação de manganês	75
Tabela 15 -	Avaliação da interferência de cálcio na determinação de manganês	75
Tabela 16 -	Avaliação da interferência de magnésio na determinação de manganês	75
Tabela 17 -	Concentrações de manganês nas amostras vegetais analisadas	77
Tabela 18 -	Figuras de mérito do sistema para determinação de manganês	77
Tabela 19 -	Comparação de métodos de análise por injeção em fluxo para determinação de manganês em amostras vegetais	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/D	Analógico/Digital
AMV	Aparelho de mudança de via
AR	Açúcar(es) Redutor(es)
ASCII	American Standard Code for Information Interchange (Código Padrão Americano para o Intercâmbio de Informação)
BASIC	Beginner's All-purpose Symbolic Instruction Code (Código de Instruções Simbólicas de Uso Geral para Principiantes)
FBA	Flow Batch Analysis (Análise em Fluxo Batelada)
FIA	Flow Injection Analysis (Análise por Injeção em Fluxo)
GUI	Graphical User Interface (Interface Gráfica do Usuário)
ICP OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (Espectroscopia de Emissão Óptica por Plasma Indutivamente Acoplado)
IDE	Integrated Development Environment (Ambiente Integrado de Desenvolvimento)
I/O	Entrada/Saída
ISP	In System Programming (Programação no sistema)
LCD	Liquid Crystal Display (Mostrador de cristal líquido)
LED	Light Emitting Diode (Diodo Emissor de Luz)
LOD	Limit of detection (Limite de detecção)
MCFA	Multicommutated Flow Analysis (Análise em Fluxo Multicomutado)
PC	Personal Computer (Computador Pessoal)
RSD	Relative Standard Deviation (Desvio Padrão Relativo)
RTC	Real Time Clock (Relógio de tempo real)
USB	Universal Serial Bus (Barramento Serial Universal)
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
1.1	Açúcares Redutores em Vinho	22
1.2	Manganês em Amostras Vegetais	24
1.3	Sistema de Análise por Injeção em Fluxo – Breve descrição	26
1.3.1	Multicomutação em Análise em Fluxo	28
1.3.2	Analizador Fluxo-Batelada	30
1.3.3	Propulsão de fluidos	32
1.3.4	Sistema de Aquecimento e Controle de Temperatura	33
1.3.5	Fotômetro baseado em LED	35
1.3.6	Interface de Controle de Dispositivos e Aquisição de Dados	35
1.3.7	Programa de Controle	35
2.	PARTE EXPERIMENTAL	
	Reagentes e Soluções	
2.1	Açúcares Redutores em Vinho	37
2.2	Manganês em Amostras Vegetais	37
	Materiais	
2.3	Câmara para aquecimento com Fotômetro acoplado	38
2.3.1	Construção da Câmara	39
2.3.2	Construção do Fotômetro	41
2.3.3	Determinação do Calor Específico	42
2.3.4	Determinação da Capacidade Térmica e de Transferência	43
2.4	Bomba Peristáltica	46
2.5	Interface Microcontrolada	47
	Procedimentos	
2.6	Açúcares Redutores (AR) em Vinho	49
2.6.1	Operação do módulo de análise para determinação AR	50
2.6.2	Software de Controle	53
2.6.3	Avaliação do comprimento de onda de absorção máxima	55
2.6.4	Efeito da variação da concentração do reagente	56
2.6.5	Efeito da variação da concentração do NaOH	58

2.6.6	Efeito da variação da temperatura	58
2.6.7	Avaliação de potenciais espécies químicas interferentes	59
2.6.8	Determinação de AR em amostras de vinho	61
2.6.9	Figuras de mérito – AR	63
2.7	Manganês em Amostras Vegetais	64
2.7.1	Operação do módulo de análise para determinação de manganês	65
2.7.2	Avaliação dos comprimentos de onda de absorção e emissão máximos	68
2.7.3	Efeito da concentração do reagente	69
2.7.4	Efeito da variação da concentração do catalisador	70
2.7.5	Efeito da temperatura sobre o tempo da reação	71
2.7.6	Avaliação da estabilidade da solução reagente	73
2.7.7	Avaliação da estabilidade do fotômetro x número de ciclos analíticos	74
2.7.8	Efeito de potenciais interferentes	75
2.7.9	Determinação de Mn em amostras vegetais	76
2.7.10	Figuras de mérito – Mn	77
3.	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICES	89
	Apêndice A – Imagens dos componentes e sistema desenvolvidos para o trabalho	91
	Apêndice B – Listagem do aplicativo desenvolvido em mikroBasic® para o controle da Placa de Interface Microprocessada	95

1. INTRODUÇÃO

Nos sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA - *Flow Injection Analysis*), o tempo disponível para o desenvolvimento das reações pode ser controlado pela vazão de bombeamento e pelo comprimento do percurso analítico [1]. Em vista disso, no desenvolvimento do procedimento analítico, procura-se estabelecer um compromisso entre estes dois parâmetros, visando obter boa sensibilidade sem comprometer o tempo de análise. Entretanto, quando a reação é lenta, torna-se necessário prolongar o tempo de deslocamento da zona da amostra para o detector. Este recurso pode ser conseguido diminuindo-se a vazão de bombeamento ou aumentando o comprimento do percurso analítico. Nos dois casos ocorre redução da frequência de amostragem. Quando o dispositivo de propulsão de fluido não dispõe de meios para redução de vazão, o recurso disponível é o aumento do percurso analítico. Este aumento reforça o efeito de dispersão da zona da amostra, para minimizar esse efeito é necessário aumentar o volume da zona da amostra, o que causa redução na frequência de amostragem [1, 2].

Nesta situação, a estratégia de fluxo monossegmentado, a qual tem como base a introdução de bolhas de ar delimitando a zona da amostra no percurso analítico, que não entram em contato com o fluido transportador, pode ser utilizada. O emprego deste recurso reduz a dispersão em sistemas com reatores longos, permitindo um maior tempo para o desenvolvimento de reações lentas. Porém, o processo pode apresentar como inconvenientes a necessidade de um módulo de análise mais complexo, para remover as bolhas de ar antes da detecção, ou o emprego de recursos eletrônicos ou de informática para reconhecer o sinal analítico [3].

O emprego de uma etapa de aquecimento [4, 5, 6] é um recurso que tem sido usado para acelerar o desenvolvimento da reação em procedimentos baseados no processo de análise por injeção em fluxo, sem diluir a amostra ou reduzir a frequência de amostragem. Alguns dos equipamentos normalmente utilizados para este fim são: banhos térmicos e forno de micro-ondas. O forno de micro-ondas [7] permite o aquecimento direto da amostra em meio aquoso. Os banhos térmicos por sua vez, requerem um fluido como trocador de calor, dentre os quais tem sido usado água, óleo, glicerina e areia [4, 5, 6]; neste sistema uma bobina de reação por onde circulam as soluções, é imersa no fluido. Outra opção é o aquecimento da solução

dentro da própria tubulação, neste caso, é necessário dispor de uma fonte de calor, e para este fim tem sido utilizado um fio de níquel-cromo submetido a uma diferença de potencial elétrico [8].

No entanto, todos esses dispositivos algumas vezes não são adequados em função de suas dimensões, que podem ser superiores ao próprio módulo de análise, e devem ser instalados entre a unidade de injeção e o detector, o que dificulta o acoplamento. Acrescentando-se ainda como uma outra desvantagem, o consumo elevado de energia. Portanto, a disponibilidade de um sistema para aquecimento eficiente com dimensão reduzida, é de grande utilidade no desenvolvimento de procedimentos analíticos em fluxo, em que parte das reações envolvidas é lenta.

Além das dificuldades de acoplamento, devido às dimensões dos banhos térmicos empregados em sistemas FIA, outro problema é liberação de bolhas de gás dentro da bobina de reação, as quais ao passarem pela cela de fluxo causam distorções nos sinais gerados, chegando a comprometer a precisão dos resultados. Em vista disso, tem sido empregados banhos com temperaturas inferiores a 50 °C [5, 6]. Visando também evitar o transtorno causado pelas bolhas de gás liberadas pelo aquecimento das soluções, tem sido empregada uma etapa de resfriamento [9], ou dispositivos para remoção de bolhas de gás [10, 11]. Nos dois casos, aumenta a complexidade do módulo de análise.

O emprego de um meio reacional em ambiente aberto, evita o uso de dispositivo para a remoção das bolhas gás, permitindo o emprego de temperaturas mais altas. A estrutura *flow-batch*, proposta em 1999 [12], tem potencial para atender a este requisito. Este tipo de sistema tem como princípio, a mimetização do processo manual, empregando recursos de eletrônica e de software para inserir de forma automática, as alíquotas das soluções envolvidas em uma câmara de mistura. Após o desenvolvimento da reação, o composto formado é transportado para o sistema de detecção. Empregando este processo foram desenvolvidos procedimentos baseados em titulação fotométrica para a determinação de acidez em vinhos [13], determinação fotométrica de ferro em ligas metálicas [14], determinação de cobre em bebidas alcoólicas [15]. Neste último trabalho, o processo *flow-batch* foi empregado para automatizar o método da adição de padrão.

O processo *flow-batch* tem sido implementado empregando bombas solenoide para o gerenciamento das soluções [16], as quais são chaveadas seguindo um padrão liga/desliga, semelhante ao empregado no processo de

multicomutação em análise em fluxo (MCFA) [17, 18]. Este padrão de funcionamento facilita o gerenciamento das soluções usadas no procedimento analítico, pois mantendo-se a vazão de bombeamento constante é possível controlar os volumes de cada alíquota pelo de tempo de acionamento da bomba solenoide.

A detecção direta na câmara de reação é um procedimento que tem sido realizado empregando LED (*Light Emitting Diode* – Diodo Emissor de Luz) como fonte de radiação e um fototransistor ou fotodiodo como detector fotométrico [13, 14, 19]. O acoplamento da fonte de radiação (LED) e do fotodetector à câmara de mistura, contribui para a redução das dimensões do equipamento.

Nesta parte da introdução, foram abordadas e discutidas as dificuldades de acoplamento de banhos térmicos aos módulos de análises baseados no processo FIA, assim como as características do processo *flow-batch*, referentes ao gerenciamento das soluções. Neste trabalho, estas observações nortearam o desenvolvimento do dispositivo baseado no conceito *flow-batch*, tendo meios para aquecimento direto da amostra sem o uso de um fluido como trocador de calor.

Para construção da câmara *flow-batch* foi utilizado um material inerte do ponto de vista químico e com boa condutibilidade térmica. A detecção fotométrica foi realizada diretamente na câmara, empregando-se a mesma como cela de detecção. O feixe de radiação emitido pelo LED usado como fonte de radiação foi conduzido até a câmara e desta até o fotodetector usando cilindros de vidro e cabos de fibra óptica.

O dispositivo desenvolvido foi empregado para implementação de sistemas analíticos para a determinação de açúcares redutores em vinhos e manganês em amostras de interesse agrônômico. Estes dois procedimentos foram escolhidos para validar a operação da câmara por apresentarem significativa dependência de aquecimento para o desenvolvimento das reações.

A determinação de açúcares redutores foi baseado na reação de redução do hexacianoferrato (III) de potássio [20]. O composto produzido apresenta absorção em torno de 420 nm, e o desenvolvimento da reação requer uma etapa de aquecimento. A determinação de manganês foi baseado na reação com periodato de potássio [21], e também requer uma etapa de aquecimento. A detecção fotométrica foi realizada, monitorando a absorção do composto em 520 nm. Nos dois casos, os compostos absorvem radiação eletromagnética na região visível, portanto permitiram o emprego de LED como fonte de radiação.

Os procedimentos analíticos foram desenvolvidos empregando o processo MCFA, usando válvulas solenoide para gerenciamento das soluções, e uma bomba peristáltica como propulsor de fluido. As interfaces eletrônicas para acionamento das válvulas solenoide e a bomba peristáltica, foram desenvolvidas como parte do projeto. A bomba peristáltica controlada por um microcontrolador possui recursos para variar a vazão, realizar sincronismo da amostragem e fazer parada de fluxo quando necessário.

Os próximos itens da introdução abordam com maior detalhamento os dois analitos, o sistema de análise em fluxo e os componentes que fazem parte do sistema desenvolvido no trabalho.

1.1 Açúcares Redutores em Vinho

O Regulamento Vitivinícola do Mercosul [22] define vinho como uma bebida alcoólica, com concentração a partir de 7% (V/V a 20° C), obtida a partir da ação de leveduras sobre o mosto de uvas íntegras ou maceradas.

A característica organoléptica adocicada do vinho é consequência de seus compostos como açúcares, alcoóis e polióis. A fotossíntese nas folhas da videira é responsável pelo açúcar presente no fruto e nos vinhos [23].

Os açúcares presentes classificam-se em:

- Monossacarídeos ou açúcares redutores: hexoses e pentoses.
- Dissacarídeo e polissacarídeo: sacarose e amido.

Para o processo de produção de vinho, os monossacarídeos são os açúcares mais importantes, pois são estes açúcares que as leveduras fermentam para a produção do etanol, durante o processo de produção denominado vinificação. A maior parte destes açúcares transformam-se em etanol, determinando o teor alcoólico dos vinhos obtidos, e uma quantidade menor permanece na bebida, promovendo o paladar doce [24].

A avaliação da concentração de açúcares redutores no processo produtivo do vinho é realizada em todas as etapas, desde a colheita da uva até a classificação final do vinho [25].

A concentração de açúcares redutores nos frutos permite acompanhar o amadurecimento das uvas e estimar a melhor data para sua colheita.

Os açúcares redutores no mosto (suco da uva esmagado) permite prever o teor alcoólico possível e caso legalmente permitido intervir.

A classificação dos vinhos e espumantes de acordo com regulamentos vinícolas, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação de vinhos segundo o Regulamento Vitivinícola do Mercosul

Vinho*	Conteúdo de açúcar (g L ⁻¹ glicose)
• Seco	≤ 4
• Demi-sec ou Meio-seco	4 - 25
• Suave ou Doce	25 - 80
Espumantes*	
• Nature	≤ 3
• Extra-brut	3 - 8
• Brut	8 - 15
• Seco	15 - 20
• Demi-sec ou Meio-seco	20 - 60
• Suave ou Doce	> 60

*Resolução 45/96 do Grupo Mercado Comum (GMC) em Buenos Aires 21/04/1996

Os açúcares que apresentam caráter redutor presentes no vinho em maior concentração são a frutose e a glicose [26]. Esta característica é expressa quando sua estrutura encontra-se na forma de cadeia aberta (acíclica), cujas estruturas são apresentadas na Figura 1, permitindo que seus grupos cetônico ou aldeídico possam ser oxidados por íons como o férrico (Fe³⁺) ou cúprico (Cu²⁺) [28].

A abertura da estrutura cíclica destes monossacarídeos pode ser realizada pela ação de um álcali e aquecimento.

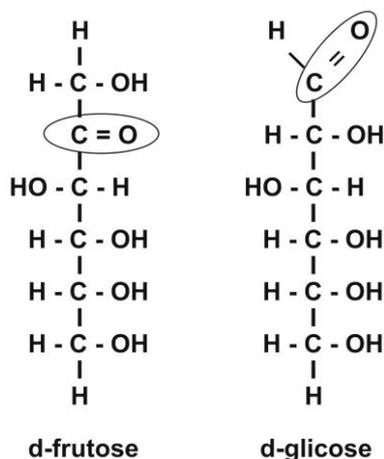
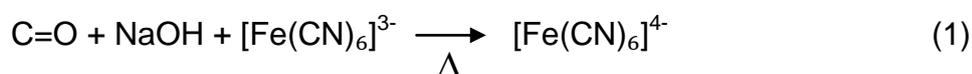


Figura 1 – Estrutura da frutose e glicose destacados grupos cetônico e aldeídico.

O método oficial para a determinação de açúcares redutores em vinho utiliza o reagente de Fehling [69]. Este método titulométrico baseia-se na redução do complexo azul de Cu^{2+} a íon cuproso (Cu^+) de coloração marrom-avermelhado em meio fortemente alcalino pelas funções aldeídicas e cetônicas dos açúcares, na temperatura de ebulição. O ponto final da reação é atingido quando todo o cobre da solução, inicialmente azul, é reduzido dando lugar a um precipitado de coloração laranja tijolo.

Como indicador auxiliar do ponto final da titulação, utiliza-se gotas de azul de metileno, o que permite observar melhor o final da viragem.

Neste trabalho, optou-se pela metodologia que utiliza o hexacianoferrato (III) como agente cromogênico [20, 29], que consiste na reação dos açúcares redutores em meio alcalino sob aquecimento segundo a Equação 1. O método apresenta significativas vantagens sobre as metodologias utilizando Cu^{2+} , como por exemplo, a estabilidade da solução do reagente que não está sujeita a precipitação ou reoxidação, apresenta relação direta entre a absorvância e a concentração de açúcar, dispensando a determinação do título, utiliza apenas reagentes inorgânicos.



A determinação de açúcares redutores em sistemas de análise em fluxo, também foi realizada, utilizando o hexacianoferrato (III) e 1,10-fenantrolina em conjunto com Fe (III), produzindo o complexo denominado azul da Prússia [30]. Este método é mais complexo, pois produz precipitados que se acumulam nas paredes dos tubos e apresenta baixa frequência analítica.

1.2 Manganês em Amostras Vegetais

O manganês é um micronutriente relacionado com a síntese de clorofila e a fotossíntese, assim como a aceleração da germinação e a resistência à seca das plantas [31]. Em concentrações elevadas o manganês é tóxico [31, 32], causando redução na nodulação e queda da produção. Devido à acidez dos solos brasileiros, o tema tem alta relevância. Em novas áreas agrícolas com baixa fertilidade, ou em áreas mais antigas de uso agrícola intensivo e onde tenha sido realizada calagem

(aplicação de calcário para elevar o pH do solo), sua concentração pode tornar-se insuficiente o que reduz o desenvolvimento da planta e a produção [33, 34].

Na Tabela 2 são apresentadas as concentrações de manganês consideradas deficiente e tóxica para a soja de acordo com alguns autores [32].

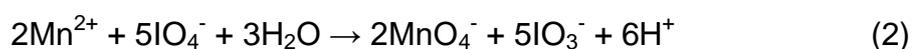
Tendo vista que o manganês é um micronutriente essencial e a diferença entre o nível essencial e o tóxico é tênue, é desejável um controle de sua concentração. A determinação de manganês em material vegetal é um recurso usado para avaliar o estado nutricional da planta, e para isso é necessário dispor de procedimentos analíticos. Neste trabalho foi desenvolvido um procedimento espectrofotométrico, automatizado para a determinação de manganês em material vegetal.

Tabela 2 – Níveis de Mn em folhas de soja em que é provável a manifestação de deficiência e toxidez do nutriente.

Deficiência (ppm)	Toxidez (ppm)	Autor
20	-	Cox (1968)
11	-	Ohki et al. (1980)
14	250	Ohlrogge & Kamprath (1968)
22	140-250	Heenan & Campbell (1980)
18	200	Ohki et al. (1980)
-	300	Miranda et al. (1982)
-	180	Martini & Mutters (1985)

Fonte: Rosolem, C.A., et al. Manganês no solo, sua avaliação e toxidez de manganês em soja. Pesquisa agropecuária Brasileira, Brasília, 27(2):277-285, fev 1992.

O método escolhido para determinação de manganês neste trabalho é baseado na reação do Mn^{2+} com periodato de sódio ($NaIO_4$) produzindo permanganato (MnO_4^-) [21]. O periodato oxida o manganês, inicialmente na forma Mn^{2+} para Mn (VII) segundo a Equação 2 representada a seguir:



O íon permanganato em meio aquoso apresenta coloração púrpura intensa e o comprimento de onda indicado na literatura para seu monitoramento é 520 nm [35].

O meio reacional deve ser mantido ácido para garantir o estado de oxidação do manganês em Mn (VII). Em temperatura ambiente, a reação de oxidação do Mn^{2+} para Mn (VII) é lenta, mas pode ser acelerada com aquecimento [6]. Também, foi demonstrado que a adição de uma pequena concentração de permanganato de potássio no meio reacional atua como catalisador e favorece o desenvolvimento da reação [6, 36].

De acordo com a literatura [21], ânions comuns como cloreto, iodeto, brometo, oxalato, tartarato, citrato, sulfito, nitrito, e arsenito podem interferir na determinação do manganês pelo método espectrofotométrico com periodato, reduzindo a intensidade da coloração monitorada. Este efeito tem sido minimizado utilizando-se um excesso do reagente oxidante, suficiente para manter o analito em seu estado oxidação mais alto Mn (VII). A interferência que pode ser causada por cátions comuns como cúprico, crômico, e férrico, os quais podem alterar a tonalidade da solução, pode ter seu efeito reduzido a níveis aceitáveis, mantendo-se o meio reacional ácido ($pH < 0,5$). Já a interferência de cátions comuns como nitrito, sulfito, sulfato, que podem reduzir a coloração do permanganato, pode ser minimizada pelo processo de oxidação nítrica no preparo das amostras e com a utilização de excesso de reagente [21].

Em amostras vegetais, ferro, cálcio e magnésio são os cátions presentes em concentrações mais altas, sendo que dentre estes apenas o ferro, elemento de transição com estados de oxidação +2 e +3, cuja presença situa-se entre 50 e 500 $mg\ kg^{-1}$ [37], possui potencial para causar interferência na determinação de manganês [21].

1.3 Sistema de Análise por Injeção em Fluxo – Breve descrição

Um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA – *Flow Injection Analysis*) é constituído por tubos de polietileno percorrido por um fluido transportador, onde é inserida a alíquota da amostra, até o sistema de detecção, e deste, para o descarte. Este sistema tubular de transporte, onde ocorrem as reações e a detecção, é

conhecido como percurso analítico [1]. Na Figura 2, é demonstrada a estrutura básica de um sistema FIA conhecido como configuração em linha única.

Os componentes principais do sistema FIA são:

- sistema de bombeamento
- sistema de injeção da amostra
- bobina de reação
- sistema de detecção

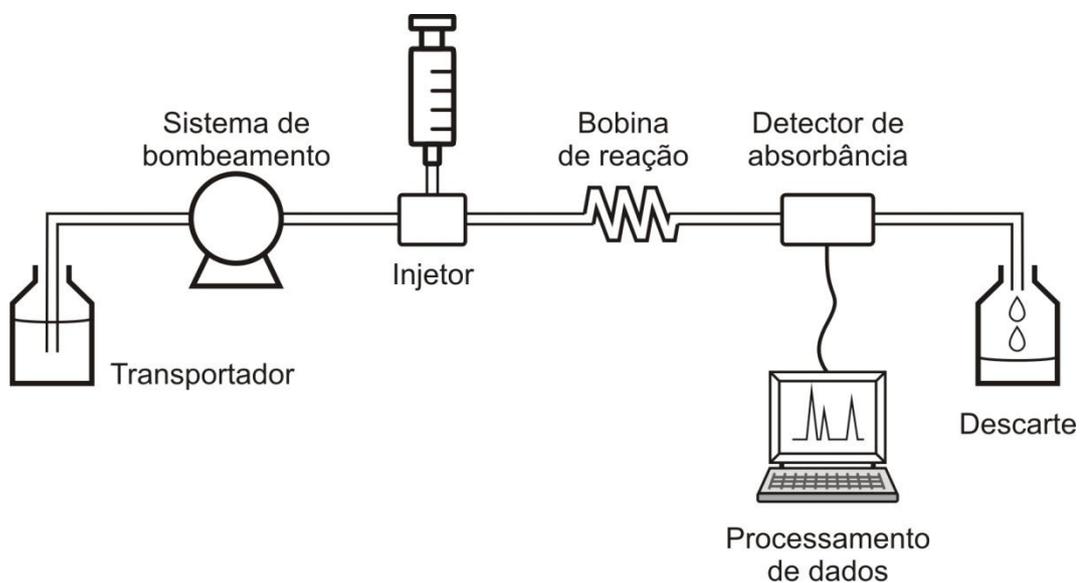


Figura 2 – Estrutura básica de um sistema FIA com configuração em linha única

No diagrama representado na Figura 2 é possível verificar que o transporte das soluções ocorre através de tubulações, ou seja, em um ambiente fechado. Desta forma, as substâncias processadas no seu interior, não são passíveis de serem contaminadas ou de causar contaminações ao ambiente externo.

Os sistemas analíticos FIA, apresentam frequências analíticas que podem atingir 120 determinações por hora [38]. Isto é possível quando a reação envolvida é rápida, permitindo trabalhar com percurso analítico curto ou com vazões mais altas. Outra característica que favorece a frequência de amostragem, é a possibilidade da leitura ser realizada sem completar o desenvolvimento da reação, sendo que uma nova injeção pode ser feita com a leitura do sinal ainda em curso [2].

Para interligação dos elementos do sistema e transporte das soluções, tubos de polietileno ou Teflon®, com diâmetros internos normalmente entre 0,5 a 0,8 mm, são utilizados. Um centímetro deste tipo de tubo apresentam volumes da ordem de 2 e 5 μL , respectivamente, portanto os volumes do módulo de análise é muito menor que o da vidraria usado em procedimento manual. Em vista disso, os volumes de amostra e de reagentes utilizados são significativamente reduzidos em relação aos métodos clássicos de análise, assim como o volume de resíduos produzidos.

O dispositivo utilizado com maior frequência para a propulsão de fluidos nos sistemas FIA, é a bomba peristáltica, que possui a característica de proporcionar fluxo pulsante de pequena amplitude, sendo a vazão média de bombeamento constante [39]. Para a inserção das alíquotas da amostra e dos reagentes no percurso analítico, tem sido empregados injetor proporcional, válvulas solenoide de três vias, bomba-solenoide, e válvulas de 6 e 8 vias [2, 40].

As funções da bobina de reação dentro do sistema é proporcionar uma mistura eficiente entre as soluções e fornecer tempo para a reação se desenvolver antes de chegar ao detector. Os tipos mais comuns têm geometrias helicoidal, enovelada, e empacotada (esferas vidro dentro de um tubo). Quanto aos detectores, encontra-se na literatura uma grande variedade, dentre os mais utilizados estão os espectrofotométricos, potenciométricos e os amperométricos [41, 42, 43].

1.3.1 Multicomutação em Análise em Fluxo

A estrutura FIA apresentada na Figura 2 é conhecida como “*configuração em linha única*”, esta montagem é considerada como o sistema FIA mais simples, e se caracteriza por apresentar poucas possibilidades de alterações no procedimento analítico.

Nessa configuração, normalmente o reagente é adicionado ao fluido transportador e é consumido de forma contínua independentemente da presença do analíto. Para superar este inconveniente, uma confluência pode ser acrescentada ao percurso, por meio da qual o reagente pode ser inserido de forma controlada.

Com o objetivo de tornar os sistemas FIA mais flexíveis e versáteis, dispositivos que permitem a alteração do fluxo das soluções foram inseridos à sua estrutura [17, 18]. Estes dispositivos atuam de modo similar aos desvios ferroviários

(AMV - Aparelho de mudança de via), redirecionando as soluções através de percursos e em momentos diferentes.

A Figura 3 exemplifica diferentes tipos de comutação mecânicas empregadas em ferrovias. Em “a”, o fluxo de origem com possibilidade de ser desviado para dois destinos diferentes, em “b”, dois fluxos de origens diferentes convergindo para o mesmo destino e, em “c” fluxos de origens diferentes convergindo para um mesmo destino e, na sequência, podendo ser desviado para dois destinos diferentes.

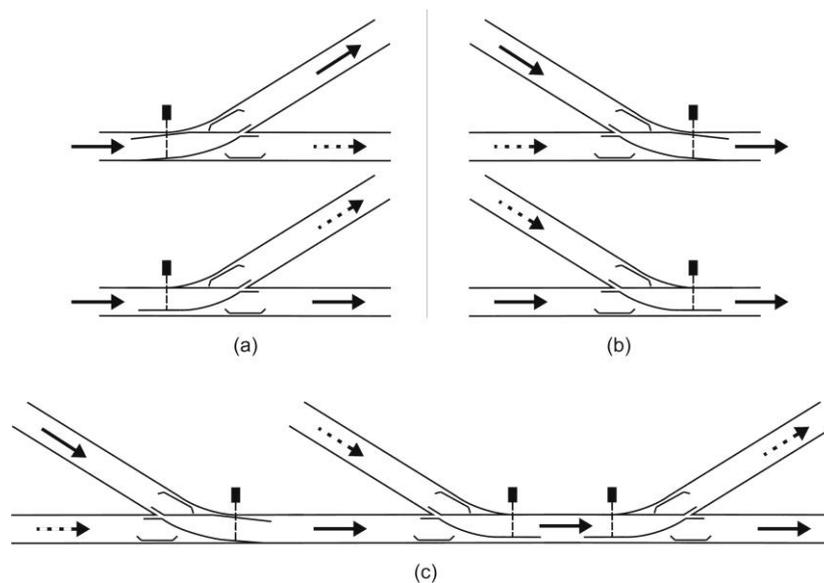


Figura 3 – Representação da mecânica de manobras ferroviárias através do dispositivo AMV (Aparelho de mudança de via). As setas contínuas demonstram o percurso percorrido no momento pela composição, e as setas tracejadas o caminho opcional após a atuação sobre o sistema de controle do dispositivo. (a) percursos divergentes; (b) percursos convergentes; (c) percursos convergentes e divergente

De forma análoga aos exemplos acima, os fluxos de soluções em sistemas FIA podem ser comutados utilizando dispositivos específicos para esta finalidade. A Figura 3c, por exemplo, poderia ser a representação ferroviária de um sistema analítico com inserção inicial de amostra no fluxo transportador, através do primeiro dispositivo; convergência de outra solução, através do segundo dispositivo; e possibilidade de uma limpeza rápida na troca de amostra através do desvio do sistema detector, o qual estaria em um dos percursos após o terceiro dispositivo.

Os dispositivos mais utilizados para a implementação da multicomutação, são as válvulas de três vias e válvulas *pinch* (estrangulamento).

A utilização da comutação dentro dos sistemas FIA tem como objetivo:

- dosar volumes precisos de soluções;
- compatibilização automática de soluções (ex.: diluição);
- agilizar procedimentos (ex.: limpeza após troca de amostra);
- permitir flexibilidade no procedimento analítico (ex.: especificação).

Operações como variação da vazão ou inversão e parada de fluxo, também podem ser considerados como procedimentos de comutação [44].

Através de recursos como a multicomutação os sistemas FIA estão aptos a realizar qualquer procedimento analítico clássico de maneira versátil. O controle da atuação dos dispositivos de comutação, seja antes da realização da análise, ou mesmo durante o processo, aumenta as possibilidades analíticas e facilita a adaptação do sistema à amostra, permitindo a realização de análises sequenciais com uma mesma alíquota, como a especificação ou determinação simultânea de analitos.

1.3.2 Analisador Fluxo-Batelada

O sistema FBA (*flow-batch analysis* - análise fluxo batelada) representa uma variante do sistema FIA. Na configuração básica de FBA, exibida na Figura 4, as alíquotas de amostra e das soluções dos reagentes, por meio dos componentes do sistema, são inseridas na câmara, onde ocorre a reação e, em seguida, a mistura contendo o composto a ser monitorado é transportada para o detector.

Para a propulsão dos fluidos, a bomba peristáltica é o dispositivo mais utilizado. Tal como nos sistemas FIA tradicionais; outros sistemas como bombas solenoide [45], bomba de seringa [46], e bomba de pistão [47] também têm sido empregados. Os tubos de conexão também são os mesmos dos sistemas FIA convencional.

A comutação dos fluidos no sistema FBA é realizada empregando válvulas solenoides de três vias ou válvulas solenoide *pinch* (estrangulamento). Quanto à detecção, têm sido empregados principalmente detectores fotométricos similares aos usados em sistemas FIA convencionais.

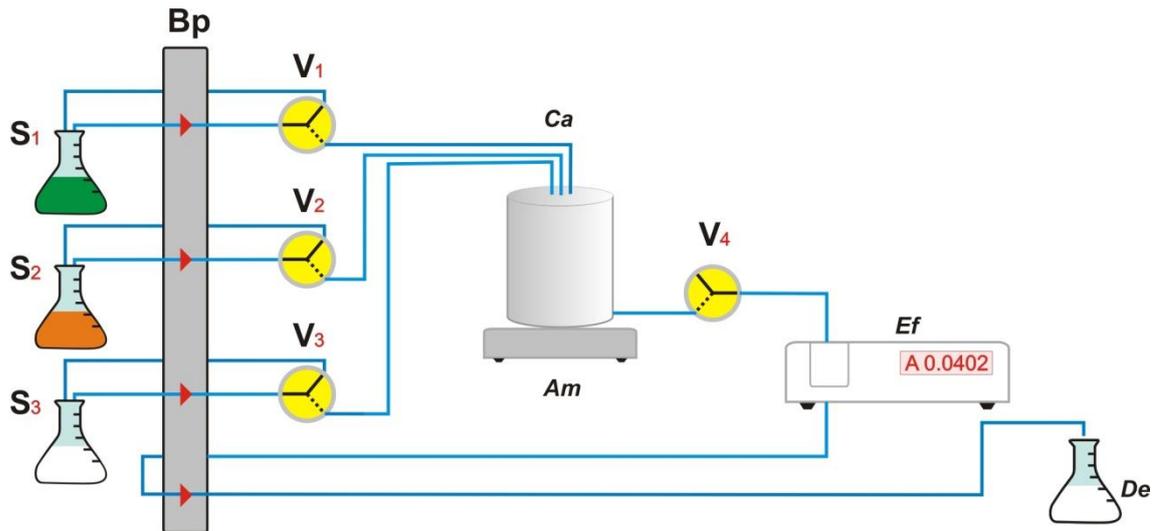


Figura 4 – Diagrama de um analisador fluxo batelada (FBA): **Bp** = bomba peristáltica, **S₁**, **S₂**, **S₃** = soluções, **V₁**, **V₂**, **V₃**, **V₄** = válvulas solenóide de três vias, **Ca** = câmara reação, **Am** = agitador magnético, **Ef** = Espectrofotômetro, **De** = frasco de descarte

No sistema FBA clássico, a solução ou a mistura preparada na câmara, é enviada para um sistema de detecção fisicamente independente da mesma. Porém, configurações alternativas têm sido desenvolvidas [48, 49, 50]. Nestes sistemas, um fotômetro foi montado na câmara com a fonte de radiação acoplada em uma das paredes e o detector na parede oposta.

Normalmente, o módulo de análise FBA é controlado por um computador, equipado com interfaces para acionar os dispositivos que o compõe, incluindo bomba peristáltica, válvulas solenóides, agitadores, etc. Da mesma forma, através de uma interface apropriada, pode ser realizada a leitura dos sinais analíticos [51].

Em um procedimento analítico baseado no sistema fluxo-batelada, pode-se simular todas as etapas de um procedimento manual, as reações envolvidas podem atingir o estado de equilíbrio, se necessário a amostra pode ser diluída dentro da câmara, assim como a leitura do sinal também pode ser feita na mesma [52]. Todas estas atividades são incorporadas ao programa de controle e podem ser executadas de forma automatizada.

1.3.3 Propulsão de fluidos

Em sistemas FIA, a formação do composto a ser detectado e o monitoramento do sinal gerado ocorre com as soluções em movimento, e o sinal gerado pode ser detectado sem a reação alcançar o estado de equilíbrio. Este recurso tem sido explorado para aumentar a frequência de amostragem e, na literatura encontram-se relatados onde frequências de amostragem igual ou superior a 120 determinações por hora foram obtidas [38, 53]. Portanto, o intervalo de tempo para o deslocamento da zona da amostra do injetor ao detector deve ser constante. Em vista disso, o dispositivo empregado na propulsão de fluidos, tem sido considerado o coração do sistema de análise por injeção em fluxo [39]. Em resumo, o dispositivo de propulsão de fluido deve fornecer vazão constante ao longo do tempo.

Os três sistemas de propulsão mais utilizados em análise em fluxo são a bomba peristáltica, a bomba de seringa e a bomba solenoide.

A bomba peristáltica é um tipo de equipamento em que o líquido contido dentro do tubo flexível, é pressionado pelo rotor com certo número de roletes dispostos em forma de cilindro contra um anteparo. Devido à rotação do rotor, a parte do tubo sob compressão é obstruída, forçando assim o fluido através do mesmo. Tipicamente, sempre haverá dois ou mais roletes, pressionando o tubo ao mesmo tempo, e prendendo entre elas um volume de fluido. A massa de fluido é empurrada para a saída. Depois da passagem do rolete, o tubo retorna ao seu diâmetro original devido à elasticidade do material com o qual o elemento tubular é fabricado. O retorno ao estado inicial permite o ingresso de uma nova alíquota do fluido que será bombeada no ciclo seguinte, e assim por diante, enquanto o equipamento estiver habilitado para bombeamento. Nas bombas peristálticas atuais, o comando de habilitação de bombeamento pode ser executado diretamente ou remotamente.

O controle do motor permite que a bomba peristáltica opere de forma contínua ou por determinado período, inverta seu fluxo, e varie a velocidade de rotação. Em determinados modelos, permite a sincronizar a amostragem com a pulsação dos roletes. Este recurso é primordial, quando a inserção da amostra é controlada por tempo de bombeamento. Todo o líquido bombeado está totalmente contido dentro

do tubo, impedindo o contato com quaisquer partes móveis e permitindo o bombeamento de forma isenta de contaminação.

A bomba peristáltica é um dispositivo de bombeamento de vazão constante, com pressão limite de operação em torno de 30 PSI. O perfil da vazão na sua saída é pulsante e a amplitude dos pulsos depende do número de roletes e do espaçamento entre eles. As bombas peristálticas permitem a instalação de diversos canais de bombeamento em paralelo e existem modelos com até 24 canais de bombeamento. Tubos com diâmetros internos diferentes podem ser utilizados.

A Figura 5 ilustra o modo de operação da bomba peristáltica, onde observa-se que há somente dois pontos de esmagamento do tubo, e em vista disso, a amplitude dos pulsos de bombeamento seria grande.

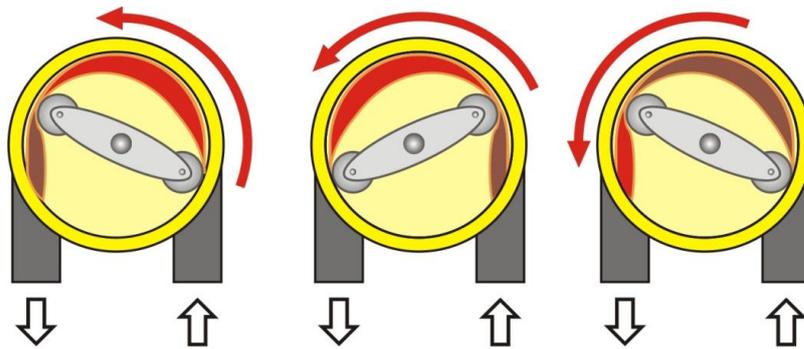


Figura 5 – Etapas do processo peristáltico de bombeamento

1.3.4 Sistema de Aquecimento e Controle Temperatura

Os sistemas FIA têm na reprodutibilidade das condições de execução da análise uma característica fundamental, diante disto, quando uma determinada condição térmica é utilizada, esta precisa ser criteriosamente controlada, de modo que a temperatura selecionada seja constante durante todo o processo.

Em relação à questão dimensional do dispositivo utilizado para produzir aquecimento no ambiente reacional, preferivelmente deve ser compatível com o da escala dos sistemas FIA.

Portanto, um sistema de aquecimento com controle de temperatura preciso e com dimensões reduzidas é desejável, pois favorece o desenvolvimento de sistemas analíticos FIA mais eficientes e compactos. Este sistema de aquecimento deve ser

capaz de superar alguns obstáculos como a possibilidade de geração de bolhas, comum em aquecimento em tubulação fechada, transferência térmica e controle de temperatura eficiente.

1.3.5 Fotômetro baseado em LED

Os diodos emissores de luz (*light emitting diodes*, LEDs) têm sido empregados com bastante frequência em sistemas ópticos de detecção [54, 55]. Estes componentes possuem larguras de banda de emissão estreitas entre 10 e 40 nm, comparáveis às larguras obtidas empregando-se fontes incandescentes combinadas com filtros ópticos (20-60 nm). Apresentam alta intensidade, estabilidade de emissão, sem pré-aquecimento, baixo consumo de energia ($\cong 3\text{mW}$) e vida útil estimada em 40-50 mil horas. Estas são vantagens importantes, considerando-se que vida útil das fontes com lâmpadas incandescentes é de no máximo 2 mil horas, e a potência de consumo é em torno de 10 W para as lâmpadas de tungstênio-halogênio [56, 57]. O emprego de LEDs como fonte de radiação eletromagnética, dispensa o uso de monocromadores, o que simplifica a montagem do equipamento de detecção fotométrica e reduz também o custo. O menor consumo de energia dos LEDs exige menos das fontes de alimentação dos fotômetros que empregam esta tecnologia, permitindo a construção de equipamentos mais compactos e portáteis.

A detecção nos fotômetros de LED, normalmente é realizada com o uso de fotodiodos ou fototransistores. Os fotodiodos apresentam melhor desempenho, pois são mais rápidos na resposta e operam linearmente em uma maior faixa de radiação [58]. É usual utilizar amplificadores na saída dos fotodetectores para ajustar o nível do sinal ao do sistema de leitura. O sinal analógico digitalizado pode então ser matematicamente convertido em absorbância [59].

1.3.6 Interface de Controle de Dispositivos e Aquisição de Dados

Nos últimos anos, a rápida evolução da microeletrônica, juntamente à expansão do campo de aplicação, possibilitou a produção de microcontroladores (microprocessadores dedicados com conversores analógico/digital, digital/analógico,

comparadores diferenciais, com resolução acima de 10 bits incorporados) de custo reduzido, viabilizando assim a utilização destes nos mais variados sistemas [60].

Os microcontroladores são dispositivos multiuso e para desempenharem uma determinada função precisam ser programados, para isto, um programa que controla seu funcionamento e é responsável pelo desempenho de todas as suas funções, pode ser escrito em linguagens como C, Basic, Pascal, Assembly. Este programa recebe a denominação de “*firmware*”, e é transferido ao microcontrolador com o uso de um dispositivo denominado programador [61, 62].

A aquisição automática de dados, através de sistemas microcontrolados, simplifica o processo e o torna mais eficiente, pois parte do processamento responsável pela aquisição e tratamento do sinal é transferida para o sistema remoto. A partir do momento em que os dados são transferidos destes sistemas para dentro de um computador, são inúmeras as possibilidades de sua manipulação, armazenamento e transferência para outros aplicativos ou lugares [63].

1.3.7 Programa de controle

A eletrônica e a informática são ferramentas indispensáveis em qualquer campo da atividade humana. Nos laboratório de química destaca-se por aplicações como a elaboração de cálculos, gráficos, análise de dados, assim como controle de sistemas analíticos, aquisição, tratamento e armazenamento das informações.

O controle de sistemas analíticos envolve a captura de sinais do processo, seguida do seu condicionamento, conversão analógica para digital (A/D), leitura pelo computador, comparação com os parâmetros de controle, acionamento de atuadores, registro e impressão gráfica dos resultados.

O acionamento dos elementos de controle do sistema (válvulas, bombas, aquecedores, etc) é realizado através do envio de um sinal digital, a partir do computador, até um dispositivo que serve como interface, neste dispositivo o sinal é amplificado e/ou convertido em um sinal analógico, e este atua sobre os elementos do sistema como válvulas, atuadores e outros dispositivos.

O controle do sistema é realizado empregando uma linguagem de programação compatível com o sistema operacional utilizado no computador, como C++, Delphi, Visual Basic, Java, e também podem ser utilizados aplicativos como o LabView e Matlab [64].

2. PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e Soluções

2.1 Açúcares Redutores em Vinho

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultra-pura com condutividade elétrica menor que $0,18 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

A solução A de Fehling foi preparada dissolvendo-se 34,6 g de sulfato de cobre pentaidratado ($\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Germany) em água e completando-se o volume para 500 mL em balão volumétrico.

A solução B de Fehling foi preparada dissolvendo-se 173,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetraidratado ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Germany) e 50,0 g de hidróxido de sódio (Merck, Germany) em água e completando o volume a 500 mL em balão volumétrico.

A solução 0,5% (m/v) de glicose utilizada para padronizar a solução de Fehling, foi preparada dissolvendo-se 0,5 g de glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (SIGMA, USA), previamente seca em estufa a 70°C durante 1 hora, em água e completado-se o volume para 100 mL em balão volumétrico.

A solução oxidante $1,8 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo 296,4 mg de hexacianoferrato (III) de potássio (Mallinckrodt, USA) em 50 mL de água, adicionando-se 50 mL da solução estoque de hidróxido de sódio (10 mol L^{-1}) e completando-se o volume com água em um balão de 500 mL.

As soluções de referência foram preparadas dissolvendo-se 0,75 g, 1,50 g, 3,00 g e 6,00 g de frutose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (Mallinckrodt, USA) em água, adicionando 1 mL de glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) e 12 mL de etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) (Merck, Germany) e completado-se o volume a 100 mL em balão (cada padrão foi individualmente preparado). Conservados sob refrigeração essas soluções foram utilizadas por uma semana.

2.2 Manganês em Amostras Vegetais

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultra-pura com condutividade elétrica menor que $0,18\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Solução estoque de manganês 1000 mg L^{-1} foi preparada dissolvendo-se $0,7912 \text{ g}$ de MnO_2 (Johnson Matthey, UK) em 20 mL de ácido clorídrico concentrado (Merck, Germany) e completando-se o volume para 500 mL com água.

Soluções de referência de manganês a $0,0$; $5,0$; $10,0$; $15,0$; $20,0$ e $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ em ácido clorídrico (Merck, Germany) $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas a partir da solução estoque de $\text{Mn}^{2+} 1000 \text{ mg L}^{-1}$.

Solução estoque de KMnO_4 (Merck, Germany) 8 mmol L^{-1} foi preparada em $\text{H}_2\text{SO}_4 10\%$ (v/v). Soluções de NaIO_4 (Merck, Germany) contendo $6,0$; $8,0$ e $10,0\%$ (m/v) foram preparadas em $\text{H}_2\text{SO}_4 0,75 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $0,36$; $0,72$ e 1 mmol L^{-1} de KMnO_4 .

Solução de limpeza utilizando cloridrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) (Merck, Germany) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para remoção do precipitado de permanganato, foi preparada dissolvendo-se $6,9 \text{ g}$ do reagente sólido e completando-se o volume a 1000 mL com água em balão volumétrico.

Amostras vegetais secas e finamente moídas foram obtidas a partir de padrões certificados e amostras armazenadas no laboratório de química analítica do CENA, estas foram mineralizadas (decompostas) empregando a digestão assistida por micro-ondas utilizando o sistema de digestão por micro-ondas Milestone Ethos e peróxido de hidrogênio e ácido nítrico, conforme descrito por Krug et al [65].

2.3 Câmara para aquecimento com fotômetro acoplado

Os componentes e materiais utilizados para a construção da câmara *flow-batch* foram os seguintes: um tarugo de aço inox 316 com $57 \text{ } \varnothing \times 50 \text{ mm}$; um tarugo de Teflon $57 \text{ } \varnothing \times 25 \text{ mm}$; dois cilindros de vidro de $2,54 \text{ } \varnothing \times 30 \text{ mm}$; duas placas de alumínio de $20 \times 35 \times 2 \text{ mm}$; uma placa de Celeron de $20 \times 35 \times 10 \text{ mm}$, *o' rings* de Viton[®]: dois de $2,57 \times 1,78$ e um de $9,12 \times 3,53$; parafusos de inox, dois $\text{M4} \times 15 \text{ mm}$, dois $\text{M4} \times 25 \text{ mm}$ e dois $\text{M5} \times 25 \text{ mm}$; três agulhas de $1,8 \times 40 \text{ mm}$ em inox; cabo de fibra óptica de 100 cm de comprimento $\times 5 \text{ mm}$ de diâmetro; um resistor de potência (DENNEX), tipo cartucho, potência de dissipação 166 W ($20 \text{ W} \times \text{cm}^2$) e $9,5 \text{ } \varnothing \times 65 \text{ mm}$; controlador de temperatura (TIC-17, Full Gauge) fornecido com sensor de temperatura; fotodiodo com amplificador OPT301 (Texas Instruments); diodo emissor de luz (LED) 5 mm ($\lambda \text{ max} = 535 \text{ nm}$); amplificador operacional OP07; transistor BC547; reguladores de tensão 78L08 e

79L08; capacitores e resistores diversos, apresentados no diagrama eletrônico do equipamento desenvolvido.

O metal escolhido para a confecção do corpo da câmara foi o aço inox 316, devido a sua resistência à corrosão e desprendimento insignificante de metal em temperatura elevada e baixa reatividade química [66].

2.3.1 Construção da câmara

As Figuras 6 e 7 exibem a vista em corte e explodida da câmara, onde é possível observar a estrutura e o acoplamento dos dispositivos que constituem este equipamento. Sua base é um cilindro de aço inox, onde foi usinado no centro uma cavidade, a qual constitui a câmara *flow-batch*. A tampa superior foi construída com placa de Nylon®, onde foram instaladas agulhas de aço inox para inserção de soluções. Para conduzir o feixe de radiação emitido pelo LED até o interior da câmara e a partir dela até o cabo de fibra ótica, foram usados cilindros de vidro que foram encaixados no corpo da cela em furos usinados no sentido radial de forma alinhada. Para evitar o vazamento de líquidos, os cilindros de vidros foram fixados com anéis de Viton®.

O resistor de aquecimento (RA) e o sensor de temperatura (ST) constituem o sistema de aquecimento e controle de temperatura da câmara, tendo sido instalados no copo da mesma em furos usinados para permitir encaixes sem folga, e para melhor transferência de calor, os dois dispositivos foram untados com pasta térmica.

O equipamento em apreço dispõe de recursos de eletrônica que permitem selecionar temperatura e potência de operação, e a Figura 8 mostra o diagrama de conexão do controlador de temperatura.

A remoção da amostra aquecida do interior da câmara é realizada por sucção a vácuo através de canal situado na parte inferior da cavidade, utilizando para isto uma bomba de aquário em que as válvulas foram invertidas e um sistema de aprisionamento (*trap*) com Erlenmeyers.

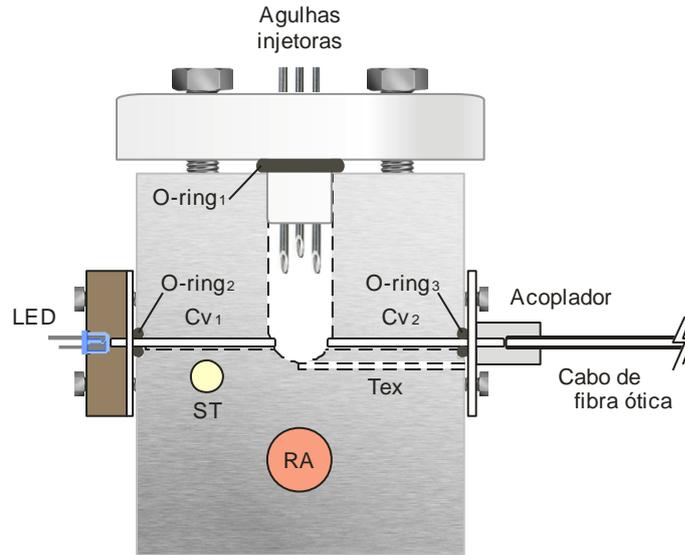


Figura 6 – Vista em corte da câmara *flow-batch*. O-ring_{1,2,3} = Anéis de vedação de Viton; LED = Diodo emissor de luz ($\lambda = 420 \text{ nm}$); Cv_{1,2} = Cilindros de vidro de 2,54 $\text{Ø} \times 30 \text{ mm}$; ST = Sensor de temperatura NTC; Tex = canal de esvaziamento da cavidade; e RA = resistor de potência (DENNEX), tipo cartucho, potência de dissipação 166 W ($20\text{W} \times \text{cm}^2$) e 9,5 $\text{Ø} \times 65 \text{ mm}$

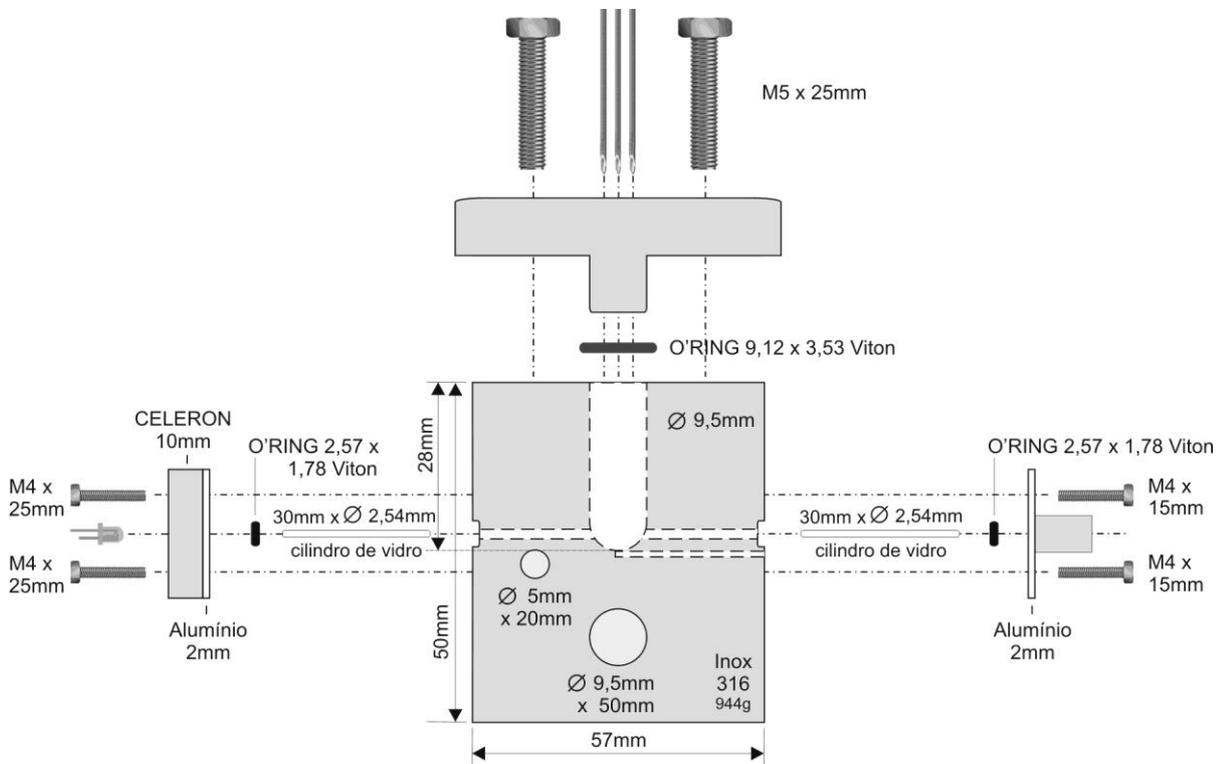


Figura 7 – Vista explodida da câmara *flow-batch*

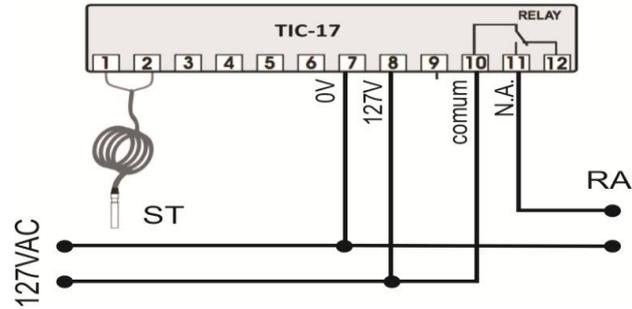


Figura 8 – Controlador de temperatura da câmara TIC-17 Full Gauge®. ST = Sensor de temperatura NTC; RA = resistor de potência (DENNEX), tipo cartucho, potência de dissipação 166 W ($20\text{W} \times \text{cm}^2$) e $9,5 \text{ Ø} \times 65 \text{ mm}$

2.3.2 Construção do Fotômetro

Com o objetivo de evitar a necessidade de resfriamento do composto cromogênico formado e seu transporte para outro dispositivo para leitura, foi incorporado um sistema fotométrico que permite a leitura das amostras diretamente na câmara. Esta solução teve como vantagem a possibilidade da realização das leituras à temperatura constante e durante o desenvolvimento da reação.

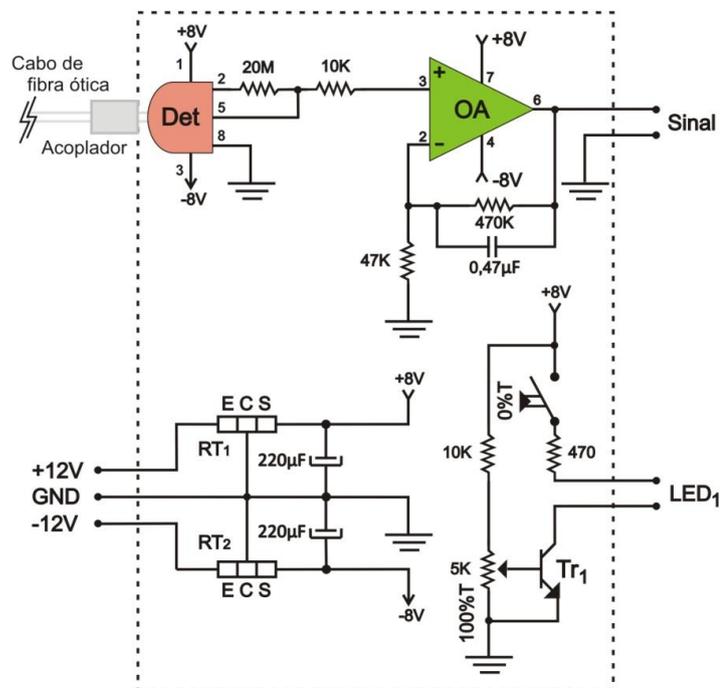


Figura 9 – Diagrama do fotômetro de LED. Det = fotodetector OPT301; AO = amplificador operacional OP07; LED₁ = diodo emissor de luz (*light emitting diode*), max = 420 nm; Tr₁ = transistor BC547; RT_{1, 2} = Reguladores de diferença de potencial; Sinal = em mV

Foi necessária a construção de uma unidade remota para acomodar o fotodetector e a inclusão de um cabo de fibra óptica para transferência da luz que atravessou a amostra até este. Esta configuração teve como objetivo evitar que o aquecimento da câmara interferisse na operação do fotodetector. Nas Figuras 6 e 7 é possível visualizar a estrutura e montagem do fotômetro na câmara.

O fotômetro foi construído empregando um LED como fonte de radiação, um fotodiodo como detector e uma malha de amplificação de sinal, baseada no amplificador operacional OP07, o diagrama é mostrado na Figura 9.

2.3.3 Determinação do calor específico da câmara

O valor do calor específico da câmara foi obtido através de ensaio utilizando um calorímetro e água desionizada como fluido trocador de calor, seguindo os passos:

- a. Com uma balança de precisão a massa da câmara seca foi obtida e anotada;
- b. A câmara foi aquecida em banho-maria até a ebulição da água do banho e a temperatura monitorada com termômetro digital foi anotada;
- c. A temperatura interna em equilíbrio do calorímetro contendo 500 mL água desionizada fria foi verificada e anotada;
- d. A câmara aquecida foi inserida no interior do calorímetro, aguardada a estabilização térmica, quando então a temperatura foi anotada.

De posse dos dados obtidos nos ensaios e utilizando a Equação 4¹ o valor para o calor específico da câmara foi calculado.

$$q_{\text{inox}} = -q_{\text{H}_2\text{O}}$$

$$mc\Delta T = -mc\Delta T \quad (3)$$

$$C_{\text{inox}} = (mc\Delta T_{\text{H}_2\text{O}}) / (m\Delta T_{\text{INOX}}) \quad (4)$$

¹ Petrucci, R.H.; Harwood, W.S.; Herring, G.E. **General chemistry**: principles and modern application. 9. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2007.

Na qual:

q_{inox} e $q_{\text{H}_2\text{O}}$ = quantidade de calor;

m = massa (gramas);

ΔT = variação de temperatura ($^{\circ}\text{C}$);

c = calor específico ($\text{calg}^{\circ}\text{C}^{-1}$).

Foram realizados três ciclos de medição, os dados obtidos estão exibidos na Tabela 3, e os resultados da determinação na Tabela 4.

Tabela 3 – Temperaturas obtidas para determinação do calor específico da câmara

Massa H_2O (g)	Massa Câmara (g)	Temperatura inicial Câmara ($^{\circ}\text{C}$)	Temperatura inicial do Calorímetro ($^{\circ}\text{C}$)	Temperatura final do Calorímetro ($^{\circ}\text{C}$)
500	944	98,1	25,5	38,1
500	944	98,1	36	46,4
500	944	97,8	25,2	37,8

Tabela 4 – Resultado obtido na determinação do calor específico da câmara

Parametro	Valor Medido	Valor Referência*	Unidade
Média	$0,117 \pm 0,025$	0,120	$\text{Cal/g } ^{\circ}\text{C}$

*UNIOESTE – Laboratório de Materiais [67]

2.3.4 Determinação da capacidade térmica e de transferência da câmara

Com uma massa de 944 g e calor específico $0,117 \pm 0,003 \text{ calg}^{\circ}\text{C}^{-1}$, a câmara possui de acordo com a Equação 5 capacidade térmica de $113 \text{ cal}^{\circ}\text{C}^{-1}$.

$$C = m.c \quad (5)$$

No cálculo da capacidade de transferência térmica, utilizou-se a Equação 6² empregada para troca de calor por convecção. Esta forma de transferência de calor se aplica a fluidos (gases ou líquidos), que em contato com superfícies com temperatura diferente dos mesmos, cria movimento desta massa em decorrência da diferença de densidade. A porção da massa fluída mais aquecida tende a subir, dando lugar a porções mais frias que descem, processo denominado convecção natural.

$$Q = h.A.(T_1 - T_2) \quad (6)$$

Na qual:

Q - Energia térmica (cal);

h - Coeficiente de transferência térmica inox ($\text{calcm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$);

A - Área da superfície de contato (cm^2);

T₁ - Temperatura câmara ($^{\circ}\text{C}$);

T₂ - Temperatura solução ($^{\circ}\text{C}$).

$$Q = 0,038 \times 4,92 \times 30 = 5,6 \text{ cal/s} \quad (7)$$

A Equação 7 exhibe o cálculo da capacidade de transferência térmica. O valor utilizado para o coeficiente de transferência térmica para o aço inoxidável 316 foi de $0,038 \text{ calscm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ [66], para um volume de solução de 1 mL e diferença de temperatura de 30°C (25 para 55°C), o que resultou em $5,6 \text{ cal/s}$, valor 30 vezes maior que a do poliuretano [66], material normalmente utilizado para confecção de bobinas imersas em banhos.

² Portal de Engenharia Química – Transferência de Calor. Disponível em: http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=248&Itemid=422 . Acesso em: 22 mar 2016.

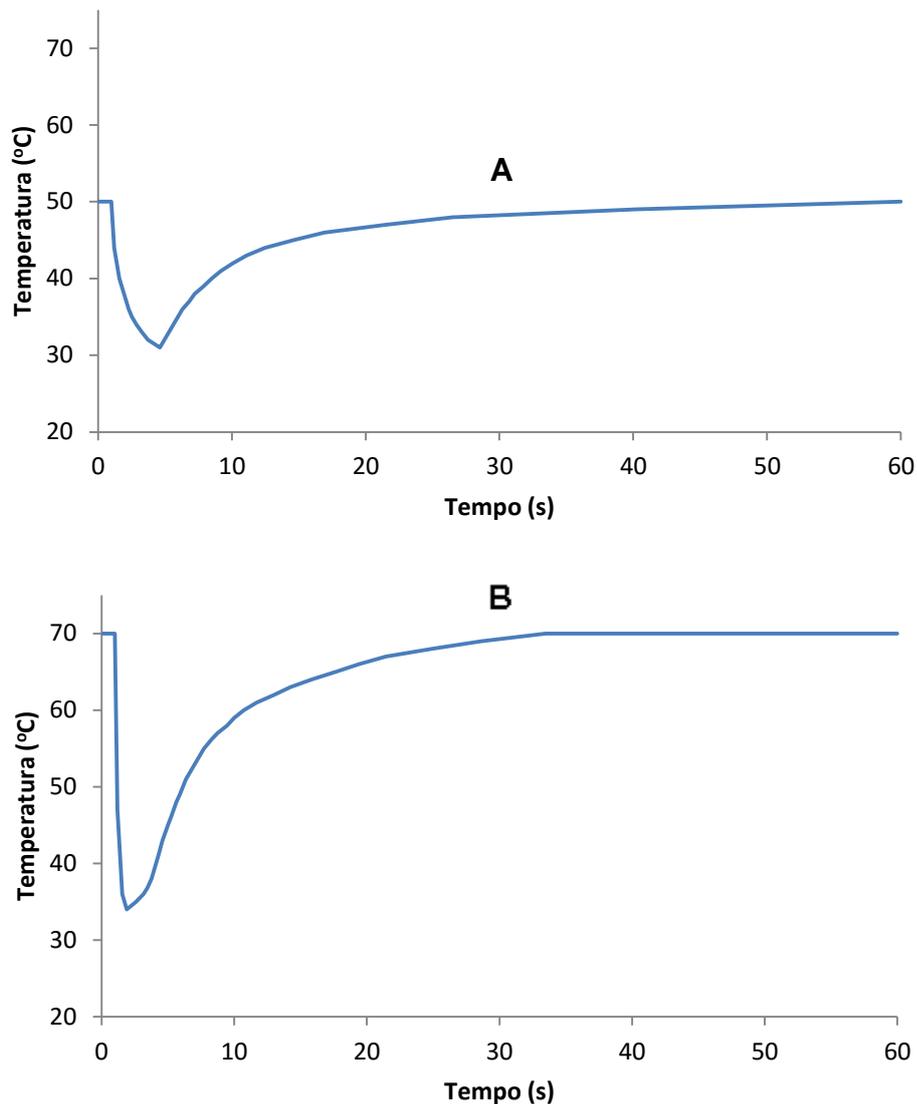


Figura 10 – Curvas correspondentes a transferência de calor para 1,0 ml de água destilada, inserida na cavidade da câmara com temperatura de: A = 50 e B = 70 °C. A temperatura da água inserida foi previamente equilibrada em 22 °C

As Figuras 10 A e B apresentam as curvas de aquecimento de 1 mL de água destilada inicialmente estável a uma temperatura de 22 °C, injetada na câmara com temperatura controlada em 50 °C e 70 °C, respectivamente. Analisando as curvas obtidas, observa-se que para ambas as temperaturas de ensaio, o intervalo de tempo decorrido da injeção até o ponto onde a água atingiu o estado de equilíbrio térmico foi de cerca de 35 s.

A Tabela 5 exhibe as características da câmara aquecida com fotômetro acoplado.

Tabela 5 – Características da câmara

Características da câmara	
Material (câmara)	Inox 316
Material (tampa)	Nylon®
Dimensões	57 Ø x 50(h) mm
Massa	944 g
Calor específico	0,117±0,003 calg ^o C ⁻¹
Condutividade térmica*	0,038 calscm ^{2o} C ⁻¹
Capacidade térmica	113 cal
Volume mínimo de leitura**	0,6 mL
Volume máximo de amostra	1,6 mL
Taxa de transferência térmica***	5,6 cal ^s ⁻¹

* [66]

** Volume necessário de solução para encobrir as guias de luz da câmara

*** 1 mL de solução aquosa com temperatura inicial de 25°C e final de 55°C.

Uma imagem da Câmara Aquecida com Fotômetro Acoplado + Detector do Fotômetro + Bomba de Vácuo pode ser vista no Apêndice A (Figura 28).

2.4 Bomba peristáltica

Os componentes e materiais utilizados na construção da bomba peristáltica foram os seguintes: um cabeçote para quatro canais com seis roletes com rolamentos e ajuste de pressão independentes (MSTECNOPON); um motor de passo NEMA 2310 com torque de 10 kgcm⁻¹; um microcontrolador AT89S52 (ATMEL); uma interface de transmissão / recepção RS232 HIN202 (INTERSIL); um display de LCD 16x2, três botões tipo *Mini Push Button Switch*; quatro transistores BD263, um regulador de diferença de potencial 7805; um transformador 12+12V x 2A, uma ponte retificadora SKB7/04; um capacitor 5000 µF x 50V.

A bomba é controlada por um microcontrolador AT89S52, produzido pela ATMEL® que pertence à família 8051 da INTEL®, programado em *Assembly* (linguagem de baixo nível, instruções elementares para computador).

O sistema possui display LCD (*liquid crystal display* – Mostrador de cristal líquido), *driver* (amplificador, acionador) para o motor de passo, três teclas e interface serial RS-232. Com as teclas incremento ou decremento, é possível alterar a velocidade, sendo o valor de 89% correspondente à vazão nominal para os tubos

de bombeamento Ismatec®. Na Figura 11, é exibido o diagrama eletrônico da bomba peristáltica.

A bomba dispõe de uma rotina de calibração iniciada pelo teclado que quando executada, aciona o motor por um intervalo de tempo preciso de 300 segundos, controlado pelo RTC, durante sua execução o volume de água bombeado é coletado e posteriormente pesado em balança analítica para aferição de vazão.

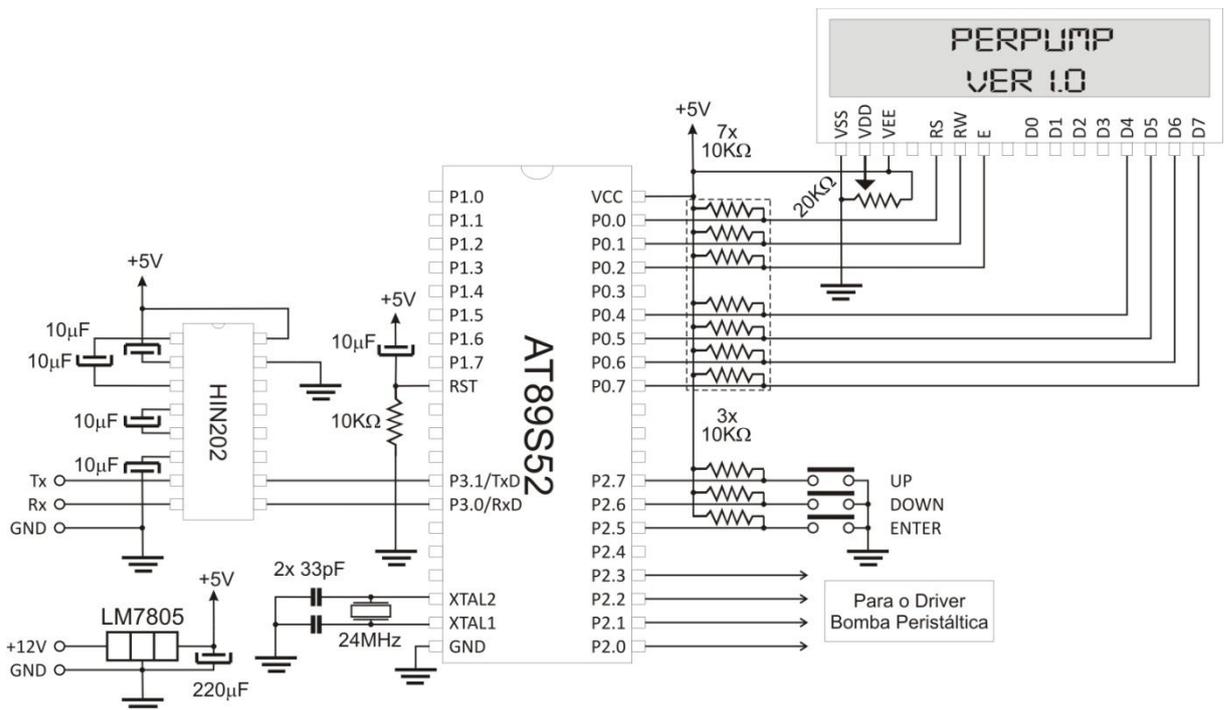


Figura 11 – Diagrama eletrônico da Bomba Peristáltica

Uma imagem da bomba peristáltica multicanal microprocessada pode ser vista no Apêndice A (Figura 29).

2.5 Interface microcontrolada

Os componentes e materiais utilizados na interface microcontrolada foram os seguintes: microcontrolador PIC18F4553 (MICROCHIP); RS232 interface HIN202 ((Transmissor/Receptor RS232 - INTERSIL), *Octal Transistor Arrays* ULN2803 (Matriz Octaédrica de Transistores - Texas Instruments), *Micropower Voltage*

Reference LM385-2.5 (Referencia de tensão - Texas Instruments), LM35 Precision Centigrade Temperature Sensor (Sensor de temperatura centigrado de precisão), regulador de diferença de potencial 7805, diodos emissores de luz (LED), capacitores e resistores.

O microcontrolador PIC 18F4553 possui 35 pinos de I/O, A/D de 12 bits e interface USB. Oito linhas de I/O foram conectados no circuito integrado ULN2803A e utilizados para o acionamento das válvulas solenoide e da bomba de vácuo.

O circuito integrado de referência de tensão LM385-2.5 foi conectado ao pino de referência positivo do conversor analógico/digital do microcontrolador visando melhorar a precisão de leitura analógica. Dois pinos de entrada analógicas foram disponibilizados em conectores do tipo borne para leitura dos sinais do fotodetector e do sensor de temperatura da câmera (LM35). O driver HIN202 compatibiliza os níveis de tensão TTL de saída do microcontrolador aos do protocolo de comunicação RS232 e foi conectado a um conector delta de nove pinos.

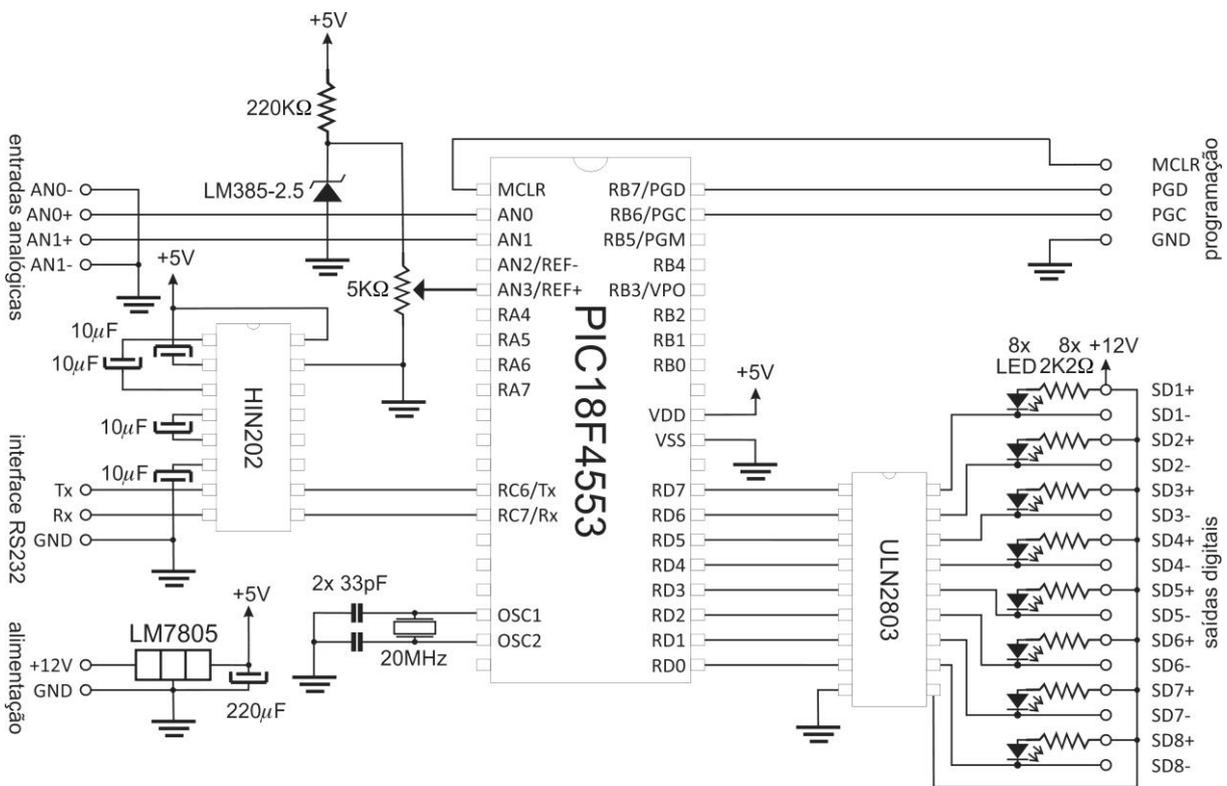


Figura 12 – Diagrama eletrônico da placa de interface microprocessada PC - Sistema Analítico

A placa conta também com os pinos da interface ISP (*In-System Programming* - Programação no Sistema) disponibilizados em um conector, para a realização da reprogramação do microcontrolador sem a necessidade de sua remoção da placa. O diagrama eletrônico da placa de interface é mostrado na Figura 12.

Uma imagem da placa de interface microprocessada pode ser vista no Apêndice A (Figura 30).

A listagem do aplicativo desenvolvido em mikroBasic® para o controle da placa de interface microprocessada encontra-se no Apêndice B

PROCEDIMENTOS

2.6 Açúcares Redutores (AR) em Vinho

O procedimento para determinação de açúcares redutores em vinhos foi desenvolvido empregando o método baseado na oxidação do analito com hexacianoferrato de potássio [20]. O monitoramento da absorção de radiação eletromagnética é realizado em 420 nm.

O módulo de análise exibido na Figura 13 é baseado no processo de multicomutação em análise em fluxo (MCFA), e foi projetado para trabalhar com pressão positiva, ou seja, as soluções utilizadas são bombeadas a partir da bomba peristáltica para os outros componentes do sistema. Na condição mostrada na figura, todas as soluções estão sendo bombeadas em circuito fechado e recuperadas (recicladas). A função da bobina B_1 é favorecer a mistura entre a amostra e a solução do reagente. A transferência por linha única da zona de amostra até a câmara propicia redução do volume morto de soluções nas tubulações e permite a mistura das soluções. Para o descarte da amostra analisada é utilizado vácuo produzido pela bomba de aquário modificada, que realiza aspiração por um canal localizada na parte inferior da câmara até um sistema “*trap*” (aprisionamento). O controle é realizado por um Computador Pessoal (PC – Personal Computer) utilizando aplicativo desenvolvido em linguagem Visual Basic® que atua sobre os componentes do sistema através da placa de interface microcontrolada.

2.6.1 Operação do módulo de análise para determinação AR

Na Figura 13 é apresentado o diagrama do módulo de análise para determinação de açúcares redutores. O procedimento para início de operação é realizado apenas uma vez em cada período de trabalho e começa com o acionamento escalonado (incremento de velocidade) da bomba peristáltica com duração de 4 s, que tem como objetivo de portar o sistema da inércia para o valor nominal de forma suave. Um intervalo de tempo de 12 s é necessário para que os tubos de bombeamento das soluções sejam preenchidos até as válvulas. Na sequência, as válvulas V_1 e V_2 (amostra e reagente respectivamente) são acionadas durante 4 s para o preenchimento da tubulação até a confluência. Em seguida a válvula V_3 (transportador) é acionada durante 12 s para a limpeza do canal de transporte até a câmara de aquecimento. A partir deste instante a bomba peristáltica permanece acionada e as válvulas V_1 , V_2 e V_3 desligadas e o ciclo analítico pode ser iniciado.

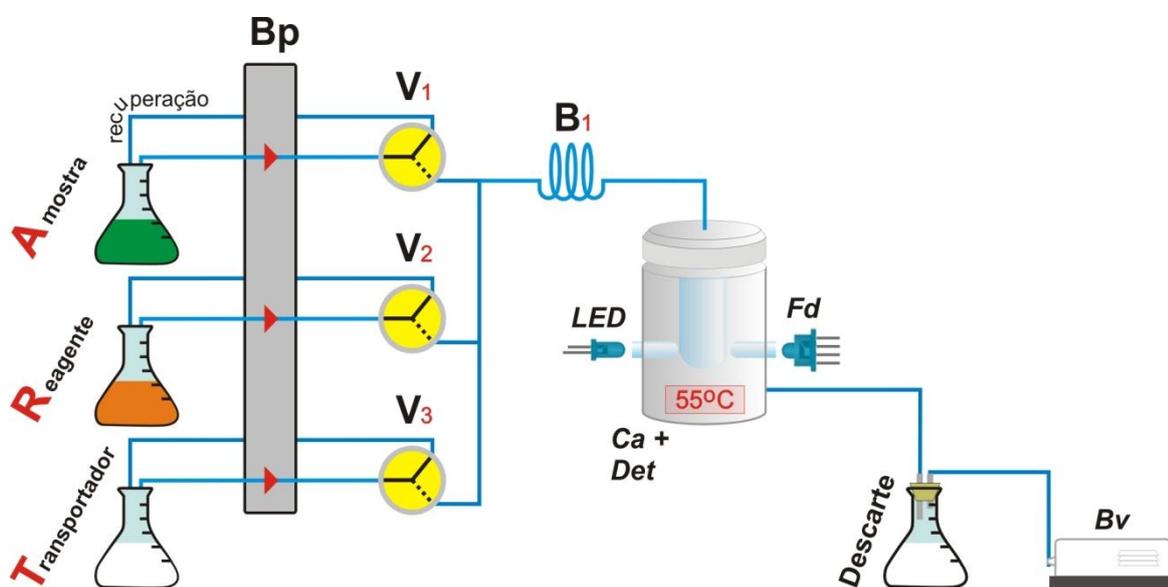


Figura 13 – Diagrama do módulo de análise para determinação de AR. Bp = Bomba peristáltica V_1 , V_2 , V_3 = Válvulas 3 vias 161T031 12VDC NResearch; B_1 = Bobina misturadora; Ca+Det = Câmara flow-batch aquecida + Fotodetector; LED = diodo emissor de luz, $\lambda = 420$ nm; Fd = Fotodetector OPT301 Burr-Brown; Bv = Bomba de vácuo (aquário)

A sequência para inserção de uma alíquota de amostra tem início com o acionamento alternado das válvulas de três vias V_1 e V_2 , em intervalos de tempo de 0,1: 0,9 s e oito ciclos de amostragem (tempo total de 8 s). Esta ação é realizada para preencher a bobina (B_1) com uma mistura da solução da amostra e do reagente. Ao fim desta etapa, a bomba de vácuo é acionada para esvaziar a câmara de aquecimento, onde ocorrerá a reação. Em seguida a válvula V_3 é ligada durante 10 s para transportar a mistura armazenada na bobina (B_1) até a câmara aquecida. Enquanto a mistura amostra/reagente é aquecida e a reação se desenvolve no interior da câmara, o sinal gerado pelo fotômetro em função do composto formado, é monitorado pelo computador e um gráfico deste sinal em função do tempo, é exibido na tela do computador, permitindo um acompanhamento visual em tempo real. As etapas descritas neste parágrafo são repetidas até completar o número de replicatas programadas.

A Tabela 6 e a Figura 14 mostram a sequência de acionamento dos dispositivos do sistema para a determinação de açúcares redutores e a temporização dos mesmos.

O procedimento para a troca de amostra é análogo ao de inicialização. Após a troca do frasco de amostra, o sistema aguarda um intervalo de 12 s para garantir que a nova solução alcance a válvula V_1 , quando então o tubo de recuperação de solução pode ser inserido no frasco. A V_1 é acionada durante 4 s para preencher a tubulação até a confluência.

Após cada troca de amostra é realizado um ciclo de limpeza, que tem início com o acionamento da bomba de vácuo para extração da amostra analisada, seguido do acionamento da válvula V_3 para inserir uma alíquota de transportador e novamente o acionamento da bomba de vácuo. Em cada uma destas etapas, a duração do acionamento do dispositivo foi de 10 s.

Tabela 6 – Sequência de acionamento dos dispositivos do sistema para determinação de AR. Bp = Bomba peristáltica; V₁, V₂, V₃ = Válvulas de três vias 161T031 12VDC NResearch; Bv = Bomba de vácuo *home made*. Dígito 1 = componente do sistema acionado; dígito 0 = componente do sistema desligado

Etapa	Evento	Bp	V ₁	V ₂	V ₃	B _v	Tempo (s)	Obs
Inicialização	Incremento gradual	1	0	0	0	0	4	Velocidade 20, 50, 90%
	Enchimentos tubos	1	0	0	0	0	12	Bomba e válvulas
	Enchimento tubos até confluência	1	1	1	0	0	4	Reagente e amostra
	Limpeza canal transporte	1	0	0	1	1	12	
Ciclo analítico	Dosagem	1	1	1	0	0	8	8 ciclos alternados
	Sucção câmara	1	0	0	0	1	10	
	Transporte	1	0	0	1	0	10	
	Leitura	1	0	0	0	0	10	
Limpeza	Sucção câmara	1	0	0	0	1	10	
	Transportador	1	0	0	1	0	10	
	Sucção câmara	1	0	0	0	1	10	
Troca amostra	Enchimentos tubos	1	0	0	0	0	12	Bomba e válvulas
	Enchimento tubos até confluência	1	1	0	0	0	4	Reagente e amostra
	Limpeza canal transporte	1	0	0	1	1	12	

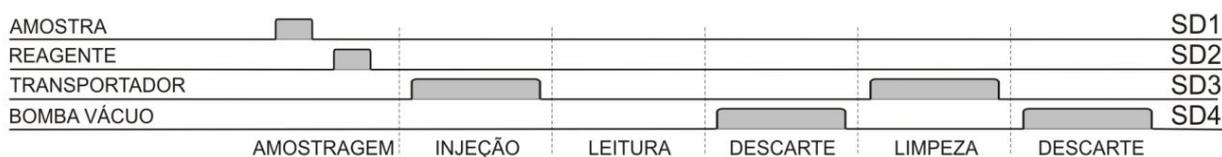


Figura 14 – Diagrama de tempos de acionamento do sistema para determinação de AR. Legenda: SD₁, SD₂, SD₃, SD₄ = Saídas digitais do sistema

Uma imagem do sistema completo para análise de açúcares redutores em vinhos pode ser vista no Apêndice A (Figura 31).

2.6.2 Software de Controle

O aplicativo para controle do sistema foi desenvolvido em Visual Basic® 6.0 o qual comunica-se com a placa de interface e bomba peristáltica por conexões USB (*Universal Serial Bus* – Barramento Serial Universal).

Na Figura 15 é possível ver a janela principal do aplicativo de controle desenvolvido.

No quadro **configurações do sistema**, são selecionadas as portas para comunicação com a bomba e com a placa de interface, e são selecionados os valores para os parâmetros: número de ciclos e replicatas, tempos (de dosagem) do analito, solvente, reagente, injeção na câmara, e limpeza (descarte).

No quadro **configurações analíticas**, são armazenados os parâmetros para calibração do fotômetro, assim como o nome do arquivo criado para o armazenamento dos dados adquiridos.

A **área gráfica** exibe o registro dos sinais adquiridos. O **diagrama de tempos** (localizado abaixo da área gráfica) sinaliza através da mudança de cor a etapa do ciclo e as saídas digitais que estão sendo executadas no momento.

O quadro **Sistema Analítico** ilustra dinamicamente (mudança de cor ou animação) o *status* do elemento acionado do sistema em tempo real.

No quadro **Auto Controle**, são apresentados o valor para sinal analítico lido (em mV e Absorbância), o ciclo e replicata em execução, bem como os valores máximos em Absorbância dos picos registrados.

Quando o programa de controle é carregado, automaticamente são recuperados os valores dos parâmetros de configurações do sistema utilizados na operação anterior, e se for necessário, estes podem ser atualizados. As configurações analíticas (0%T, 100%T, luz espúria) também são recuperadas automaticamente e podem ter seus valores inseridos manualmente ou ainda serem atualizados através de leitura direta do sistema pressionando-se os botões correspondentes.

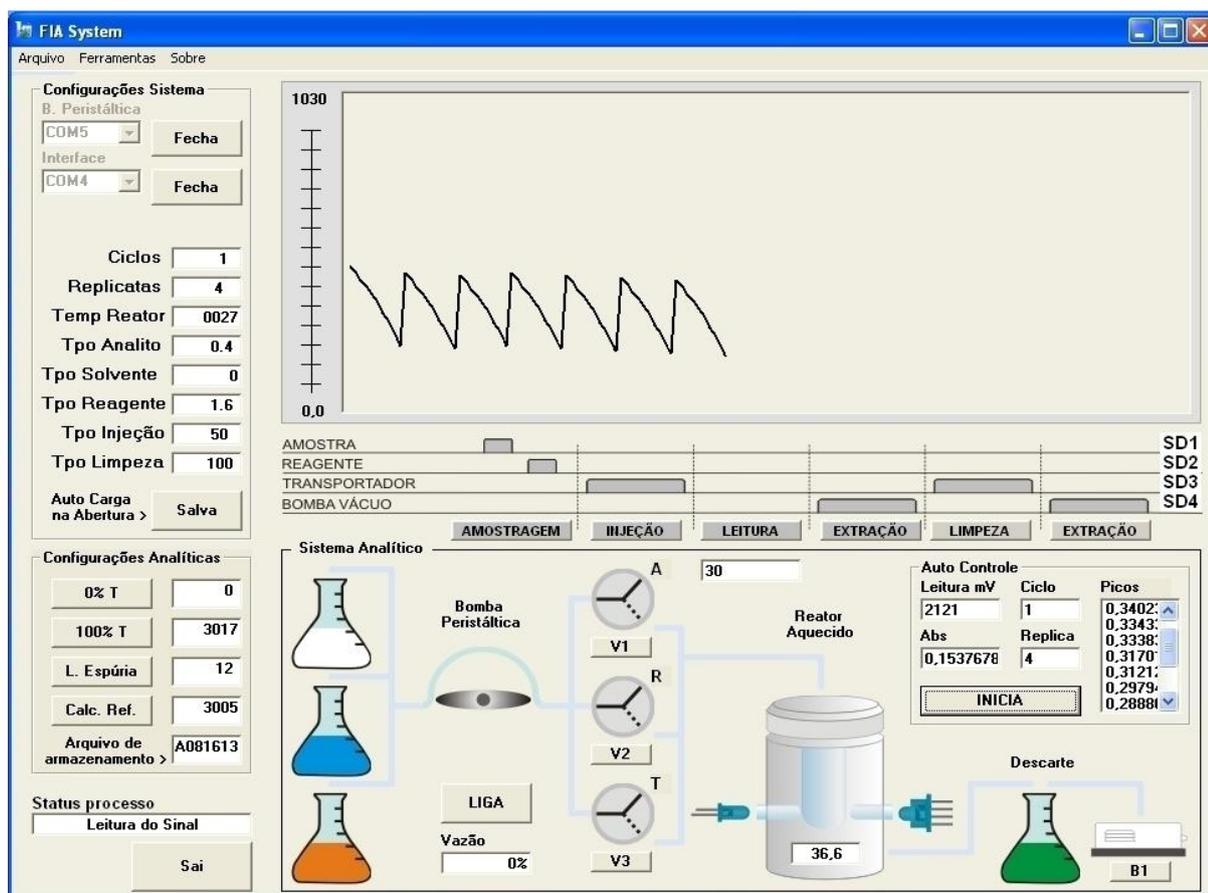


Figura 15 – Imagem da tela principal do aplicativo em Visual Basic 6 para controle do Sistema Analítico

O sistema possui três modos de operação: **manual** – basta clicar no botão correspondente ao elemento desejado, apresentado na tela do computador, para acioná-lo; **semi-automático** – clicando nos botões sob o diagrama de tempo, a etapa correspondente do ciclo é executada (esta opção é muito útil na configuração inicial e otimização do sistema); **automático** – executa o ciclo completo, de acordo com as opções de ciclo e replicatas.

Todos os valores adquiridos são armazenados em arquivo, juntamente com os parâmetros analíticos do sistema, para posterior análise e/ou construção de gráficos. O programa conta ainda com uma ferramenta que possibilita a abertura de arquivos de dados das curvas analíticas geradas, eliminando a necessidade da utilização de algum outro programa para visualizações rápidas. Neste ponto, vale a pena destacar o fato de que este aplicativo realiza de forma completa, sincronizada e integrada, a tarefa de controlar os elementos do módulo de análise, adquirir dados, gerar o gráfico e armazenar todas as informações.

2.6.3 Avaliação do comprimento de onda de absorção máxima

O procedimento analítico em apreço é baseado na reação de oxidação do hexacianoferrato (III) em solução alcalina. A literatura consultada indica que a detecção fotométrica é realizada em 420 nm [20, 29]. Como detector é empregado um fotômetro de LED construído no laboratório. O LED adquirido no mercado local não foi fornecido com especificações do comprimento de onda e da largura de banda de emissão, então foi necessário realizar medições para avaliar estes parâmetros, bem como confirmar o comprimento de onda de máxima absorção do composto a ser monitorado. A varredura de comprimento de onda de absorção foi realizada, usando uma solução do composto, obtida misturando-se uma solução padrão de frutose 3 % (m/v) com igual volume de uma solução do reagente hexacianoferrato ($1,8 \text{ mmolL}^{-1}$) em meio alcalino (hidróxido de sódio $0,5 \text{ molL}^{-1}$). A obtenção do espectro de absorção do composto foi realizada utilizando o espectrofotômetro USB4000 da Ocean Optics Inc, uma fonte de radiação modelo PX2 *pulsed xenon*, cubeta de quartzo com passo óptico de 10 mm. O mesmo equipamento foi utilizado para obtenção do espectro de emissão do LED. Os registros dos dois espectros são mostrados na Figura 16.

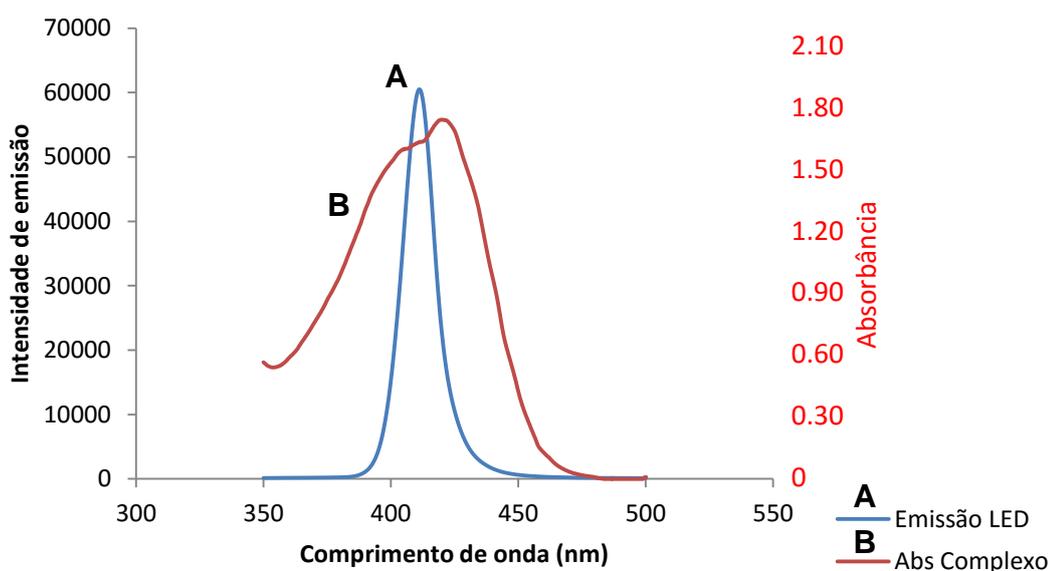


Figura 16 – Espectros de emissão e de absorção. A = Espectro de emissão do LED (máximo em 420 nm) e B = espectro de absorção do complexo formado entre hexacianoferrato(III) e frutose. Espectros produzidos com USB4000 *Miniature Fiber Optic Spectrometer* Ocean Optics Inc, Fonte de luz PX2 *pulsed xenon*, *Software SpectraSuite*

Em primeira vista, observa-se que o espectro de emissão do LED está contido inteiramente no espectro de absorção do complexo, portanto este LED pôde ser usado como fonte de radiação para monitoramento deste composto. Além disso, o máximo de emissão do LED está próximo do máximo de absorção do complexo, garantindo maior precisão das medidas. Adicionalmente, há outras considerações que corroboram para esta escolha: medições destes registros mostram que a largura de meia banda do espectro de emissão do LED é de aproximadamente 22 nm e a do espectro de absorção do complexo é 45 nm, dado relevante, pois quanto mais estreita a janela do espectro de emissão, menor a possibilidade de ocorrer interferências advindas de outras espécies químicas concomitantes

2.6.4 Efeito da variação da concentração do reagente

Esta avaliação teve como objetivo determinar o efeito da concentração do reagente hexacianoferrato(III) de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) sobre a sensibilidade do procedimento. Os experimentos foram realizados usando soluções padrão contendo 0,0; 0,75; 1,5; 3,0 e 6,0 % (m/v) de frutose. As soluções do reagente oxidante foram preparadas nos dias de uso com as seguintes concentrações 0,3; 0,9 e 1,8 mmol L⁻¹. Para estes ensaios, a temperatura no reator foi ajustada para 50 °C. Os resultados obtidos são exibidos no Figura 17.

As curvas do Figura 17 e a Tabela 7, mostram que o aumento da concentração do reagente, incrementou a sensibilidade de forma progressiva. Analisando os dados da Tabela 7, podemos deduzir que a sensibilidade teve um aumento em torno de 300 % quando comparamos a curva obtida com a concentração do reagente em 0,3 mmolL⁻¹ com 1,8 mmolL⁻¹, enquanto que o aumento da intersecção foi em torno de 50 %, o que é vantajoso, pois não compromete a faixa de resposta linear do fotômetro em detrimento do aumento em sensibilidade. Em fotômetro de LED sem correção da radiação espúria, a faixa de resposta linear é de até 1 absorbância [68], portanto um procedimento analítico com leitura de branco alta (intercepto) pode limitar a faixa de resposta linear.

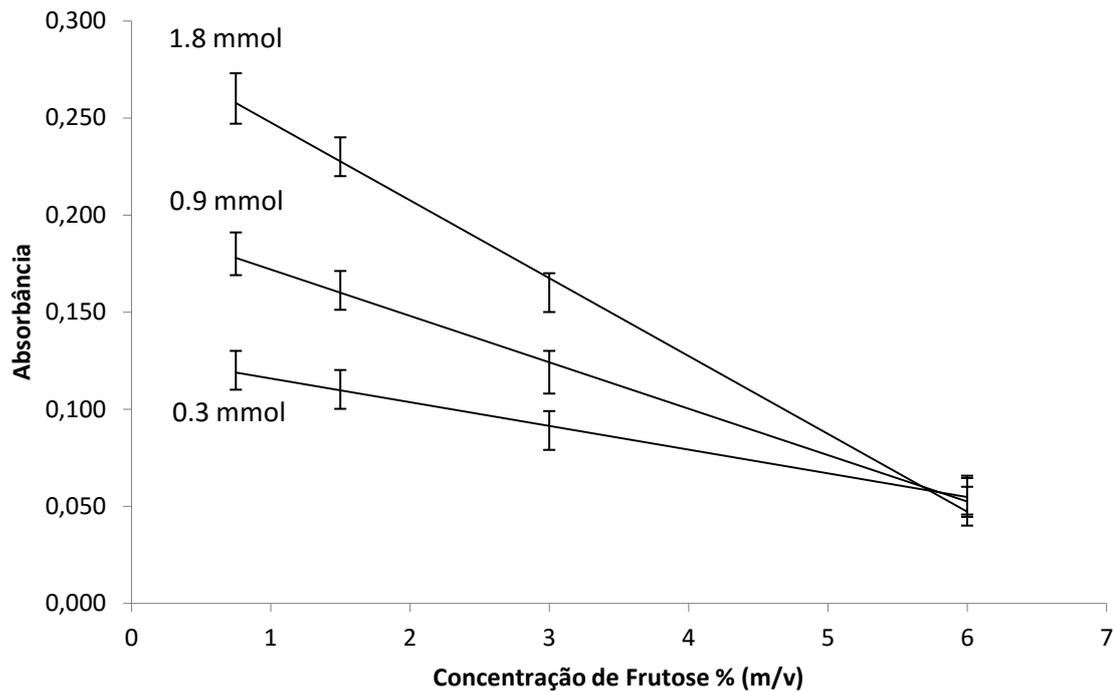


Figura 17 - Efeito da concentração do reagente hexacianoferrato(III) na reação com soluções padrão com 0,0; 0,75; 1,5; 3,0 e 6,0 % (m/v)

Os parâmetros obtidos utilizando regressões lineares das curvas mostradas na Figura 17 são exibidos na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados do estudo da concentração do reagente

Parâmetro	Concentração do reagente (mmol L ⁻¹)		
	0,3	0,9	1,8
Coef. Angular	-0,0122	-0,0239	-0,0401
Correlação	0,9967	0,9961	0,9971
Intersecção	0,1281	0,1959	0,2878

2.6.5 Efeito da variação da concentração de NaOH

Conforme apresentado na introdução, a alcalinização da amostra é necessária para produzir a abertura da estrutura cíclica dos açúcares redutores, e promover seu caráter redutor responsável pela descoloração do reagente cromogênico. Em trabalho anterior [29], foi utilizada uma solução de hidróxido de sódio com concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Neste experimento, o reagente foi preparado em soluções de hidróxido de sódio com concentrações de 0,3, 0,5 e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

O efeito percebido relacionado ao aumento da concentração foi a aceleração do desenvolvimento da reação, no entanto o número de ciclos para estabilização das leituras entre soluções com concentrações diferentes, também aumentou proporcionalmente, o que reduzia a frequência de amostragem. Este efeito foi observado com a concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Com a concentração de $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, o desenvolvimento da reação era mais lento, requerendo um tempo mais longo, causando também redução da frequência de amostragem. O melhor resultado foi obtido com o reagente preparado em uma solução de hidróxido sódio com concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Nesta condição, a curva analítica apresentou coeficiente angular de $-0,0401$, coeficiente linear de $0,2878$ com correlação de $0,998$ e tempo de limpeza aproximadamente 50% menor que o usado para solução com concentração $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, então a solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi selecionada para dar continuidade ao trabalho.

2.6.6 Efeito da variação da temperatura

A taxa de oxidação dos carboidratos é significativamente favorecida pelo aumento da temperatura [30], provocando então ganho relevante em sensibilidade. Isto demonstra a importância desse parâmetro e a escolha desta reação para a consecução deste trabalho, envolvendo o uso de câmara aquecida. Foram realizados ensaios com temperaturas entre $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, e os resultados são mostrados no Figura 18.

As curvas desta figura correspondem aos seguintes coeficientes angulares (sensibilidade): $Y_1 = -0,0267$; $Y_2 = -0,0381$; $Y_3 = -0,053$; $Y_4 = -0,0531$. Nos quais Y_1 , Y_2 , Y_3 e Y_4 são os coeficientes angulares obtidos com as temperaturas de 30 , 40 , 50 e $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente. O aumento significativo dos coeficientes angulares das

curvas analíticas, com os incrementos em temperatura, demonstram a aceleração do desenvolvimento da reação, sem prejuízo da resposta linear. Comparando-se ainda os coeficientes angulares e com uma inspeção visual no Figura 18, nota-se que as curvas relacionadas às temperaturas de 50 e 60 °C são as que possuem maior coeficiente angular e portanto sensibilidade. Além disto ambas são praticamente paralelas (mesmo coeficiente angular), isto significa que as sensibilidades são equivalentes. Tendo isto em vista, a temperatura de 50 °C foi selecionada, pois a curva de 60 °C apresenta o ponto com concentração de 6% muito próximo ao valor zero de absorbância.

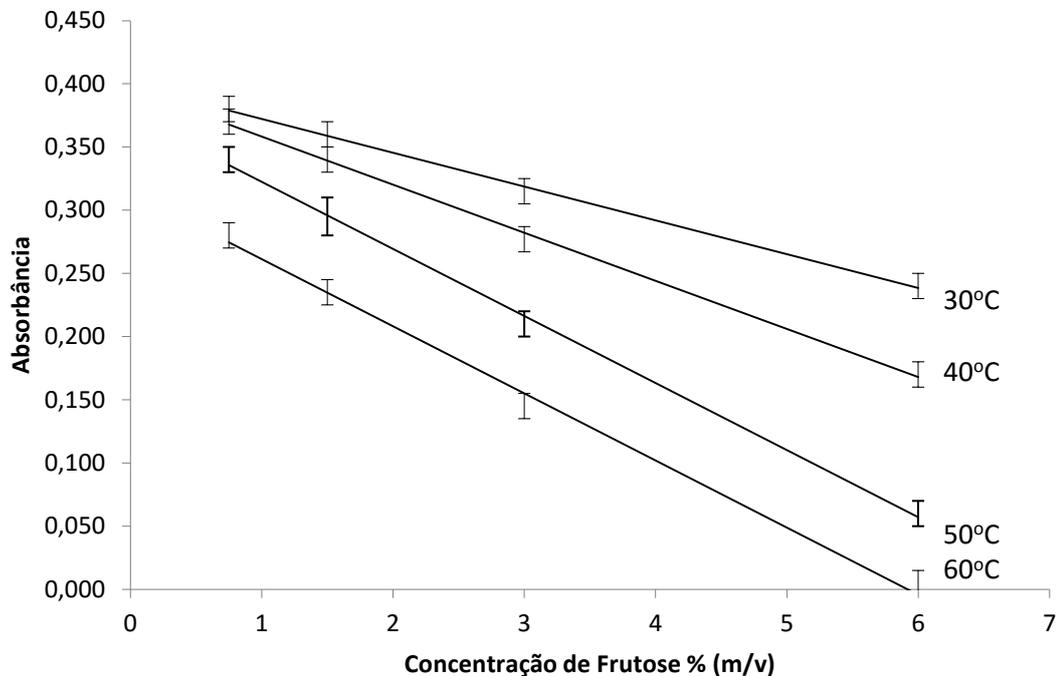


Figura 18 - Efeito da temperatura no desenvolvimento da reação para determinação da concentração de frutose

2.6.7 Avaliação de potenciais espécies químicas interferentes

Etanol e glicerol são espécies químicas presentes nas amostras de vinho em maior concentração [26], então estas foram avaliadas quanto a possibilidade de causar interferência na determinação de AR. Neste estudo, foram adicionadas quantidades destes dois possíveis interferentes à solução com o açúcar redutor. Foram preparados três conjuntos de soluções padrão com frutose nas concentrações de 0,75; 1,5; 3,0 e 6,0 % (m/v), um em água (sem interferentes),

o segundo em meio contendo 12% (v/v) de etanol, e o terceiro em meio contendo 12 % (v/v) de etanol e 1 % (v/v) de glicerol [27]. Os resultados são mostrados no Figura 19.

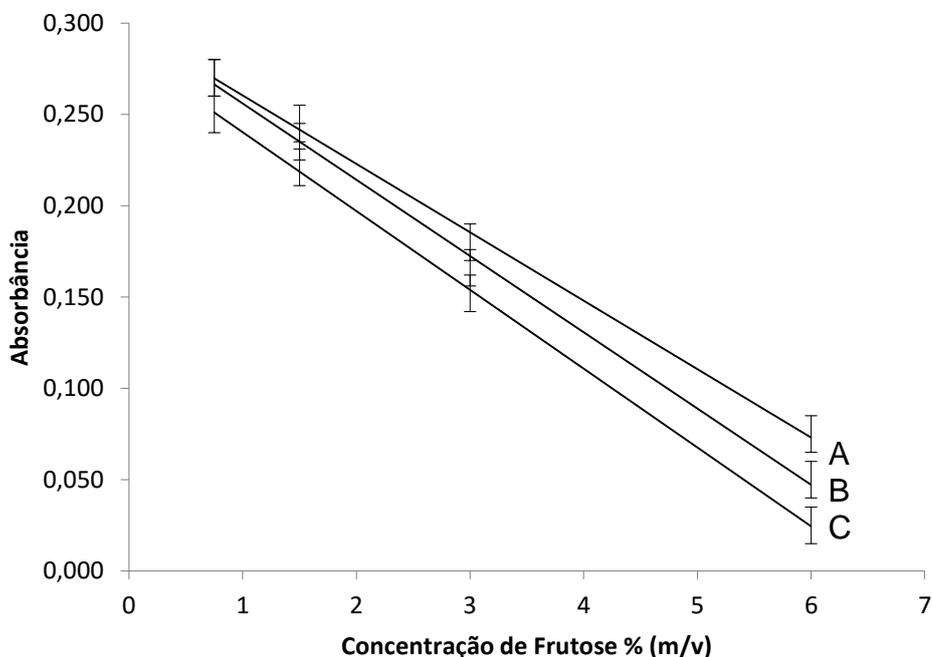


Figura 19 - Avaliação de possíveis espécies interferentes na determinação de AR. A = Solução de amostra contendo Frutose + Etanol + Glicerol; B = Solução de amostra contendo apenas Frutose; C = Solução de amostra contendo Frutose + Etanol

Tabela 8 – Resultados do gráfico de avaliação de interferentes

		Coefficiente Angular	Intercepto	R²	
A) Frut+Et+Glicerol		-0,037	0,298	0,9980	
B) Frutose		-0,042	0,298	0,9978	
C) Frutose+Etanol		-0,043	0,283	0,9997	
	Média >	0,0396	Média >	0,0424	
A - B	D. P. >	0,0030	B - C	D. P. >	0,0010
	C. V. >	7,69		C. V. >	2,33

Os dados obtidos a partir das curvas de avaliação de possíveis espécies interferentes na determinação de açúcares redutores no vinho, Figura 19, estão organizados na Tabela 8. Analisando os dados não foi observada diferença significativa nos parâmetros da curva preparada apenas com frutose e da obtida a

partir de frutose + etanol. A curva obtida apenas com frutose e a obtida a partir de frutose + etanol + glicerol foi observada uma diferença de aproximadamente 8 % na sensibilidade o que poderia ser considerado interferência. Portanto o etanol e glicerol nas concentrações avaliadas passaram a fazer parte dos padrões, objetivando a compatibilização da matriz.

2.6.8 Determinação de AR em amostras de vinho

Tendo sido estabelecidas as condições operacionais, um conjunto de amostras de vinho foram analisadas, visando comprovar a aplicabilidade do sistema desenvolvido e do procedimento proposto. O conjunto de soluções padrão com concentrações de 0,75; 1,5; 3,0 e 6,0 % (m/v) de frutose, foram preparadas em meio contendo etanol (12 %, v/v) e glicerol (1 % v/v). A temperatura do reator foi ajustada para 50 °C, relação de volumes amostra/reagente de 10:220 µL (determinados no estudo do reagente). A partir dos máximos de absorção dos picos registrados foi traçada a curva exibida no Figura 20, a qual foi usada para calcular as concentrações de frutose nas amostras.

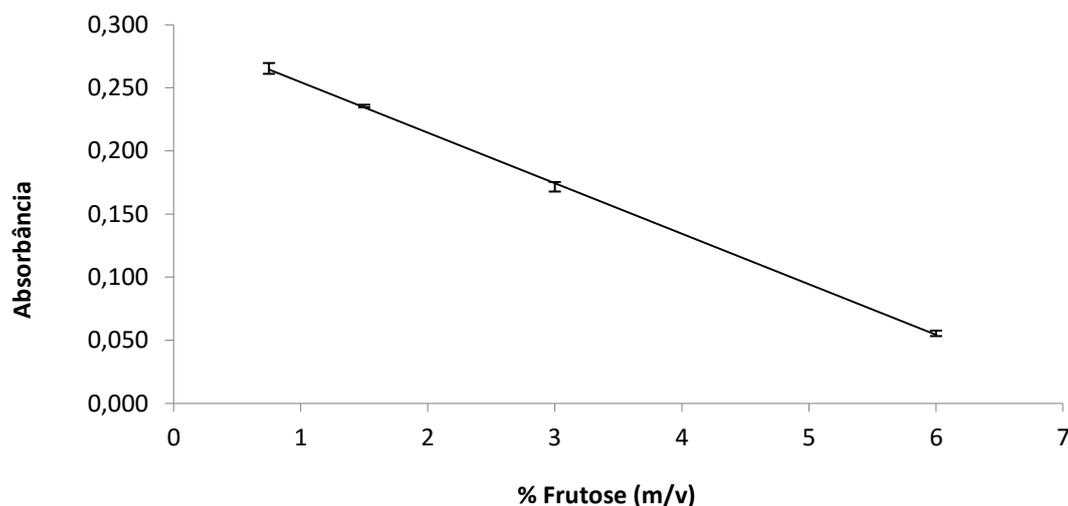


Figura 20 – Curva de calibração. Equação da reta: $y = -0,0400x + 0,2946$ ($R^2 = 0,9991$)
Parâmetros do sistema: temperatura 50°C, volume amostra/reagente de 10:220 µL

As amostras foram introduzidas no sistema de análise sem tratamento prévio, não tendo sido observados desvios em decorrência da cor em algumas destas por conta da diluição de 22 vezes a que foram submetidas. As amostras de vinhos frisantes foram mantidas em banho ultrassom por 5 minutos para eliminação da fase gasosa.

Visando avaliar a exatidão do procedimento proposto, as amostras foram processadas empregando a titulação com o reagente Fehling [69]. As concentrações obtidas com a volumetria e com o procedimento proposto estão expressas na Tabela 9. Também nesta tabela é apresentada a classificação dos vinhos segundo o percentual de AR (Tabela 1 - Regulamento Vitivinícola do Mercosul).

Tabela 9 – Concentrações de açúcar redutor em amostras de vinho

Amostra	Procedimento Proposto % (m/v)	Método Fehling % (m/v)	Classificação*	Cor
1	1,61±0,04	1,58±0,09	Demi-sec	Branco
2	2,57±0,05	2,56±0,06	Suave	Branco
3	3,84±0,11	3,69±0,25	Suave	Branco
4	0,49±0,04	0,49±0,06	Demi-sec	Branco
5	2,38±0,04	2,36±0,17	Demi-sec	Rose
6	2,92±0,04	2,87±0,29	Suave	Rose
7	0,44±0,07	0,43±0,07	Demi-sec	Tinto
8	4,13±0,05	4,35±0,13	Suave	Tinto

*Resolução 45/96 do Grupo Mercado Comum (GMC) em Buenos Aires 21/04/1996.

O resultado da aplicação do teste-*t* pareado entre os resultados obtidos pelo método oficial e os resultados obtidos pelo procedimento proposto resultou em $t = 0,17$, sendo que o valor crítico para sete graus de liberdade e nível de confiança de 95% é de 2,36, indicando não existir diferença significativa entre os conjuntos de dados.

2.6.9 Figuras de mérito – AR

A Tabela 10 exibe as características obtidas com o sistema analítico para determinação de açúcares redutores em vinho.

Tabela 10 – Figuras de mérito

Parâmetro	Valor
Tempo para início de operação	15 min
Temperatura de operação	50 °C
Frequência de amostragem	75 h ⁻¹ (48 s det ⁻¹)
Volume de amostra / reagente	10 µL / 220 µL
Faixa linear	0,75 % - 6 % (m/v n = 4)
Limite de detecção	0,14 % (m/v n = 11)
Coefficiente angular	-0,0402
Correlação (r ²)	0,999
d.p.r.	< 4% (n = 4)

O tempo para início de operação é o intervalo médio necessário para que a temperatura da câmara atinja o valor de 50 °C a partir de uma temperatura ambiente em torno de 25 °C. O desvio padrão relativo foi calculado utilizando a solução padrão de 3 % de frutose.

Na Tabela 11 é exposta uma comparação de características analíticas do presente sistema com as de outros trabalhos existentes para a determinação de açúcares redutores por análises em fluxo. Comparando-se essas características, observa-se que o sistema desenvolvido com a utilização da câmara com aquecimento direto e fotômetro acoplado, tem como pontos fortes a dimensão reduzida, frequência analítica elevada, dispensa o pré-tratamento da amostra (processo demorado e que consome volume significativo das amostras) e reduzidos volumes de amostra e de resíduo.

Tabela 11 – Comparação de métodos de análise por injeção em fluxo para determinação de açúcares redutores

Trabalho/ referência	Sistema	Limite Detec	Faixa	RSD (%)	Amostra (μ L)	Frequência (/h)	Pré Tratamento
Presente	FIA Fotométrico	0,25%	0,75-6 (%)	<4	10	75	Sonicação amostras frisantes
70	FIA Fotométrico	0,12%	0,2-0,8 (%)	< 2		32	Secagem, moagem, solubilização
71	FIA Fotométrico		0,14-16,25 (%)	2,3	30-125	>10	Nenhum
72	FIA Fotométrico	0,025 0,0007 0,003 (g L ⁻¹)	0,025-1,5 0,004-0,04 0,08-0,6 (g L ⁻¹)	2	300 300 20	50 40 30	Diluição e clarificação
73	FIA Fotométrico	-	0,15-0,72 (%)	1,72	143	40	Clarificação
74	FIA Fotométrico	-	0,3-2,75 0,05-7,0 1,0-6,0 (g L ⁻¹)	2,88 1,61 3,13	230	40 50 40	Diluição e clarificação
75	FIA Potenciomé --trico	-	2,5-20 (%)	< 4	150	50	Sonicação em todas soluções

2.7 Manganês em Amostras Vegetais

Para a determinação de manganês, foi empregada a estrutura do módulo de análise desenvolvido para a determinação açúcares redutores com algumas modificações. O *software* de controle de dispositivos e aquisição de dados também foi modificado para acompanhar as mudanças na estrutura. Foi realizada a incorporação de dispositivo para dosagem de solução para limpeza (cloridrato de hidroxilamina) diretamente à câmara, com a inserção da válvula de três vias V₄ (161T031 12VDC NResearch) e um tubo de bombeamento cinza/cinza (na bomba peristáltica). Foi alterado o sistema transportador de amostra com a inserção da válvula *pinch* V₅ (225P091-11 12VDC NResearch) para permitir o transporte das soluções com ar, evitando assim a diluição do complexo formado e aumentando assim a sensibilidade, e por fim, foi realizada modificação no

trap do sistema de extração com a incorporação de um erlenmeyer adicional para possibilitar a retenção de substâncias voláteis da reação. O LED do fotômetro foi substituído por outro com 520 nm de comprimento de onda de máxima emissão. Na Figura 21 é possível ver a estrutura do sistema analítico.

2.7.1 Operação do módulo de análise para determinação de manganês

O módulo de análise mostrado na Figura 21 opera da seguinte forma: quando o programa de controle é iniciado, a bomba peristáltica inicia um acionamento escalonado (incremento de velocidade) com duração de 4 s, que tem como objetivo de portar o sistema da inércia para o valor nominal de forma suave. Um intervalo adicional de 12 s é necessário para preencher os tubos de bombeamento com as soluções até as válvulas. Na sequência, as válvulas V_1 e V_2 (amostra e reagente respectivamente) são acionadas durante 4 s para o preenchimento das linhas de fluxo até a confluência. Em seguida, as válvulas V_3 e V_5 são acionadas por 12 s para a limpeza, com solução transportadora, do canal de transporte até a câmara. A bomba de vácuo é mantida ligada nesta etapa para manter a câmara vazia.

O ciclo analítico é iniciado com a inserção da alíquota da amostra e da solução do reagente via o acionamento alternado das válvulas V_1 e V_2 . O volume dessas alíquotas é função da vazão de bombeamento e do intervalo de tempo de acionamento da respectiva válvula solenoide. O intervalo de tempo para o acionamento das válvulas foi mantido em 1 s para cada válvula por 20 s e foram programados dez ciclos de amostragem. Em vista disso, o volume interno da alça de amostragem é preenchido com uma sequência de alíquotas da amostra em tandem com alíquotas da solução de reagente. Em seguida, a bomba de vácuo é acionada durante 12 s para secar a câmara. Após esta etapa, é acionada a válvula V_3 durante 10 s, deslocando com ar a solução armazenada na bobina para a câmara. No interior da câmara, a mistura das soluções da amostra e do reagente é aquecida, favorecendo o desenvolvimento da reação. Ao mesmo tempo, o sinal produzido pelo fotômetro em função do composto formado, é monitorado pelo computador e exibido no vídeo, permitindo o acompanhamento visual da formação composto em tempo real, esta etapa tem a duração de 40 s.

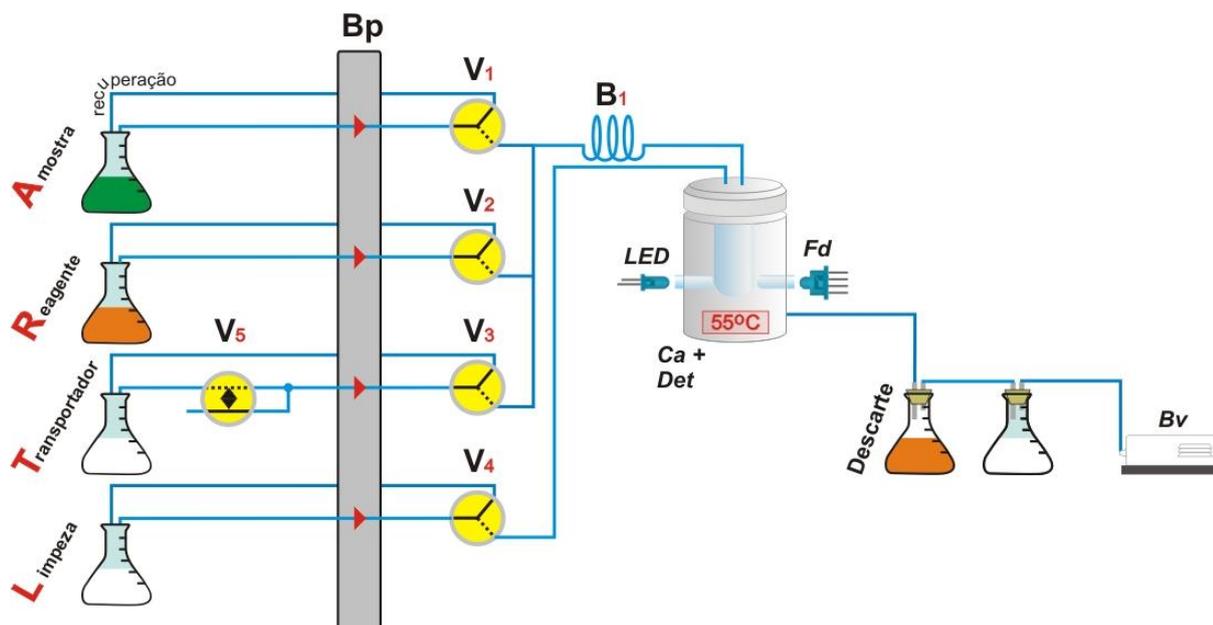


Figura 21 – Diagrama do sistema analítico para determinação de manganês. Legenda: Bp = Bomba peristáltica *home made*; V₁, V₂, V₃, V₄, V₅ = Válvulas 3 vias 161T031 12VDC NResearch; V₅ = Válvulas pinch 225P09 12VDC NResearch; B₁ = Bobina misturadora; Ca+Det = Câmara *flow-batch* aquecida + Fotodetector; LED = Diodo emissor de luz 520 nm; Fd = Fotodetector OPT301, Texas Instruments; Bv = Bomba de vácuo *home made*

A etapa de sucção de solução da câmara é realizada mediante o acionamento da bomba de vácuo por 12 s, seguido de um período de espera de 10 s para estabilização da pressão dentro dos frascos do *trap* que armazenam os resíduos e a solução para neutralização de vapores.

Na etapa de lavagem, uma alíquota de solução transportadora é inserida na câmara. Isto é realizado acionando-se as válvulas V₃ e V₅, e após 5 s a válvula V₅ é desligada, permanecendo apenas a válvula V₃ acionada por mais 30 s, a solução permanece na câmara por um intervalo de 20 s e em seguida um ciclo de sucção de 22 s é realizado.

A Tabela 12 ilustra a sequência de acionamento dos componentes do sistema, e os respectivos tempos em cada uma das etapas do processo analítico.

Tabela 12 – Sequência de acionamento dos componentes do sistema para determinação de manganês. Bp = Bomba peristáltica; V₁, V₂, V₃, V₄, V₅ = Válvulas de três vias; Bv = Bomba de vácuo. Dígito 1 = componente do sistema acionado; dígito 0 = componente do sistema desligado

Etapa	Evento	Bp	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	B _v	Tempo (s)	Obs
Inicialização	Incremento gradual	1	0	0	0	0	0	0	4	Velocidade 20, 50 e 90%
	Enchimentos tubos	1	0	0	0	0	0	0	12	Bomba e válvulas
	Enchimento tubos até a confluência	1	1	1	0	0	0	0	4	Reagente e amostra
	Limpeza canal transporte	1	0	0	1	0	1	1	12	
Ciclo analítico	Dosagem	1	1	1	0	0	0	0	20	10 ciclos alternados
	Sucção câmara	1	0	0	0	0	0	1	22	
	Transporte	1	0	0	1	0	0	0	10	
	Leitura	1	0	0	0	0	0	0	40	
Sucção	Sucção câmara	1	0	0	0	0	0	1	12	
	Espera	1	0	0	0	0	0	0	10	
Limpeza	Solução	1	0	0	0	1	0	0	8	
	Limpeza	1	0	0	0	0	0	0	6	
	Etapa Sucção								22	(conf. etapa indicada)
	Etapa de Lavagem								77	(conf. etapa indicada)
Lavagem	Transportador	1	0	0	1	0	1	0	5	
	Espera	1	0	0	1	0	0	0	50	
	Sucção	1	0	0	0	0	0	0	22	

Devido à deposição de sólidos nos cilindros de vidro usados como guias de onda para a transmissão da radiação para dentro da câmara e desta para o detector, a intensidade do sinal lido do fotômetro é reduzida. Quando a intensidade referente a leitura do branco se reduz a 50% do valor obtido na calibração inicial, é realizada uma etapa de limpeza destes componentes. Ela consiste no acionamento da válvula V₄ durante 8 s, introduzindo assim a solução de limpeza na câmara, após um intervalo de tempo de 6 s é realizado um ciclo de sucção da câmara, seguido de uma etapa de lavagem, conforme descritas anteriormente.

2.7.2 Avaliação dos comprimentos de onda de absorção e emissão máximos

O procedimento analítico em apreço é baseado na reação de oxidação do manganês (Mn^{2+}) para permanganato, utilizando periodato de sódio como agente oxidante. A literatura consultada [21] indica o comprimento de onda em torno de 522 nm como adequado para determinação espectrofotométrica de permanganato. Em vista disso, neste trabalho foi realizado um estudo preliminar para confirmar o comprimento de onda de máxima absorção do complexo, visando à seleção adequada do LED usado como fonte de radiação. Este estudo foi realizado com uma varredura espectrofotométrica, utilizando uma solução do composto colorido, obtida misturando 2 mL de uma solução de manganês (15 mgL^{-1}) com 2 mL^{-1} da solução do reagente oxidante (10,0% (m/v) de $NaIO_4$ preparado em H_2SO_4 $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $0,36 \text{ mmolL}^{-1}$ de $KMnO_4$).

O espectro de absorção do permanganato foi obtido empregando-se um espectrofotômetro modelo USB4000 (Ocean Optics Inc) configurado no modo absorção, utilizando como fonte de radiação uma lâmpada de halogênio/tungstênio (LS-1 *tungsten halogen*) e uma cubeta de vidro óptico com caminho óptico de 10 mm. Usando o mesmo equipamento foi realizada uma varredura do espectro de emissão do LED. Os resultados referentes aos dois espectros são mostrados na Figura 22.

Observa-se que o espectro de emissão do LED está contido dentro de espectro de absorção do complexo gerado na reação do manganês com o periodato, portanto este LED pode ser usado como fonte de radiação. Além disso, o máximo de emissão do LED está próximo do máximo de absorção do complexo. Adicionalmente, há outras considerações que corroboram para esta escolha. A largura de meia banda do espectro de emissão do LED é de 40 nm e está centralizada em relação ao espectro de absorção do complexo que é de 84 nm, dado relevante, pois quanto mais estreita a janela do espectro de emissão, menor a possibilidade de ocorrerem interferências de outras espécies químicas concomitantes.

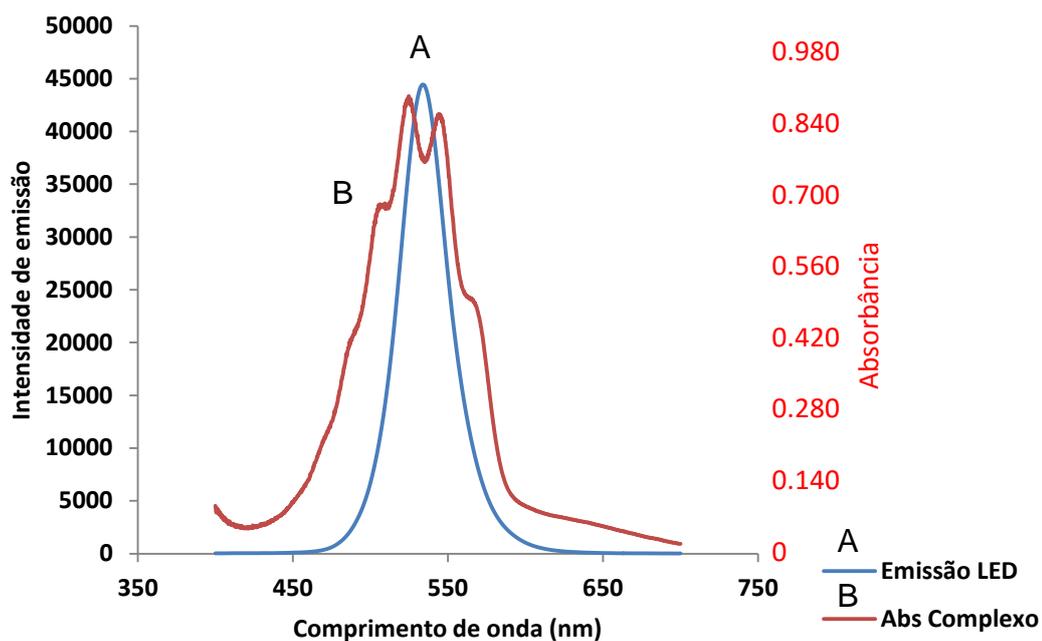


Figura 22 – Espectro de absorção e emissão. A = Espectro de emissão do LED 520 nm e B = Espectro de absorção do complexo reagente contendo $Mn^{2+}+NaIO_4+KMnO_4$. Espectros produzidos com USB4000 *Miniature Fiber Optic Spectrometer* Ocean Optics Inc, Fonte de luz LS-1 *tungsten halogen*, Software *SpectraSuite*

2.7.3 Efeito da concentração do reagente

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da concentração do reagente periodato de sódio ($NaIO_4$) sobre a sensibilidade do método. Os experimentos foram realizados utilizando soluções padrão contendo 10, 20 e 30 mgL^{-1} de manganês (II). As soluções do reagente oxidante foram preparadas nos dias de uso com as seguintes concentrações 6, 8 e 10% (m/v) de periodato de sódio. Para estes ensaios, a temperatura na câmara foi ajustada para 55 °C (estudado apresentado no tópico 2.7.5). Os resultados são mostrados no Figura 23.

As curvas do Figura 23 e a Tabela 13 demonstram um aumento da sensibilidade com o incremento da concentração do reagente oxidante, sem prejuízo para a linearidade. A concentração de 10 % (m/v) do reagente colorimétrico oxidante utilizado, representa a máxima solubilidade do mesmo possível de se obter em meio aquoso à temperatura de 25 °C, portanto soluções mais concentradas não foram avaliadas. A solução com concentração de 10 % (m/v) foi então escolhida para os experimentos subsequentes.

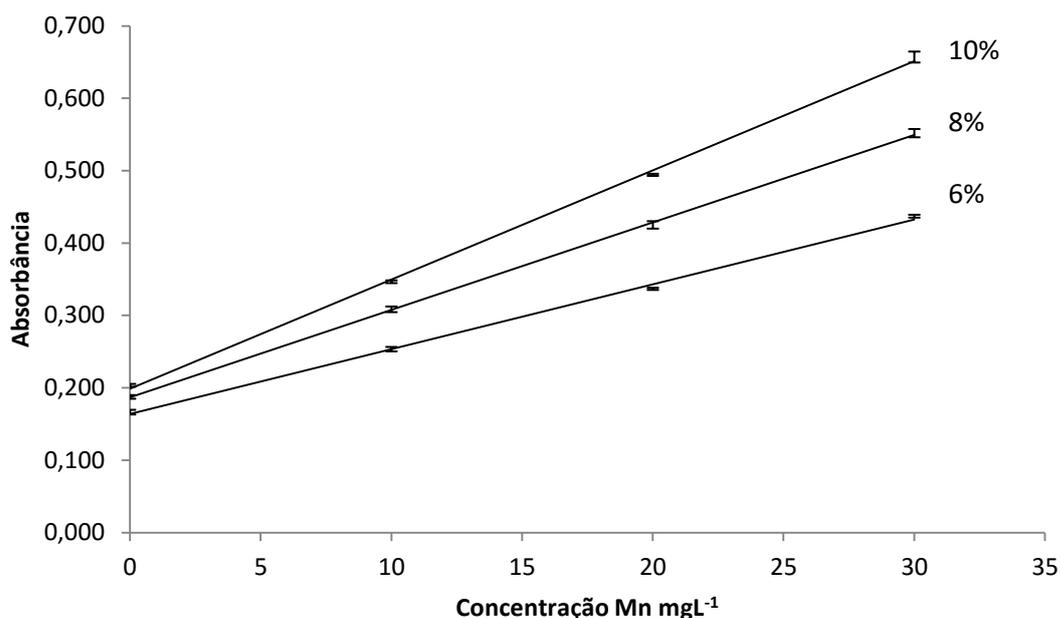


Figura 23 – Efeito da concentração em padrões de Mn na faixa entre 0 a 30 mgL⁻¹ reagindo com concentrações variáveis de NaIO₄: 6, 8 e 10 % (m/v)

Tabela 13 – Dados das curvas do estudo de concentração de NaIO₄

Conc. NaIO ₄	6%	8%	10%
C. Angular	0,009	0,012	0,015
C. Linear	0,164	0,187	0,199
Correlação	0,998	0,999	0,999

2.7.4 Efeito da variação da concentração do catalisador

As curvas da Figura 24 mostram que a adição de MnO₄⁻ na solução do oxidante (IO₄), acelera o desenvolvimento da reação de oxidação.

Com objetivo de encontrar a concentração de permanganato adequada, experimentos foram realizados variando-se as concentrações de permanganato na solução do oxidante (10% (m/v) KIO₄ em meio H₂SO₄ 0,75 mol.L⁻¹) e utilizando uma solução padrão de 15 mgL⁻¹ de Mn²⁺.

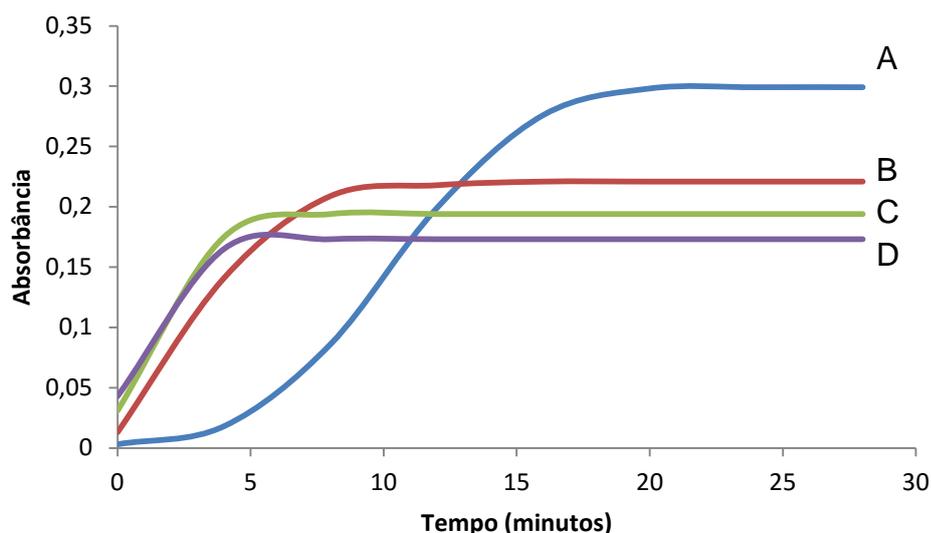


Figura 24 – Estudo do efeito catalítico do permanganato na determinação de Mn utilizando uma solução de 10% (m/v) de KIO_4 em meio H_2SO_4 $0,75 \text{ mol.L}^{-1}$. Os gráficos de A a D representam as concentrações de permanganato adicionadas à solução oxidante em concentração de 0, 0,36, 0,72 e $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, respectivamente

Observa-se que é significativa, a redução do intervalo de tempo necessário para reação de oxidação alcançar o estado de equilíbrio, e que a absorbância registrada em equilíbrio tende para um valor constante com as concentrações de 0,36 a $1,00 \text{ molL}^{-1}$. Observa-se que há uma redução significativa da magnitude do sinal com o aumento da concentração do catalisador na condição de equilíbrio.

Um outro efeito secundário e indesejável também foi observado no sistema, a deposição de precipitado nas guias de luz do fotômetro. Esta deposição causa a redução do sinal analítico, exigindo limpeza periódica. As soluções com concentrações de 0,72 e $1,00 \text{ mmolL}^{-1}$, produziram proporcionalmente maiores deposições. Vistas estas observações, a solução de $0,36 \text{ mmolL}^{-1}$ (KMnO_4) foi selecionada.

2.7.5 Efeito da temperatura sobre o tempo da reação

O aumento da temperatura do meio reacional e a adição de permanganato (KMnO_4), aceleram o desenvolvimento da reação de oxidação do manganês (Mn^{2+}). Tendo em vista estes aspectos, foi avaliado o desenvolvimento do composto formado em função da temperatura da câmara *flow-batch* com a adição de permanganato à solução do reagente oxidante. Os experimentos foram realizados

empregando-se uma solução padrão de manganês (Mn^{2+}) com concentração de 15 mg.L^{-1} e soluções de $NaIO_4$ 10 % (v/v) com e sem adição permanganato, preparadas em H_2SO_4 $0,75\text{ mol.L}^{-1}$, os resultados são mostrados no Figura 25.

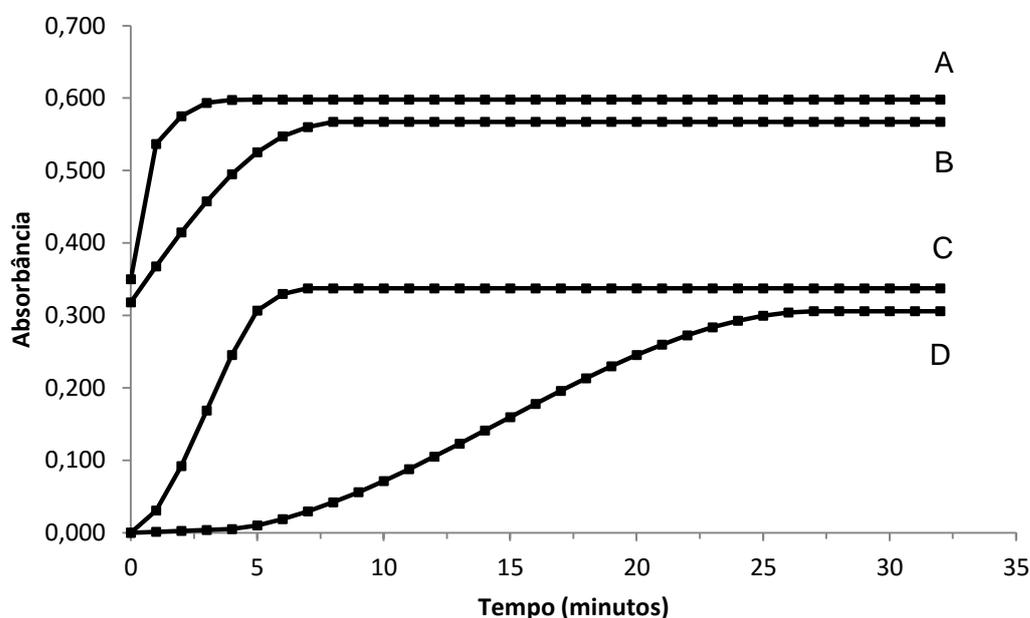


Figura 25 – Efeito da temperatura e da adição de $KMnO_4$ sobre o tempo de reação: curva A = temperatura de $60\text{ }^\circ\text{C}$ + $KMnO_4$; curva B = temperatura de $26\text{ }^\circ\text{C}$ + $KMnO_4$; curva C = temperatura de $60\text{ }^\circ\text{C}$; curva D = temperatura de $26\text{ }^\circ\text{C}$

As curvas A e B da Figura 25 foram obtidas utilizando a solução reagente 10% (m/v) KIO_4 com a adição de $0,36\text{ mmol.L}^{-1}$ de $KMnO_4$ em meio H_2SO_4 $0,75\text{ mol.L}^{-1}$, padrão de manganês com concentração de 15 mg.L^{-1} e temperatura câmara de 26 e $60\text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente. Elas demonstram uma acentuada redução no tempo, com o aumento da temperatura, para que a magnitude do sinal gerado atinja o equilíbrio de aproximadamente 7,5 para 2,5 min.

As curvas C e D da Figura 25 foram obtidas utilizando a solução reagente 10% (m/v) KIO_4 em meio H_2SO_4 $0,75\text{ mol.L}^{-1}$, padrão de manganês com concentração de 15 mg.L^{-1} e temperatura câmara de 26 e $60\text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente. Analogamente elas demonstram que o tempo para que a magnitude do sinal gerado atinja o equilíbrio, com o aumento da temperatura, sofre uma redução de aproximadamente 27 para 7,5 min.

Observou-se que esse aumento na temperatura ($34\text{ }^\circ\text{C}$) acelerou a reação da solução que continha permanganato assim como a que não continha em cerca de 3x.

A aceleração da reação por aquecimento possibilitou a obtenção de uma frequência analítica de 40 amostras por hora contra 15, sem a utilização dos recursos, mantendo-se uma sensibilidade equivalente.

2.7.6 Avaliação da estabilidade da solução reagente

Este estudo teve como objetivo avaliar eventuais variações no sinal analítico em decorrência do tempo de preparo da solução reagente. Os experimentos foram realizados usando como oxidante uma solução contendo 10% KIO_4 + $0,36 \text{ mmolL}^{-1}$ KMnO_4 em meio H_2SO_4 $0,75 \text{ molL}^{-1}$ e soluções padrão de manganês com concentração de 5, 15 e 30 mg.L^{-1} . A temperatura câmara de foi mantida em 55°C .

O estudo foi realizado entre os meses de junho e julho de 2015, em que a temperatura média do laboratório apresentava valores na faixa de $18\text{-}26^\circ\text{C}$. A solução ficou armazenada no laboratório em frasco recoberto com papel alumínio e sem refrigeração.

Os resultados de absorvância x tempo de armazenamento do reagente obtidos são exibidos na Figura 26.

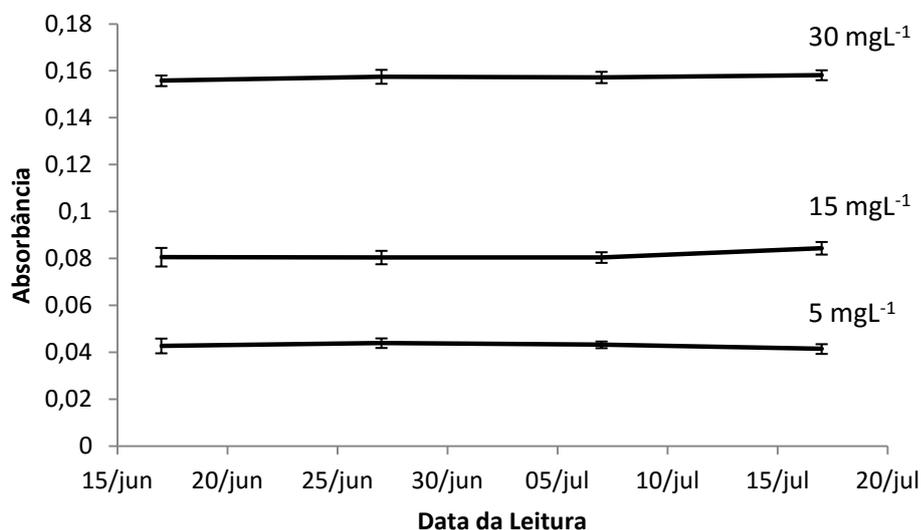


Figura 26 – Efeito do tempo sobre o reagente armazenado

Os coeficientes de variação entre as medidas ao longo do período de estudo (30 dias), para cada uma das três concentrações avaliadas apresentaram variação inferior a 2%, demonstrando a estabilidade desta solução reagente no período.

2.7.7 Avaliação da estabilidade do fotômetro x número de ciclos analíticos

Este estudo teve como objetivo avaliar eventuais mudanças no sinal analítico, causadas pela deposição de precipitado sobre os guias de onda do fotômetro acoplado a câmara. Os ensaios foram realizados utilizando a solução do reagente oxidante (10% m/v KIO_4 + $0,36 \text{ mmolL}^{-1} \text{ KMnO}_4$) em meio ácido ($0,75 \text{ molL}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$), e solução padrão de manganês com concentração de 30 mgL^{-1} . A temperatura da câmara foi mantida em $55 \text{ }^\circ\text{C}$.

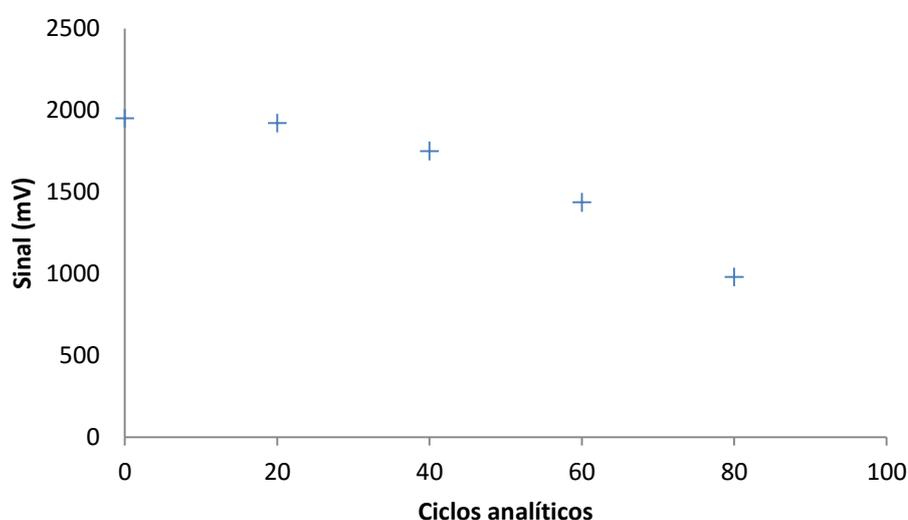


Figura 27 – Efeito do número de ciclos analíticos sobre o sinal de transmitância

Os valores de sinal apresentados na Figura 27 referem-se a leitura em mV da solução de referência (utilizada para o ajuste do valor de 100 % de transmitância do fotômetro), cujo valor inicial foi fixado em 2000 mV.

Após 80 ciclos analíticos, utilizando a solução padrão de 30 mgL^{-1} , o sinal produzido pelo fotômetro para o branco apresentou uma atenuação de aproximadamente 50%. O estudo propositalmente utilizou a solução padrão de maior concentração da faixa analítica com objetivo de intensificar o efeito, determinando assim o pior caso.

Durante a operação do sistema, sempre que a intensidade do sinal recebido do fotômetro sofre uma redução de 50 % em relação ao valor da calibração inicial com branco, é realizada uma etapa de limpeza utilizando a solução de cloridrato de hidroxilamina $0,1 \text{ molL}^{-1}$, este procedimento é descrito em detalhes no item 2.7.1 (operação do módulo).

2.7.8 Efeito de potenciais interferentes

Os íons ferro, cálcio e magnésio são os elementos químicos potencialmente interferentes que se apresentam em maiores concentrações em amostras vegetais [37]. Visando avaliar se estes elementos causam ou não interferência, experimentos foram realizados usando soluções padrão de Mn^{2+} com concentrações de 5, 15 e 30 mgL^{-1} , com e sem a presença destes, em concentrações atingindo os valores máximos indicados pela literatura [37].

Tabela 14 – Avaliação da interferência de ferro na determinação de manganês

Padrão Mn	Interferente (Fe^{3+})			
	0 mgL^{-1}	50 mgL^{-1}	100 mgL^{-1}	150 mgL^{-1}
5 mgL^{-1}	0,2489±0,007	0,2470±0,003	0,2504±0,002	0,2547±0,017
15 mgL^{-1}	0,3650±0,003	0,3711±0,016	0,3695±0,005	0,3709±0,014
30 mgL^{-1}	0,5584±0,012	0,5627±0,012	0,5662±0,014	0,5659±0,018

Tabela 15 – Avaliação da interferência de cálcio na determinação de manganês

Padrão Mn	Interferente (Ca^{2+})			
	0 mgL^{-1}	1000 mgL^{-1}	2500 mgL^{-1}	5000 mgL^{-1}
5 ppm	0,2574±0,007	0,2527±0,004	0,2582±0,007	0,2445±0,008
15 ppm	0,3669±0,009	0,3793±0,011	0,3757±0,010	0,3614±0,015
30 ppm	0,5740±0,015	0,5757±0,002	0,5688±0,002	0,5625±0,025

Tabela 16 – Avaliação da interferência de magnésio na determinação de manganês

Padrão Mn	Interferente (Mg^{2+})			
	0 mgL^{-1}	500 mgL^{-1}	1000 mgL^{-1}	2000 mgL^{-1}
5 ppm	0,2559±0,003	0,2620±0,004	0,2648±0,008	0,2648±0,003
15 ppm	0,3733±0,006	0,3715±0,003	0,3657±0,001	0,3707±0,001
30 ppm	0,5538±0,001	0,5512±0,004	0,5547±0,005	0,5433±0,006

As Tabelas 14, 15 e 16 compilam os resultados do estudo de interferência de ferro, cálcio e magnésio na determinação das concentrações de manganês.

Normalmente, a metodologia utilizada para avaliar se ocorreu interferência envolve o processamento de uma solução padrão do analito com e sem adição da

espécie química interferente. O critério para decidir se a espécie química investigada interfere no resultado é uma variação de sinal em uma faixa mais ampla que $\pm 5\%$, considerando como referência, o sinal obtido com a solução do analito sem o possível interferente. Aplicando este critério aos dados das Tabelas 14, 15 e 16, observa-se que não ocorreu variação significativa de sinais para os três cátions investigados, portanto essas espécies químicas, nas concentrações estudadas, não causaram interferência na determinação de manganês proposta neste trabalho.

Em amostras digeridas em meio ácido, o magnésio encontra-se em seu estado máximo de oxidação (Mg^{2+}), portanto não seria esperado atuasse como interferente na reação de oxidação do manganês [21]. Entretanto, o ferro possui dois estados de oxidação, podendo ser, portanto um potencial interferente quando no seu estado de oxidação Fe^{2+} . O recurso recomendado na literatura para evitar interferências dessa natureza, é a operação em meio ácido. No presente trabalho, o meio reacional é ácido, portanto não seria viável a formação de hidróxido a partir do íon Fe^{2+} , que poderia absorver radiação e causar interferência. Já o cálcio (Ca^{2+}) poderia apresentar interferência pelo efeito matriz e, portanto a relevância da avaliação do seu possível efeito, que não foi verificado nas concentrações estudadas.

2.7.9 Determinação de Mn em Amostras Vegetais

Tendo sido selecionadas as condições operacionais, Mn^{2+} foi determinado em um conjunto variado de digeridos de amostras vegetais e os resultados são apresentados na Tabela 17. A exatidão foi averiguada comparando-se esses resultados com os obtidos por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente. A aplicação do teste-*t* pareado entre os conjuntos de dados obtidos onde foi encontrado o valor de 0,61, sendo o valor tabelado para oito graus de liberdade igual a 2,31, indicando que não há diferença significativa para um nível de confiança de 95%. Outras características favoráveis, tais como frequência analítica de 40 determinações por hora, consumo da solução reagente de 332 μL (33 μg de $NaIO_4$) por determinação e limite de detecção de 2 $mg L^{-1}$ também foram obtidas.

Tabela 17 – Concentrações de manganês nos digeridos de amostras vegetais analisadas pelo procedimento proposto e pelo método de referência

Amostras	Procedimento Proposto (mgL ⁻¹)	Referência ICPOES (mgL ⁻¹)
Folha de Palmeira	654,1 ±47,9	596,3 ±02,8
Folha de Codia	608,8 ±16,4	602,3 ±15,8
Grão de Soja	038,7 ±01,2	029,6 ±00,7
Folha de Arroz	507,6 ±06,3	482,1 ±05,8
Folha de Cana de Açúcar	084,3 ±00,4	086,0 ±01,7
Folha de Soja	224,5 ±04,0	235,3 ±02,6
Folha de Café	305,6 ±12,2	298,0 ±03,9
Folha de Banana	647,9 ±08,4	694,7 ±12,0
Folha de Milheto	046,4 ±01,5	041,7 ±00,3

2.7.10 Figuras de mérito – Mn

A Tabela 18 apresenta as características analíticas do procedimento proposto.

Tabela 18 – Figuras de mérito do sistema para determinação de manganês

Figuras de mérito	Valor
Tempo para início de operação	20 min
Temperatura de operação	55 °C
Frequência amostragem	40 h ⁻¹
Volume amostra / reagente	332 / 166 µL
Limite de detecção	2,0 mgL ⁻¹ (n = 11)
Faixa linear	5,0 – 30,0 mgL ⁻¹
Correlação (r ²)	0,998
d.p.r.	5 % (n = 4)

O tempo para início de operação é o intervalo médio necessário para que a temperatura da câmara atinja o valor de 55 °C a partir de uma temperatura ambiente em torno de 25 °C. O desvio padrão relativo foi calculado utilizando o padrão de 15 mgL⁻¹ de manganês.

Na Tabela 19 é realizada uma comparação de características analíticas do presente procedimento com outros existentes para determinação de manganês por análise em fluxo. Comparando-se as características, observa-se que o sistema desenvolvido com a utilização da câmara com aquecimento direto com fotômetro

acoplado e demais estratégias adotadas apresentou uma frequência amostragem significativamente mais alta, volume de amostra médio entre os demais, faixa linear e limite de detecção adequados a proposta.

Tabela 19 – Comparação de métodos de análise por injeção em fluxo para determinação de manganês em amostras vegetais

Trabalho/ referência	Sistema	Limite Detecção (mg L-1)	Faixa (mg L-1)	RSD (%)	Amostra (uL)	Frequência (h)
Presente	FIA Fotométrico	1,36	5-30	5	410	40
76	FIA Fotométrico	0,031	0.047-4.50	<1,85	20	24
77	FIA Fotométrico	8×10^{-5}	3×10^{-4} á 3×10^{-3}		1000	15
78	FIA Fotométrico	0,38	1-20	<1,35	20	-
79	FIA Fotométrico*	$5,5 \times 10^{-9}$	55×10^{-9} á 550×10^{-9}	3	11000	10

*com fotomultiplicadora

3. CONCLUSÕES

O sistema para determinação de açúcares redutores em vinho desenvolvido com a utilização da câmara *flow-batch* com aquecimento direto e fotômetro acoplado, demandou um volume de amostra reduzido e obteve uma frequência de amostragem significativamente mais elevada em comparação a outros sistemas que operam com a mesma técnica, além de dispensar o prévio tratamento da amostra.

Da mesma forma o sistema para determinação de manganês em amostras vegetais apresentou uma frequência de amostragem superior a outros sistemas com as mesmas características. Vale destacar que ambos os sistemas propostos dispensaram qualquer tipo de dispositivo de desborbulhamento, permitindo ainda que as leituras sejam realizadas à temperatura constante sem a necessidade de resfriamento ou transporte da solução para outro componente do sistema.

A qualidade dos resultados apresentados pelos sistemas indica que as estratégias previstas quando do projeto inicial foram extremamente positivas.

O que leva a concluir-se que a câmara representa uma solução eficiente para sistemas analíticos baseados em reações lentas e adequada para operação em sistemas de análise em fluxo.

REFERÊNCIAS

- 1 REIS, B. F. Chemical analysis by flow injection: twenty years of development. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, p. 51-58, 1996.
- 2 REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, E. A. M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**, São Paulo, v. 12, p. 82-91, 1989.
- 3 PASQUINI, C. **Instrumentação e metodologia para análise em fluxo contínuo: desenvolvimento de um entalpímetro de fluxo, de um sistema monosegmentado e construção de um circuito retentor de picos**. 1984. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1984.
- 4 MALCOLME-LAWES, D. J.; PASQUINI, C. A novel approach to non-segmented flow analysis. Part 2. A prototype high-performance analyser. **Journal of Automatic Chemistry**, London, v. 10, p. 25-30, 1988.
- 5 ARAÚJO, A. N.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G. Multicommutation in flow analysis. Part 3. Spectrophotometric kinetic determination of creatinine in urine exploiting a novel zone sampling approach. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 310, p. 447-452, 1995.
- 6 SMIDERLE, M.; REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P. Monosegmented flow system exploiting multicommutation applied to spectrophotometric determination of manganese in soybean digests. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 386, p. 129-135, 1999.
- 7 KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B. **Introduction to microwave sample preparation: theory and practice**. Washington, DC: American Chemical Society, 1988.
- 8 SMIDERLE, M.; TOMAZZI, M. C.; REIS, B. F. Development of a micro-heater for flow analysis systems: spectrophotometric determination of manganese in plant digest. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 50-54, 2004.
- 9 SAKAI, T.; TANAKA, S.; TESHIMA, N.; YASUDA, S.; URA, N. Fluorimetric flow injection analysis of trace amount of formaldehyde in environmental atmosphere with 5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione. **Talanta**, Amsterdam, v. 58, p. 1271-1278, 2002.
- 10 MESQUITA, M.; JACINTHO, A. O.; ZAGATTO, E. A. G.; ANTONIO, R. F. Autocatalysis in the spectrophotometric flow-injection determination of manganese as permanganate: soil, plant and rock analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 1, p. 28-34, 1990.
- 11 ALVES, E. R.; FERES, M. A.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, L. F. C. Exploiting pulsed flows for heating improvement: application to determination of total reducing sugars in molasses and sugar-cane juices. **Current Analytical Chemistry**, Sharjah, v. 5, p. 65-69, 2009.

12 HONORATO, R. S.; ARAÚJO, M. C. U.; LIMA, R. A. C.; ZAGATTO, E. A. G.; LAPA, R. A. S.; COSTA LIMA, J. L. F. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimization algorithm for end point search. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 396, p. 91–97, 1999.

13 GARCIA, A. J. C.; REIS, B. F. Instrumentation and automated photometric titration procedure for total acidity determination in red wine employing a multicommutated flow system. **Journal of Automated Methods and Management in Chemistry**, New York, v. 385, n. esp., p. 1-8, 2006.

14 HONORATO, R. S.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, R. A. C.; ARAÚJO, M. C. U. Prior assay as an approach to flow titrations: spectrophotometric determination of iron in alloys and ores. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 416, p. 231–237, 2000.

15 ALMEIDA, L. F.; MARTINS, V. L.; SILVA, E. C.; MOREIRA, P. N. T.; ARAÚJO, M. C. U. Implementation of an automatic standard addition method in a flow–batch system: application to copper determination in analcoholic beverage by atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 486, p. 143–148, 2003.

16 LIMA, M. B.; BARRETO, I. S.; ANDRADE, S. I. E.; 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**, Amsterdam, v. 98, p. 118–122, 2012.

17 LAVORANTE, A. F.; FERES, M. A.; REIS, B. F. Multi-commutation in flow analysis: a versatile tool for the development of the automatic analytical procedure focused on the reduction of reagent consumption. **Spectroscopy Letters**, New York, v. 39, p. 631–650, 2006.

18 CRISPINO, C. C.; REIS, B. F. Development of a multicommutated flow analysis procedure for photometric determination of total N-ureide in soybean tissues. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 24, p. 541-549, 2013.

19 MONTE-FILHO, S. S.; LIMA, M. B.; ANDRADE, S. I.; HARDING, D. P.; FAGUNDES, Y. N.; SANTOS, S. R.; LEMOS, S. G.; ARAÚJO, M. C. Flow–batch miniaturization. **Talanta**, Amsterdam, v. 86, p. 208–213, 2011.

20 FRIEDEMANN, T. E.; WEBER, C. W.; WITT, N. F. Determination of reducing sugars by oxidation in alkaline ferricyanide solution. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 4, p. 358-377, 1962.

21 MEHLIG, J. P. Colorimetric determination of manganese with periodate. **Industrial and Engineering Chemistry-Analytical**, Washington, DC, v. 11, p. 274–277, 1939.

22 MERCOSUL. **Resolução nº 45/96 de 21 de abril de 1996. Regulamento vitivinícola do Mercosul. Buenos Aires: Grupo Mercado Comum, 1996.** Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/reg_vit_mercosul.doc>. Acesso em: 27 jul. 2013.

23 RAVEN, P. H.; EVERT, R. E.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

24 AMARANTE, J. O. A. **Os segredos do vinho**: para Iniciantes e iniciados. 3. ed. São Paulo: Mescla Editorial, 2010. 619 p.

25 GALACHO, P. C. **A química “doce” do vinho**. Évora, Portugal: Universidade de Évora, 2007. Disponível em: <http://home.uevora.pt/~ueline/quimica_para_todos/a_quimica_doce_do_vinho.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2016.

26 PINHO, M. P. G. **Manual de enologia**. Santa Maria Lamas, Portugal: Cincork. Disponível em: <<http://opac.iefp.pt:8080/images/winlibimg.exe?key=&doc=42438&img=562>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

27 ALPUIM, J. P. Aprendendo a química do vinho. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, Lisboa, n. 65, p. 13-27, 1997.

28 OETTERER, M. **Mono e dissacarídeos**: propriedades dos açúcares. Piracicaba: ESALQ-USP. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Mono%20e%20Dissacarideos%20-%20Propriedades%20dos%20Acucares.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

29 ALVES, E. R.; BORGES, E. P.; BARROS, V. A. F.; ZAGATTO, E. A. G. Determinação de açúcares redutores totais empregando sistemas de análise por injeção em fluxo. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 19, p. 74-77, 2005.

30 MATTOS, I. L.; ZAGATTO, E. A. G.; JACINTHO, A. O. Spectrophotometric flow-injection determination of sucrose and total reducing sugar in sugar-cane juice and molasses. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 214, p. 247-257, 1988.

31 PINTO, A. S. **Adubação com manganês em soja**: efeitos no solo e na planta. Jaboticabal: UNESP, 2012.

32 ROSOLEM, C. A.; BESSA, M. A.; DO AMARAL, P. G.; PEREIRA, H. F. M. Manganês no solo, sua avaliação e toxidez de manganês em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 277-285, 1992.

33 SÃO JOÃO, A. C. G. **Eficiência agrônômica de fontes de manganês, disponibilidade para a soja e distribuição nas frações do solo**. 2006. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2006.

34 FERTILIDADE do solo: micronutrientes. Uberlândia: UNIPAC, jun. 2005. Disponível em: <<http://www.institutounipac.com.br/aulas/2010/2/UBAGR05N1/001367/000/Micronutrientes.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

35 SOUSA, R. A.; SEMAAN, F. S.; BAIO, J. A. F.; CAVALHEIRO, E. T. G. Fast determination of minoxidil by photometric flow titration. **Eclética Química**, São Paulo, v. 30, p. 79-84, 2005.

36 WATERBURY, G.R; HAYES, A.M.; MARTIN, D.S. Kinetics of the periodate oxidation of manganese to permanganate. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 74, p. 15-20, 1952.

37 MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 1980. 251 p.

38 REIS, B. F.; JACINTHO, A. O.; MORTATTI, J.; KRUG, F. J.; ZAGATTO, E. A. G.; BERGAMIN FILHO, H.; PESSEDA, L. C. R. Zone-sampling processes in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 123, p. 221-228, 1981.

39 PRADOS-ROSALES, R. C.; LUQUE-GARCIA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Propelling devices: the heart of flow injection approaches. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 461, p. 169-180, 2002.

40 REIS, B. F.; BERGAMIN FILHO, H. Evolução dos Injetores Empregados em Sistemas de Análise Química por Injeção em Fluxo. **Química Nova**, São Paulo, v. 16, p. 570-573, 1993.

41 RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. **Flow injection analysis**. 2. ed. New York: John Wiley, 1988.

42 KARLBERG, B.; PACEY, G. E. **Flow injection analysis: a practical guide** (techniques and instrumentation in analytical chemistry). Amsterdam: Elsevier, 1989.

43 LOURENCAO, B. C.; MEDEIROS, R. A.; FATIBELLO, O. Simultaneous determination of antihypertensive drugs by flow injection analysis using multiple pulse amperometric detection with a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 754, p. 154–159, 2015.

44 ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S.; SANTOS, J. L. M. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 468, p. 119-131, 2002.

45 NASCIMENTO, C. F.; BRASIL, M. A. S.; COSTA, S. P. F.; PINTO, P. C. A. G.; SARAIVA, M. L. M. F. S.; ROCHA, F. R. P. Exploitation of pulsed flows for on-line dispersive liquid–liquid microextraction: spectrophotometric determination of formaldehyde in milk. **Talanta**, Amsterdam, v. 144, p. 1189–1194, 2015.

46 SILVA, M. J.; ANJOS, E. V.; HONORATO, R. S.; PIMENTEL, M. F.; PAIM, A. P. S. Spectrophotometric cocaine determination in a biphasic medium employing flow-batch sequential injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 629, p. 98-103, 2008.

47 ALMEIDA, L. F.; VALE, M. G. R.; DESSUY, M. B.; SILVA, M. M.; LIMA, R. S.; SANTOS, V. B.; DINIZ, H. G. D.; ARAUJO, M. C. U. A flow-batch analyzer with piston propulsion applied to automatic preparation of calibration solutions for Mn determination in mineral waters by ET AAS. **Talanta**, Amsterdam, v. 73, p. 906–912, 2007.

48 ZAGATTO, E. A. G.; CARNEIRO, J. M. T.; VICENTE, S.; FORTES, R.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C. Mixing chambers in flow analysis: a review. **Journal of Analytical Chemistry**, Dordrecht, v. 64, p. 524-532, 2009.

49 FREITAS, S. K. B.; SILVA, V. L.; ARAUJO, A. N.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; REIS, B. F.; PAIN, A. P. S. Multicommuted flow analysis method for the photometric determination of amoxicillin in pharmaceutical formulations using a diazo coupling reaction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 22, p. 279-285, 2011.

50 SILVA, B.; CRISPINO, C. C.; REIS, B. F. Automatic photometric titration procedure based on multicommutation and flow-batch approaches employing a photometer based on twin LEDs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 21, p. 1854-1860, 2010.

51 DINIZ, P. H. G. D.; ALMEIDA, L. F.; HARDING, P. D.; ARAUJO, M. C. U. Flow-batch analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 35, p. 39-49, 2012.

52 GARCIA, A. J. C.; REIS, B. F. Instrumentation and automated photometric titration procedure for total acidity determination in red wine employing a multicommuted flow system. **Journal of Automated Methods & Management in Chemistry**, New York, n. 83247, p. 1-8, 2006.

53 RUZICKA, J., HANSEN, E. H. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 78, p. 145-157, 1975.

54 MACKA, M.; PIASECKI, T.; DASGUPTA, P. K. Light-emitting diodes for analytical chemistry. **Annual Review of Analytical Chemistry**, Palo Alto, v. 7, p. 183-207, 2014.

55 HAUSER, P. C.; RUPASINGHE, T. W. T. Simultaneous determination of metal ion concentrations in binary mixtures with a multi-LED photometer. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 357, p. 1056-1060, 1997.

56 DASGUPTA, P. K.; BELLAMY, H. S.; LIU, H.; LOPEZ, J. L.; LOREE, E. L.; MORRIS, K.; PETERSEN, K.; MIR, K.A. Light emitting diode based flow-trought optical absorption detectors, **Talanta**, Amsterdam, v. 40, p. 53-74, 1993.

57 JAMBUNATHAN, S.; DASGUPTA, P. K.; WOLCOTT, D. K.; MARSHALL, G. D.; OLSON, D. C. Optical fiber coupled light emitting diode based absorbance detector with a reflective flow cell. **Talanta**, Amsterdam, v. 50, p. 481-490, 1999.

58 REFAAT, T. F.; JOHNSON, D. G. Absolute linearity measurement of photodetectors using sinusoidal modulated radiation. **Applied Optics**, Washington, DC, v. 51, p. 4420-4429, 2012.

59 TROJANOWICZ, M.; WORSFOLD, P. J.; CLINCH, J. R. Solid-state photometric detectors for flow injection analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 7, p. 301-305, 1988.

60 PAMBOUKIAN, S. V. D.; PEDROTTI, J. J. Desenvolvimento de instrumentação analítica e software para controle, aquisição e tratamento de dados analíticos. **Revista Mackenzie de Engenharia e Computação**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 32-43, 2012.

61 TEIXEIRA, I.; ARANTES, J. C. S.; MACEDO, J. Frequencímetro digital com a utilização de microcontrolador PIC. **Anuário de Produção Acadêmica Docente**, São Paulo, v. 1, p. 168-173, 2007.

62 PACHECO, G.; ROQUITSKI, G.; FRANKIV, I. A. **Sistema microcontrolado de aquisição de dados para análise de motoventiladores aplicados a refrigeradores**. Curitiba: Universidade Tecnológica do Paraná, 2011.

63 VILELA, L. A. A.; GERVÁSIO, E. S.; SOCCOL, O. J.; BOTREL, T. A. Sistema para aquisição de dados de pressão e vazão usando o microcomputador. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v. 1, p. 25-30, 2001.

64 ROSÁRIO, J. M. **Princípios de mecatrônica**. São Paulo: Pearson Brasil, 2005.

65 KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Piracicaba: O autor, 2010.

66 ROMEIRO, S. B. B. **Química na siderurgia**. Porto Alegre: UFRGS, 1997. Disponível em: http://www.quimica.seed.pr.gov.br/arquivos/File/AIQ_2011/siderurgia_ufrgs.pdf >. Acesso em: 25 fev. 2016.

67 MORA, N. D.; LUCAS, J. F. R.; MARAM, M. A. **Apostila Laboratório de Materiais**. Foz do Iguaçu: UNIOESTE, 2010. Disponível em: <http://www.foz.unioeste.br/~lamat/downmateriais/materiaiscap13.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

68 DIAS, T. R.; BRASIL, M. A. S.; FERES, M. A.; et al. A flow cell with a new design to improve the utilization of the radiation emitted by LED and employed as a radiation source for photometric detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Amsterdam, v. 198, p. 448-454, 2014.

69 QUISUMBING, F. A.; THOMAS, A. W. Conditions affecting the quantitative determination of reducing sugars by Fehling solution elimination of certain errors involved current in methods. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 43, p. 1503-1526, 1921.

70 TUMANG, C. A.; TOMAZZINI, M. C.; REIS, B. F. Automatic procedure exploiting multicommutation in flow analysis for simultaneous spectrophotometric determination of nonstructural carbohydrates and reducing sugar in forage materials. **Analytical Sciences**, v.9, p. 1683-1686, 2003.

71 CANIZARES-MACIAS, P.; HERNANDEZ-GARCIADIEGO, L.; GOMEZ-RUIZ, H. An automated flow injection analysis procedure for the determination of reducing sugars by DNSA method. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 66, p. 407-411, 2001.

72 HARTMANN, P.; HASWELL, S. J.; GRASSERBAUER, M. Monitoring of Reducing Sugars by Flow-Injection Analysis using P-hydroxybenzoic acid hydrazide. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 285, p. 1-8, 1994.

73 PERISTORTAJADA, M.; PUCHADES, R.; MAQUIERIA, A. Determination of reducing sugars by Necuproine method using flow-injection analysis. **Food Chemistry**, Barking, v.43, p. 65-69, 1992.

74 MAQUIEIRA, A.; DECASTRO, M. D. L.; VALCARCEL, M. Determination of reducing sugars in wine by flow-injection analysis. **Analyst**, Cambridge, v. 112, p. 1569-1572, 1987.

75 LOPES, T. I. M. S.; RANGEL, A. O. S. S.; LIMA, J. L. F. C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Construction and use of a tubular picrate ion-selective electrode for reducing sugar determination in port-wine by flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 308, p. 122-128, 1995.

76 KARGOSHA, K.; NOROOZIFAR, M. Flow injection speciation analysis of manganese in real samples by diphenylcarbazide-spectrophotometric determination. **Turkish Journal of Chemistry**, Ankara, v. 27, p. 227-233, 2003.

77 WATANABE, K.; WATANABE, T.; ITAGAKI, M. Flow injection analysis of manganese (II) in drinking water using its catalytic effect on the oxidation reaction of azo compound. **Bunseki Kagaku**, Tokyo, v. 51, p. 553-559, 2002.

78 KARGOSHA, K.; NOROOZIFAR, M. Solid-phase sodium bismuthate as an oxidant in flow injection analysis: determination of manganese in effluent streams. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 413, p. 57-61, 2000.

79 CHAPIN, T. P.; JOHNSON, K. S.; COALE, K. H. Rapid-determination of manganese in sea-water by flow-injection analysis with chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 249, p. 469-478, 1991.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Imagens dos componentes e sistema desenvolvidos para o trabalho.



Figura 28A - Câmara de aquecimento direto com fotômetro acoplado.



Figura 28B e Figura 28C - Detector do fotômetro com conexão para fibra óptica; bomba de aquário com válvulas modificadas para vácuo.

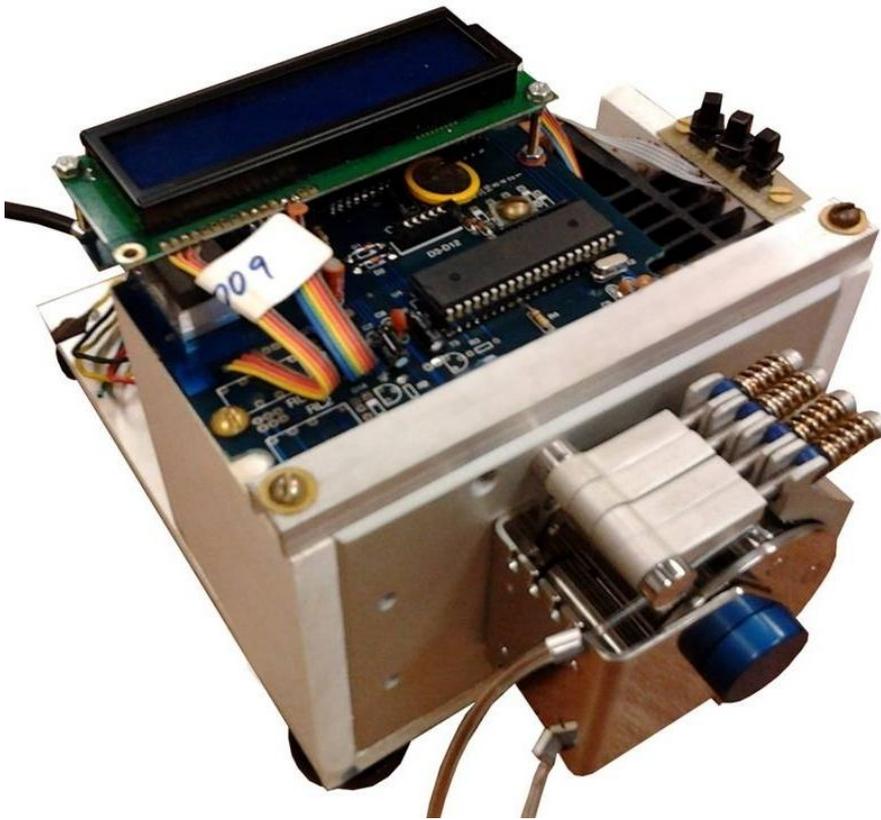


Figura 29 – Bomba peristáltica multicanal microprocessada.

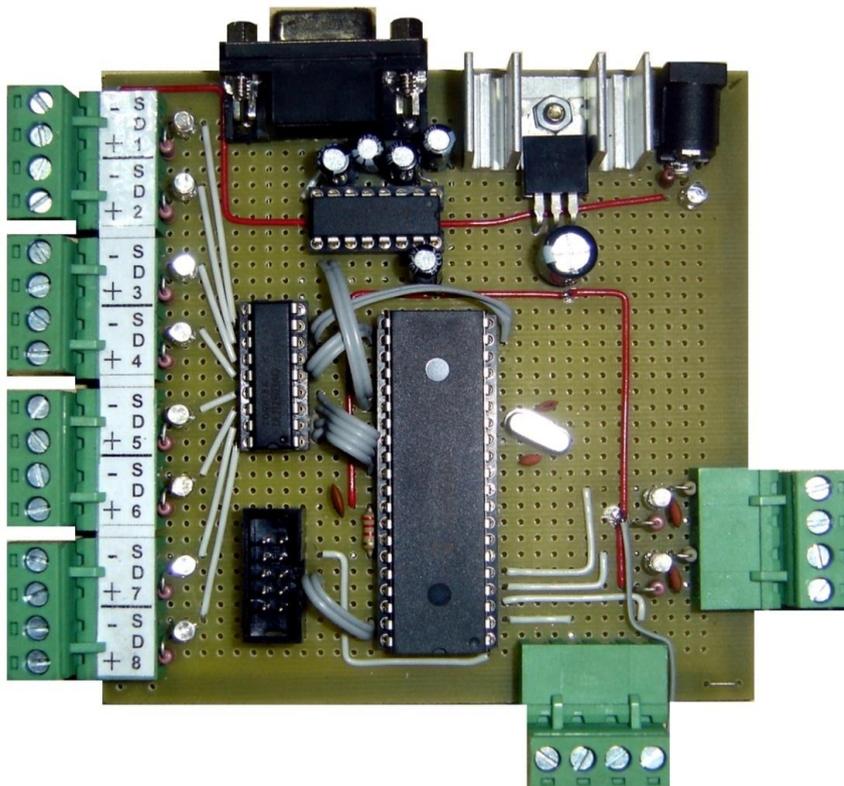


Figura 30 – Placa de interface microprocessada.



Figura 31 – Sistema para análise de açúcares redutores em vinho.

APÊNDICE B – Listagem do aplicativo desenvolvido em mikroBasic® para o controle da placa de interface microprocessada.

```
program FIA_Ctrol_MB2
```

```
' * Nome do Projeto: FIA Ctrol MB2
'   MCU:           P18F4550 ou '4553
'   Dev.Board:    PIC_FIA
'   Oscillator:   HS, 8.0 MHz
'   SW:           mikroBasic PRO for PIC
' * NOTES: brasilmas@terra.com.br
```

```
'Variáveis Globais
```

```
dim recebido as string[16]
```

```
dim texto0 as string[6]
```

```
dim texto1 as string[6]
```

```
' Declarations section - Protótipo de função
```

```
sub procedure comando() 'Liga e desliga saídas digitais
```

```
  if (recebido[1]="W") then
```

```
    select case recebido[2]
```

```
      case "A"
```

```
        if (recebido[3] = "0") then portd.rd0 = 0 else portd.rd0 = 1 end if
```

```
      case "B"
```

```
        if (recebido[3] = "0") then portd.rd1 = 0 else portd.rd1 = 1 end if
```

```
      case "C"
```

```
        if (recebido[3] = "0") then portd.rd2 = 0 else portd.rd2 = 1 end if
```

```
      case "D"
```

```
        if (recebido[3] = "0") then portd.rd3 = 0 else portd.rd3 = 1 end if
```

```
      case "E"
```

```
        if (recebido[3] = "0") then portd.rd4 = 0 else portd.rd4 = 1 end if
```

```
      case "F"
```

```
        if (recebido[3] = "0") then portd.rd5 = 0 else portd.rd5 = 1 end if
```

```
      case "G"
```

```
        if (recebido[3] = "0") then portd.rd6 = 0 else portd.rd6 = 1 end if
```

```
      case "H"
```

```
        if (recebido[3] = "0") then portd.rd7 = 0 else portd.rd7 = 1 end if
```

```
      case "I"
```

```
        if (recebido[3] = "0") then portd = 0 else portd = 255 end if
```

```
    end select
```

```
  end if
```

```
  if (recebido[1]="R") then 'Leitura canais analógicos
```

```
    select case recebido[2]
```

```
      case "J"
```

```
        'Converte canal 0
```

```
        wordtostr(adc_read(0), texto0)
```

```
        uart1_write("{}")
```

```
        uart1_write("J")
```

```

        uart1_write_text(texto0)
        uart1_write("{}")
    case "K"
        'Converte canal 1
        wordtostr(adc_read(1), texto1)
        uart1_write("{}")
        uart1_write("K")
        uart1_write_text(texto1)
        uart1_write("{}")
    end select
end if

pir1.rcif = 0      'Limpa flag da interrupção de recebimento serial
recebido = ""

end sub

main:
'Main program
'Configurações de IO
trisa = 0          'PortB como saída
trisd = 0          'PortD como saída
trise = 0          'PortE como saída
trisa.ra0 = 1      'Entrada analógica 0
trisa.ra1 = 1      'Entrada analógica 1
trisa.ra3 = 1      'Entrada analógica 3 = Ref Ext
portd = 0          'Inicializa PortB em 0;

'Entradas analógicas
cmcon = cmcon or 7 'Config entradas analogicas (ou lógico)
adcon1 = %00011101 'Configura AN0 e AN1 e demais como IO e Ref Ext /
                    Int 0V

'Inicialização Serial
UART1_Init(9600)   'Inicializa UART com 9600 bps
Delay_ms(100)

while TRUE
if (UART1_Data_Ready() = 1) then ' if data is received
    UART1_Read_Text(recebido, "}", 10) ' reads text until 'OK' is found
    comando()
end if
wend

end.

```

Obs.: A listagem do **aplicativo de controle do sistema**, escrito em Visual Basic® 6, bem como o **programa de controle da bomba peristáltica**, escrito em *Assembly* '51, são muito extensos para serem incorporados a este trabalho, podendo ser solicitados ao autor.